

博士論文

ホエイペプチドの生理機能に関する研究

神田 淳

# 目次

第一章 序論	1
第二章 長期的なホエイペプチドの摂取が骨格筋中グリコーゲン量 及びグリコーゲン合成酵素に与える影響の検討	10
第一節 目的	10
第二節 材料と方法	12
第三節 結果	17
1. 体重と臓器重量	
2. 骨格筋中グリコーゲン量	
3. 骨格筋中グリコーゲン合成関連遺伝子 mRNA 量	
4. 骨格筋中グリコーゲン合成酵素、GLUT4 の Western Blotting 解析	
5. 運動パフォーマンス	
6. 筋中グリコーゲン量と運動パフォーマンスの相関関係	
第四節 考察	19
第三章 運動後のホエイペプチドの摂取が 骨格筋タンパク質合成に与える影響の検討	37
第一節 目的	37
第二節 材料と方法	39
第三節 結果	44
1. 骨格筋タンパク質合成速度	
2. 血中インスリン、アミノ酸、グルコース濃度	
3. リン酸化 mTOR、4E-BP1、S6K1 量	

第四節 考察	46
第四章 運動後のホエイペプチドの摂取が	58
骨格筋遺伝子発現に与える影響の網羅的解析	
第一節 目的	58
第二節 材料と方法	60
第三節 結果	63
1. DNA マイクロアレイ解析	
2. Gene Ontology 解析	
3. 遺伝子ネットワーク解析	
4. 発現変動遺伝子上流因子解析	
5. Western blotting 解析	
第四節 考察	68
第五章 総合討論	85
参考文献	94
要旨	110
謝辞	114

## 略語集

4E-BP1: eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1、真核生物翻訳開始因子 4E  
結合タンパク質 1

AAM: amino acids mixture、アミノ酸混合物

BCAA: branched-chain amino acid、分岐鎖アミノ酸

DFW 法: distribution free weighted 法

ERK1/2: extracellular signal-regulated kinase 1/2、細胞外シグナル調節キナーゼ 1/2

FSR: fractional rate of protein synthesis、骨格筋タンパク質合成速度

GLUT4: glucose transporter 4、グルコース輸送体 4

GO: gene ontology

GS: glycogen synthase、グリコーゲン合成酵素

GSK-3: glycogen synthase kinase 3、グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3

HIF: hypoxia inducible factor、低酸素誘導因子

IPA: Ingenuity Pathways Analysis

mTOR: mammalian target of rapamycin、哺乳類ラパマイシン標的タンパク質

S6K1: 70 kDa ribosomal protein S6 kinase 1、p70S6 キナーゼ

WPH: whey protein hydrolysates、ホエイペプチド

## 第一章 序論

現在、日本は 65 歳以上の高齢者の人口に占める割合が 21%を超えた超高齢社会へと突入し、さらに高齢者人口が増加している。2030 年には実に人口の 3 分の 1 が高齢者となると推定されている。超高齢社会を迎え、日常生活に介護を必要としない、自立した生活ができる生存期間として健康寿命という概念が考えられている。2000 年に WHO がこの概念を提唱して以来、寿命を伸ばすだけでなく、いかに健康に生活できる期間を伸ばすかに関心が高まっている。健康であり続けるためには福祉などの充実が重要ではあるが、健康な状態を自分自身で作り上げる必要があり、日々の食事や運動に留意することが重要である。

骨格筋はヒトの運動をつかさどる組織である。ヒトは筋肉を収縮させたり、弛緩させたりすることで、身体運動を行う。運動選手にとって筋肉が重要なことはいうまでも無く、競技において優れた運動能力を発揮し、好成績を残すためには、それぞれのスポーツに適した筋肉と筋力を身につける必要がある。一方で、骨格筋は健康寿命を保つという観点から、全てのヒトにとって重要な組織でもある。高い生活の質を維持し健康寿命を伸ばしていくためには、寝たきりにならずに活動し、体を満足に動かせることが重要である。しかしながら、老化は身体的に自立していく能力を徐々に奪い、生活の質を低下させる。高齢者におけるこれらの問題を引き起こす根本的要因はサルコペニア、すなわち筋量及び筋機能の低下である(1-3)。一般的に 30 歳を超えると 10 年おきに約 3~5% の筋量が減少するが、この減少率は 60 歳を超えるとさらに加速することが報告されている(4, 5)。また、骨格筋は身体運動を行うために必要であるだけでなく、血液中の糖や脂肪を取り込んで消費する最大の組織でもあることから、適切な骨格筋量の維持が健康寿命の維持に重要であるといえる。

骨格筋中にはグリコーゲンと呼ばれる顆粒状の物質として糖質が蓄えられている。脂質は糖質に比べてエネルギー密度が高く、体重を増やさずに大量のエネルギーを蓄えるのに適しているが、脂質を代謝するためには糖質よりも多くの手間が必要であり、素早い ATP 再合成が必要な激しい運動のエネルギー源には適していない。そこで、激しい運動時には素早く ATP を再合成するために、骨格筋は貯蔵しているグリコーゲンをエネルギー源として利用する。グリコーゲンが分解されて生じたグルコース-6-リン酸は解糖系を経てミトコンドリア内で代謝され、その過程で生じるエネルギーによって筋収縮に必要な ATP が再合成される(6)。運動中、骨格筋は筋グリコーゲンを分解するとともに、グルコース輸送体 4 (glucose transporter 4; GLUT4) と呼ばれる糖輸送担体を筋細胞膜表面に移行させて血中グルコースを取り込み、利用している。この筋の血糖取り込みは、運動終了後 2 時間程度持続するので、この間に骨格筋は運動中に消耗した筋グリコーゲンを急速に回復させる。しかし、2 時間程度では筋グリコーゲンを運動前のレベルにまで回復させることはできない。そこで、2 時間経過以降も骨格筋は筋グリコーゲンを引き続き回復させるために、一定濃度のインスリン刺激に対して、より多くの GLUT4 を細胞膜へと移行させて血糖取り込みを促進する(7)。この骨格筋での糖取り込みが促進されている間に十分な糖質を補給すれば、血糖値ならびに血中インスリンレベルの上昇との相乗効果により、骨格筋グリコーゲン量を運動前のレベルにまで高めることが可能となる(6)。

骨格筋グリコーゲンの枯渇はスプリント運動、持久的運動のどちらの運動においても疲労困憊につながるということが知られている(8, 9)。つまり、運動選手にとって筋中グリコーゲン量を高めることは重要である。前述の通り、糖質は異化されて組織中のグリコーゲンの原料となるため、骨格筋グリコーゲン量を高めるためには糖質の摂取が重要である。近年、運動後に糖質だけでなく、糖質と組み合わせてタンパク質を摂取することでより効果的に筋グリコーゲン量が回

復することが報告されている(10, 11)。しかしながら、タンパク質と糖質を組み合わせる摂取する効果を報告している研究が、糖質のみを摂取している場合と摂取エネルギー量が異なっていることから、タンパク質の効果に疑問を呈する報告もある(12, 13)。これらの報告では、糖質とタンパク質の同時摂取と、エネルギー量を等しくした糖質の摂取とでは筋グリコーゲンの合成量は差がなかったとされている。しかし、さらに近年の研究では、糖質とタンパク質の同時摂取は、エネルギー量を等しくした糖質との比較においても筋グリコーゲン量を高めることが報告されている(14, 15)。タンパク質の骨格筋グリコーゲン促進効果には分岐鎖アミノ酸 (branched-chain amino acids; BCAA)、特にロイシンが関与していることが報告されている(16)。ロイシンは GLUT4 の膜移行に関与するタンパク質である PI3 キナーゼの活性化を介して骨格筋への糖取り込みを活性化すると考えられている(17-19)。

骨格筋量は筋タンパク質を合成する期間と分解する期間との微細なバランスによって保たれており、日常生活において絶えず古い筋タンパク質を分解し新しく作り直すリモデリングが骨格筋内で繰り返されている(20)。つまり、骨格筋量の維持、増加のためには骨格筋合成を増加させ、骨格筋分解を減少させることが重要である。重いダンベルを持ち上げるようなウェイトトレーニングや、スポーツジムでのマシントレーニングなどは、筋肉に抵抗や負荷をかけて行う運動であり、レジスタンス運動と呼ばれる。高強度のレジスタンス運動が長期的に骨格筋肥大を促すことは明らかであり、レジスタンス運動が運動選手の骨格筋肥大に効果的であるだけでなく、高齢者においてもレジスタンス運動がサルコペニア予防に効果的であることはこれまで多くの研究によって支持されている(21-23)。レジスタンス運動による骨格筋肥大の主な要因は運動刺激によるタンパク質合成速度の増加によるものである。一過性のレジスタンス運動は骨

骨格筋タンパク質合成を刺激し、骨格筋タンパク質同化作用を促進することが報告されている(21)。レジスタンス運動を行うと、運動中は一時的にタンパク質合成速度が安静時と比較して低下するが、運動 1 時間後から 2 時間後にかけて急激に骨格筋タンパク質合成速度が増加することが報告されている(24)。また、Biolo ら(25)はレジスタンス運動前後での骨格筋タンパク質合成速度と分解速度の変化について検討を行い、レジスタンス運動によって骨格筋タンパク質合成速度は増加するものの、同時に骨格筋タンパク質分解も増加していることを明らかにした。つまり、レジスタンス運動によって、骨格筋タンパク質の合成も分解もともに増加するが、骨格筋タンパク質合成の増加が骨格筋タンパク質分解の増加を上回ることによって、骨格筋タンパク質量が増大し、筋肥大が引き起こされることが明らかになった。このようなレジスタンス運動による骨格筋タンパク質代謝の亢進は運動後 48 時間続くことが報告されている(26)。また、レジスタンス運動に比べ、筋肉に対する負荷が少ない持続的な運動を行った場合においても骨格筋タンパク質合成速度の亢進が報告されている(27)。これらの結果から、運動選手だけでなく、一般の人々にとっても筋肉のタンパク質代謝を良好な状態に保ち、筋肉を維持するためには、習慣的に運動を行うことが必要であると考えられる。

栄養摂取、特にタンパク質とアミノ酸摂取は骨格筋タンパク質の合成を促す重要な因子である。血中から筋細胞内へ取り込まれたアミノ酸は、いったん遊離アミノ酸のプールに取り込まれ、そこから骨格筋タンパク質合成に利用される (Fig. 1-1)。タンパク質、アミノ酸摂取による骨格筋タンパク質合成促進効果には用量依存性があり、血液中のアミノ酸濃度が低下した場合には、速やかに骨格筋タンパク質合成速度が低下し(28)、逆に血液中のアミノ酸濃度が上昇すると、速やかに骨格筋タンパク質合成速度が上昇することが知られている(29)。Biolo ら(30)は安静状態のヒトにアミノ酸を静脈から投与した場合、血液中のア



ミノ酸濃度は増加し、骨格筋タンパク質合成が増加するものの、骨格筋タンパク質分解には変化が無いことを報告した。さらに、運動後にアミノ酸の投与を行った場合、運動により高まった骨格筋タンパク質合成はさらに増加し、一方、運動により高まった骨格筋タンパク質分解は抑制されることも報告した。

タンパク質、アミノ酸による骨格筋タンパク質合成の効果は主に必須アミノ酸によってもたらされる(31)。必須アミノ酸の中でも BCAA が骨格筋タンパク質合成を直接刺激することになったが、その中でも特にロイシンが最も高い同化作用を示す(32)。ロイシンは骨格筋細胞内の哺乳類ラパマイシン標的タンパク質 (mammalian target of rapamycin; mTOR) シグナル伝達系を通じて mRNA の翻訳開始を活性化し、骨格筋タンパク質合成を急速に刺激していると考えられている (Fig. 1-2) (33, 34)。

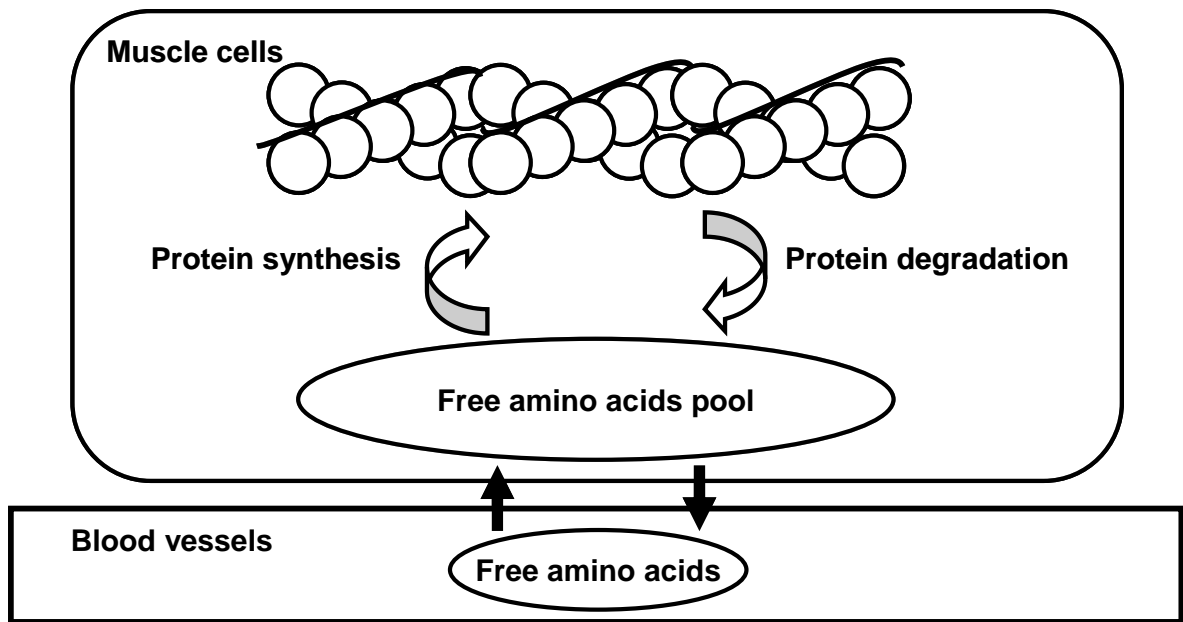
これまでに述べたような観点から、運動と組み合わせてタンパク質、アミノ酸を摂取することは重要であり、摂取するタンパク質として乳由来のタンパク質であるホエイタンパク質が広く用いられている。ホエイタンパク質は牛乳のタンパク質中に約 20%含まれており、主にβ-ラクトグロブリン (50%)、α-ラクトアルブミン (25%)、血清アルブミン (7%)、免疫グロブリン (5%) から構成されている。ホエイタンパク質は主にチーズ製造時の副産物として得られるが、アミノ酸組成で約 20%と豊富に BCAA を含むことから、近年サプリメントとして利用されている。ホエイタンパク質の生理機能に関しては多くの研究が報告されている。我々の先行研究において、Morifuji ら(35)はラットを用いて、ホエイタンパク質の摂取により、カゼインの摂取よりも骨格筋グリコーゲン量が高まることを報告している。また、Tang ら(36)はホエイタンパク質の摂取により大豆タンパク質やカゼインの摂取と比較して骨格筋タンパク質合成速度が高まることを報告している。さらに Norton ら(37)はホエイタンパク質または小麦タン

タンパク質摂取が骨格筋合成速度に与える影響を比較検討し、摂取するタンパク質中のロイシン量が骨格筋タンパク質合成を高めるために重要であると主張している。このように、ホエイタンパク質の生理機能には、豊富に含まれる BCAA、特にロイシンが重要な役割を果たしていると考えられる。

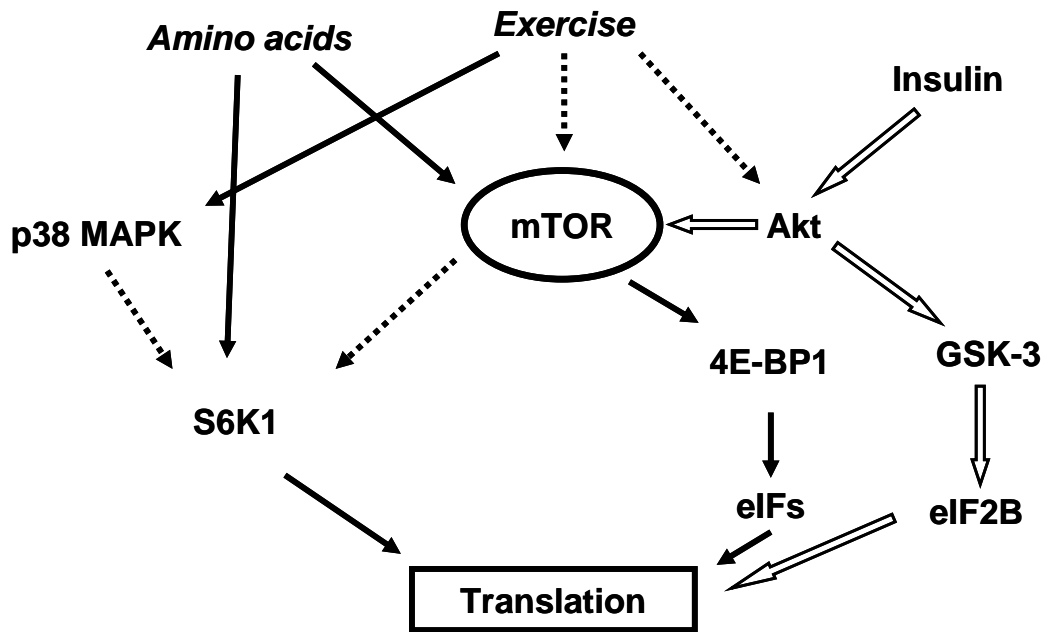
これまで述べたように、摂取するタンパク質の生理機能において、タンパク質のアミノ酸組成が重要であることは良く知られているが、近年、摂取するタンパク質のアミノ酸組成の違いだけでなく、その分子形態の違いに関する研究結果が報告されている。Poullain ら(38, 39)はラットを用いた研究においてペプチドは遊離のアミノ酸よりも効率的に生体で利用されることを示した。しかしながら、Manninen ら(40)はアミノ酸と比較してペプチド摂取が栄養的に有益であるという考えはまだ完全に明らかになったわけではないと主張している。我々は、ホエイタンパク質を微生物由来の酵素によりペプチド化することで新たな生理機能を得ることができるのではないかと考え、研究を進めてきた。先行研究において、Morifuji ら(41)はホエイペプチド中に含まれる BCAA を含むジペプチドにロイシンと同様の骨格筋への糖取り込み促進作用があることを見出した。さらに、Morifuji ら(42)は運動モデルラットを用いて、糖質とホエイペプチドの摂取はホエイタンパク質や BCAA の摂取よりもグリコーゲン回復量を高めることを明らかにした。我々のこれまでの研究報告は、摂取するタンパク質の BCAA 量だけが重要なのではなく、タンパク質の分子形態も重要であることを示唆するものであるが、まだホエイペプチドの生理機能については不明な点が多く、未分解のホエイタンパク質や BCAA と異なる作用を示すメカニズムも明らかではない。

本研究では、ホエイペプチドの新たな生理機能を探索するとともに、そのホエイペプチドが特異的な効果を示す作用メカニズムを明らかにすることを目的

とした。具体的には、第二章では運動後の短期間の回復のみでなく、運動と組み合わせた長期的なホエイペプチドの摂取が骨格筋グリコーゲン量に与える影響を、同組成のアミノ酸混合物摂取と比較検討するとともに、ホエイペプチドがグリコーゲン合成に与える作用メカニズムの解明を試みた。また、第三章では、運動後のホエイペプチドの摂取が骨格筋タンパク質合成速度と骨格筋タンパク質合成に関与する mTOR シグナルに与える影響を、同組成のアミノ酸混合物摂取と比較検討することとした。最後に第四章ではホエイペプチド摂取が筋肉中の遺伝子発現に与える影響を網羅的に解析することで、ホエイペプチド摂取の生理機能のメカニズム解明に寄与することが可能になると考えた。



**Fig. 1-1.** Muscle protein synthesis and degradation (43).



**Fig. 1-2.** Proposed scheme for the activation of signaling pathways in protein synthesis by amino acids/BCAAs and resistance exercise. Solid arrow, demonstrated effect; dashed arrow, possible effect; open arrow, effect of insulin(34).

## 第二章 長期的なホエイペプチドの摂取が骨格筋中グリコーゲン量及びグリコーゲン合成酵素に与える影響の検討

### 第一節 目的

骨格筋中のグリコーゲンは中～高強度の運動時に主にエネルギー源として使用され(44)、運動前の筋中のグリコーゲン量と運動持続可能時間の間には相関関係があることが知られている(45)。つまり、アスリートにとって筋中グリコーゲン量を高めることは重要である。

運動により減少した骨格筋グリコーゲン量を高めるためには、運動後に糖質と組み合わせてタンパク質を摂取することが効果的である(10, 11, 14)。我々は、これまでに摂取するタンパク質の種類や分子量に注目し、それらの違いが筋グリコーゲン量に与える影響について研究を行ってきた。すなわち、Morifuji ら(42)はホエイペプチドがホエイタンパク質や BCAA よりも優れたグリコーゲン合成促進効果を有することを示し、BCAA だけでなく、ホエイペプチド中に含まれる何らかのペプチドが筋グリコーゲン合成促進効果を有する可能性が示唆された。しかしながら、ホエイペプチドが BCAA やホエイタンパク質よりも優れたグリコーゲン合成促進効果を示す作用メカニズムは不明である。

骨格筋において、糖の取り込みとグリコーゲン合成酵素の活性がグリコーゲン合成を調節する主要な因子である(46, 47)。Morifuji ら(35)の先行研究により、ホエイタンパク質の摂取による筋グリコーゲン量の増加はグリコーゲン合成酵素活性の増加が寄与している可能性が示唆された。しかしながら、どのような分子形態（未分解のタンパク質、ペプチド、アミノ酸）でホエイ由来のタンパク質を摂取することがグリコーゲン合成酵素の活性化に最も効果的であるのかは明らかでない。そこで、我々はホエイ由来のタンパク質としてホエイペプチ

ドを摂取することにより、アミノ酸として摂取する場合よりもグリコーゲン合成酵素が活性化されると仮説を立てた。

本章ではホエイペプチド摂取によるグリコーゲン合成促進効果の作用メカニズムを明らかにすることを目的として試験をおこなった。すなわち、ホエイペプチドの摂取が骨格筋中のグリコーゲン合成に関与するタンパク質の mRNA 量、タンパク質量に与える影響をホエイタンパク質と同組成のアミノ酸混合物摂取と比較検討することとした。その中でも、我々はホエイペプチドがグリコーゲン合成酵素に与える影響について注目して試験を行うこととした。

## 第二節 材料と方法

### 実験動物

5 週齢の雄性 ddY マウス（日本 SLC）を室温  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、明期 8 時～20 時の環境下で飼育した。本研究は株式会社明治 食機能科学研究所 動物実験倫理委員会による承認を得て、「実験動物の飼養及び保管に関する基準、昭和 55 年総理府告示第 6 号」に従って実施した。

### 試験デザイン

予備飼育期間中、マウスに AIN-93G 食(48)を 3 週間与えた。3 週間後、すなわち 8 週齢時に全てのマウスは最初の運動パフォーマンステスト（後述）を実施し、各群の運動パフォーマンス時間と体重の平均がほぼ等しくなるようにコントロール群、ホエイタンパク質と同組成のアミノ酸混合物（AAM）群、ホエイペプチド（WPH）群の 3 つの群に分けた（各群  $n = 8$ ）。各群に対応する飼料（後述）を 5 週間、自由摂食させた。5 週間後、エーテル麻酔下で解剖を行い、腓腹筋を摘出し、使用時まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。また、肝臓、副睾丸脂肪、後腹壁脂肪を摘出し、重量を測定した。

### 水泳運動方法

水泳運動は Murase ら(49)の報告に準じて行った。水泳運動には京大松元式マウス運動量測定流水槽（石原モデル）を用いた(50)。予備飼育期間中、1 週間の馴化期間後、2 週目に予備トレーニングとしてマウスに週 3 回、30 分間、13 L/min の流水負荷で水泳運動を実施させた。予備トレーニング終了後、3 週目に一週間の間に 3 回の運動パフォーマンステストを実施した。マウスの運動パフォーマンスのバラつきを抑えるために、Mizunoya ら(51)の方法に従い、マウスを選抜



した。3回の運動パフォーマンスの標準偏差が5分未満かつ、全ての運動パフォーマンスの値が20～35分の中に収まった24匹のマウスを選抜した。予備飼育終了後、試験期間中はマウスに1週間に5回の水泳運動を14 L/minの流水負荷で実施させた。また、4週目まで週に一度運動パフォーマンステストを行った。全ての水泳運動は9時～12時の間に実施した。また、解剖の2日前に最後の水泳運動を実施した。

### 運動パフォーマンステスト方法

運動パフォーマンステストは石原ら(50)の方法に準じて以下の方法で行った。京大松元式マウス運動量測定流水槽（石原モデル）を用いて、マウスに後述の条件下で水泳運動を実施させ、疲労困憊に至るまでの時間を運動パフォーマンスとした。マウスが7秒間以上呼吸をするために水面に浮上できない状態に至ったら疲労困憊と判断した。流水負荷は13 L/minから開始し、18 L/minまで5分おきに流水負荷を1 L/minずつ増加させた。

### ホエイペプチドの調製

本試験では株式会社明治のホエイペプチドを用いた。ホエイタンパク質を微生物由来のプロテアーゼにより加水分解後、脱脂工程を経て製造されたホエイペプチドであり、その栄養成分組成を **Table 2-1** に示した。本試験で用いたホエイペプチドの平均ペプチド鎖長はアミノ酸窒素と全窒素の比率から算出した結果 3.64 であった。また、数平均分子量は 403 であった。また本試験で用いたホエイペプチド中には Morifuji ら(41)が糖取り込み活性を見出した7種類のジペプチド (Ile-Val、Leu-Val、Val-Leu、Ile-Ile、Leu-Ile、Ile-Leu、Leu-Leu) を合計 21.6 mg/g 含んでいた。

## 試験飼料

試験飼料の組成は AIN-93 食(48)に準じた。試験飼料の組成を **Table 2-2** に示した。全ての飼料は等量のタンパク質を含むように調製した (WPH 群、AAM 群は窒素含量で揃えた)。ホエイペプチド (株式会社明治) 中の窒素量はケルダール法(52)にて測定した。アミノ酸混合物は、ホエイペプチドのアミノ酸組成と同等になるように各種 L-アミノ酸粉末を混合して調製した (**Table 2-3**)。

## 体重と摂餌量

試験期間中、マウスの体重は毎週測定し、摂餌量はケージごとに記録した。

## 筋中グリコーゲン量の測定

マウスから摘出した腓腹筋を冷凍下、0.3 M 過塩素酸を用いホモジナイズした。Morifuji ら(42)の方法に従い、ホモジナイズしたサンプルはアミログルコシダーゼにより加水分解し、グルコースを定量することによりグリコーゲン含量を求めた。

