

肉用鶏における骨格筋量の個体差を
支配する要因の解明

島元 紗希

2019

<目次>

肉用鶏における骨格筋量の個体差を支配する要因の解明と 鶏肉生産への応用

第1章 緒言

第1節 骨格筋の構造と可塑性	7
第2節 肉用鶏の骨格筋におけるタンパク質代謝の研究の意義	9
第3節 本研究の目的と概要	12

第2章 肉用鶏ヒナの成長速度の個体差と骨格筋タンパク質代謝回転速度との関連

第1節 初期成長期のブロイラーヒナにおける 3-MeHis の組織分布	
2-1-1 目的	17
2-1-2 材料および方法	17
2-1-3 結果	22
2-1-4 考察	25
第2節 成長速度が異なるブロイラーヒナの骨格筋タンパク質分解の代謝回転速度の比較	
2-2-1 目的	27
2-2-2 材料および方法	27
2-2-3 結果	30
2-2-4 考察	32

第3章 肉用鶏ヒナの骨格筋タンパク質分解速度を支配する分子機構の解明

第1節 成長速度が異なるブロイラーヒナの骨格筋タンパク質分解関連因子の比較

3-1-1	目的	34
3-1-2	材料および方法	34
3-1-3	結果	41
3-1-4	考察	49

第2節 成長速度が異なるブロイラーヒナにおけるタンパク質分解抑制シグナルの比較

3-2-1	目的	52
3-2-2	材料および方法	53
3-2-3	結果	59
3-2-4	考察	64

第4章 肉用鶏ヒナの骨格筋におけるアドレナリンシグナルの作用

第1節 アドレナリンおよびイソプロテレノールの腹腔内投与がブロイラーヒナの骨格筋における *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現に及ぼす影響

4-1-1	目的	67
4-1-2	材料および方法	67
4-1-3	結果	69
4-1-4	考察	71

第2節 アドレナリンによる *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現制御に関わる β アドレナリン受容体サブタイプの同定

4-2-1	目的	72
4-2-2	材料および方法	72
4-2-3	結果	74
4-2-4	考察	78

第3節	ニワトリヒナの骨格筋における β_2 -アドレナリン受容体シグナルによるタンパク質分解抑制メカニズムのさらなる解明	
4-3-1	目的	80
4-3-2	材料および方法	81
4-3-3	結果	85
4-3-4	考察	91
第5章	培養骨格筋細胞における β_2 -アドレナリン受容体シグナルによる FoxO1 転写活性抑制分子機構の解明	
第1節	ニワトリ初代培養筋管細胞の培地へのクレンプテロール添加条件の検討	
5-1-1	目的	93
5-1-2	材料および方法	94
5-1-3	結果	97
5-1-4	考察	99
第2節	ニワトリ初代培養筋管細胞に対するクレンプテロールの添加が AKT-FoxO シグナルならびに <i>FoxO1</i> mRNA の発現量に及ぼす影響	
5-2-1	目的	100
5-2-2	材料および方法	100
5-2-3	結果	103
5-2-4	考察	107
第3節	C2C12 培養筋管細胞の培地へのクレンプテロール添加条件の検討	
5-3-1	目的	109
5-3-2	材料および方法	109
5-3-3	結果	111
5-3-4	考察	114

第4節	C2C12 培養筋管細胞に対するクレンブテロールの添加が AKT-FoxO シグナルに及ぼす影響	
5-4-1	目的	115
5-4-2	材料および方法	115
5-4-3	結果	118
5-4-4	考察	122
第6章	培養骨格筋細胞における β_2 -アドレナリン受容体シグナルによる microRNA を介した FoxO1 転写活性の抑制分子機構の解明	
第1節	β_2 -アドレナリン受容体シグナルによる <i>FoxO1</i> mRNA 発現抑制に関わる microRNA の同定	
6-1-1	目的	126
6-1-2	材料および方法	126
6-1-3	結果	129
6-1-4	考察	131
第2節	C2C12 培養筋管細胞における β_2 -アドレナリン受容体シグナルにより増加する microRNA の導入が FoxO1 転写活性に与える影響	
6-2-1	目的	133
6-2-2	材料および方法	133
6-2-3	結果	136
6-2-4	考察	139
第7章	総合考察	141

摘要	157
謝辞	167
引用文献	168
付表	185

略語一覧

AKT protein kinase B

AR アドレナリン受容体

Atrogin-1/MAFbx muscle atrophy F-box

cAMP 環状アデノシンーリン酸

FoxO forkhead box O

GH 成長ホルモン

IGF-1 インスリン様成長因子

Kd タンパク質分解速度

Ks タンパク質合成速度

miRNA microRNA

MuRF-1 muscle ring finger 1

PKA protein kinase A

第 1 章 緒言

第 1 節 骨格筋の構造と可塑性

骨格筋は、多数の核を含む細胞である筋線維を最小単位として構成される。筋線維に含まれる核は、細胞膜の直下に配置されており、細胞質の大半は筋原線維により構成されている。筋原線維は、直径が 1~2 μm の円筒状の構造をしており、サルコメアとよばれる 2.2 μm の長さの収縮単位の反復により構成されている (Albuerts *et al.*, 2007)。サルコメアは、アクチンフィラメントとミオシンフィラメントが並行に重なるように配列した構造をとる。アクチンフィラメントは、アクチン、トロポミオシン、およびトロポニンサブユニット (トロポニン I、トロポニン T、トロポニン C) で構成されており、ミオシンフィラメントはミオシンにより構成されている (岡田ら, 2004)。

骨格筋は外部からの生理刺激に対する反応として、その量または質が可逆的に変化する組織である。骨