## RNA の単離及び TaqMan 定量 RT-PCR

マウスから摘出した腓腹筋をサンプルとし、QIAGEN RNeasy Fibrous Tissue Kit を用い、個別に total RNA を抽出・精製した。RNA サンプルは 260 及び 280 nm の吸光度を測定するとともに、BioAnalyzer (Agilent) を用いてゲル電気泳動パターンを取得し、各 RNA サンプルの量および質を確認した。各 1 µg の total RNA を用い、RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) を用いて single-strand cDNA を調製した。定量 RT-PCR は TaqMan universal PCR Master Mix Kit 及び Assays on Demand<sup>TM</sup> Gene Expression Probes を用い、ABI PRISM 7000 sequence detection system (いずれも Applied Biosystems) にて行った。遺伝子の

増幅は 95°C・10 分間の過熱の後、95°C・15 秒間の変性ステップ、60°C・1 分間のアニーリング及び伸長ステップを 40 サイクル繰り返して行った。解析した各遺伝子の mRNA の相対量は、standard curve 法により算出した。各サンプル中における mRNA 量は、cDNA サンプル中の 18S rRNA の量で除することにより標準化した。

### Western Blotting

腓腹筋を氷冷した 1 mM フッ化フェニルメチルスルフォニル含有 RIPA buffer (Cell Signaling Technology) 中でホモジナイズした後、4000×g・30 分間・4°C の条件下で遠心分離を行い、上清を得た。サンプル中のタンパク質量は牛血清アルブミンを標準品として、BCA 法により定量し、各サンプル中のタンパク質濃度が等しくなるように RIPA buffer により希釈した。各サンプル、タンパク質量として 50 µg を SDS PAGE に供した。アクリルアミド濃度 5.0-10% のグラジェントゲル (Perfect NT Gel, DRC) を用いて、200 V 定電圧・1 時間電気泳動を行った。泳動終了後、iBlot Gel Transfer Devise (Invitrogen) を用いて、PVDF 膜に転写を行った。転写後、PVDF 膜を 0.5 % ECL Prime Blocking Agent (GE ヘルスケア)・0.1% Tween20 含有 TBS バッファー (BioRad) 中で室温・一時間振とうし、ブロッキングを行った。続いて、PVDF 膜を、各一次抗体を含む 0.1% Tween20 含有 TBS バッファー (BioRad) 中で 4°C・一晩振とうした。リン酸化グリコーゲン合成酵素の定量には rabbit anti-p-GS (Ser 641, Cell Signaling Technology) を 1000 倍希釈し、総グリコーゲン合成酵素の定量には rabbit anti- GS (Cell Signaling Technology) を 1000 倍希釈し、GLUT4 の定量には rabbit anti- GLUT4 (AbD Serotec) を 1000 倍希釈し、β-アクチンの定量には rabbit anti- β-actin (Cell Signaling Technology) を 1000 倍希釈してそれぞれ用いた。続いて、PVDF 膜を anti-rabbit IgG HRP-linked antibody (Cell Signaling Technology) を含んだ 0.1% Tween20 含有 TBS

バッファー (BioRad) 中で室温・一時間振とうした。抗体が結合した各種タンパク質は ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GEヘルスケア)、Chemi-doc Gel Quantification System (Bio-Rad) を用いて可視化・定量を行った。総グリコーゲン合成酵素、GLUT4 量は、 $\beta$ -アクチンの量で除することにより標準化した。リン酸化グリコーゲン合成酵素の量は総グリコーゲン合成酵素量との割合で示した。

### 統計処理

統計処理は SPSS ver. 14.0J (SPSS) を用いて解析した。全ての結果は平均値±標準誤差で示した。有意差検定は一元配置の分散分析後、Tukey の多重比較検定を行った。また、相関関係の検定には Pearson の相関係数の有意性検定を用いた。いずれも、有意水準は 5%未満とした。

### 第三節 結果

#### 体重と臓器重量

Table 2-4 に摂餌量、終体重、肝臓及び脂肪組織重量を示した。終体重及び臓器重量において群間に有意な差は認められなかった。

#### 骨格筋中グリコーゲン量

我々の先行研究と相反せず、腓腹筋中のグリコーゲン量はホエイペプチド群において、アミノ酸混合物群、コントロール群と比較して有意に高値を示した (Fig. 2-1)。また、アミノ酸混合物群もコントロール群と比較して有意に高いグリコーゲン量を示した。

#### 骨格筋中グリコーゲン合成関連遺伝子 mRNA 量

グリコーゲン合成に関与するタンパク質であるグリコーゲン合成酵素 I、GLUT4、ヘキソキナーゼ II の mRNA 量をそれぞれ定量した。その結果、ホエイペプチドの摂取により、アミノ酸混合物またはコントロール食の摂取と比較して有意にグリコーゲン合成酵素 I の mRNA 量が増加することが示された (Fig. 2-2)。アミノ酸混合物群とコントロール群の間には有意な差は認められなかった。一方、GLUT4 とヘキソキナーゼ II の mRNA 量は群間で有意な差は認められなかった (Fig. 2-3, 4)。

#### 骨格筋中グリコーゲン合成酵素、GLUT4 の Western Blotting 解析

mRNA 量において群間で有意な差が認められたため、グリコーゲン合成酵素のタンパク質量の定量を行った。まず総グリコーゲン合成酵素量を定量した結果、mRNA 量と同様、ホエイペプチド群においてコントロール群、アミノ酸混

合物群と比較して有意に高値を示した (**Fig. 2-5**)。また、グリコーゲン合成酵素の活性はリン酸化により調節されていることがよく知られている。すなわち、グリコーゲン合成酵素は脱リン酸化されることにより活性化状態となる(53)。そのため、リン酸化グリコーゲン合成酵素量を定量し、グリコーゲン合成酵素の活性状態を評価することとした。その結果、ホエイペプチド群においてリン酸化グリコーゲン合成酵素量はアミノ酸混合物群、コントロール群と比較して有意に低下することが示された (**Fig. 2-6**)。一方、mRNA 量に差が認められなかった GLUT4 についても同様にタンパク質量を定量したが、群間に有意な差は認められなかった (**Fig. 2-7**)。

### 運動パフォーマンス

運動パフォーマンスは各週、群間に有意な差は認められなかった (**Table 2-5**)。4 週目にホエイペプチド群はコントロール群よりも 49%、アミノ酸混合物群よりも 13%長い運動パフォーマンスを示したが、いずれも統計的に有意な差ではなかった。

### 筋中グリコーゲン量と運動パフォーマンスの相関関係

Pearson の相関係数の優位性検定を用いて解析を行った結果、マウスの筋中グリコーゲン量と運動パフォーマンスの間には有意な正の相関関係があることを見出した (**Fig. 2-8**)。

#### 第四節 考察

Morifuji ら(42)はラットを用いた先行研究において、グリコーゲンが枯渇するような激しい運動後に糖質とホエイペプチドを同時に摂取することにより、ホエイタンパク質、カゼインペプチドまたは BCAA を摂取した場合と比較して有意に筋グリコーゲン量が高まることを示している。本章において、我々はホエイペプチドまたはアミノ酸混合物の長期的な摂取が筋グリコーゲン量とグリコーゲン合成を制御するタンパク質に与える影響について比較検討した。本研究によって初めて、ホエイペプチド摂取によりグリコーゲン合成酵素の活性化を介して筋グリコーゲン量が高まることが示された。

既に述べたように、Morifuji ら(42)は先行研究で、グリコーゲン枯渇運動 2 時間後のグリコーゲン回復にはホエイペプチドが他のタンパク質源と比較して最も効果的であることを示している。本研究において、我々は長期的なホエイペプチドの摂取がアミノ酸混合物やカゼインの摂取と比較して有意に筋グリコーゲン量を高めることを見出した。これらの結果を併せて考えると、ホエイペプチドの摂取は運動後の初期のグリコーゲン回復に有効だけでなく、長期的に摂取することで筋グリコーゲン貯蔵量を高めることが示唆された。さらに、統計的に有意な差は認められなかったものの、ホエイペプチド群は他の群よりも実測値として高い運動パフォーマンスを示した。筋グリコーゲン量と運動パフォーマンスの間に正の相関関係があることは良く知られており(54)、本研究においてもその相関関係が認められた。すなわち、ホエイペプチドの摂取により筋グリコーゲン量が増加し、運動パフォーマンスも増加した可能性が考えられた。

これまでに、摂取するタンパク質の分子形態の違いに関する研究結果が報告

されている。Poullain ら(38, 39)はラットを用いた研究においてペプチドは遊離のアミノ酸よりも効率的に生体で利用されることを示した。しかしながら、Manninen ら(40)はアミノ酸と比較してペプチド摂取が栄養的に有益であるという考えはまだ完全に明らかになったわけではないと主張している。本研究において、マウスにホエイタンパク質由来の 2 種類のタンパク質源としてホエイペプチドまたはアミノ酸混合物を含む餌を与えた。これら 2 種類の餌の違いはタンパク質源の分子形態のみである。本研究においてホエイペプチド群がアミノ酸混合物群よりも高い筋グリコーゲン量を示したことにより、摂取するタンパク質の分子形態の違いが長期的なグリコーゲン貯蔵量に影響を与える可能性が示唆された。

骨格筋グリコーゲンの合成において、グルコースの取り込みとグリコーゲン合成酵素の活性が重要な調節因子であることが知られている(46, 47)。本研究において、我々はホエイペプチドの摂取により有意に筋中グリコーゲン合成酵素 I の mRNA 量が増加することを見出した。一方で糖取り込みに関わる GLUT4 及びヘキソキナーゼ II の mRNA 量は変化が認められなかった。さらに、我々はホエイペプチドの摂取によりグリコーゲン合成酵素のタンパク質量も増加することを見出した。これらの知見はホエイペプチドの摂取によりグリコーゲン合成酵素 I の mRNA 量が増加し、その結果グリコーゲン合成酵素がタンパク質レベルでも増加したことを示唆するものである。

グリコーゲン合成酵素の活性はリン酸化によりアロステリックに調節されている。すなわち、脱リン酸化によりグリコーゲン合成酵素は活性化される(55, 56)。これまでに、運動直後にグリコーゲン合成酵素が活性化することが示されている(57)。運動後の回復期間に減少した筋グリコーゲン量が増加すると、グリコーゲン合成酵素の活性は急速に減衰する。先行研究において、運動後の回復期間



を経て、グリコーゲン超回復が生じたとき、グリコーゲン合成酵素の活性は運動直後の活性化状態よりもはるかに低い値であることが示されている(58, 59)。本研究において、ホエイペプチド群は筋グリコーゲン量が群間で最も高値を示したにもかかわらず、グリコーゲン合成酵素のリン酸化量は最も低値を示した。これらの結果は、ホエイペプチドの摂取により、筋グリコーゲンが高い状態であったとしても、グリコーゲン合成酵素の活性が保たれることを示唆するものである。その結果、ホエイペプチド群は筋グリコーゲンをさらに高めることが可能となったと考えられる。一方で、アミノ酸混合物の摂取はグリコーゲン合成酵素の活性に影響を与えなかった。すなわち、アミノ酸ではなくペプチドとして摂取することで、本試験で用いた 5% 混餌の摂取でもグリコーゲン合成酵素の活性化作用を示すことが示唆された。

BCAA、特にロイシンはグリコーゲン合成酵素の活性化に重要な役割を果たすことが知られている。Armstrong ら(60)はヒト培養細胞において、アミノ酸が p70S6 キナーゼ (70 kDa ribosomal protein S6 kinase 1; S6K1) を活性化するとともにグリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 (glycogen synthase kinase 3; GSK-3) を不活性化し、グリコーゲン合成を高めることを報告した。Peyrollier ら(17)は L6 細胞を用いて、ロイシンが GSK-3 の不活性化を介してグリコーゲン合成を高めることを報告している。本試験に用いたホエイペプチド食とアミノ酸混合物食のアミノ酸組成は同一である。しかしながら、2 群間で筋グリコーゲン貯蔵量は異なる結果となった。この結果は、骨格筋グリコーゲン貯蔵量を高めるためには摂取するタンパク質中の BCAA 量だけでなく、BCAA の分子形態も重要であることを強く示唆するものである。Morifuji ら(41)はホエイペプチド中に含まれる BCAA から構成されるジペプチドが骨格筋細胞への糖取り込みを促進することを見出した。さらに Morifuji ら(61)は、ホエイペプチドの摂取後に血中でこれら

のジペプチド濃度が高まることを報告している。本試験に用いたホエイペプチドはこれらの生理活性を有する7種類のBCAA含有ジペプチド(Ile-Val、Leu-Val、Val-Leu、Ile-Ile、Leu-Ile、Ile-Leu、Leu-Leu)を21.6 mg/g含んでいる。これらのBCAA含有ジペプチドが、ホエイペプチドにより引き起こされるグリコーゲン合成酵素の活性化を介した筋グリコーゲンの増加に寄与している可能性が考えられる。

BCAAは骨格筋においてGLUT4の膜移行を誘導することで糖取り込みを増加させる(18)。また、Doiら(16)は*in vivo*での試験で、ロイシン摂取により筋グリコーゲンへのグルコースの取り込みが増加することを報告している。さらに、我々は先行研究において、グルコースとホエイペプチドの同時摂取により、GLUT4の膜移行を調節する重要な酵素を活性化することを見出している(42)。これらの結果を併せて考えると、摂取するタンパク質の分子形態の違いがGLUT4の膜移行にも影響を与える可能性が考えられる。そのため、ホエイペプチドがGLUT4の膜移行に与える影響についてさらなる研究が必要である。

本研究で明らかになった知見では、ホエイペプチドが糖代謝に与える影響について全てが明らかになったわけではない。細胞内に取り込まれたグルコースはグリコーゲン合成に用いられるだけでなく、解糖系にも利用される。そして、ホエイペプチド摂取はグリコーゲン合成だけでなく、解糖系にも影響を与える可能性が考えられる。先行研究においてMorifujiら(35)はホエイタンパク質の摂取により、解糖系を調節する重要な酵素である6-ホスホフルクトキナーゼの活性が低下することで筋グリコーゲン量が増加することを報告している。それゆえ、ホエイペプチドが解糖系に与える影響についても、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

本研究では長期的なホエイペプチドの摂取がグリコーゲン合成酵素の活性化を介して、アミノ酸混合物の摂取よりも筋グリコーゲン量を高めることを初めて明らかにした。また、筋グリコーゲン量が高い状態にあっても、グリコーゲン合成酵素の活性化状態が保たれることを示した。これらの結果は筋グリコーゲン量を高めることを目標としているアスリートに対する栄養処方において新たな知見であり、運動後の回復期間にどのようなサプリメントを摂るべきかという疑問に対する一つの回答となるものである。しかしながら、ホエイペプチドの筋グリコーゲン量増加効果の活性本体は明らかになっていない。今後、ホエイペプチド中に含まれる生理活性ペプチド等の活性本体を明らかにするとともに、グリコーゲン合成酵素活性化作用の分子メカニズムを明らかにしていく必要があると考えられる。例えば、我々がホエイペプチドの活性本体の候補物質であると考えている BCAA 含有ジペプチド類の精製品を用いた動物での評価、及びグリコーゲン合成酵素の活性に関与する各種シグナル因子の阻害剤を用いた評価等が今後行うべき実験として挙げられる。

**Table 2-1.** Macronutrient composition of the WPH

WPH	(g/100 g)
Carbohydrate	12.0
Fat	0.3
Protein	79.1
Moisture	2.2
Ash	6.4

WPH, whey protein hydrolysates

**Table 2-2.** Composition of the test diets

Ingredient	Control	AAM (g/kg)	WPH
casein	245.900	200.000	200.000
L-cystine	3.000	3.000	3.000
cornstarch	351.586	357.936	347.486
dextrinized cornstarch	132.000	132.000	132.000
sucrose	100.000	100.000	100.000
soy oil	70.000	70.000	70.000
cellulose	50.000	50.000	50.000
mineral mixture	35.000	35.000	35.000
vitamin mixture	10.000	10.000	10.000
coline bitartate	2.500	2.500	2.500
tert-butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014
whey amino acids mixture		39.550	
whey protein hydrolysates			50.000

AAM, amino acids mixture; WPH, whey protein hydrolysates.

**Table 2-3.** Composition of the amino acids mixture

Amino acid	(g/100 g)
Ala	4.90
Arg	2.79
Asn + Asp	10.91
Cys	2.42
Gln + Glp	17.65
Gly	1.89
His	2.20
Ile	4.82
Leu	11.07
Lys	9.77
Met	2.18
Phe	3.39
Pro	5.45
Ser	5.02
Thr	5.30
Trp	1.77
Tyr	3.46
Val	5.01

**Table 2-4.** Food intake, body weight, liver weight, and fat weight of mice fed casein, AAM, or WPH diets for 5 weeks <sup>1</sup>.

	Control	AAM	WPH
Food intake (g/mouse/day)	4.20	4.35	4.22
Final body weight (g)	41.6 ± 1.0	41.6 ± 0.4	41.7 ± 1.2
Liver weight (g/100 g body weight)	4.29 ± 0.13	4.46 ± 0.15	4.44 ± 0.06
Epididymal fat weight (g/100 g body weight)	1.80 ± 0.22	2.03 ± 0.28	1.80 ± 0.28
Retroperitoneal fat weight, (g/100 g body weight)	0.68 ± 0.09	0.54 ± 0.11	0.53 ± 0.11

<sup>1</sup>Values are means ± SEM, *n* = 8.

AAM, amino acids mixture; WPH, whey protein hydrolysates.

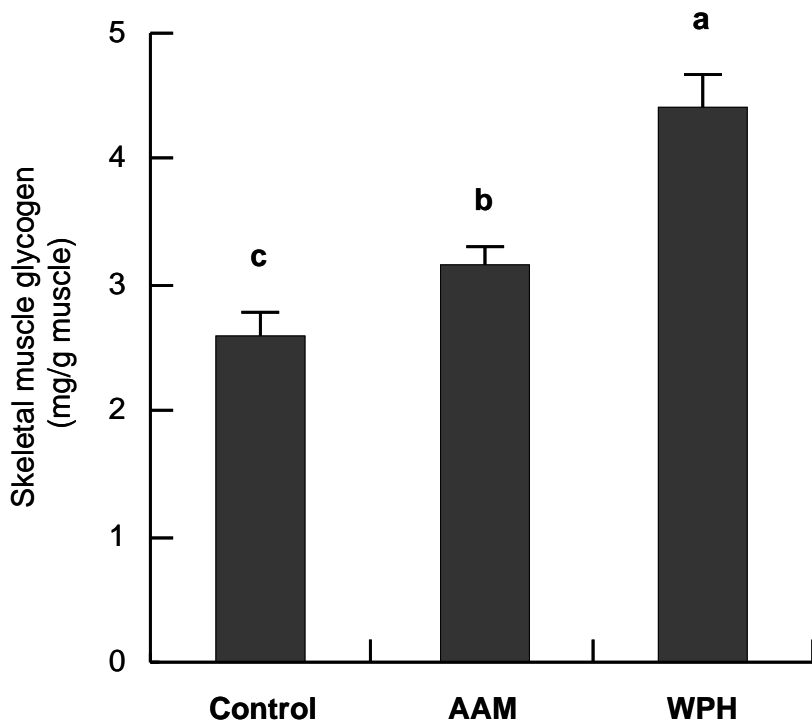
**Table 2-5.** Exercise performance of mice fed casein, AAM, or WPH diets through the experimental period<sup>1</sup>.

	0 wk	1 wk	2 wk	3 wk	4 wk
	(min)				
Control	25.5 ± 0.7	26.4 ± 1.1	27.5 ± 1.4	27.9 ± 1.5	28.5 ± 2.0
AAM	25.4 ± 1.2	25.4 ± 0.9	28.2 ± 2.7	35.3 ± 3.4	37.5 ± 5.0
WPH	26.1 ± 0.9	27.2 ± 1.0	34.8 ± 5.2	40.1 ± 6.2	42.4 ± 5.1

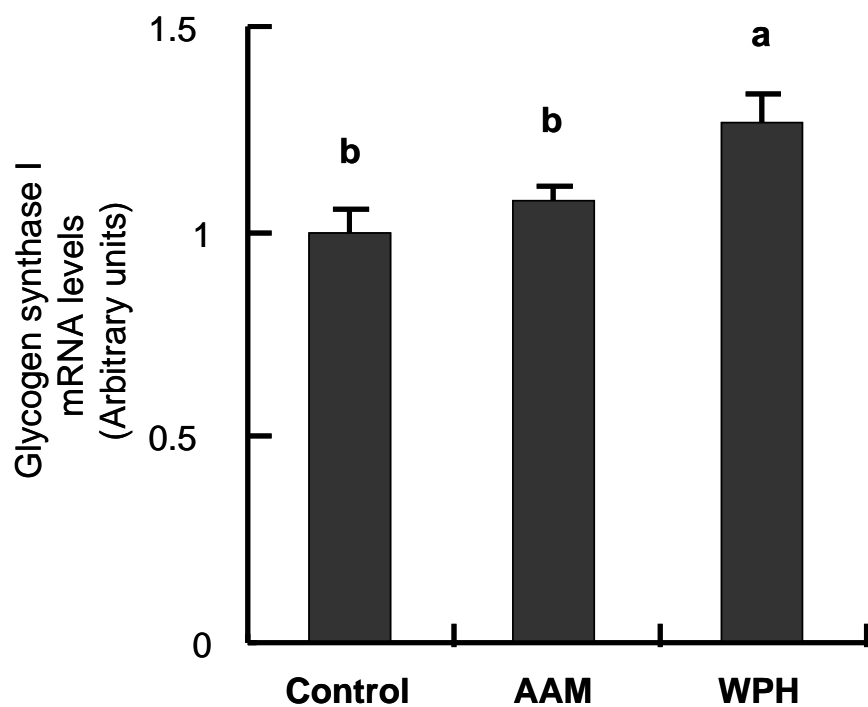
<sup>1</sup>Values are means ± SEM, *n* = 8.

AAM, amino acids mixture; WPH, whey protein hydrolysates.

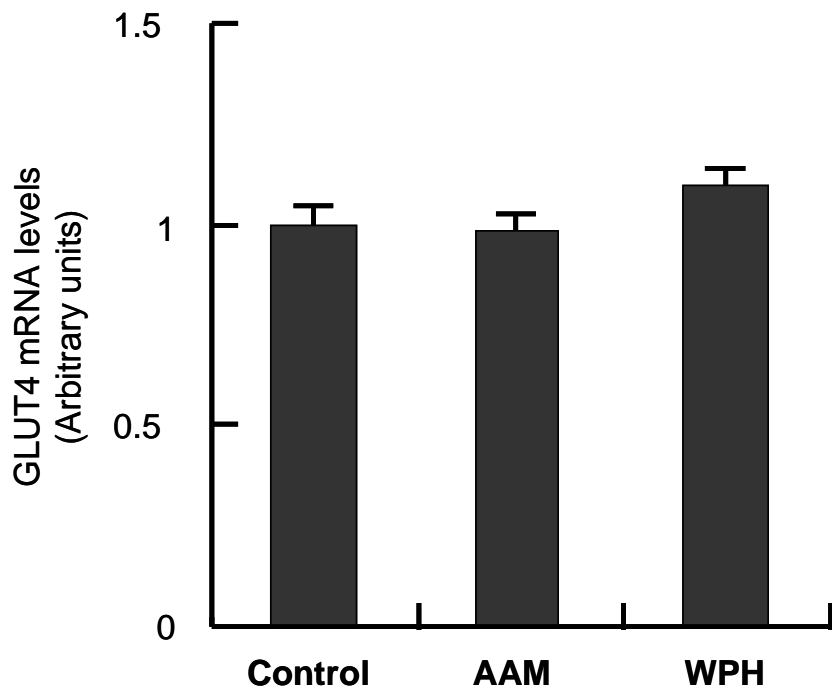




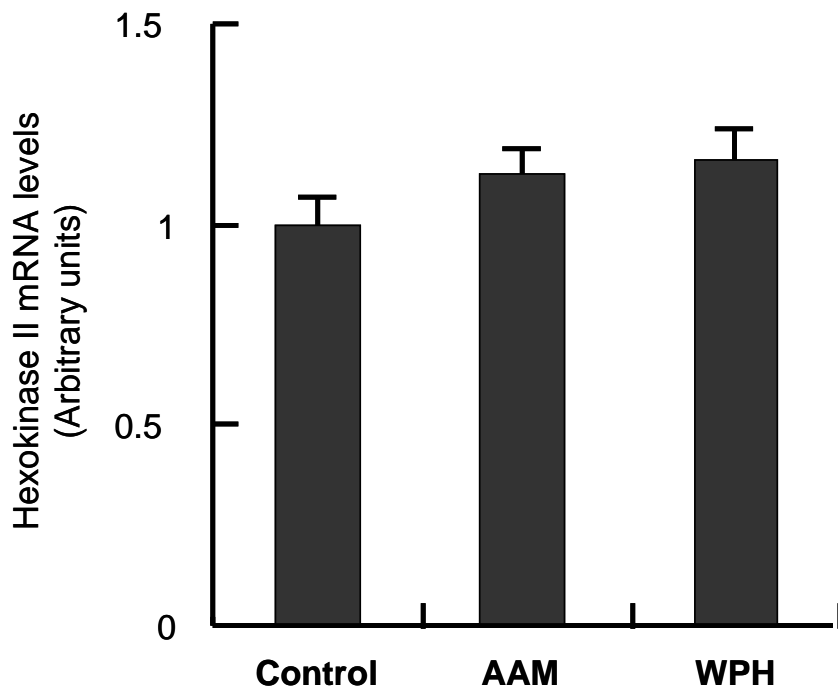
**Fig. 2-1.** Glycogen content in the skeletal muscle of the mice fed control, WAA, or WPH diets for 5 weeks. Values are means  $\pm$  SEM,  $n = 8$ . Means not sharing a common letter differ,  $P < 0.05$  (Tukey's post hoc analysis). AAM, amino acids mixture; WPH, whey protein hydrolysates.



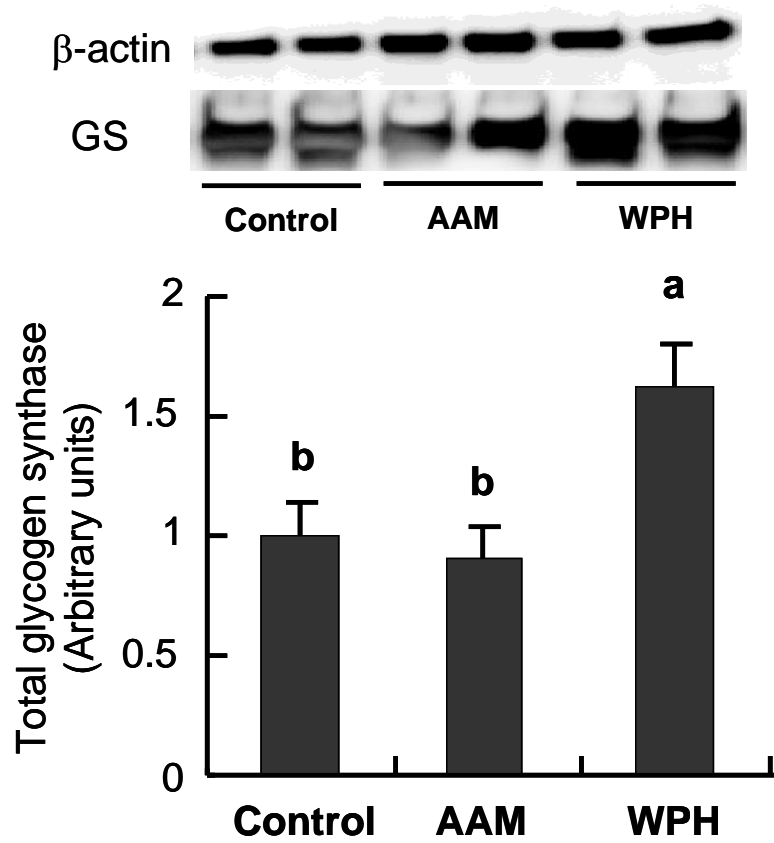
**Fig. 2-2.** mRNA levels of glycogen synthase I in skeletal muscle of the mice fed control, WAA, or WPH diets for 5 weeks. Values are means  $\pm$  SEM,  $n = 8$ . Means not sharing a common letter differ,  $P < 0.05$  (Tukey's post hoc analysis). AAM, amino acids mixture; WPH, whey protein hydrolysates.



**Fig. 2-3.** mRNA levels of GLUT4 in skeletal muscle of the mice fed control, WAA, or WPH diets for 5 weeks. Values are means  $\pm$  SEM,  $n = 8$ . Means not sharing a common letter differ,  $P < 0.05$  (Tukey's post hoc analysis). AAM, amino acids mixture; WPH, whey protein hydrolysates.



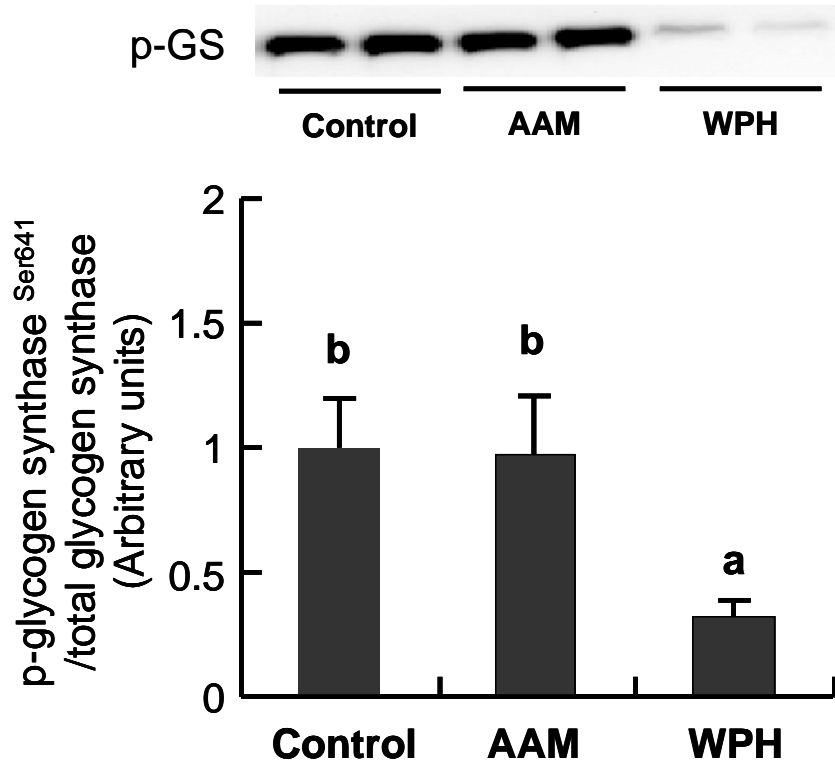
**Fig. 2-4.** mRNA levels of Hexokinase II in skeletal muscle of the mice fed control, WAA, or WPH diets for 5 weeks. Values are means  $\pm$  SEM,  $n = 8$ . Means not sharing a common letter differ,  $P < 0.05$  (Tukey's post hoc analysis). AAM, amino acids mixture; WPH, whey protein hydrolysates.



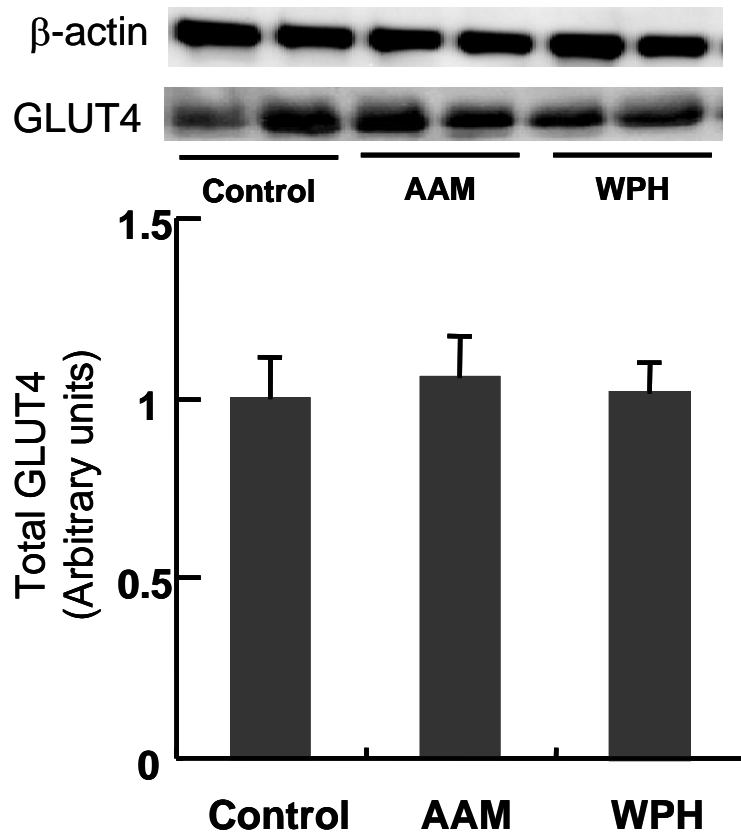
**Fig. 2-5.** Protein levels of total glycogen synthase in skeletal muscle of the mice fed control, WAA, or WPH diets for 5 weeks. Values are means  $\pm$  SEM,  $n = 8$ .

Means not sharing a common letter differ,  $P < 0.05$  (Tukey's post hoc analysis).

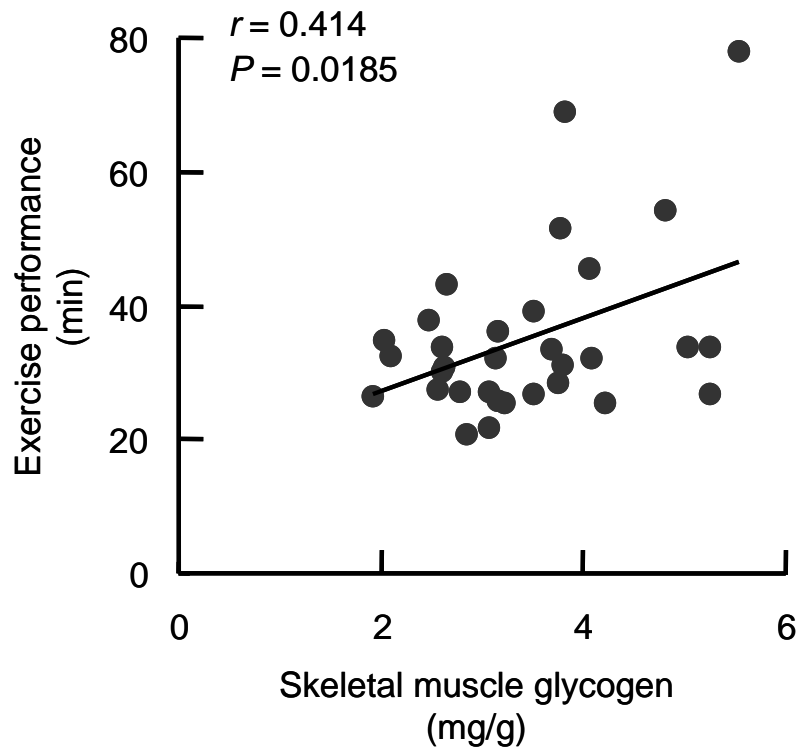
AAM, amino acids mixture; WPH, whey protein hydrolysates.



**Fig. 2-6.** Protein levels of phosphorylated glycogen synthase in skeletal muscle of the mice fed control, WAA, or WPH diets for 5 weeks. Phosphorylated glycogen synthase was normalized to total glycogen synthase. Values are means  $\pm$  SEM,  $n = 8$ . Means not sharing a common letter differ,  $P < 0.05$  (Tukey's post hoc analysis). AAM, amino acids mixture; WPH, whey protein hydrolysates.



**Fig. 2-7.** Protein levels of GLUT4 in skeletal muscle of the mice fed control, AAM, or WPH diets for 5 weeks. Values are means  $\pm$  SEM,  $n = 8$ .



**Fig. 2-8.** Correlation between skeletal muscle glycogen content and exercise performance.



### 第三章 運動後のホエイペプチドの摂取が 骨格筋タンパク質合成に与える影響の検討

#### 第一節 目的

骨格筋は筋タンパク質を合成する期間と分解する期間との微細なバランスによって保たれており、日常生活において絶えず古い筋タンパク質を分解し新しく作り直すリモデリングが骨格筋内で繰り返されている(20)。骨格筋のリモデリングは骨格筋タンパク質の合成と分解により行われているが、長時間の運動は骨格筋タンパク質合成を抑制することが知られている(62, 63)。

これまでに、運動直後にタンパク質を含んだ食事を摂取することで、骨格筋タンパク質合成が促進されることが報告されている(64, 65)。さらに、Anthonyら(66, 67)はBCAAの一つであるロイシンが単独でも、タンパク質やアミノ酸混合物を摂取した場合と同様に骨格筋タンパク質合成を促進することを報告した。ロイシンの効果は用量依存的であり、mRNA 翻訳開始に関わる mTOR シグナル伝達系の活性化を介して骨格筋タンパク質合成を促進させることが報告されている。mTOR シグナル経路には S6K1 や真核生物翻訳開始因子 4E 結合タンパク質 1 (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1; 4E-BP1) などが関わっている。

摂取するタンパク質の原料の違い、例えばホエイ、カゼイン、大豆、小麦などが骨格筋合成に与える影響に関する研究がいくつか報告されている(36, 37, 68)。これらの研究結果から、ホエイタンパク質が他のタンパク質と比較して最も効果的に翻訳開始を刺激し、骨格筋タンパク質合成を増加させると考えられている。さらに Norton ら(37)は摂取するタンパク質中のロイシン含量が骨格筋タンパク質合成の活性化に重要であると主張している。これらの結果から、ホエイタンパク質の骨格筋タンパク質合成促進効果は、そのロイシン含量が高い

ことに由来すると考えられる。このように、ロイシンや、ロイシン含量の高いホエイタンパク質が骨格筋タンパク質合成と mTOR シグナルに与える影響についての報告は多いが、摂取するタンパク質の分子形態の違いが骨格筋タンパク質合成に与える影響についての報告は少ない。

これまでに我々は運動後の糖質とホエイペプチドの同時摂取が、ホエイタンパク質や BCAA を摂取した場合よりも筋グリコーゲン回復を促進することを報告している(42)。さらに、第 2 章において、運動と組み合わせて長期的に摂取した場合においてもホエイペプチドは、ホエイタンパク質と同一組成のアミノ酸混合物よりも筋グリコーゲン量を高めることを明らかにした。これらの結果はホエイペプチド中に含まれる何らかの生理活性ペプチドがアミノ酸よりも優れたグリコーゲン合成促進効果を有する可能性を示唆するものである。そこで、我々は、生理活性ペプチドを含むホエイペプチドがグリコーゲン合成促進効果だけでなく、運動後の骨格筋タンパク質合成促進効果においても優れた効果を有するのではないかと仮説を立てた。本章では、運動後のホエイペプチドの摂取が、アミノ酸摂取と比較して優れた骨格筋合成促進効果を示すかどうか検証することを目的とした。さらに、ホエイペプチドの摂取が mTOR シグナルに与える影響についてもアミノ酸摂取と比較検討することとした。

## 第二節 材料と方法

### 実験動物

初期体重 150 g 前後の 5 週齢雄性 SD ラット（日本クレア）を室温  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、明期 8 時～20 時の環境下で飼育した。飼育期間中、ラットに固形飼料 MF（オリエンタル酵母）を自由に摂取させた。本研究は株式会社明治 食機能科学研究所 動物実験倫理委員会による承認を得て、「実験動物の飼養及び保管に関する基準、昭和 55 年総理府告示第 6 号」に従って実施した。

### 試験デザイン

3~4 日間の予備飼育後、Sonou ら(69)の方法に準じて、ラットに 3 日間の水泳トレーニングを実施させた。1 日目に 2 時間水泳運動、30 分休憩、2 時間水泳運動を 2, 3 日目には 3 時間水泳運動、30 分休憩、3 時間水泳運動を実施させた。3 日目のトレーニング終了後、ラットに制限食として 5 g の粉末飼料 MF（オリエンタル酵母）を与えた。試験当日、ラットを非運動群 ( $n = 8$ ) と水泳を実施する群に群分けした。水泳運動群は 2 時間の水泳運動に供した。水泳運動はバケツに 50 cm の深さで  $35^{\circ}\text{C}$  の水を張り、常に同時に 4 匹のラットが水泳運動を実施しているように調節し、一匹あたりの遊泳可能面積が  $400 \text{ cm}^2$  となるようにした。運動直後に一群（運動直後群； $n = 8$ ）は解剖に供した。その他の群（各群、 $n = 8$ ）は 3 種の試験溶液（糖質溶液、アミノ酸混合物溶液またはホエイペプチド溶液）のいずれかを 1 個体あたり 4 mL 経口投与した。各試験溶液は 4 mL 中に含まれるエネルギー量が今回用いたラットの一日の必要エネルギー量の約 15%である(64)44 kJ となるように調製した。試験溶液の組成を **Table 3-1** に示した。いずれの試験溶液も炭水化物として 50%グルコース+50%スクロースの混合物を用いた。アミノ酸混合物群の投与溶液は約 18%のアミノ酸混合物を、ホエ

イペプチド群の投与溶液は約 23%のホエイペプチド（株式会社明治；詳細は第二章に記載した）を含むように milliQ 水に溶解して調製した。ホエイペプチドの栄養組成、アミノ酸混合物のアミノ酸組成は第二章にて示した。アミノ酸混合物のアミノ酸組成はホエイペプチドと同一になるように各種 L-アミノ酸（和光純薬工業）を混合して調製した。ホエイペプチド中の窒素含量はケルダール法(52)により測定し、アミノ酸混合物群とホエイペプチド群の摂取するタンパク質（窒素）量が等しくなるように調製した。

試験溶液投与 1 時間後に残りの全てのラットをエーテル麻酔下で解剖した。上肢三頭筋を摘出し液体窒素で凍結後、腹部大静脈より採血した。血液は 3000 ×g、4°C、10 分間遠心分離を行い、血漿を得た。サンプルは使用時まで-80°Cで保存した。ラットを用いた先行研究(64)において、運動+再摂餌後 1 時間の時点で骨格筋タンパク質合成の増加が確認されているため、本研究においても試験溶液投与 1 時間後の時点での骨格筋タンパク質合成を評価することとした。

### 代謝標識物の投与

全てのラットは解剖の 15 分前に骨格筋タンパク質合成速度を測定するための標識物として重水素ラベルフェニルアラニン ( $[^2\text{H}_5]\text{Phe}$ 、Cambridge Isotope Laboratories) を生理食塩水（大塚製薬）に 22.5 mg/mL となるように溶解し、投与量が 45 mg/kg BW となるよう尾静脈より投与した。尾静脈からの投与 15 分後に解剖を実施し上肢三頭筋を摘出し、同位体ラベルフェニルアラニンが取り込まれるまでの時間として、尾静脈投与から上肢三頭筋を凍結するまでの時間を正確に記録した。

### 血漿成分分析

血漿中のインスリンは市販のラットインスリン用 ELISA キット（Mercodia）

を用いて測定した。実験操作は添付のプロトコルに従った。血漿中の遊離アミノ酸濃度は Morifuji ら(61)の方法に従い、測定した。血糖は市販のグルコース測定キット（和光純薬工業）を用いて測定した。実験操作は添付のプロトコルに従った。

### 骨格筋タンパク質合成速度測定法

骨格筋タンパク質合成速度（fractional rate of protein synthesis; FSR）は Bark ら(70)の方法に準じ、骨格筋タンパク質中に取り込まれた同位体ラベルフェニルアラニンの量を測定することにより算出した。上肢三頭筋全量に 3 mL の氷冷した 0.3 M 過塩素酸を添加し、ホモジナイズした。サンプルを 8000×g、4°C、15 分間遠心分離し、上清を回収し、筋中遊離アミノ酸エンリッチメント測定用サンプルとした。沈殿に milliQ 水を添加し、再度 8000×g、4°C、15 分間遠心分離し、上清を捨てることを 2 回繰り返した。沈殿を 6N の HCl に懸濁し、150°C、1 時間加水分解を行い、骨格筋中エンリッチメント測定用サンプルを得た。血漿中及び加水分解した骨格筋中の同位体ラベルフェニルアラニンのエンリッチメントの分析には LC/MS/MS (TQD; Waters Corporation) を用いた。長さ 2.1×50 mm、粒子径 1.7 μm のカラム (ACQUITY UPLC BEH C18 ; Waters Corporation) を用いた。移動相 A には 0.05% トリフルオロ酢酸を、移動相 B には 0.05% トリフルオロ酢酸含有アセトニトリルを用いた。流速は 0.3 mL/min、カラム温度は 40°C とし、以下のグラジエント条件で分析を行った。B0% で分析を開始し、9 分までに B 比率を直線的に 40% まで引き上げた。9.01 分から 10 分まで B80%、10.01 分から 13 分まで B0% でカラムを洗浄した。フェニルアラニンの測定には親イオン m/z 166.19、娘イオン m/z 120.10 のフラグメントイオンを、同位体ラベルフェニルアラニンの測定には親イオン m/z 171.19、娘イオン m/z 125.10 のフラグメントイオンをそれぞれ用いた。MS 条件は以下の通りである : capillary voltage, 3000 V;

source temperature 120°C; desolvation temperature, 400°C; desolvation gas flow, 849 L/h; cone gas flow, 48 L/h; cone voltage, 25 V; collision energy, 15 eV。FSR は以下の数式に従い算出した。

$$FSR = (E_b \times 100) / (E_a \times t)$$

$t$  は同位体ラベルフェニルアラニンを投与してから上肢三頭筋を凍結するまでの時間を表し、 $E_a$  と  $E_b$  はそれぞれ筋中遊離アミノ酸と加水分解した骨格筋サンプル中の同位体ラベルフェニルアラニンのエンリッチメントを表す。

### Western Blotting

上肢三頭筋を氷冷した 1 mM フッ化フェニルメチルスルフォニル含有 RIPA buffer (Cell Signaling Technology) 中でホモジナイズした後、4000 g・30 分間・4°C の条件下で遠心分離を行い、上清を得た。サンプル中のタンパク質量は牛血清アルブミンを標準品として、BCA 法により定量し、各サンプル中のタンパク質濃度が等しくなるように RIPA buffer により希釈した。各サンプル、タンパク質量として 50 µg を SDS PAGE に供した。アクリルアミド濃度 5.0-10% のグラジェントゲル (Perfect NT Gel, DRC) を用いて、200 V・1 時間電気泳動を行った。泳動終了後、iBlot Gel Transfer Devise (Invitrogen) を用いて、PVDF 膜に転写を行った。転写後、PVDF 膜を 0.5 % ECL Prime Blocking Agent (GE ヘルスケア)・0.1% Tween20 含有 TBS バッファー (BioRad) 中で室温・一時間振とうし、ブロッキングを行った。続いて、PVDF 膜を各一次抗体を含んだ 0.1% Tween20 含有 TBS バッファー (BioRad) 中で 4°C・一晩振とうした。リン酸化 mTOR の定量には rabbit anti-phospho-mTOR (Ser2448, Cell Signaling Technology) を 1000 倍希釈し、総 mTOR の定量には rabbit anti- mTOR (Cell Signaling Technology) を 1000 倍希釈して用いた。リン酸化 4E-BP1 の定量には rabbit anti-phospho-4E-BP1 (Thr37/46, Cell Signaling Technology) を 1000 倍希釈し、総 4E-BP1 の定量には

rabbit anti- 4E-BP1 (Cell Signaling Technology) を 1000 倍希釈して用いた。S6K1 の定量には Thr389 のリン酸化量の測定には rabbit anti-phospho-S6K1 (Thr389, Cell Signaling Technology) を 1000 倍希釈し、Thr421/Ser424 のリン酸化量の測定には (Thr421/Ser424, Santa Cruz Biotechnology) を 1000 倍希釈し、総 S6K1 の定量には rabbit anti- S6K1 (Cell Signaling Technology) を 1000 倍希釈して用いた。続いて、PVDF 膜を anti-rabbit IgG HRP-linked antibody (Cell Signaling Technology) を含んだ 0.1% Tween20 含有 TBS バッファー (BioRad) 中で室温・一時間振とうした。抗体が結合した各種タンパク質は ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE ヘルスケア)、Chemi-doc Gel Quantification System (Bio-Rad) を用いて可視化・定量を行った。各種タンパク質のリン酸化量はリン酸化タンパク質量と総タンパク質量との割合で示した。

#### 統計処理

統計処理は SPSS ver. 14.0J (SPSS) 用いて解析した。全ての結果は平均値±標準誤差で示した。有意差検定は一元配置の分散分析後、Tukey の多重比較検定を行った。有意水準は 5%未満とした。

### 第三節 結果

#### 骨格筋タンパク質合成速度

2 時間の水泳運動により、運動直後群は非運動群よりも 42% 低い FSR を示した。糖質のみを投与した場合、FSR の回復は認められなかった。一方、タンパク質源を投与したホエイペプチド群とアミノ酸混合物群は減少した FSR の回復が認められ、さらにホエイペプチドの摂取によりアミノ酸混合物群よりも有意に FSR が増加した (Fig. 3-1)。

#### 血中インスリン、アミノ酸、グルコース濃度

ホエイペプチド群の血中インスリン濃度は糖質群と比較して有意に高値を示した (Table 3-2)。しかしながら、ホエイペプチド群とアミノ酸混合物群との間には有意な差は認められなかった。タンパク質源を投与したホエイペプチド群、アミノ酸混合物群において、血中ロイシン、総アミノ酸、必須アミノ酸及びBCAA濃度の上昇が認められた。しかし、この 2 群間では有意な差が認められなかった。血中グルコース濃度は全ての群間で有意な差は認められなかった。

#### リン酸化 mTOR、4E-BP1、S6K1 量

運動後のホエイペプチドの投与により、アミノ酸混合物群、糖質群と比較して有意にリン酸化 mTOR 量が増加した (Fig. 3-2)。同様に、アミノ酸混合物群も糖質群と比較して有意に高いリン酸化 mTOR 量を示した。

ホエイペプチド群はアミノ酸混合物群、糖質群と比較して有意に高いリン酸化 4E-BP1 量を示した (Fig. 3-3)。アミノ酸混合物群も糖質群と比較して有意に高いリン酸化 4E-BP1 量を示した。

S6K1 の 2 種類のリン酸化抗体を用いて解析を行った結果、Thr389、



Thr421/Ser424 どちらのリン酸化部位においてもホエイペプチド群はアミノ酸混合物群、糖質群と比較して有意に高いリン酸化量を示した (**Fig. 3-4, 3-5**)。アミノ酸混合物群も同様にどちらのリン酸化部位においても糖質群よりも高いリン酸化量を示した。

#### 第四節 考察

本研究では運動後に摂取するタンパク質の分子形態の違いが骨格筋タンパク質合成の回復と mTOR シグナリングに与える影響について検討した。我々は 2 時間の水泳運動により骨格筋合成速度が減少した状態のラットにホエイタンパク質由来のタンパク質源としてホエイペプチドまたは同組成のアミノ酸混合物を投与することで骨格筋タンパク質合成速度が回復することを示した。さらに、ホエイペプチド群はアミノ酸混合物群と比較して有意に高い骨格筋合成速度を示した。運動後に摂取するタンパク質源として、ホエイペプチドがアミノ酸よりも優れた骨格筋タンパク質合成促進効果を有することが本研究によって初めて示された。さらに本研究の結果は、ホエイペプチド中に含まれる何らかの生理活性ペプチドがアミノ酸よりも優れた骨格筋タンパク質合成促進効果を有する可能性を示唆するものである。

BCAA、特にロイシンが骨格筋タンパク質合成の活性化において重要な役割を果たしていることは良く知られている(34, 71)。運動後にロイシンを単独で摂取した場合においても骨格筋タンパク質合成が促進されることが報告されている(72, 73)。さらに Norton ら(37)は摂取するタンパク質中に含まれるロイシン量が骨格筋タンパク質合成の活性化には重要であると主張している。一方で、本研究で用いた 2 種類のタンパク質源であるホエイペプチドとアミノ酸混合物のアミノ酸組成は同一である。すなわち、摂取した BCAA 量及びロイシン量は等しい。さらに、ホエイペプチドとアミノ酸混合物とで骨格筋タンパク質合成速度に与える影響が異なっているにもかかわらず、血中アミノ酸濃度は 2 群間で差が認められなかった。これらの結果は、骨格筋タンパク質合成を活性化するためには、摂取するタンパク質のロイシン含量のみが重要なのではなく、その分

子形態も重要であることを強く示唆するものである。さらに、我々はホエイペプチド中に含まれる活性物質がロイシンよりも優れた骨格筋タンパク質合成促進活性を有する可能性があると考えている。Morifuji ら(41)はホエイペプチド中に含まれる BCAA 含有ジペプチドである Ile-Val, Leu-Val, Val-Leu, Ile-Ile, Ile-Leu, Leu-Ile, Leu-Leu がラット摘出筋において糖取り込み促進効果を有することを示し、これらのペプチドが骨格筋グリコーゲン合成促進活性を有する可能性を示した。このことと我々のデータをあわせて考えると、これらのペプチドが骨格筋グリコーゲン合成のみならず、骨格筋タンパク質合成に関しても生理活性ペプチドとして機能していることが示唆される。

mTOR シグナルは骨格筋タンパク質合成を調節する重要なシグナル因子であり、アミノ酸、特にロイシンによってポジティブに制御されることが良く知られている(33, 74, 75)。本研究において、血中アミノ酸濃度には有意な差が認められなかったにもかかわらず、ホエイペプチドの投与によりアミノ酸混合物と比較して有意に高い mTOR のリン酸化を引き起こした。本研究の結果により、ホエイペプチド中に含まれる何らかの生理活性物質がロイシン単独よりも強く mTOR のリン酸化を引き起こす可能性が示唆された。mTOR の下流のシグナル因子である S6K1 と 4E-BP1 は mRNA の翻訳開始を活性化し、骨格筋タンパク質合成を刺激することが知られている(76, 77)。本研究において、ホエイペプチド群は S6K1 と 4E-BP1 のいずれのタンパク質のリン酸化量についてもアミノ酸混合物群よりも高値を示した。本研究の結果により、ホエイペプチドは mTOR の活性化を介して、アミノ酸混合物よりも強く S6K1 と 4E-BP1 のリン酸化を引き起こす可能性が示唆された。また、Karlsson ら(78, 79)は S6K1 の Thr421/Ser424 のリン酸化が mTOR の活性化を介さずに BCAA により引き起こされることを示した。このことより、本研究において、ホエイペプチド群において S6K1 の

Thr421/Ser424 のリン酸化量が増加したのは、ホエイペプチドに含まれる生理活性ペプチドが mTOR を介さずに直接 Thr421/Ser424 部位のリン酸化を増加させることで S6K1 を活性化する可能性を示していると考えられる。

Morifuji ら(61)は骨格筋への糖取り込み活性を有する BCAA 含有ジペプチドの血中濃度がホエイペプチドの摂取により増加することを報告している。しかしながら、それらジペプチドの血中濃度はアミノ酸の濃度と比較してかなり低いものであった。本研究においてアミノ酸混合物群とホエイペプチド群の血中ロイシン濃度はそれぞれ 409.8  $\mu\text{mol/L}$ 、423.9  $\mu\text{mol/L}$  であった。Morifuji ら(61)の方法に従い、本研究においてもホエイペプチド投与群のホエイペプチド中に含まれる 7 種類の血中ジペプチド濃度を測定した結果を **Table 3-3** に示した。しかし、それらの値はアミノ酸濃度と比較して極端に低いものであった。一方で、これらのジペプチドはアミノ酸混合物群では検出されなかった。これらのジペプチドがロイシンよりも低い血中濃度であっても mTOR シグナルを活性化する効果を有するかどうか、今後さらなる検討が必要である。

これまでに多くの研究において、アミノ酸刺激と運動刺激のどちらにおいても骨格筋タンパク質合成の活性化には血中インスリンが必須であることが示されている(80)。特に mTOR シグナルの調節にはインスリン利用能が重要である。Morifuji ら(61)はホエイペプチド摂取後 1 時間までの血中インスリン応答が未分解のホエイタンパク質よりも優れていることを示した。本研究において、統計学的に有意な差は認められなかったものの、ホエイペプチド群はアミノ酸混合物群よりも高い血中インスリン濃度を示した。また、血中インスリン濃度と FSR、mTOR のリン酸化量の相関関係を調べた結果、どちらも有意な正の相関関係が認められた (FSR ;  $r = 0.51$ 、 $P = 0.012$ 、p-mTOR ;  $r = 0.66$ 、 $P < 0.001$ )。これら

の結果を併せて考えると、ホエイペプチドの投与により増加した血中インスリンにより mTOR のリン酸化を介して骨格筋タンパク質合成が活性化される可能性が示唆された。

水泳運動はラットにとって非常にストレス負荷が高い運動であり、ストレスホルモンであるグルココルチコイドの分泌を増加させることが知られている(81)。グルココルチコイドの分泌量の増加と骨格筋萎縮の関係性がこれまでに報告されており(82)、グルココルチコイド処理した動物において、骨格筋タンパク質合成が阻害されることが報告されている(83)。さらに、グルココルチコイド活性を有する化合物であるデキサメタゾン骨格筋において、アミノ酸によって誘導される骨格筋タンパク質合成と、S6K1 及び 4E-BP1 のリン酸化を阻害することが報告されている(84)。それゆえ、本研究において認められたホエイペプチドによる骨格筋タンパク質合成促進効果は mTOR シグナルを活性化する作用のみによるのではなく、グルココルチコイドによる影響を抑える作用が関与している可能性も考えられる。

本章において、持久運動後のホエイペプチドの投与はアミノ酸よりも優れた骨格筋合成促進作用を示し、その作用メカニズムとして mTOR シグナルの活性化が関与している可能性が示された。これらの結果は、ホエイペプチド中に含まれる何らかのペプチド等の活性物質がロイシンよりも優れた mTOR シグナル活性化作用を有する可能性を示唆するものである。本章の結果により、スポーツ栄養学において、アスリートが運動後に骨格筋の増量を目的として摂取すべきタンパク質の分子形態に関して新たな知見が得られた。

**Table 3-1.** Macronutrient composition of the test solutions

	carbohydrate	Fat	Protein	carbohydrate	Fat	Protein	Energy	carbohydrate	Fat	Protein
	(g/ 100 g)			(% energy)			(kJ/ g)	(g/ 44 kJ)		
CHO	100.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	16.74	2.63	0.00	0.00
AAM	82.00	0.00	18.00	82.00	0.00	18.00	16.74	2.16	0,00	0.47
WPH	82.02	0.07	17.91	81.95	0.15	17.90	16.75	2.15	0.01 >	0.47

AAM, amino acids mixture; CHO, carbohydrate; WPH, whey protein hydrolysates

**Table 3-2.** Plasma amino acid and insulin levels of rats administered diets that differed in the molecular forms of dietary whey-based protein, measured 1 h after swimming.

(Mean values and standard errors)

	CHO		AAM		WPH	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Leucine ( $\mu\text{mol/l}$ )	176.6 <sup>b</sup>	16.9	409.8 <sup>a</sup>	44.1	423.9 <sup>a</sup>	28.8
TAA ( $\mu\text{mol/l}$ )	4949.0 <sup>b</sup>	159.2	7368.3 <sup>a</sup>	420.2	7119.8 <sup>a</sup>	208.0
EAA ( $\mu\text{mol/l}$ )	1467.4 <sup>b</sup>	79.5	2577.6 <sup>a</sup>	232.7	2584.7 <sup>a</sup>	128.6
BCAA ( $\mu\text{mol/l}$ )	552.8 <sup>b</sup>	49.4	1115.6 <sup>a</sup>	111.8	1133.8 <sup>a</sup>	73.0
Glucose (mmol/l)	10.0 <sup>a</sup>	0.5	9.3 <sup>a</sup>	0.7	9.2 <sup>a</sup>	0.6
Insulin (pmol/l)	76.6 <sup>b</sup>	9.7	107.9 <sup>ab</sup>	20.1	147.9 <sup>a</sup>	20.4

AAM, amino acid mixture; BCAA, branched chain amino acids; CHO, carbohydrate; EAA, essential amino acids; TAA, total amino acids; WPH, whey protein hydrolysates

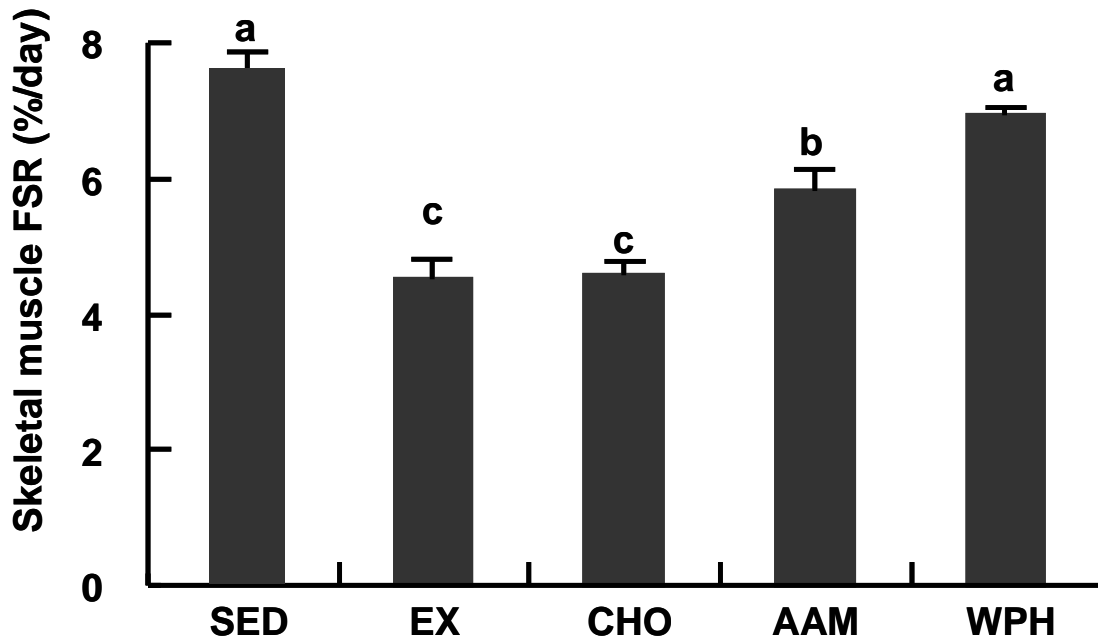
<sup>a,b</sup> Means not sharing a common letter differ,  $P < 0.05$  (Tukey's post-hoc analysis).

**Table 3-3.** Plasma BCAA-contained dipeptide levels of rats administered WPH, measured 1 h after swimming.  
(Mean values and standard errors)

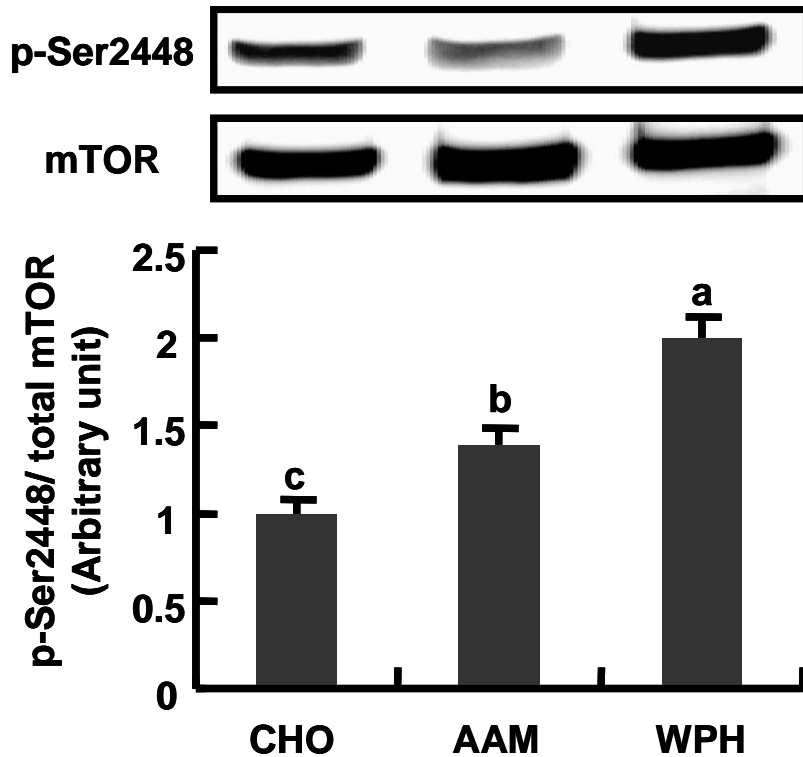
	WPH	
	Mean	SE
Ile-Val (nmol/l)	11.1	1.4
Leu-Val (nmol/l)	6.0	0.7
Val-Leu (nmol/l)	25.9	3.1
Ile-Ile (nmol/l)	9.4	1.1
Leu-Ile (nmol/l)	1.7	0.2
Ile-Leu (nmol/l)	13.2	1.2
Leu-Leu (nmol/l)	34.2	4.3

WPH, whey protein hydrolysates

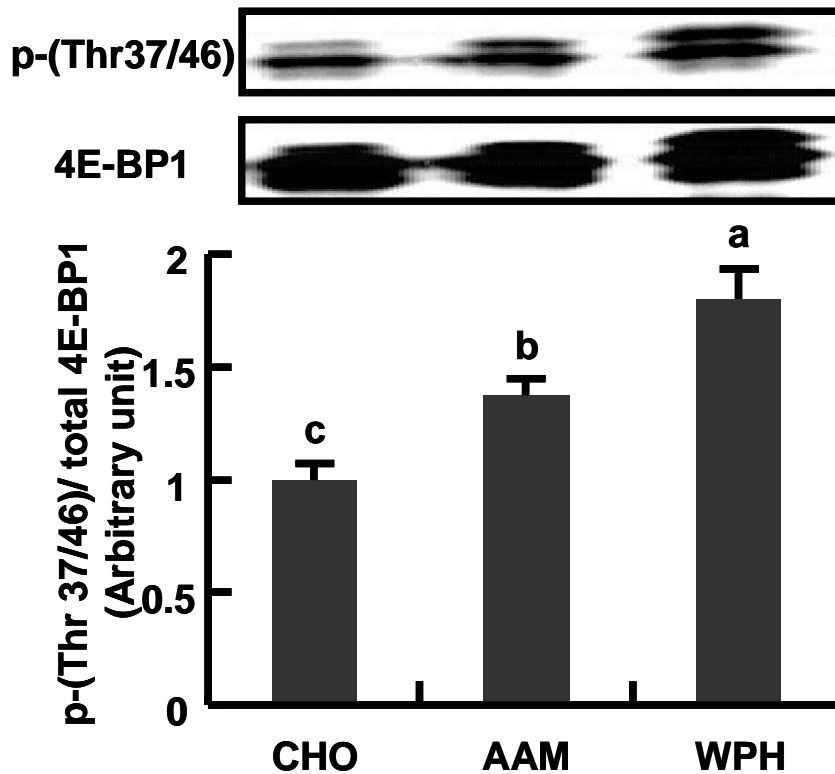




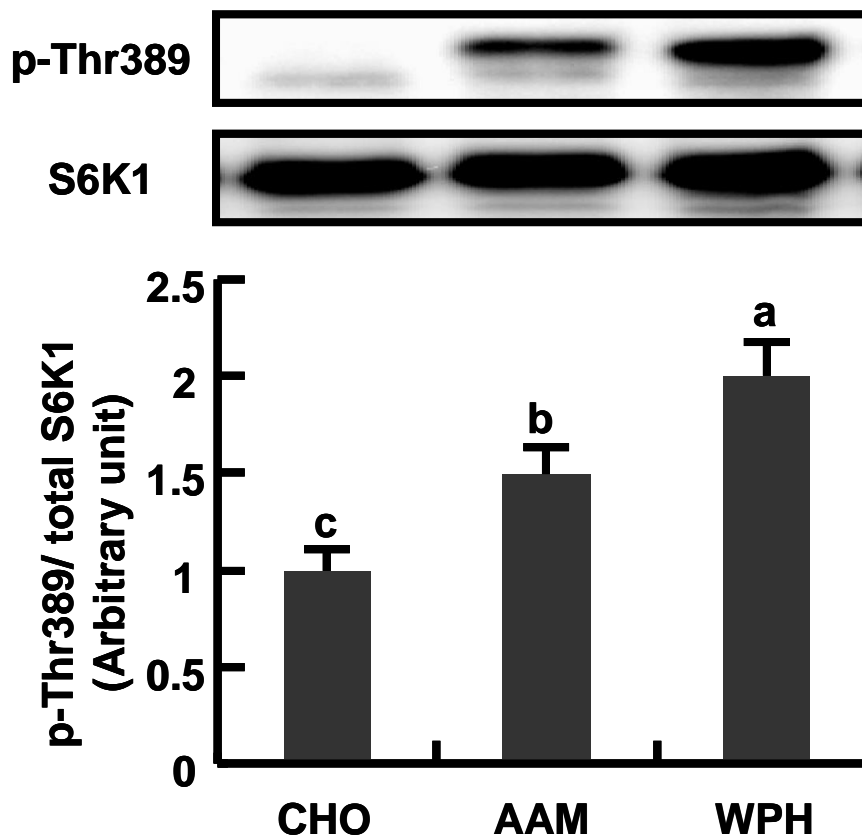
**Fig. 3-1.** The fractional rates of protein synthesis in rats administered diets that differed in molecular forms of dietary whey-based protein, measured 1 h after swimming activity. The values are expressed as means and SE,  $n = 8$ . <sup>a,b,c</sup> Means not sharing a common letter differ,  $P < 0.05$  (Tukey's post-hoc analysis). AAM, amino acids mixture; CHO, carbohydrate; EX, exercise control; SED, sedentary controls; WPH, whey protein hydrolysates.



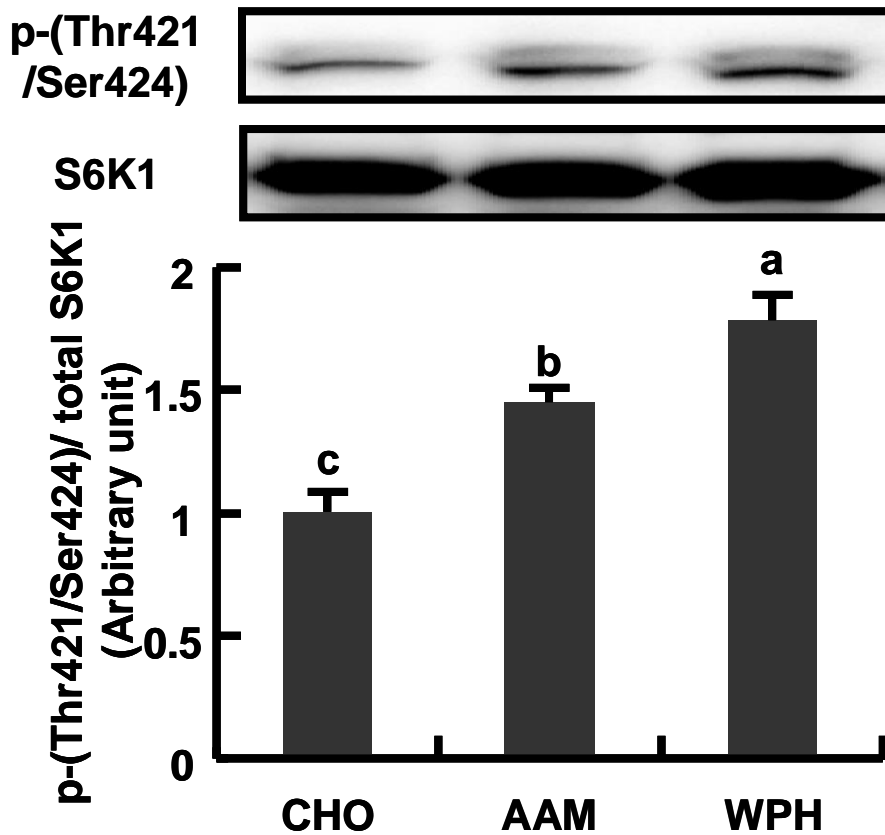
**Fig. 3-2.** Skeletal muscle phosphorylated mTOR levels of rats administered diets that differed in molecular forms of dietary whey-based protein, measured 1 h after swimming. Phosphorylated mTOR was normalized for total mTOR. The values are expressed as means and SE,  $n = 8$ . <sup>a,b,c</sup> Means not sharing a common letter differ,  $P < 0.05$  (Tukey's post-hoc analysis). AAM, amino acids mixture; CHO, carbohydrate; mTOR, mammalian target of rapamycin; WPH, whey protein hydrolysates.



**Fig. 3-3.** Skeletal muscle phosphorylated 4E-BP1 levels of rats administered diets that differed in molecular forms of dietary whey-based protein, measured 1 h after swimming. phosphorylated 4E-BP1 was normalized for total 4E-BP1. The values are expressed as means and SE,  $n = 8$ . <sup>a,b,c</sup> Means not sharing a common letter differ,  $P < 0.05$  (Tukey's post-hoc analysis). AAM, amino acids mixture; CHO, carbohydrate; WPH, whey protein hydrolysates; 4E-BP1, eukaryotic initiation factor 4E binding protein-1.



**Fig. 3-4.** Skeletal muscle phosphorylated S6K1 at Thr389 levels of rats administered diets that differed in molecular forms of dietary whey-based protein, measured 1 h after swimming. Phosphorylated S6K1 was normalized for total S6K1. The values are expressed as means and SE,  $n = 8$ . <sup>a,b,c</sup> Means not sharing a common letter differ,  $P < 0.05$  (Tukey's post-hoc analysis). AAM, amino acids mixture; CHO, carbohydrate; S6K1, ribosomal protein S6 kinase; WPH, whey protein hydrolysates.



**Fig. 3-5.** Skeletal muscle phosphorylated S6K1 at Thr421/Ser424 levels of rats administered diets that differed in molecular forms of dietary whey-based protein, measured 1 h after swimming. Phosphorylated S6K1 was normalized for total S6K1. The values are expressed as means and SE,  $n = 8$ . <sup>a,b,c</sup> Means not sharing a common letter differ,  $P < 0.05$  (Tukey's post-hoc analysis). AAM, amino acids mixture; CHO, carbohydrate; S6K1, ribosomal protein S6 kinase; WPH, whey protein hydrolysates.

## 第四章 運動後のホエイペプチドの摂取が 骨格筋遺伝子発現に与える影響の網羅的解析

### 第一節 目的

長時間の運動は糖質の貯蔵形態である筋グリコーゲン量の減少(85)や骨格筋タンパク質合成・分解のバランスの変化(24, 86)等多くの変化を身体にもたらす。そのため、これまでに運動後の回復期間における、組織中の糖代謝とタンパク質代謝に関して多くの研究が行われてきている(10, 86)。

運動後のタンパク質、アミノ酸の摂取は筋グリコーゲンの回復(10, 14)、骨格筋タンパク質合成の促進に効果的であることが知られている(86)。タンパク質、アミノ酸摂取によるこれらの生理機能においては、アミノ酸の中でも BCAA、特にロイシンが重要な役割を果たしていることが報告されており(16, 17, 60, 72, 87)、Norton ら(37)は摂取するタンパク質のロイシン含量が骨格筋タンパク質合成を高めるためには重要であると主張している。

我々はこれまでにホエイタンパク質を加水分解したホエイペプチドに注目して研究を進めており、本研究の第二章、第三章において運動後に摂取するタンパク質の BCAA 含量だけでなく、分子形態が重要であることを示した。すなわち、ホエイペプチドがアミノ酸よりも優れたグリコーゲン合成促進、骨格筋タンパク質合成促進効果を有することを示した。しかしながら、ペプチドとして摂取した場合とアミノ酸として摂取した場合とで、どのように作用メカニズムが異なるのかは不明である。

最近の研究で Rowland ら(88)は運動後のホエイタンパク質の摂取により細胞外マトリックスや収縮タンパク質を含む、組織構造や再構成に関わる遺伝子発現が調節されることを示した。しかしながら、運動後に摂取するタンパク質の

分子形態の違い、すなわちタンパク質やアミノ酸という形態ではなく、ホエイペプチドとして摂取することによって、骨格筋の遺伝子発現に与える影響がどのように異なるのかは不明である。そこで、本研究ではホエイペプチドとアミノ酸が骨格筋の代謝に与える影響の作用メカニズムの違いを明らかにする目的で、それぞれが骨格筋の遺伝子発現に与える影響の違いを、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。

## 第二節 材料と方法

### 実験動物

本章では第三章にて用いた動物個体のうち、アミノ酸混合物群とホエイペプチド群の動物個体を用いた。

### 試験デザイン

動物試験デザインは第三章に記した。解剖時に滑車上筋を摘出し、RNAlater (QIAGEN) 中に保存し、使用時まで-20°Cで保存した。

### 血漿成分分析

血漿成分の分析方法は第三章に記した。

### 骨格筋タンパク質合成速度測定法

骨格筋タンパク質合成速度 (FSR) 測定法は第三章に記した。

### RNA の単離及び DNA マイクロアレイ

アミノ酸混合物群とホエイペプチド群から FSR の値が平均的な各群 4 個体を選抜した (Table 4-1)。ラットから摘出した滑車上筋をサンプルとし、QIAGEN RNeasy Fibrous Tissue Kit を用い、個別に total RNA を抽出・精製した。RNA サンプルは 260 及び 280 nm の吸光度を測定するとともに、BioAnalyzer (Agilent) を用いてゲル電気泳動パターンを取得し、各 RNA サンプルの量的・質的適性を確認した。抽出した RNA を Suyama ら(89)の方法に準じて DNA マイクロアレイに供した。100 ng の RNA サンプルから GeneChip 3'IVT Express Kit (Affimetrix) を用いてビオチン標識化 aRNA を調製した。続いて 50-200 残基



の aRNA 断片とし、Affymetrix 社提供のプロトコルに従い、Affymetrix Rat Genome 230 2.0 Array にハイブリダイズした。16 時間のハイブリダイゼーションの後、Affymetrix Fluidics Station 400 を用いて洗浄工程を行い、GeneChip 上のプローブに結合した RNA を streptavidin-phycoerythrin 染色し、蛍光標識した抗 streptavidin 抗体で処理することにより蛍光シグナルを増幅させた。各プローブの蛍光強度は Affymetrix 社のスキャナーで測定し、データファイル (CEL ファイル) を得た。GeneChip データは公共のデータベースに登録した (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, GEO Series accession number GSE49486)。

#### DNA マイクロアレイデータ解析

得られた CEL ファイルを統計解析言語環境 R (<http://www.r-project>) (90)および Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>) (91)を用いて distribution free weighted (DFW) 法を用いて正規化を行った。続いて、2 群間の発現プロファイル比較を行うため、R 上で `prcomp()`関数を用いて主成分分析(92)を行った。2 群間で有意に発現変動した遺伝子を探索するため、rank products 法(93)による解析を行い、 $FDR < 0.05$  と判定された遺伝子をホエイペプチド摂取により有意に発現変動した遺伝子として選抜した。Rat Genome 230 2.0 Array の各遺伝子のアノテーションファイル (October 29, 2012, Rat230\_2.na33.annot.csv) は Affymetrix の Web サイトよりダウンロードした。

発現変動遺伝子の中に、どのような機能に関する遺伝子が有意に濃縮されているかについて、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discover (DAVID; <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) (94) 及び Quick GO (<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>) (95)を用いて解析を行い、 $P < 0.01$  と判定された Gene Ontology (GO) term を抽出した。

## 遺伝子ネットワーク解析

有意に発現変動した個々の遺伝子間の関係性を調べるため、Ingenuity Pathways Analysis (IPA; Ingenuity Systems, <http://www.ingenuity.com>) を用いて解析を行った。

## 発現変動遺伝子の上流因子解析

有意に発現変動した遺伝子の上流因子を予測するため、IPA と TFactS (<http://www.tfacts.org>) (96, 97)を用いて解析を行った。

## Western Blotting

サンプルとして各個体の上肢三頭筋を用い、第三章に記した方法で Western Blotting を実施した。リン酸化細胞外シグナル調節キナーゼ 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2; ERK1/2) の定量には rabbit anti-phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204, Cell Signaling Technology) を 1000 倍希釈し、総 ERK1/2 の定量には rabbit anti-ERK1/2 (Cell Signaling Technology) を 1000 倍希釈して用いた。低酸素誘導因子 (hypoxia inducible factor; HIF) -1 $\alpha$ の定量には rabbit anti-HIF-1 $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology) を 1000 倍希釈し、 $\beta$ -アクチンの定量には rabbit anti- $\beta$ -アクチン (Cell Signaling Technology) を 1000 倍希釈して用いた。リン酸化 ERK1/2 量は総 ERK1/2 量との割合で示した。HIF-1 $\alpha$ 量は $\beta$ -actin 量で標準化した値で示した。

## 統計処理

FSR、血中成分、Western blotting の結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。有意差検定は Student の  $t$  検定を用いた。なお、有意水準は 5%未満とした。

### 第三節 結果

#### DNA マイクロアレイ解析

DFW 法により正規化したマイクロアレイデータについて主成分分析を行った。その結果、ホエイペプチド群とアミノ酸混合物群は異なるクラスターを形成し、2 群間で遺伝子発現プロファイルが異なっていることが示された (**Fig. 4-1**)。

ホエイペプチド摂取により有意に発現変動した遺伝子を探索するため、DFW 法により正規化したマイクロアレイデータについて rank products 法による比較解析を行った。DFW 法と rank products 法を組み合わせる手法は、発現変動遺伝子を検出する最適な方法の一つであることが報告されている(98)。FDR < 0.05 と判定された遺伝子を発現変動遺伝子として選抜した結果、ホエイペプチド摂取によりアミノ酸混合物群と比較して有意に発現変動した 189 遺伝子が特定された。その内訳はホエイペプチド摂取により発現亢進した遺伝子: 134 遺伝子、ホエイペプチド摂取により発現抑制された遺伝子: 55 遺伝子であった。

#### Gene Ontology 解析

発現変動遺伝子群に有意に濃縮された生理機能について、DAVID を用いて Gene-annotation enrichment analysis (GO\_BP3) を行った。得られた GO term のリストを Quick GO を用いて階層表示し、結果を図としてまとめた。ホエイペプチド摂取により発現亢進した遺伝子については **Fig. 4-2** に、発現減少した遺伝子は **Fig. 4-3** に示した。これら GO term のツリーの最下層に示された GO term が最も具体的な機能を表す遺伝子カテゴリであるため、最下層の GO term に注目した。

ホエイペプチド摂取により発現亢進した遺伝子群の解析においては、免疫応

答 (immune response)、サイトカイン産生の負の制御 (negative regulation of cytokine production)、RNA ポリメラーゼ II プロモーターからの転写の正の制御 (positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter)、ニューロン分化の負の制御 (negative regulation of neuron differentiation)、有機物刺激に対する応答 (response to organic substance)、機械的刺激に対する応答 (response to mechanical stress)、創傷に対する応答 (response to wounding)、横紋筋組織の発達 (striated muscle tissue development) の各 GO term が見出された。これらの GO term には 45 遺伝子が含まれており、それらの個々の遺伝子と GO term の関係を Fig. 4-4 に示した。個々の遺伝子に注目した結果、多くの GO term に筋修復に関与する遺伝子が共通に含まれていることが示された。すなわち、免疫応答、サイトカイン産生の負の制御、ニューロン分化の負の制御、有機物に対する応答、創傷に対する応答の GO term には *Cd24(99)* が共通に含まれていた。免疫応答、創傷に対する応答の GO term には *Ccl7* と *Cxcl1(100, 101)* が共通に含まれていた。有機物に対する応答、機械的刺激に対する応答、創傷に対する応答の GO term には *Ccl2(100)* が共通に含まれていた。また、RNA ポリメラーゼ II プロモーターからの転写の正の制御の GO term には骨格筋の発達に関与する重要な遺伝子である *Nr4a3*、*Egr1*、*Junb*、*Nr4a1*、*Cited2*、*Six1* が含まれていた。

ホエイペプチド摂取により発現抑制された遺伝子群の解析においては、免疫応答 (immune response)、抗原プロセッシング及びペプチド抗原の提示 (antigen processing and presentation of peptide antigen)、横紋筋収縮 (striated muscle contraction)、血液循環 (blood circulation)、心室心筋の形態形成 (ventricular cardiac muscle morphogenesis)、筋組織の形態形成 (muscle tissue morphogenesis)、心臓の形態形成 (heart morphogenesis)、筋繊維の発達 (muscle fiber development)、ATPase 活性の制御 (regulation of ATPase activity) に分類される GO term が見出された。これら 9 つの GO term 中には 14 の発現変動した遺伝子が含まれてい

た (Fig. 4-5)。これらを9つのGO termはFig. 4-5に示したとおり、ATPase活性の制御を含むクラスターと免疫応答を含むクラスターの2つに分かれた。特に、*Myh6* と *Myh7* は横紋筋収縮、血液循環、心室心筋の形態形成、筋組織の形態形成、心臓の形態形成、筋繊維の発達、ATPase活性の制御の全てのGO termに共通に含まれていた。さらに、*Tnnc1* と *Tnni1* は心室心筋の形態形成、筋組織の形態形成、心臓の形態形成の全てのGO termに共通に含まれていた。これらの遺伝子は全て骨格筋収縮に関与する遺伝子であった。

### 遺伝子ネットワーク解析

IPAを用いて有意に発現変動した遺伝子間の相互関係のネットワークについて解析を行い、特にホエイペプチド摂取により発現亢進した遺伝子群では骨格筋発達に関与する遺伝子群に注目し、発現減少した遺伝子群では骨格筋収縮に関与する遺伝子群のネットワークに注目して解析を行った。その結果、細胞の発達 (cellular development) に関与する遺伝子群のネットワークにホエイペプチド摂取により発現が亢進した *Nr4a3*、*Nr4a1*、*Egr1* といった骨格筋における重要な転写因子が含まれていた (Fig. 4-6)。また、骨格と筋組織の発達 (skeletal and muscular system development) に関与する遺伝子群のネットワーク中にホエイペプチド摂取により発現が減少した *Myh7*、*Tnnc1*、*Tnni1*、*Tnnt1* といった骨格筋収縮に関与する遺伝子群が含まれていた (Fig. 4-7)。興味深いことに同じくこの遺伝子ネットワークに含まれる、骨格筋収縮に関与する遺伝子である *Myh3* は発現が亢進していた。

### 発現変動遺伝子の上流因子解析

有意に発現変動した遺伝子の上流因子を解析するため、IPAとTFactSを用いて解析を行った。

第一に IPA を用いた上流因子解析を行い、ERK1/2 によって発現が調節される 9 遺伝子を見出した (Table 4-2)。ERK1/2 により発現調節される遺伝子群の中で、*Nr4a3*、*Egr1*、*Ankrd2*、*Ccl7*、*Junb*、*Myc*、*Serpine1* はホエイペプチド摂取により発現が亢進していた。*Nr4a3* と *Junb* はいずれも骨格筋量の調節に関与する遺伝子である(102, 103)。*Egr1* はミトコンドリアの発生に関与する遺伝子である(104)。*Ankrd2* は *Ttn*、*Csrp3*、*Myod1* といった遺伝子群の発現に関わっている遺伝子である(105)。*Myc* は糖代謝及びエネルギー代謝に関わる遺伝子群の発現を調節する役割をもつ(106)。*Serpine1* はフィブリン溶解、タンパク質分解を調節している(107)。一方、*Adipoq* と *Cdkn1a* の 2 つの遺伝子はホエイペプチド摂取により発現が減少していた。*Adipoq* は選択的に ERK1/2 シグナル経路を阻害することが報告されている(108)。*Cdkn1a* は抗アポトーシス作用があると考えられている遺伝子である(109)。

続いて、TFactS を用いて、HIF-1 $\alpha$ によって発現が調節されている 3 遺伝子を見出した (Table 4-2)。これらの 3 遺伝子 (*Nr4a1*、*Serpine1*、*Hmox1*) はいずれもホエイペプチド摂取により発現が亢進していた。*Nr4a1* は糖代謝及び脂質代謝に関与していると考えられている遺伝子である(110)。*Hmox1* は通常時では発現量が非常に低いものの、激しい運動の後には発現が亢進することが報告されている(111)。

### Western blotting 解析

最後に、ホエイペプチドが実際に ERK1/2 及び HIF-1 $\alpha$ の 2 つのタンパク質を活性化しているかどうか調べるため、ERK1/2 のリン酸化量と HIF-1 $\alpha$ の総タンパク質量を Western blotting 法によって解析した。ERK1/2 はリン酸化により活性化することが知られている(33, 112)。一方で、HIF-1 $\alpha$ は低酸素等の刺激によ

り急激にタンパク質量が増加し、下流の遺伝子発現を誘導することが報告されている(113)。ホエイペプチド群の ERK1/2 のリン酸化量はアミノ酸混合物群と比較して有意に高値を示した (**Fig. 4-8**)。また、ホエイペプチドの投与によりアミノ酸混合物投与と比較して有意に HIF-1 $\alpha$ の総タンパク質量が増加した (**Fig. 4-9**)。

#### 第四節 考察

我々は、第三章において運動後のホエイペプチドの摂取よりアミノ酸混合物摂取と比較して有意に骨格筋タンパク質合成が促進されることを示した。本章では、ホエイペプチドが遺伝子発現に与える影響を網羅的に解析するため、DNA マイクロアレイを用いて、ホエイペプチド群とアミノ酸混合物群とで比較解析を行った。得られた DNA マイクロアレイのデータを用いて、初めに主成分分析を行った。その結果、ホエイペプチド群とアミノ酸混合物群とでは骨格筋における遺伝子発現プロファイルが異なっていることが明らかになった。

続いて、ホエイペプチド摂取により発現亢進した遺伝子群が関与する生理機能について GO 解析を行い、8 つの特異的な GO term を見出した。これらの GO term 中に運動後の骨格筋修復に関与する重要な因子である、*Cd24*、*Ccl2*、*Ccl7*、*Cxcl1* が含まれていた(99-101)。これらの結果は、ホエイペプチドはアミノ酸混合物摂取よりも、素早く骨格筋修復を誘導する可能性を示唆するものである。さらに、RNA ポリメラーゼ II プロモーターからの転写の正の制御の GO term には骨格筋の発達に関与する重要な遺伝子群が含まれていた。そこで、我々はこの GO term に注目し、これらの遺伝子が関与する遺伝子ネットワークに注目して IPA を用いて解析を行った。その結果、細胞の発達に関与する遺伝子ネットワーク中に *Nr4a3*、*Nr4a1*、*Egr1* の転写因子が含まれており、これらの遺伝子は糖代謝と骨格筋タンパク質合成に関わる重要な酵素である Akt と相互作用を及ぼしていることが明らかになった(17, 33)。Morifuji ら(42)は運動後の糖質とホエイペプチドの同時摂取は Akt を活性化することで、糖質のみを摂取した場合よりも骨格筋グリコーゲンの回復量を高めることを報告している。今回の結果と併せて考えると、ホエイペプチド摂取による Akt の活性化が *Nr4a3*、*Nr4a1*、



*Egr1* の遺伝子発現亢進に関与している可能性が考えられた。また、これら3つの遺伝子はいずれも代謝に関与する遺伝子である(104, 110)。今回、細胞の発達に関与する遺伝子ネットワーク解析から、これらの遺伝子が糖代謝を制御する酵素であるヘキソキナーゼ(114)、ピルビン酸キナーゼ(115)、ホスホフルクトキナーゼ(116)と相互作用を及ぼしていることが示された。これらの結果を併せて考えると、これら3つの遺伝子発現の亢進が、ホエイペプチド摂取による骨格筋グリコーゲン増加効果に関与している可能性が示唆された。

ホエイペプチド摂取により発現減少した遺伝子群が関与する生理機能に関しても同様に Gene Ontology 解析を行い、9つの特異的な GO term を見出し、それらが2つのクラスターに分かれていることが示された。2つのクラスターのうちの1つには骨格筋繊維をコードする遺伝子である *Myh7*、*Tnni1*、*Tnnc1*、*Tnnt1* が含まれていた。これらの骨格筋繊維に関与する遺伝子群が含まれる遺伝子ネットワークについて解析を行った結果、骨格と筋組織の発達に関与する遺伝子群のネットワーク中にこれらのホエイペプチド摂取により発現が減少した遺伝子群が含まれる一方、発現亢進した遺伝子であり骨格筋繊維をコードする遺伝子である *Myh3* も含まれていることが明らかになった。げっ歯類の骨格筋はタイプ I、タイプ IIa、タイプ IIx、タイプ IIb の4種類の異なる筋繊維タイプから構成されている(117, 118)。遅筋繊維であるタイプ I 繊維は、最大発揮筋力は弱いものの長時間筋力発揮を持続可能である。また、多くのミトコンドリアを含んでおり、脂質代謝が活発である。速筋繊維であるタイプ IIx、タイプ IIb 繊維は短時間に強い筋力を発揮することができる。またミトコンドリア含量は低く、主に解糖系からエネルギーを産生する。タイプ IIa 繊維はこれらの中間的な繊維であり、両方の特徴を併せ持つ繊維である。興味深いことに、本研究でホエイペプチドによって発現減少した *Myh7*、*Tnni1*、*Tnnc1*、*Tnnt1* はいずれもタイ

型 I 繊維をコードする遺伝子である(117)。一方、ホエイペプチド摂取により発現亢進した *Myh3* は筋細胞の発達初期に発現することが知られている(119)。また、本研究においてホエイペプチド摂取により骨格筋における重要な転写因子である *Six1* の遺伝子発現が亢進していることを見出した。*Six1* は骨格筋組織を遅筋繊維から速筋繊維へと再構成することが報告されている(120)。本章では、我々は DNA マイクロアレイ解析に滑車上筋を用い、Western blotting 解析及び第三章での骨格筋タンパク質合成解析には上肢三頭筋を用いた。滑車上筋と上肢三頭筋はどちらも上肢筋であり、ラットの水泳運動時に主に使用される筋肉であることが報告されている(121)。加えて、どちらの筋肉も約 90%のタイプ II 繊維から構成される高度に速筋優位の筋肉である(122, 123)。つまり、滑車上筋と上肢三頭筋は同様の機能と筋繊維組成を有する筋肉であるといえる。これらを併せて考えると、本研究の結果から、ホエイペプチドは滑車上筋と上肢三頭筋における速筋繊維の比率をより高めることで運動後の骨格筋適応を促進する可能性が示唆された。

本研究において DNA マイクロアレイデータの解析から ERK1/2 と HIF-1 $\alpha$  の 2 つの因子が、ホエイペプチド摂取により発現変動した遺伝子のうち、それぞれ 9 遺伝子と 3 遺伝子の発現を調節していることを見出した。さらに、ホエイペプチド摂取によりアミノ酸混合物摂取と比較して、ERK1/2 のリン酸化量及び HIF-1 $\alpha$  の総タンパク質量が増加することが示された。これらの結果は、ホエイペプチドが ERK1/2 と HIF-1 $\alpha$  の活性化を介して遺伝子発現を調節している可能性を示唆するものである。ERK1/2 と HIF-1 $\alpha$  の遺伝子発現調節の作用メカニズムについて、本研究の結果から考えられる仮説を Fig. 4-10 に示した。ERK1/2 シグナル経路は骨格筋収縮後の転写の開始と伸長の調節に関与することが報告されている(112)。ERK1/2 と mTOR のシグナル経路の相互作用が知られている

が、栄養素の摂取が骨格筋タンパク質の再構成に与える効果は主に mTOR シグナルの活性化によるものであるとされている(33)。我々は第三章において、アミノ酸混合物を摂取した場合と比較してホエイペプチド摂取により mTOR シグナルが活性化されることを示した。Karlsson ら(78)はヒト試験において BCAA の摂取により ERK1/2 ではなく、mTOR シグナルの活性化を介して転写開始が活性化されることを報告している。しかし、本研究の結果は、ホエイペプチド摂取が mTOR シグナル経路と同様に ERK1/2 も活性化することを示すものである。また、Motobayashi ら(108)はアディポネクチンが ERK1/2 抑制を介して IGF-1 による細胞遊走を阻害することを報告している。本研究の結果と併せて考えると、ホエイペプチドは *Adipoq* の発現を抑制することで ERK1/2 の活性を保つ可能性が示唆された。一方、HIF-1 $\alpha$  は低酸素刺激に対する転写応答を調節している(124)。摂取する栄養素と HIF-1 $\alpha$  の活性については明らかになっていないが、本研究によりホエイペプチドが mTOR の活性化を介して HIF-1 $\alpha$  を活性化する可能性が示唆された。本研究により、摂取する栄養素が mTOR シグナル、ERK1/2 シグナルに与える効果に関する新たな知見が得られた。

さらに本研究において、HIF-1 $\alpha$ 、ERK1/2 によって発現調節される、*Nr4a3*(102)、*Junb*(103)、*Ankrd2*(125, 126)の3つの骨格筋肥大に関与する遺伝子の発現がホエイペプチド摂取により亢進していた。それゆえ、ホエイペプチド摂取によるこれらの遺伝子の発現亢進と骨格筋タンパク質合成の促進は相互に影響を及ぼしあっている可能性が考えられた。また、ホエイペプチドにより発現亢進した骨格筋修復に関与する遺伝子である *Ccl7* と *Hmox1* も ERK1/2 または HIF-1 $\alpha$  によって発現調節されている。損傷した骨格筋において、修復のためには *Ccl2* の発現が必要であることが知られているが、特に *Ccl2* 欠損時には *Ccl7* が同様に筋修復において重要な役割を果たすことが報告されている(100)。*Hmox1* の骨格筋

における役割はまだ不明な点が多いが、Pilegaard ら(111)は *Hmox1* が他の組織において果たす役割と同様に、運動後に発生するフリーラジカルからの細胞内損傷を減少させることで骨格筋において保護的な役割を果たしていると主張している。本研究において認められた、ホエイペプチドの摂取によるこれらの遺伝子発現の亢進は、ホエイペプチドが ERK1/2 と HIF-1 $\alpha$ の活性化を介して素早い骨格筋修復を誘導する可能性を示唆するものである。

本研究で用いたホエイペプチドとアミノ酸混合物のアミノ酸組成は同一であり、それぞれの群の血中アミノ酸濃度には差が認められなかったが、遺伝子発現に与える影響は両群間で異なっていることが示された。それゆえ、ホエイペプチド中に含まれるなんらかの活性物質が遺伝子発現に影響を与えた可能性が考えられた。第三章において、ホエイペプチド摂取により、骨格筋への糖取り込み促進活性を有する BCAA 含有ペプチドの血中濃度が上昇することを示した。これらのペプチドが遺伝子発現にも影響を及ぼすか否かについてはさらなる検討が必要である。

本章では、運動後のラット骨格筋を用いて、ホエイペプチド摂取によりアミノ酸混合物摂取と比較して発現が有意に変動する 189 遺伝子を同定した。さらに、ホエイペプチド摂取により発現変動した遺伝子の発現を調節する上流因子として ERK1/2 と HIF-1 $\alpha$ の 2 つのタンパク質を見出した。本研究により、ホエイペプチド摂取により ERK1/2 と HIF-1 $\alpha$ の活性化を介して遺伝子発現プロファイルの変化が誘導される可能性が初めて示された。本研究の結果は摂取 1 時間後の、比較的初期の遺伝子発現応答について検討したものであり、今後ホエイペプチドの作用メカニズムをより詳細に明らかにするためには、より長期間摂取した状態での遺伝子発現変化を検討することが必要である。

**Table 4-1.** FSR and plasma parameters. (Mean values and standard errors)

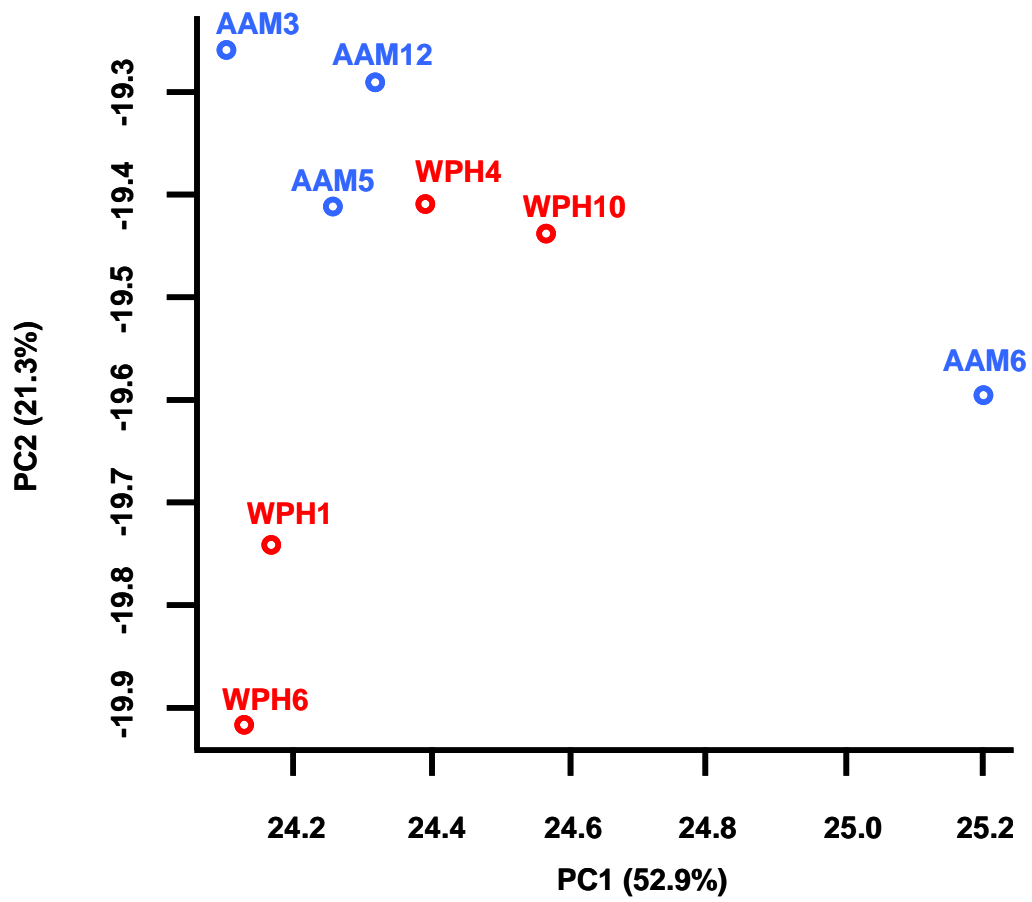
	AAM		WPH	
	Mean	SE	Mean	SE
<i>A. Rats ingested AAM or WPH after exercise (n = 8)</i>				
FSR (%/day)	5.8	0.3	6.9 *	0.1
Body weight (g)	169.6	2.0	169.9	2.1
Plasma Insulin (pmol/l)	107.9	20.1	147.9	20.4
Plasma TAA (mmol/l)	7.4	0.5	7.1	0.2
Plasma BCAA (mmol/l)	1.1	0.1	1.1	0.1
<i>B. Rats subjected to DNA microarray analysis (n = 4)</i>				
FSR (%/day)	5.8	0.2	6.9 *	0.1
Body weight (g)	166.7	1.2	172.0	2.7
Plasma Insulin (pmol/l)	83.3	13.6	126.9	11.3
Plasma TAA (mmol/l)	6.9	0.4	7.2	0.3
Plasma BCAA (mmol/l)	1.1	0.1	1.2	0.1

AAM, amino acids mixture; BCAA, branched-chain amino acids; TAA, total amino acids; WPH, whey protein hydrolysate

\*;  $P < 0.05$  (Student's *t*-test).

**Table 4-2.** ERK1/2 and/or HIF-1 $\alpha$  target genes that showed altered expression due to WPH administration compared to amino acids

Upstream Regulator	gene title	gene symbol	up/down	FDR
ERK1/2	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	<i>Nr4a3</i>	up	0
	early growth response 1	<i>Egr1</i>	up	0
	ankyrin repeat domain 2 (stretch responsive muscle)	<i>Ankrd2</i>	up	0.000824
	chemokine (C-C motif) ligand 7	<i>Ccl7</i>	up	0.002133
	jun B proto-oncogene	<i>Junb</i>	up	0.014278
	myelocytomatosis oncogene	<i>Myc</i>	up	0.027593
	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	<i>Serpine1</i>	up	0.040616
	adiponectin, C1Q and collagen domain containing	<i>Adipoq</i>	down	0.0076
	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	<i>Cdkn1a</i>	down	0.02713
	HIF-1 $\alpha$	heme oxygenase (decycling) 1	<i>Hmox1</i>	up
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1		<i>Nr4a1</i>	up	0.017517
serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1		<i>Serpine1</i>	up	0.040616



**Fig. 4-1.** Principal component analysis. AAM, amino acids mixture; WPH, whey protein hydrolysates.

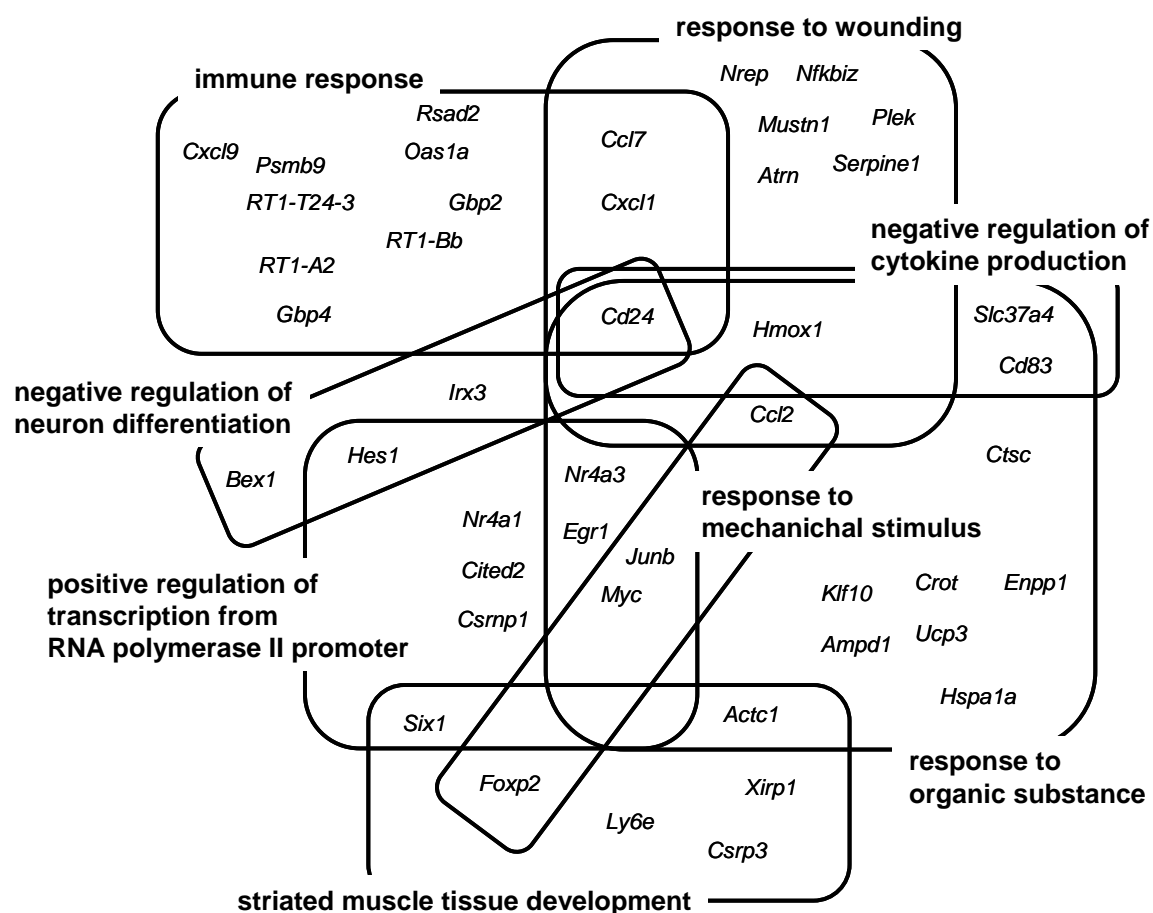
GO-ID	GO term	P-Value
0006955	immune response	7.80E-05
0001818	negative regulation of cytokine production	2.33E-03
0051252	regulation of RNA metabolic process	4.81E-03
0051254	positive regulation of RNA metabolic process	2.24E-03
0045893	positive regulation of transcription, DNA-dependent	2.08E-03
0045944	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	6.05E-03
0006357	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	7.72E-04
0006355	regulation of transcription, DNA-dependent	3.57E-03
0010628	positive regulation of gene expression	8.73E-03
0051960	regulation of nervous system development	5.00E-03
0045664	regulation of neuron differentiation	4.19E-03
0045665	negative regulation of neuron differentiation	3.48E-03
0010033	response to organic substance	5.35E-03
0009612	response to mechanical stimulus	5.31E-03
0009611	response to wounding	5.97E-03
0060537	muscle tissue development	8.47E-03
0014706	striated muscle tissue development	6.70E-03

**Fig. 4-2.** Significantly enriched Gene Ontology (GO) terms ( $P < 0.01$ ) found in the top 161 upregulated genes in the WPH group. WPH, whey protein hydrolysates.

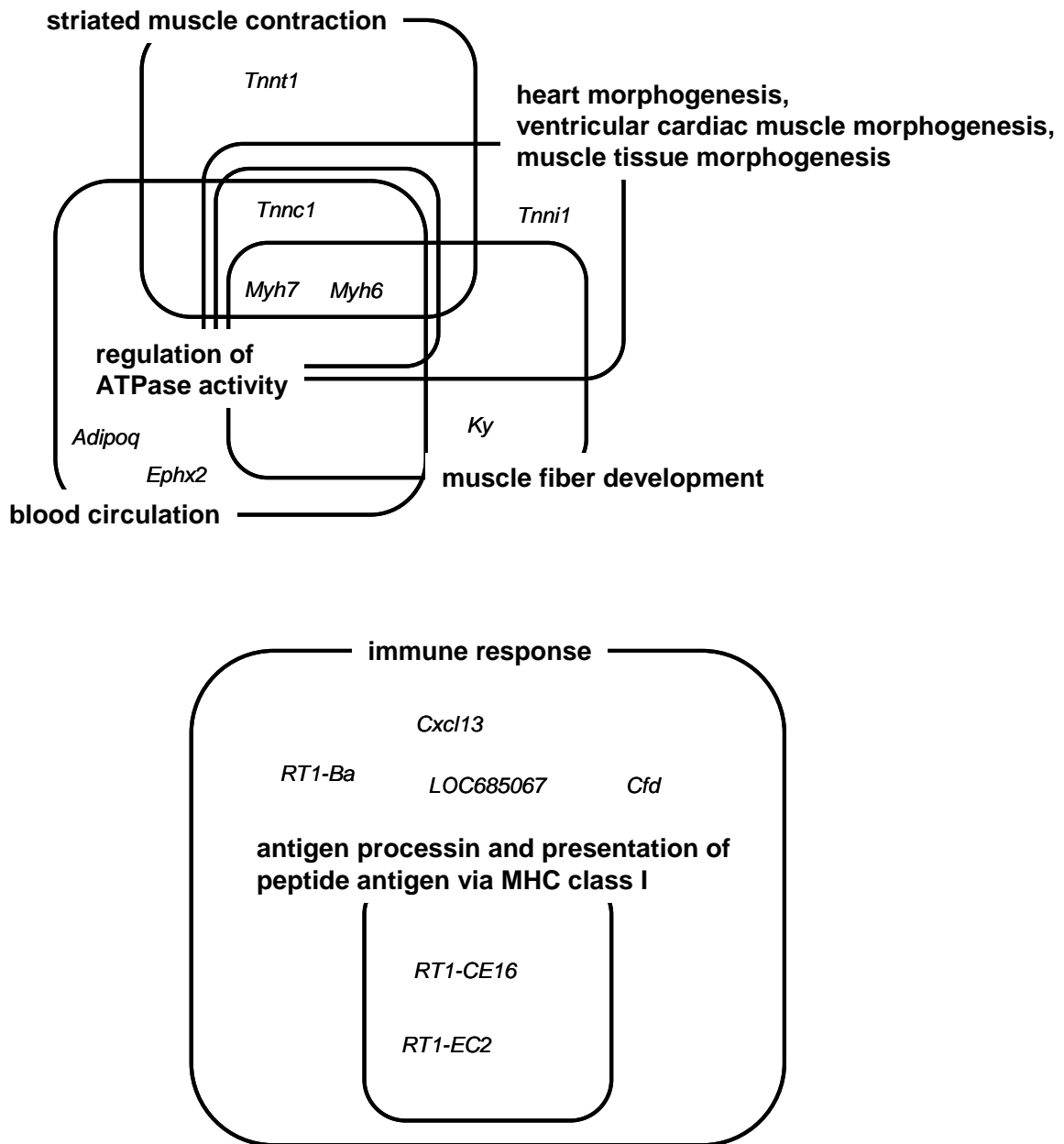


GO-ID	GO term	P-Value
0006955	immune response	3.24E-03
0019882	antigen processing and presentation	1.24E-03
0048002	antigen processing and presentation of peptide antigen	3.28E-04
0002474	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I	2.34E-03
0003012	muscle system process	8.79E-04
0006936	muscle contraction	5.52E-04
0006941	striated muscle contraction	2.46E-05
0003013	circulatory system process	4.45E-03
0008015	blood circulation	4.45E-03
0060537	muscle tissue development	2.59E-04
0014706	striated muscle tissue development	1.99E-04
0048738	cardiac muscle tissue development	1.86E-03
0055008	cardiac muscle tissue morphogenesis	1.89E-04
0055010	ventricular cardiac muscle morphogenesis	8.12E-05
0007517	muscle organ development	5.75E-04
0007522	visceral muscle development	9.11E-03
0060415	muscle tissue morphogenesis	1.89E-04
0003007	heart morphogenesis	3.16E-03
0048747	muscle fiber development	9.81E-03
0043462	regulation of ATPase activity	1.30E-03

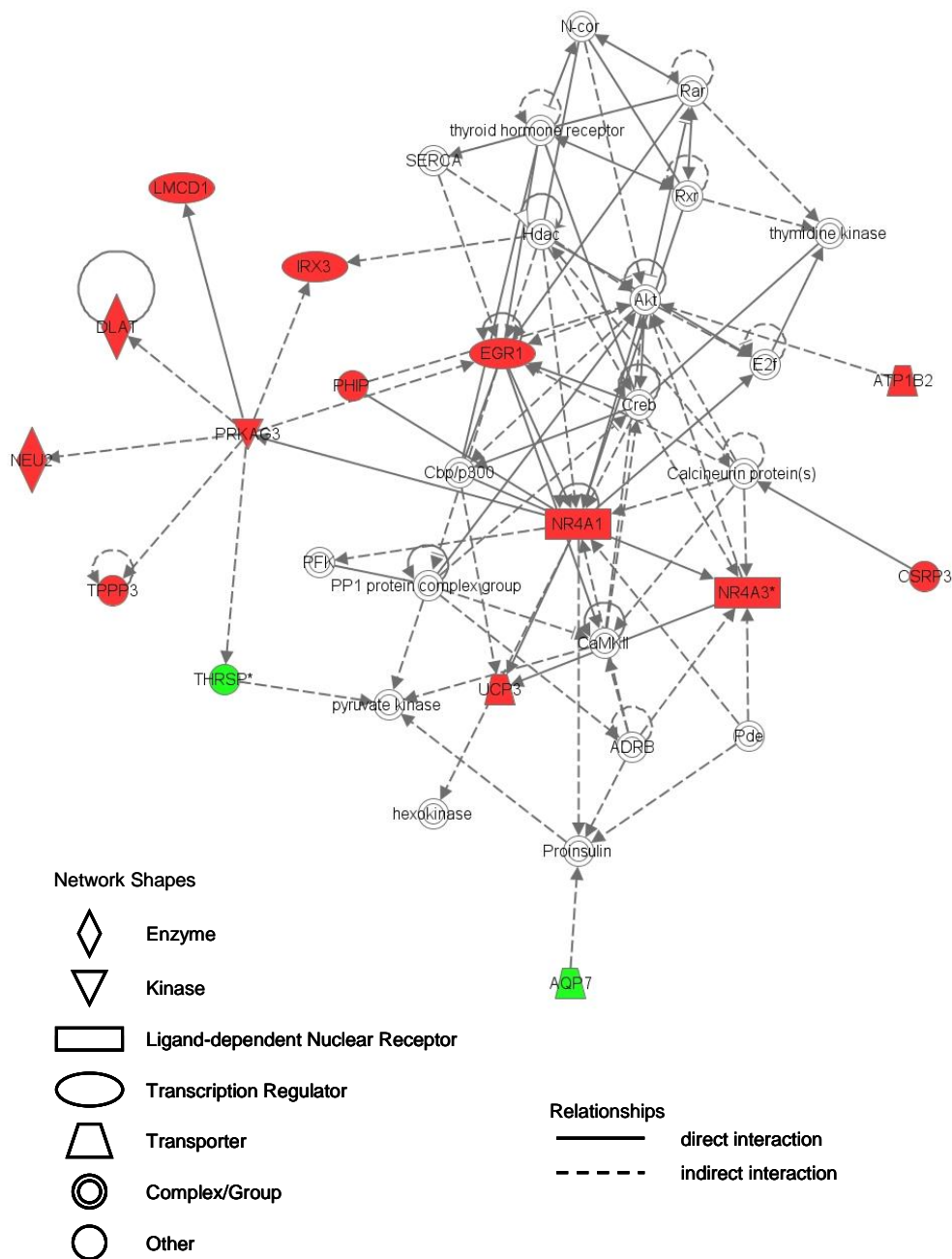
**Fig. 4-3.** Significantly enriched gene ontology (GO) terms ( $P < 0.01$ ) found in the top 70 downregulated genes in the WPH group. WPH, whey protein hydrolysates.



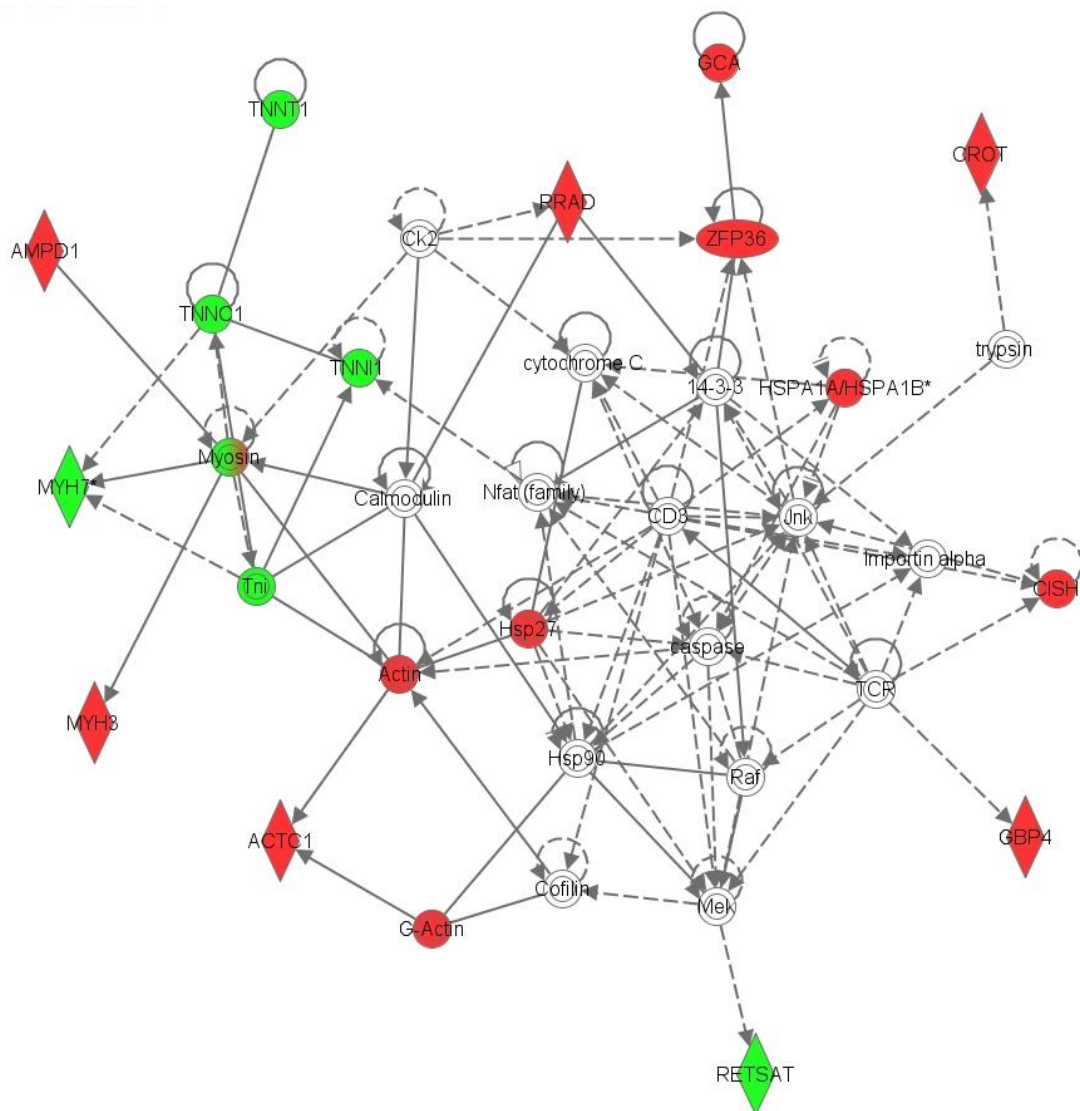
**Fig. 4-4.** Venn and Euler diagrams represent the association of upregulated genes with multiple GO terms by WPH. The genes are represented as gene symbols. WPH, whey protein hydrolysates.



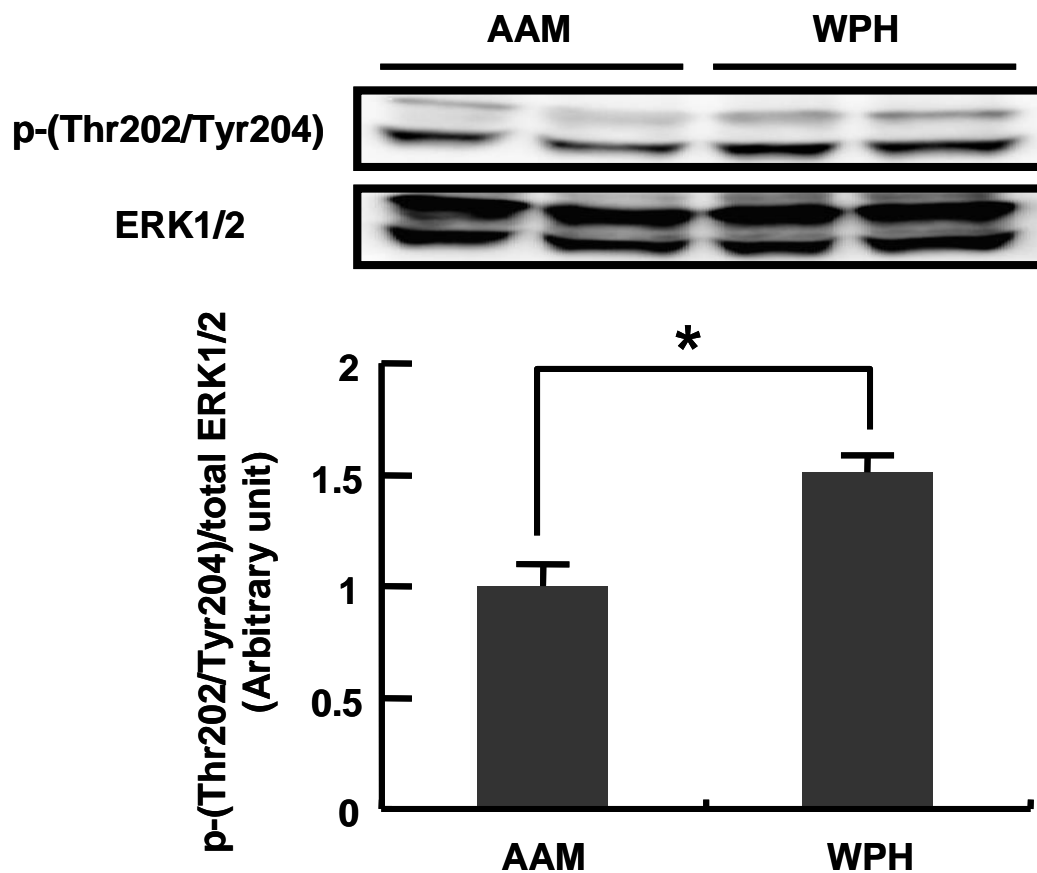
**Fig. 4-5.** Venn and Euler diagrams represent the association of downregulated genes with multiple GO terms by WPH. The genes are represented as gene symbols. WPH, whey protein hydrolysates.



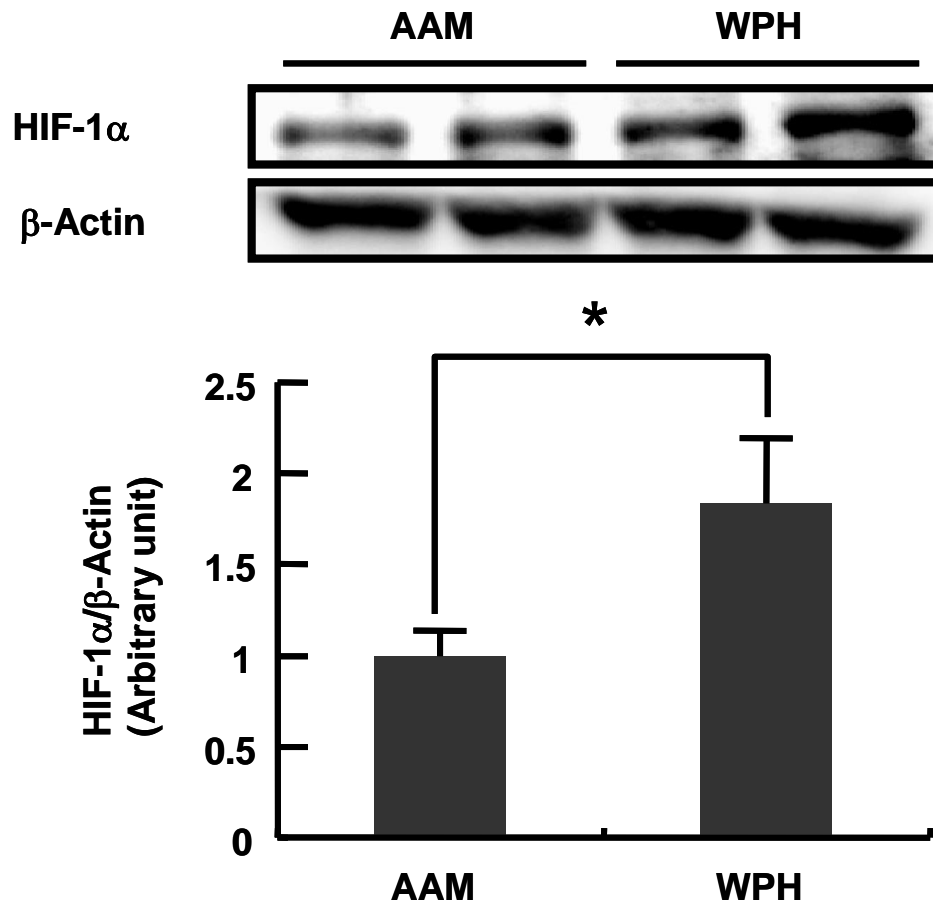
**Fig. 4-6.** Analysis of an IPA-generated gene network. The top functions of this network are cell cycle, cellular development, and lipid metabolism. The intensity of the node colour indicates the degree of up- (red) or downregulation (green). Nodes are displayed using various shapes that represent the functional class of the gene product.



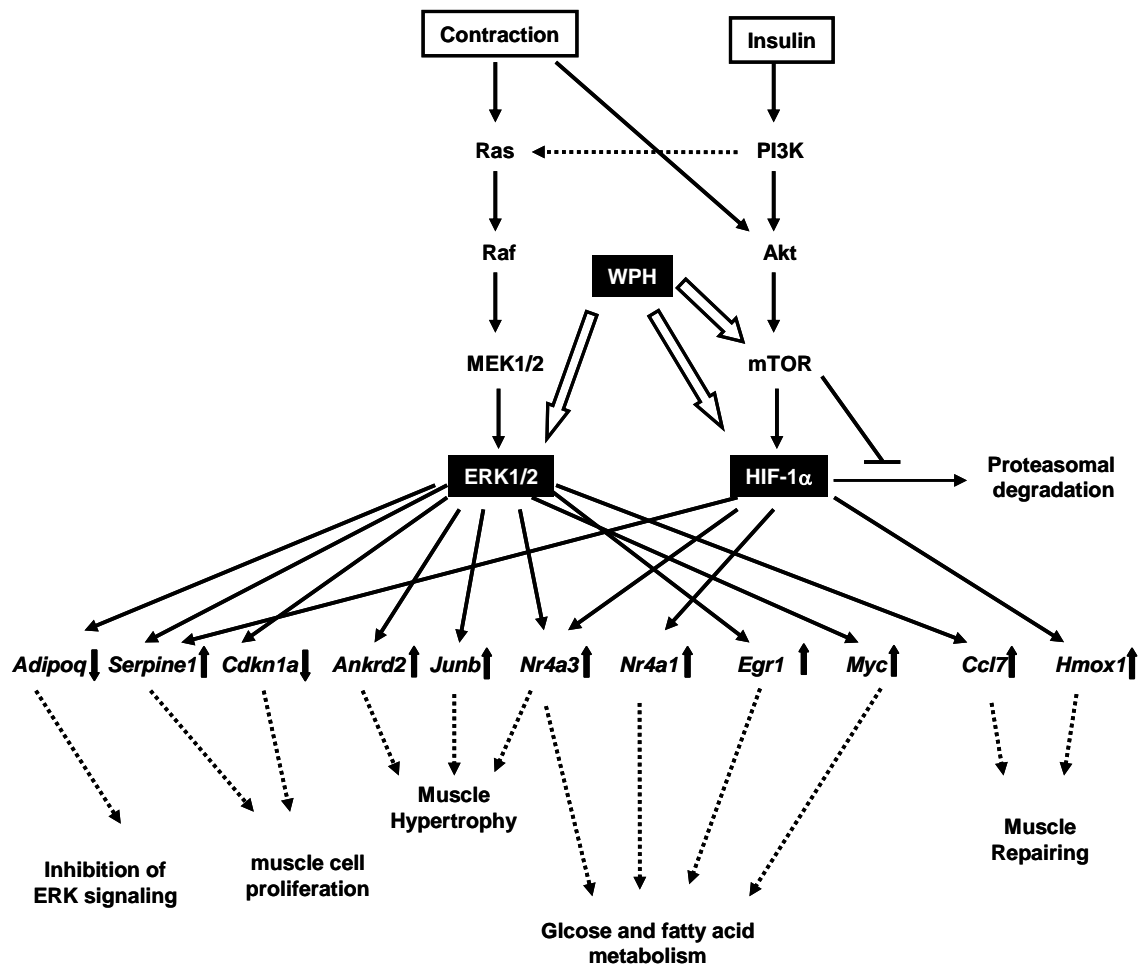
**Fig. 4-7.** Analysis of an IPA-generated gene network. The top functions of this network are organ morphology, skeletal and muscular system development and function, and cardiovascular disease. The intensity of the node colour indicates the degree of up- (red) or downregulation (green). Nodes are displayed using various shapes that represent the functional class of the gene product.



**Fig. 4-8.** Skeletal muscle phosphorylated ERK1/2 levels of rats administered WPH or AAM, measured 1 h after swimming. Phosphorylated ERK1/2 was normalized to total ERK1/2. The values are expressed as means and SE,  $n = 8$ . \*,  $P < 0.05$  (Student's *t*-test). AAM, amino acids mixture; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2; WPH, whey protein hydrolysates.



**Fig. 4-9.** Skeletal muscle HIF-1 $\alpha$  levels of rats administered WPH or AAM, measured 1 h after swimming. HIF-1 $\alpha$  was normalized to  $\beta$ -actin. The values are expressed as means and SE,  $n = 8$ . \*,  $P < 0.05$  (Student's  $t$ -test). AAM, amino acids mixture; HIF-1 $\alpha$ , hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ; WPH, whey protein hydrolysates.



**Fig. 4-10.** The possible pathway of regulation of gene expression by WPH via activation of ERK1/2 and HIF-1 $\alpha$ .



## 第五章 総合討論

運動後に摂取するタンパク質として広く用いられているホエイタンパク質は様々な生理機能を有することが知られているが、その生理機能にはホエイタンパク質中に豊富に含まれる BCAA、特にロイシンが重要な役割を果たしていると考えられてきた(37)。我々の先行研究において、Morifuji ら(42)は運動モデルラットを用いて、糖質とホエイペプチドの同時摂取はホエイタンパク質やBCAAとの同時摂取よりもグリコーゲン回復量を高めることを明らかにし、摂取するタンパク質の BCAA 量だけが重要なのではなく、タンパク質の分子形態も重要であることを示した。しかしながら、ホエイペプチドの生理機能については不明な点が多く、未分解のホエイタンパク質や BCAA と異なる作用を示すメカニズムに関する詳細な報告は無かった。

そこで、本研究ではまず第二章において、運動と組み合わせたホエイペプチドの長期的な摂取が骨格筋中グリコーゲン量に与える影響を調べた。その結果、ホエイペプチドの摂取により、グリコーゲン合成酵素が活性化されることで骨格筋グリコーゲン量が高まることが示唆された。さらに、統計的に有意な差は認められなかったものの、ホエイペプチド群は他の群よりも実測値として高い運動パフォーマンスを示し、ホエイペプチドの摂取により筋グリコーゲン量が増加し、運動パフォーマンスも増加したものと推定された。

第三章においては、運動後のホエイペプチドの摂取が骨格筋タンパク質合成と mTOR シグナリングに与える影響についてアミノ酸混合物の摂取を対照に比較検討した。ホエイペプチドの投与はアミノ酸よりも優れた骨格筋合成促進作用を示し、その作用メカニズムとして mTOR シグナルの活性化が関与している可能性が示された。

第四章においては、ホエイペプチドの作用メカニズムをさらに詳細に解明す

るために、ホエイペプチドが遺伝子発現に与える影響を、アミノ酸混合物摂取を対照として DNA マイクロアレイを用いて網羅的に比較解析を行い、発現変動遺伝子を同定するとともに、上流因子として ERK1/2 と HIF-1 $\alpha$ を見いだした。

第四章の遺伝子間ネットワーク解析の中で、細胞の発達に関与する遺伝子ネットワーク中に *Nr4a3*、*Nr4a1*、*Egr1* の転写因子が含まれており、これらの遺伝子は糖代謝と骨格筋タンパク質合成の両方に関わる重要な酵素である Akt と相互作用していることが明らかになった(17, 33)。Akt はインスリンの下流にあるシグナル因子であることが知られている(18)。第三章において、有意な差は認められなかったものの、ホエイペプチド摂取により血中インスリン濃度が実測値として高い値を示した。つまり、インスリン濃度が上昇し、Akt が活性化されることで、これらの 3 つの遺伝子の発現が亢進した可能性が考えられた。第二章において、ホエイペプチド摂取によりグリコーゲン合成酵素の脱リン酸化が生じることを示したが、Akt はグリコーゲン合成酵素をリン酸化する酵素である GSK-3 の活性を抑えることで、グリコーゲン合成酵素を活性化することが知られている(127, 128)。また、これら 3 つの遺伝子はいずれも代謝に関与する遺伝子であり(104, 110)、遺伝子ネットワーク解析から、これらの遺伝子が糖代謝を制御する酵素であるヘキソキナーゼ(114)、ピルビン酸キナーゼ(115)、ホスホフルクトキナーゼ(116)と相互作用していることが示された。ホエイペプチド摂取がこれらの酵素に及ぼす影響は不明であるが、我々の先行研究において Morifuji ら(35)はホエイタンパク質の摂取により、解糖系を調節する重要な酵素である 6-ホスホフルクトキナーゼの活性が低下することで筋グリコーゲン量が増加することを報告している。これらの結果を併せて考えると、これら 3 つの発現亢進遺伝子と Akt を含む相互ネットワークが、ホエイペプチド摂取による骨格筋グリコーゲン増加効果において重要な役割を果たしている可能性が示唆された

(Fig. 5-1)。

また骨格筋繊維をコードする発現変動遺伝子群を含む遺伝子ネットワークについても解析を行い、タイプ I 繊維をコードする遺伝子である *Myh7*、*Tnni1*、*Tnnc1*、*Tnnt1*(117)がホエイペプチド摂取により発現減少し、筋細胞の発達初期に発現する遺伝子である *Myh3*(119)が発現亢進していることを見出した。さらに、骨格筋組織を遅筋繊維から速筋繊維へと再構成する重要な転写因子である *Six1*(120)の遺伝子発現が亢進していることを見出した。第三章、第四章ではそれぞれ上肢三頭筋、滑車上筋をサンプルとして用いたが、どちらも上肢筋であり、ラットの泳運動時に主に使用される速筋優位の筋肉であることが報告されている(121-123)。第三章の結果と第四章の結果を併せて考えると、運動後のホエイペプチドの摂取は骨格筋タンパク質合成速度を高めて骨格筋肥大を引き起こすだけでなく、骨格筋組織における速筋繊維の比率をより高めることで運動後の骨格筋適応を促進する可能性が示唆された。さらに、第二章においてホエイペプチドの摂取により運動パフォーマンスの向上の可能性が示唆されたことから、骨格筋繊維組成の変化が運動パフォーマンスに影響を及ぼした可能性が考えられた。食事成分が骨格筋の繊維タイプ移行に与える影響について、Nakazato ら(129)はリンゴポリフェノールの摂取により、骨格筋の繊維タイプ移行が誘導される可能性を示唆している。しかしながら、摂取するタンパク質の種類、分子形態の違いが骨格筋繊維タイプに与える影響については報告がない。今後、ホエイペプチドの摂取が骨格筋繊維タイプ移行に与える影響についてさらなる検討が必要である。

第四章において、ホエイペプチドの作用メカニズムを詳細に明らかにするため、発現変動遺伝子の上流因子を解析した結果、ホエイペプチドが ERK1/2 と

HIF-1 $\alpha$ の活性化を介して遺伝子発現を調節している可能性が示された。ERK1/2 シグナル経路は mTOR シグナル経路と同様に、骨格筋収縮後の転写の開始と伸長の調節に関与することが報告されている(112)。ERK1/2 と mTOR のシグナル経路の相互作用が知られているが、栄養素の摂取が骨格筋タンパク質の再構成に与える効果は主に mTOR シグナルの活性化によるものであると言われている(33, 78)。しかし、第三章、第四章の結果を併せて考えると、ホエイペプチド摂取により mTOR シグナルだけでなく、ERK1/2 シグナルも活性化されることで、アミノ酸摂取よりも優れた骨格筋タンパク質合成促進効果が引き起こされる可能性が示唆された。つまり、本研究により、栄養素と mTOR シグナル、ERK1/2 シグナルの関係性について、新たな知見が得られたと考えられる。一方、HIF-1 $\alpha$ は低酸素刺激に対する転写応答を調節している(124)。通常状態下では、HIF-1 $\alpha$ はプロリン残基がヒドロキシル化されることで分解されている(130)。低酸素状態下では、HIF-1 $\alpha$ は安定化し、核内に移行後、HIF-1 $\beta$ と二量体を形成し、低酸素誘導遺伝子の転写を活性化する(131)。摂取する栄養素と HIF-1 $\alpha$ の活性との関係については明らかになっていないが、HIF-1 $\alpha$ の機能は mTOR によって調節されていることが報告されている(124)。つまり、第三章と第四章の結果を併せて考えると、ホエイペプチドが mTOR の活性化を介して HIF-1 $\alpha$ を活性化し、遺伝子発現を調節する可能性が示唆された。これらの知見はホエイペプチドの新たな作用メカニズムを明らかにするとともに、摂取する栄養成分が HIF-1 $\alpha$ の活性化を刺激するという初めての報告である。

本研究の第三章においてホエイペプチド摂取により、骨格筋タンパク質合成速度が増加することを見出し、さらに第四章において、HIF-1 $\alpha$ 、ERK1/2 によって発現調節される、*Nr4a3*(102)、*Junb*(103)、*Ankrd2*(125, 126)の3つの骨格筋肥大に関与する遺伝子の発現がホエイペプチド摂取により亢進していることを見出

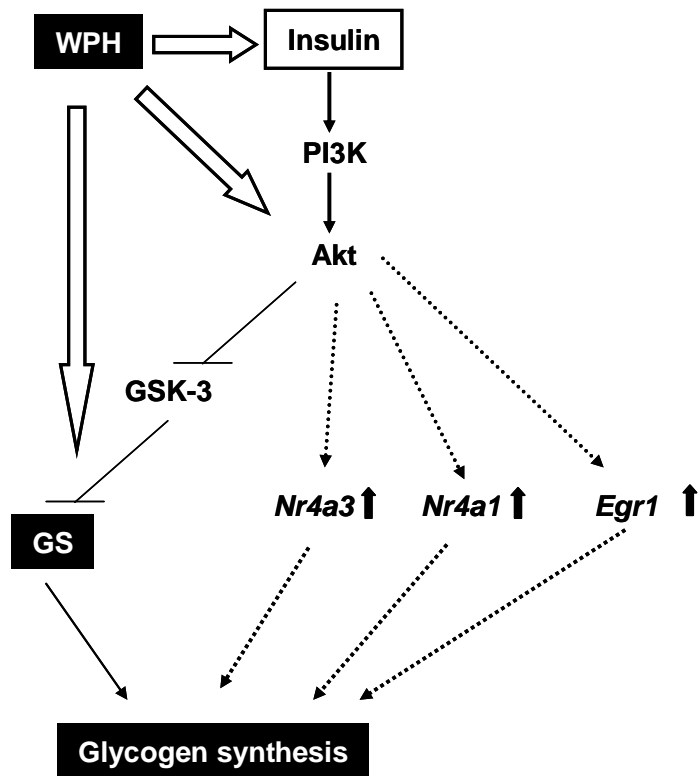
した。併せて考えると、ホエイペプチド摂取により mTOR シグナルの活性化を介した骨格筋タンパク質合成が促進されるだけでなく、これらの遺伝子の発現も亢進することで骨格筋の肥大が誘導される可能性が考えられた (**Fig. 5-2**)。また、これらの遺伝子発現により骨格筋量が増加することで、第二章において示唆された運動パフォーマンスの向上が引き起こされた可能性も考えられる。今後、ホエイペプチドの摂取によって、実際に筋肥大が誘導され、筋量や筋力の増加が認められるのかどうか、検討をおこなう必要があると考えられる。

近年、Poullain ら(38, 39)はラットを用いた研究においてペプチドは遊離のアミノ酸よりも効率的に生体で利用されることを示した。また、特定のペプチドが生体内でアミノ酸とは異なる特徴的な生理機能を示すことも報告されている。たとえば、Hirota ら(132)はカゼイン由来のペプチド IPP、VPP がアンジオテンシン転換酵素阻害活性を示すことから高血圧症状を緩和することを報告している。我々はホエイペプチドにも、特徴的な生理機能があると仮説を立て、本研究では同じアミノ酸組成のアミノ酸混合物の摂取と比較することで、ホエイペプチドの生理機能と作用メカニズムを明らかにしてきた。すなわち、第二章ではグリコーゲン合成酵素を活性化し、骨格筋グリコーゲン量を高めることを、第三章では mTOR シグナルを活性化し骨格筋タンパク質合成速度を高めることを、第四章では遺伝子発現プロファイルの詳細を示した。しかしながら、ホエイペプチドが同じ組成のアミノ酸混合物よりも優れた作用を示す、その活性本体は明らかになっていない。我々の先行研究において Morifuji ら(41)はホエイペプチド中に含まれる BCAA を含むジペプチドにロイシンと同様の骨格筋への糖取り込み促進作用があることを見出した。また、そのメカニズムには PI3 キナーゼ、PKC $\zeta$ 、Akt の活性化を介した GLUT4 の細胞膜移行が関わっている可能性を示し(42, 133)、実際にラットを用いてホエイペプチドの摂取により PKC $\zeta$ 、Akt が活

活性化されることを見出した。本研究においても第四章において遺伝子間ネットワーク解析の結果ホエイペプチド摂取による遺伝子発現の変動に Akt が関わっている可能性が示唆された。また第三章において mTOR シグナルの活性化を示したが、Akt は mTOR の上流因子の一つである(33)。これらの結果を併せて考えると、本研究によって示されたホエイペプチドの生理機能の発現には、BCAA 含有ジペプチドによる Akt の活性化が関与しているかもしれない。しかしながら、第三章において、ホエイペプチド摂取後の BCAA 含有ジペプチドの血中濃度を測定した結果、アミノ酸と比較して極めて低いものであった。これらのジペプチドが低濃度でもアミノ酸と同等以上の生理機能を発揮するのか、それとも他に活性本体であるペプチドが存在するのか、さらなる検討が必要である。

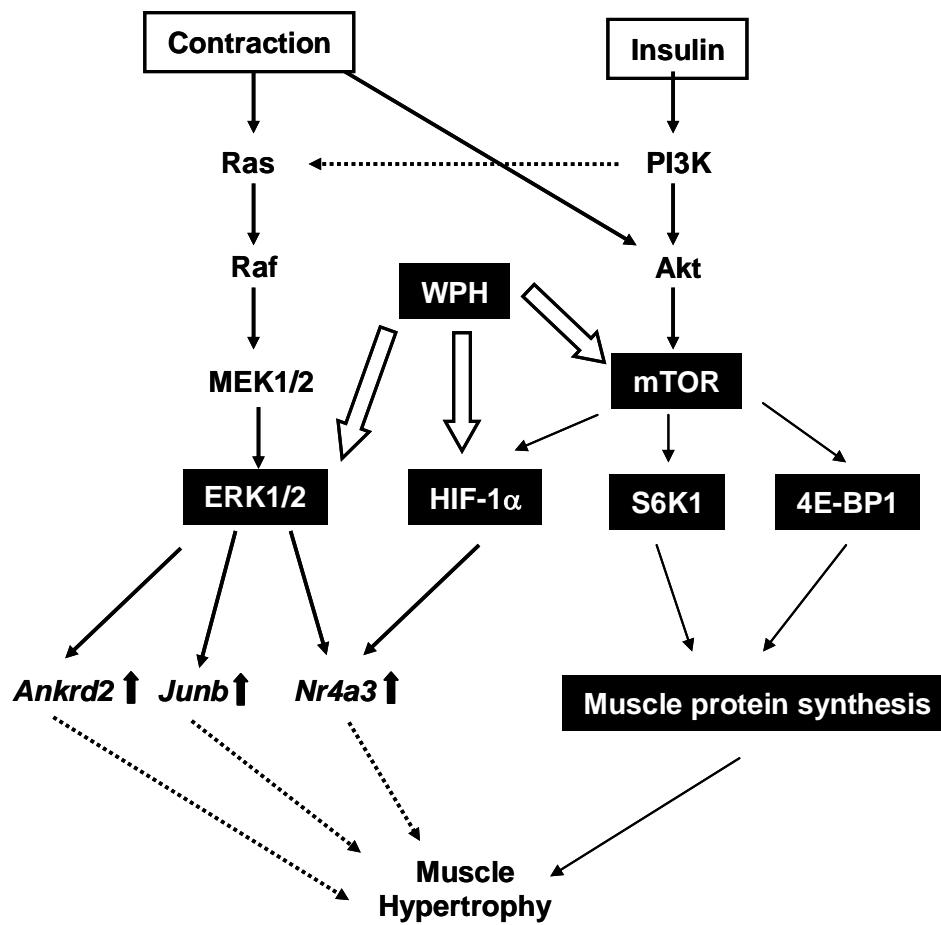
また、本論文の第三章においてホエイペプチド群が最も高い血中インスリン濃度を示し、インスリンを介したシグナル伝達がホエイペプチドの生理機能の発現に重要である可能性が示唆された。タンパク質の摂取により血中インスリン濃度が上昇することは良く知られているが、作用メカニズムとしてロイシンを含めた特定のアミノ酸は膵臓の $\beta$ 細胞に作用し、インスリンを分泌させることが知られている(134, 135)。さらに、近年では栄養摂取によるインスリン分泌には小腸から分泌されるインクレチンである GLP-1 (glucagon-like peptide-1) と GIP (glucose-dependent insulintropic polypeptide) が重要であることが知られるようになり(136)、摂取するタンパク質の違いによってインクレチンの応答が異なることが報告されている(137)。ホエイペプチド中に含まれるペプチドにも、膵臓 $\beta$ 細胞に作用してインスリン分泌を促進させる作用、あるいは小腸細胞に作用してインクレチン分泌を促進させることでインスリン分泌を増加させる作用があるのか、細胞レベルでの検討をおこない明らかにしていく必要がある。

骨格筋はヒトの運動をつかさどる組織であり、運動選手にとって筋肉が重要であることはいうまでも無い。一方で、骨格筋は健康寿命を保つという観点から、全てのヒトにとって重要な組織でもある。骨格筋量を増加させるためには運動と組み合わせてタンパク質、アミノ酸を摂取することが重要であることが知られている。近年では、運動選手を用いた研究に留まらず、高齢者を用いた研究において、サルコペニアの予防に運動と組み合わせてタンパク質を摂取することが効果的であることが報告されている(138)。タンパク質、アミノ酸摂取による効果は、ロイシンが重要な役割を果たしていると考えられ、Kobayashiら(139)はロイシンを高配合したアミノ酸混合物の摂取が骨格筋肥大に効果的であると主張している。しかし、一定量以上のロイシンを摂取しても骨格筋タンパク質合成には影響がなく、過剰にロイシンを摂取する効果はないという報告もある(140)。本研究の結果は、摂取するタンパク質のロイシン含量のみに注目するのではなく、その分子形態も生理機能の発現に重要であることを示すものであり、ホエイペプチドが骨格筋グリコーゲンを高めるため、あるいは骨格筋タンパク質合成を高めるためのサプリメントとして効果的であることが示された。今後、さらにホエイペプチドの活性本体を明らかにしていくことで、運動選手にとって効果的なサプリメントの開発に繋がるだけでなく、高齢者のQOL維持、健康寿命の延長に効果的な健康食品の開発に繋がることが期待される。



**Fig. 5-1.** Possible effects of WPH on muscle glycogen synthesis.





**Fig. 5-2.** Possible effects of WPH on skeletal muscle hypertrophy.

## 参考文献

1. Evans WJ. What is sarcopenia? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1995; 50 Spec No: 5-8.
2. Roubenoff R, Castaneda C. Sarcopenia-understanding the dynamics of aging muscle. *JAMA*. 2001; 286: 1230-1.
3. Lexell J. Human aging, muscle mass, and fiber type composition. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1995; 50 Spec No: 11-6.
4. Holloszy JO. The biology of aging. *Mayo Clin Proc*. 2000; 75 Suppl: S3-8; discussion S-9.
5. Melton LJ, 3rd, Khosla S, Crowson CS, O'Connor MK, O'Fallon WM, Riggs BL. Epidemiology of sarcopenia. *J Am Geriatr Soc*. 2000; 48: 625-30.
6. 川中健太郎. 運動・スポーツと糖質代謝. *臨床スポーツ医学*. 2009; 26 (臨時増刊号) : 13-29.
7. Holloszy JO. Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity. *J Appl Physiol (1985)*. 2005; 99: 338-43.
8. Hermansen L, Hultman E, Saltin B. Muscle glycogen during prolonged severe exercise. *Acta Physiol Scand*. 1967; 71: 129-39.
9. Karlsson J, Saltin B. Diet, muscle glycogen, and endurance performance. *J Appl Physiol*. 1971; 31: 203-6.
10. Zawadzki KM, Yaspelkis BB, 3rd, Ivy JL. Carbohydrate-protein complex increases the rate of muscle glycogen storage after exercise. *J Appl Physiol*. 1992; 72: 1854-9.
11. van Loon LJ, Saris WH, Kruijshoop M, Wagenmakers AJ. Maximizing postexercise muscle glycogen synthesis: carbohydrate supplementation and the

application of amino acid or protein hydrolysate mixtures. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72: 106-11.

12. Tarnopolsky MA, Bosman M, Macdonald JR, Vandeputte D, Martin J, Roy BD. Postexercise protein-carbohydrate and carbohydrate supplements increase muscle glycogen in men and women. *J Appl Physiol* (1985). 1997; 83: 1877-83.

13. Jentjens RL, van Loon LJ, Mann CH, Wagenmakers AJ, Jeukendrup AE. Addition of protein and amino acids to carbohydrates does not enhance postexercise muscle glycogen synthesis. *J Appl Physiol* (1985). 2001; 91: 839-46.

14. Ivy JL, Goforth HW, Jr., Damon BM, McCauley TR, Parsons EC, Price TB. Early postexercise muscle glycogen recovery is enhanced with a carbohydrate-protein supplement. *J Appl Physiol.* 2002; 93: 1337-44.

15. Berardi JM, Price TB, Noreen EE, Lemon PW. Postexercise muscle glycogen recovery enhanced with a carbohydrate-protein supplement. *Med Sci Sports Exerc.* 2006; 38: 1106-13.

16. Doi M, Yamaoka I, Nakayama M, Mochizuki S, Sugahara K, Yoshizawa F. Isoleucine, a blood glucose-lowering amino acid, increases glucose uptake in rat skeletal muscle in the absence of increases in AMP-activated protein kinase activity. *J Nutr.* 2005; 135: 2103-8.

17. Peyrollier K, Hajduch E, Blair AS, Hyde R, Hundal HS. L-leucine availability regulates phosphatidylinositol 3-kinase, p70 S6 kinase and glycogen synthase kinase-3 activity in L6 muscle cells: evidence for the involvement of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway in the L-leucine-induced up-regulation of system A amino acid transport. *Biochem J.* 2000; 350 Pt 2: 361-8.

18. Nishitani S, Matsumura T, Fujitani S, Sonaka I, Miura Y, Yagasaki K. Leucine promotes glucose uptake in skeletal muscles of rats. *Biochem Biophys Res Commun.*

2002; 299: 693-6.

19. Nishitani S, Ijichi C, Takehana K, Fujitani S, Sonaka I. Pharmacological activities of branched-chain amino acids: specificity of tissue and signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 313: 387-9.

20. Welle S, Thornton C, Statt M, McHenry B. Postprandial myofibrillar and whole body protein synthesis in young and old human subjects. *Am J Physiol.* 1994; 267: E599-604.

21. Yarasheski KE, Zachwieja JJ, Bier DM. Acute effects of resistance exercise on muscle protein synthesis rate in young and elderly men and women. *Am J Physiol.* 1993; 265: E210-4.

22. Hasten DL, Pak-Loduca J, Obert KA, Yarasheski KE. Resistance exercise acutely increases MHC and mixed muscle protein synthesis rates in 78-84 and 23-32 yr olds. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000; 278: E620-6.

23. Chesley A, MacDougall JD, Tarnopolsky MA, Atkinson SA, Smith K. Changes in human muscle protein synthesis after resistance exercise. *J Appl Physiol* (1985). 1992; 73: 1383-8.

24. Dreyer HC, Fujita S, Cadenas JG, Chinkes DL, Volpi E, Rasmussen BB. Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle. *J Physiol.* 2006; 576: 613-24.

25. Biolo G, Maggi SP, Williams BD, Tipton KD, Wolfe RR. Increased rates of muscle protein turnover and amino acid transport after resistance exercise in humans. *Am J Physiol.* 1995; 268: E514-20.

26. Phillips SM, Tipton KD, Aarsland A, Wolf SE, Wolfe RR. Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. *Am J Physiol.* 1997; 273: E99-107.

27. Carraro F, Stuart CA, Hartl WH, Rosenblatt J, Wolfe RR. Effect of exercise and recovery on muscle protein synthesis in human subjects. *Am J Physiol.* 1990; 259: E470-6.
28. Kobayashi H, Borsheim E, Anthony TG, Traber DL, Badalamenti J, Kimball SR, et al. Reduced amino acid availability inhibits muscle protein synthesis and decreases activity of initiation factor eIF2B. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 284: E488-98.
29. Bohe J, Low A, Wolfe RR, Rennie MJ. Human muscle protein synthesis is modulated by extracellular, not intramuscular amino acid availability: a dose-response study. *J Physiol.* 2003; 552: 315-24.
30. Biolo G, Tipton KD, Klein S, Wolfe RR. An abundant supply of amino acids enhances the metabolic effect of exercise on muscle protein. *Am J Physiol.* 1997; 273: E122-9.
31. Volpi E, Kobayashi H, Sheffield-Moore M, Mittendorfer B, Wolfe RR. Essential amino acids are primarily responsible for the amino acid stimulation of muscle protein anabolism in healthy elderly adults. *Am J Clin Nutr.* 2003; 78: 250-8.
32. Anthony JC, Yoshizawa F, Anthony TG, Vary TC, Jefferson LS, Kimball SR. Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J Nutr.* 2000; 130: 2413-9.
33. Drummond MJ, Dreyer HC, Fry CS, Glynn EL, Rasmussen BB. Nutritional and contractile regulation of human skeletal muscle protein synthesis and mTORC1 signaling. *J Appl Physiol.* 2009; 106: 1374-84.
34. Blomstrand E, Eliasson J, Karlsson HK, Kohnke R. Branched-chain amino acids activate key enzymes in protein synthesis after physical exercise. *J Nutr.* 2006; 136: 269S-73S.

35. Morifuji M, Sakai K, Sanbongi C, Sugiura K. Dietary whey protein increases liver and skeletal muscle glycogen levels in exercise-trained rats. *Br J Nutr.* 2005; 93: 439-45.
36. Tang JE, Moore DR, Kujbida GW, Tarnopolsky MA, Phillips SM. Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. *J Appl Physiol* (1985). 2009; 107: 987-92.
37. Norton LE, Layman DK, Bunpo P, Anthony TG, Brana DV, Garlick PJ. The leucine content of a complete meal directs peak activation but not duration of skeletal muscle protein synthesis and mammalian target of rapamycin signaling in rats. *J Nutr.* 2009; 139: 1103-9.
38. Poullain MG, Cezard JP, Marche C, Roger L, Mendy F, Broyart JP. Dietary whey proteins and their peptides or amino acids: effects on the jejunal mucosa of starved rats. *Am J Clin Nutr.* 1989; 49: 71-6.
39. Poullain MG, Cezard JP, Roger L, Mendy F. Effect of whey proteins, their oligopeptide hydrolysates and free amino acid mixtures on growth and nitrogen retention in fed and starved rats. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1989; 13: 382-6.
40. Manninen AH. Protein hydrolysates in sports nutrition. *Nutr Metab (Lond).* 2009; 6: 38.
41. Morifuji M, Koga J, Kawanaka K, Higuchi M. Branched-chain amino acid-containing dipeptides, identified from whey protein hydrolysates, stimulate glucose uptake rate in L6 myotubes and isolated skeletal muscles. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2009; 55: 81-6.
42. Morifuji M, Kanda A, Koga J, Kawanaka K, Higuchi M. Post-exercise carbohydrate plus whey protein hydrolysates supplementation increases skeletal muscle

glycogen level in rats. *Amino Acids*. 2010; 38: 1109-15.

43. 藤田聡. 加齢と筋. *運動生理学のニューエビデンス*. 宮村実春 編, 東京, 真興交易医書出版部, 2010: 114-22.

44. Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Gastaldelli A, Horowitz JF, Endert E, et al. Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am J Physiol*. 1993; 265: E380-91.

45. Bergstrom J, Hermansen L, Hultman E, Saltin B. Diet, muscle glycogen and physical performance. *Acta Physiol Scand*. 1967; 71: 140-50.

46. Bogardus C, Lillioja S, Stone K, Mott D. Correlation between muscle glycogen synthase activity and in vivo insulin action in man. *J Clin Invest*. 1984; 73: 1185-90.

47. Cartee GD, Young DA, Sleeper MD, Zierath J, Wallberg-Henriksson H, Holloszy JO. Prolonged increase in insulin-stimulated glucose transport in muscle after exercise. *Am J Physiol*. 1989; 256: E494-9.

48. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993; 123: 1939-51.

49. Murase T, Haramizu S, Shimotoyodome A, Nagasawa A, Tokimitsu I. Green tea extract improves endurance capacity and increases muscle lipid oxidation in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 288: R708-15.

50. Ishihara K, Yamada A, Mita Y, Goto A, Ishimi T, Mabuchi H, et al. Improved swimming pool achieves higher reproducibility and sensitivity to effect of food components as ergogenic AIDS. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2009; 55: 301-8.

51. Mizunoya W, Oyaizu S, Ishihara K, Fushiki T. Protocol for measuring the endurance capacity of mice in an adjustable-current swimming pool. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2002; 66: 1133-6.

52. Bradstreet RB. Kjeldahl method for organic nitrogen. *Anal Chem.* 1954; 26: 185-7.
53. Danforth WH. Glycogen Synthetase Activity in Skeletal Muscle. Interconversion of Two Forms and Control of Glycogen Synthesis. *J Biol Chem.* 1965; 240: 588-93.
54. Passonneau JV, Lauderdale VR. A comparison of three methods of glycogen measurement in tissues. *Anal Biochem.* 1974; 60: 405-12.
55. Parker PJ, Caudwell FB, Cohen P. Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle; effect of insulin on the state of phosphorylation of the seven phosphoserine residues in vivo. *Eur J Biochem.* 1983; 130: 227-34.
56. Skurat AV, Roach PJ. Phosphorylation of sites 3a and 3b (Ser640 and Ser644) in the control of rabbit muscle glycogen synthase. *J Biol Chem.* 1995; 270: 12491-7.
57. Conlee RK, Hickson RC, Winder WW, Hagberg JM, Holloszy JO. Regulation of glycogen resynthesis in muscles of rats following exercise. *Am J Physiol.* 1978; 235: R145-50.
58. McCoy M, Proietto J, Hargreaves M. Skeletal muscle GLUT-4 and postexercise muscle glycogen storage in humans. *J Appl Physiol.* 1996; 80: 411-5.
59. Nakatani A, Han DH, Hansen PA, Nolte LA, Host HH, Hickner RC, et al. Effect of endurance exercise training on muscle glycogen supercompensation in rats. *J Appl Physiol.* 1997; 82: 711-5.
60. Armstrong JL, Bonavaud SM, Toole BJ, Yeaman SJ. Regulation of glycogen synthesis by amino acids in cultured human muscle cells. *J Biol Chem.* 2001; 276: 952-6.
61. Morifuji M, Ishizaka M, Baba S, Fukuda K, Matsumoto H, Koga J, et al. Comparison of different sources and degrees of hydrolysis of dietary protein: effect on



plasma amino acids, dipeptides, and insulin responses in human subjects. *J Agric Food Chem.* 2010; 58: 8788-97.

62. Davis TA, Karl IE. Response of muscle protein turnover to insulin after acute exercise and training. *Biochem J.* 1986; 240: 651-7.

63. Dohm GL, Kasperek GJ, Tapscott EB, Beecher GR. Effect of exercise on synthesis and degradation of muscle protein. *Biochem J.* 1980; 188: 255-62.

64. Gautsch TA, Anthony JC, Kimball SR, Paul GL, Layman DK, Jefferson LS. Availability of eIF4E regulates skeletal muscle protein synthesis during recovery from exercise. *Am J Physiol.* 1998; 274: C406-14.

65. Williamson DL, Kubica N, Kimball SR, Jefferson LS. Exercise-induced alterations in extracellular signal-regulated kinase 1/2 and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling to regulatory mechanisms of mRNA translation in mouse muscle. *J Physiol.* 2006; 573: 497-510.

66. Anthony JC, Lang CH, Crozier SJ, Anthony TG, MacLean DA, Kimball SR, et al. Contribution of insulin to the translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002; 282: E1092-101.

67. Crozier SJ, Kimball SR, Emmert SW, Anthony JC, Jefferson LS. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *J Nutr.* 2005; 135: 376-82.

68. Anthony TG, McDaniel BJ, Knoll P, Bunpo P, Paul GL, McNurlan MA. Feeding meals containing soy or whey protein after exercise stimulates protein synthesis and translation initiation in the skeletal muscle of male rats. *J Nutr.* 2007; 137: 357-62.

69. Sonou T, Higuchi M, Terada S. An acute bout of high-intensity intermittent swimming induces glycogen supercompensation in rat skeletal muscle. *European Journal of Sport Science.* 2008; 8: 413-20.

70. Bark TH, McNurlan MA, Lang CH, Garlick PJ. Increased protein synthesis after acute IGF-I or insulin infusion is localized to muscle in mice. *Am J Physiol.* 1998; 275: E118-23.
71. Escobar J, Frank JW, Suryawan A, Nguyen HV, Kimball SR, Jefferson LS, et al. Physiological rise in plasma leucine stimulates muscle protein synthesis in neonatal pigs by enhancing translation initiation factor activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005; 288: E914-21.
72. Anthony JC, Anthony TG, Layman DK. Leucine supplementation enhances skeletal muscle recovery in rats following exercise. *J Nutr.* 1999; 129: 1102-6.
73. Koopman R, Wagenmakers AJ, Manders RJ, Zorenc AH, Senden JM, Gorselink M, et al. Combined ingestion of protein and free leucine with carbohydrate increases postexercise muscle protein synthesis in vivo in male subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005; 288: E645-53.
74. Byfield MP, Murray JT, Backer JM. hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *J Biol Chem.* 2005; 280: 33076-82.
75. Findlay GM, Yan L, Procter J, Mieulet V, Lamb RF. A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signalling. *Biochem J.* 2007; 403: 13-20.
76. Baar K, Esser K. Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. *Am J Physiol.* 1999; 276: C120-7.
77. Wang X, Proud CG. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology (Bethesda).* 2006; 21: 362-9.
78. Karlsson HK, Nilsson PA, Nilsson J, Chibalin AV, Zierath JR, Blomstrand E. Branched-chain amino acids increase p70S6k phosphorylation in human skeletal muscle after resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004; 287: E1-7.

79. Hornberger TA, Stuppard R, Conley KE, Fedele MJ, Fiorotto ML, Chin ER, et al. Mechanical stimuli regulate rapamycin-sensitive signalling by a phosphoinositide 3-kinase-, protein kinase B- and growth factor-independent mechanism. *Biochem J.* 2004; 380: 795-804.
80. Kimball SR, Farrell PA, Jefferson LS. Invited Review: Role of insulin in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by amino acids or exercise. *J Appl Physiol.* 2002; 93: 1168-80.
81. Korz V, Frey JU. Stress-related modulation of hippocampal long-term potentiation in rats: Involvement of adrenal steroid receptors. *J Neurosci.* 2003; 23: 7281-7.
82. Rannels SR, Jefferson LS. Effects of glucocorticoids on muscle protein turnover in perfused rat hemicorpus. *Am J Physiol.* 1980; 238: E564-72.
83. Odedra BR, Bates PC, Millward DJ. Time course of the effect of catabolic doses of corticosterone on protein turnover in rat skeletal muscle and liver. *Biochem J.* 1983; 214: 617-27.
84. Shah OJ, Anthony JC, Kimball SR, Jefferson LS. Glucocorticoids oppose translational control by leucine in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000; 279: E1185-90.
85. Philp A, Hargreaves M, Baar K. More than a store: regulatory roles for glycogen in skeletal muscle adaptation to exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012; 302: E1343-51.
86. Walker DK, Dickinson JM, Timmerman KL, Drummond MJ, Reidy PT, Fry CS, et al. Exercise, amino acids, and aging in the control of human muscle protein synthesis. *Med Sci Sports Exerc.* 2011; 43: 2249-58.
87. Churchward-Venne TA, Burd NA, Mitchell CJ, West DW, Philp A, Marcotte

GR, et al. Supplementation of a suboptimal protein dose with leucine or essential amino acids: effects on myofibrillar protein synthesis at rest and following resistance exercise in men. *J Physiol*. 2012; 590: 2751-65.

88. Rowlands DS, Thomson JS, Timmons BW, Raymond F, Fuerholz A, Mansourian R, et al. Transcriptome and translational signaling following endurance exercise in trained skeletal muscle: impact of dietary protein. *Physiol Genomics*. 2011; 43: 1004-20.

89. Suyama T, Okada S, Ishijima T, Iida K, Abe K, Nakai Y. High phosphorus diet-induced changes in NaPi-IIb phosphate transporter expression in the rat kidney: DNA microarray analysis. *PLoS One*. 2012; 7: e29483.

90. R Development Core Team. *A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2006.

91. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*. 2004; 5: R80.

92. Kachigan S. *Statistical Analysis*. New York: Radius Press. 1996.

93. Breitling R, Armengaud P, Amtmann A, Herzyk P. Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Lett*. 2004; 573: 83-92.

94. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2009; 4: 44-57.

95. Binns D, Dimmer E, Huntley R, Barrell D, O'Donovan C, Apweiler R. QuickGO: a web-based tool for Gene Ontology searching. *Bioinformatics*. 2009; 25: 3045-6.

96. Hosack DA, Dennis G, Jr., Sherman BT, Lane HC, Lempicki RA. Identifying

biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol.* 2003; 4: R70.

97. Essaghir A, Toffalini F, Knoop L, Kallin A, van Helden J, Demoulin JB. Transcription factor regulation can be accurately predicted from the presence of target gene signatures in microarray gene expression data. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38: e120.

98. Kadota K, Nakai Y, Shimizu K. Ranking differentially expressed genes from Affymetrix gene expression data: methods with reproducibility, sensitivity, and specificity. *Algorithms Mol Biol.* 2009; 4: 7.

99. Higuchi I, Kawai H, Kawajiri M, Fukunaga H, Horikiri T, Niiyama T, et al. Statistically significant differences in the number of CD24 positive muscle fibers and satellite cells between sarcoglycanopathy and age-matched Becker muscular dystrophy patients. *Intern Med.* 1999; 38: 412-5.

100. Lu H, Huang D, Ransohoff RM, Zhou L. Acute skeletal muscle injury: CCL2 expression by both monocytes and injured muscle is required for repair. *FASEB J.* 2011; 25: 3344-55.

101. Roseguini BT, Arce-Esquivel AA, Newcomer SC, Laughlin MH. Impact of a single session of intermittent pneumatic leg compressions on skeletal muscle and isolated artery gene expression in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011; 301: R1658-68.

102. Pearen MA, Ryall JG, Maxwell MA, Ohkura N, Lynch GS, Muscat GE. The orphan nuclear receptor, NOR-1, is a target of beta-adrenergic signaling in skeletal muscle. *Endocrinology.* 2006; 147: 5217-27.

103. Raffaello A, Milan G, Masiero E, Carnio S, Lee D, Lanfranchi G, et al. JunB transcription factor maintains skeletal muscle mass and promotes hypertrophy. *J Cell Biol.* 2010; 191: 101-13.

104. Irrcher I, Hood DA. Regulation of Egr-1, SRF, and Sp1 mRNA expression in

- contracting skeletal muscle cells. *J Appl Physiol*. 2004; 97: 2207-13.
105. Barash IA, Bang ML, Mathew L, Greaser ML, Chen J, Lieber RL. Structural and regulatory roles of muscle ankyrin repeat protein family in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007; 293: C218-27.
106. Gohil K, Brooks GA. Exercise tames the wild side of the Myc network: a hypothesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012; 303: E18-30.
107. Lijnen HR. Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *J Thromb Haemost*. 2005; 3: 35-45.
108. Motobayashi Y, Izawa-Ishizawa Y, Ishizawa K, Orino S, Yamaguchi K, Kawazoe K, et al. Adiponectin inhibits insulin-like growth factor-1-induced cell migration by the suppression of extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation, but not Akt in vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res*. 2009; 32: 188-93.
109. Ishido M, Kami K, Masuhara M. In vivo expression patterns of MyoD, p21, and Rb proteins in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004; 287: C484-93.
110. Kawasaki E, Hokari F, Sasaki M, Sakai A, Koshinaka K, Kawanaka K. Role of local muscle contractile activity in the exercise-induced increase in NR4A receptor mRNA expression. *J Appl Physiol*. 2009; 106: 1826-31.
111. Pilegaard H, Ordway GA, Saltin B, Neufer PD. Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000; 279: E806-14.
112. Goodyear LJ, Chang PY, Sherwood DJ, Dufresne SD, Moller DE. Effects of exercise and insulin on mitogen-activated protein kinase signaling pathways in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1996; 271: E403-8.
113. Martorell L, Gentile M, Rius J, Rodriguez C, Crespo J, Badimon L, et al. The

hypoxia-inducible factor 1/NOR-1 axis regulates the survival response of endothelial cells to hypoxia. *Mol Cell Biol.* 2009; 29: 5828-42.

114. Shulman RG, Bloch G, Rothman DL. In vivo regulation of muscle glycogen synthase and the control of glycogen synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 8535-42.

115. Yamada K, Noguchi T. Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *Biochem J.* 1999; 337: 1-11.

116. Mayes PA. Intermediary metabolism of fructose. *Am J Clin Nutr.* 1993; 58: 754S-65S.

117. de Wilde J, Hulshof MF, Boekschoten MV, de Groot P, Smit E, Mariman EC. The embryonic genes *Dkk3*, *Hoxd8*, *Hoxd9* and *Tbx1* identify muscle types in a diet-independent and fiber-type unrelated way. *BMC Genomics.* 2010; 11: 176.

118. Booth FW, Thomason DB. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol Rev.* 1991; 71: 541-85.

119. Eller M, Stedman HH, Sylvester JE, Fertels SH, Wu QL, Raychowdhury MK, et al. Human embryonic myosin heavy chain cDNA. Interspecies sequence conservation of the myosin rod, chromosomal locus and isoform specific transcription of the gene. *FEBS Lett.* 1989; 256: 21-8.

120. Grifone R, Laclef C, Spitz F, Lopez S, Demignon J, Guidotti JE, et al. *Six1* and *Eya1* expression can reprogram adult muscle from the slow-twitch phenotype into the fast-twitch phenotype. *Mol Cell Biol.* 2004; 24: 6253-67.

121. Terada S, Tabata I. Effects of acute bouts of running and swimming exercise on PGC-1 $\alpha$  protein expression in rat epitrochlearis and soleus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004; 286: E208-16.

122. Rodnick KJ, Henriksen EJ, James DE, Holloszy JO. Exercise training, glucose

transporters, and glucose transport in rat skeletal muscles. *Am J Physiol.* 1992; 262: C9-14.

123. Fuentes I, Cobos AR, Segade LA. Muscle fibre types and their distribution in the biceps and triceps brachii of the rat and rabbit. *J Anat.* 1998; 192: 203-10.

124. Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda).* 2009; 24: 97-106.

125. Kemp TJ, Sadusky TJ, Saltisi F, Carey N, Moss J, Yang SY, et al. Identification of *Ankrd2*, a novel skeletal muscle gene coding for a stretch-responsive ankyrin-repeat protein. *Genomics.* 2000; 66: 229-41.

126. Tsukamoto Y, Hijiya N, Yano S, Yokoyama S, Nakada C, Uchida T, et al. Arpp/*Ankrd2*, a member of the muscle ankyrin repeat proteins (MARPs), translocates from the I-band to the nucleus after muscle injury. *Histochem Cell Biol.* 2008; 129: 55-64.

127. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 1995; 378: 785-9.

128. Yeaman SJ, Armstrong JL, Bonavaud SM, Poinasamy D, Pickersgill L, Halse R. Regulation of glycogen synthesis in human muscle cells. *Biochem Soc Trans.* 2001; 29: 537-41.

129. Nakazato K, Ochi E, Waga T. Dietary apple polyphenols have preventive effects against lengthening contraction-induced muscle injuries. *Mol Nutr Food Res.* 2010; 54: 364-72.

130. Safran M, Kaelin WG, Jr. HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. *J Clin Invest.* 2003; 111: 779-83.

131. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF



system. *Nat Med.* 2003; 9: 677-84.

132. Hirota T, Ohki K, Kawagishi R, Kajimoto Y, Mizuno S, Nakamura Y, et al. Casein hydrolysate containing the antihypertensive tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro improves vascular endothelial function independent of blood pressure-lowering effects: contribution of the inhibitory action of angiotensin-converting enzyme. *Hypertens Res.* 2007; 30: 489-96.

133. 森藤雅史. ホエイタンパク質の筋グリコーゲン貯蔵促進効果. 早稲田大学審査学位論文 博士 (スポーツ科学) . 2010.

134. Yang J, Chi Y, Burkhardt BR, Guan Y, Wolf BA. Leucine metabolism in regulation of insulin secretion from pancreatic beta cells. *Nutr Rev.* 2010; 68: 270-9.

135. Newsholme P, Bender K, Kiely A, Brennan L. Amino acid metabolism, insulin secretion and diabetes. *Biochem Soc Trans.* 2007; 35: 1180-6.

136. Kieffer TJ, Habener JF. The glucagon-like peptides. *Endocr Rev.* 1999; 20: 876-913.

137. Nilsson M, Stenberg M, Frid AH, Holst JJ, Bjorck IM. Glycemia and insulinemia in healthy subjects after lactose-equivalent meals of milk and other food proteins: the role of plasma amino acids and incretins. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80: 1246-53.

138. 藤田聡, Volpi E. サルコペニアと栄養・運動. 運動とタンパク質・遺伝子. 柳原大, 内藤久士 編, 東京, ナップ. 2004: 129-49.

139. Kobayashi H. Age-related sarcopenia and amino acid nutrition. *The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine.* 2013; 2: 401-7.

140. Glynn EL, Fry CS, Drummond MJ, Timmerman KL, Dhanani S, Volpi E, et al. Excess leucine intake enhances muscle anabolic signaling but not net protein anabolism in young men and women. *J Nutr.* 2010; 140: 1970-6.

## 要旨

長時間の運動は身体、特に骨格筋の代謝に大きな影響をもたらす。筋中のエネルギー源であるグリコーゲンは枯渇し、骨格筋タンパク質合成の制御は大きく変化する。枯渇した筋グリコーゲンを回復させるには、炭水化物を摂取することが効果的である。近年、炭水化物のみを摂取するのではなく、炭水化物と組み合わせてタンパク質を摂取することにより、効果的に筋グリコーゲンが回復することが報告された。また、骨格筋は筋タンパク質の合成と分解のバランスにより一定量に保たれている。骨格筋量を増加させるための手段として運動が広く実施されているが、運動によって骨格筋タンパク質合成が増加する一方、骨格筋タンパク質分解も増加することが知られている。しかし、運動後にタンパク質を摂取した場合、運動により高まった骨格筋タンパク質合成はさらに増加し、一方、運動により高まった骨格筋タンパク質分解は抑制され、筋タンパク質合成が分解を大きく上回った状態となることが報告されている。

それらの作用メカニズムとして、分岐鎖アミノ酸、特にロイシンの関与が考えられている。ロイシンにより骨格筋における糖の取り込みが促進し、筋グリコーゲン合成が亢進するという研究結果が報告されている。また、ロイシンは筋細胞内のシグナル系を通じて mRNA の翻訳開始を活性化することで、筋タンパク質合成を急速に刺激していると考えられている。つまり、運動と組み合わせるタンパク質、特に分岐鎖アミノ酸、ロイシンを多く含んだものを摂取することが筋肉増強には重要であると考えられている。

一方、近年、特定のジペプチド、トリペプチドがアミノ酸に比べ腸管吸収が優れているのみならず、生理機能を有することが明らかになってきている。そこで、我々は摂取するタンパク質の分岐鎖アミノ酸含量及びロイシン含量のみが重要なのではなく、摂取するタンパク質の分子形態も重要であると仮説を立て、

研究を進めてきた。その中で、分岐鎖アミノ酸、ロイシンを多く含むホエイタンパク質を加水分解したホエイペプチド中に含まれる特定のジペプチド (Ile-Val, Leu-Val, Val-Leu, Ile-Ile, Leu-Ile, Ile-Leu, Leu-Leu) にロイシンと同様の骨格筋への糖取り込み促進作用を見出し、報告した。また、運動後に糖質とホエイペプチドを組み合わせて摂取した場合、ホエイタンパク質、分岐鎖アミノ酸を摂取した場合と比較して有意に骨格筋グリコーゲンが高値まで回復すること、つまり、ホエイペプチドがホエイタンパク質や遊離アミノ酸よりも優れたグリコーゲン回復促進作用を有することを報告した。しかし、これは単回投与の報告であり、ホエイペプチドの長期的摂取が筋グリコーゲンに与える影響については明らかではない。また、同様にホエイペプチドの筋グリコーゲン促進作用のメカニズムも明らかにされていない点が多い。そこで、本研究では、まず、マウスを用いて、運動と組み合わせてホエイペプチドを長期的に摂取した場合の筋グリコーゲン量を、ホエイペプチドと同組成のアミノ酸混合物と比較検討した。その結果、ホエイペプチドの長期摂取によりアミノ酸混合物摂取と比較して有意に筋グリコーゲン量が増加することが明らかになった。また、筋グリコーゲン量は運動パフォーマンスと相関することがよく知られている。本研究において、マウスの運動パフォーマンスを測定した結果、有意差は認められなかったものの、ホエイペプチド群は最も高い運動パフォーマンスを示し、運動パフォーマンスと筋グリコーゲン量の間には正の相関関係が認められた。

ホエイペプチドの筋グリコーゲン増加作用のメカニズムを明らかにするため、グリコーゲン合成に関与するタンパク質であるグリコーゲン合成酵素、ヘキソキナーゼ、GLUT4 の mRNA 量を測定した結果、グリコーゲン合成酵素の mRNA 量はホエイペプチド群で有意に増加していることが明らかとなった。また、ホエイペプチド群のグリコーゲン合成酵素はタンパク質レベルでも増加していることに加え、活性化状態である脱リン酸化状態にあることが明らかとなった。

つまり、ホエイペプチドはグリコーゲン合成酵素の活性化を介して筋グリコーゲンを増加させる可能性が示唆された。

ホエイペプチドがタンパク質やアミノ酸よりも優れたグリコーゲン回復促進効果を有することはこれまでに示しているが、筋タンパク質代謝に与える影響がホエイペプチドとアミノ酸で異なるのかについては明らかにされていない。そこで、本研究では、ホエイペプチドの摂取が筋タンパク質代謝に与える影響においてもアミノ酸と比較して優位性があると仮説を立て、運動後のホエイペプチド摂取が骨格筋タンパク質合成に与える影響を同組成のアミノ酸と比較検討することとした。具体的にはラットを用いて水泳運動後にホエイペプチドまたは同組成のアミノ酸混合物を投与し、骨格筋合成速度を調べた。その結果、ホエイペプチドの摂取によりアミノ酸摂取と比較して骨格筋合成速度が有意に増加することが明らかになった。また、骨格筋合成に関与する mTOR シグナルに関するタンパク質のリン酸化量を測定した結果、mTOR、4E-BP1、S6K1 のリン酸化量がホエイペプチド摂取により亢進することが明らかとなった。すなわち、ホエイペプチドは同組成のアミノ酸よりも効果的に mTOR シグナリングを活性化し、骨格筋タンパク質合成を促進する可能性を示した。

本研究において、これら新たなホエイペプチドの生理機能が示されたが、ホエイペプチドの作用メカニズムの詳細をさらに明らかにする目的で、ホエイペプチドの摂取が遺伝子発現に与える影響を網羅的に解析することとした。具体的には、ラットを用いて、運動後にホエイペプチドまたはホエイペプチドと同組成のアミノ酸を摂取した場合の骨格筋中の遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより解析した。その結果、ERK1/2 及び HIF-1 $\alpha$  標的遺伝子群の発現がペプチド摂取とアミノ酸摂取の二群間で変動することを見出した。さらにタンパク質レベルの解析においても、ペプチド摂取によって ERK1/2 及び HIF-1 $\alpha$  が活性化していることを見出し、ホエイペプチドの生理機能の発現において、骨格筋にお

ける ERK1/2 及び HIF-1 $\alpha$ の活性化が関与している可能性が示唆された。

本研究により、ホエイペプチドはアミノ酸よりも優れた骨格筋グリコーゲン増加作用、骨格筋合成促進作用を有することが明らかとなった。これらの結果は運動後に摂取するサプリメントとして、ホエイペプチドが効果的であることを示すものである。また、新たに ERK1/2 や HIF-1 $\alpha$ といった因子がホエイペプチドの生理作用に関与している可能性が示された。これらの新たなシグナル因子の影響を詳細に調べていくことにより、ペプチドとアミノ酸の作用機作の違いを明らかにすることができると考えられる。さらには、運動後に摂取するタンパク質源として、どのような種類のタンパク質、ペプチドまたはアミノ酸が最も効果的であるのかが明らかになり、現在の超高齢化社会において課題となっているサルコペニア（加齢に伴う筋量の減少、筋機能の低下）を防ぎうる食品の開発につながることを期待される。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、ニュートリゲノミクス分野のみならず研究全般にわたる懇切なるご指導、ご助言を賜るとともに、いつも暖かい激励をもって著者の背中を押してくださいました東京大学大学院農学生命科学研究科特任教授の阿部啓子博士に心より感謝いたします。DNA マイクロアレイ解析を行うにあたり、懇切丁寧なご指導ならびに鋭いご指摘をいただき、また発表の機会を与えてくださいました同研究科イルシージャパン寄付講座「機能性食品ゲノミクス」特任准教授の中井雄治博士に心より感謝いたします。DNA マイクロアレイ解析の手技をご指導くださいました、同講座の石島智子博士に、この場を借りて感謝いたします。(財) 神奈川科学技術アカデミー「健康・アンチエイジングプロジェクト」の篠崎文夏博士には、DNA マイクロアレイのデータ解析において多大なるご助力を頂きました。心より感謝いたします。

早稲田大学スポーツ科学研究科教授の樋口満博士には運動生理学の基礎から懇切丁寧にご指導いただくとともに、研究の方向性に関して多大なるご助言をいただきました。心より感謝いたします。

新潟医療福祉大学健康科学部教授の川中健太郎博士には動物実験の手技について懇切丁寧にご指導いただくとともに、研究の推進にあたり多くのご助言を頂きました。心より感謝いたします。

(株) 明治 食機能科学研究所 所長の伊藤裕之博士、機能性評価研究二部部長の池上秀二博士、機能研究 1G 長の三本木千秋博士、機能研究 2G 長の河端恵子氏には、本論文を纏めるにあたり甚大なるご配慮をいただきましたことを感謝いたします。(株) 明治 坂戸工場長の鐘ヶ江穰博士には、著者が明治製菓(株)に入社した折に基礎研究の道に導いていただきましたことを感謝いたします。帝京大学理工学部准教授の古賀仁一郎博士には、著者が明治製菓(株)

に入社以来、研究に対する心構えをご指導いただき、いつも厳しくも暖かく著者を見守っていただきましたことを心より感謝いたします。深澤朝幸博士には細かな実験手技から研究者としての姿勢までご指導いただくとともに、本論文を纏めるにあたり、貴重なご助言をいただきました。心より感謝いたします。共同研究者として、また良き先輩として動物実験手技から研究の方向性までご指導、ご鞭撻をくださいました森藤雅史博士に深く感謝いたします。また、動物実験を進めるにあたり共同研究者としてご協力いただいた中山恭佑氏に感謝いたします。最後になりますが、本研究を進めるにあたり日ごろからご助言、ご協力をいただきました(株)明治 食機能科学研究所 機能性評価研究二部の皆様に心より御礼申し上げます。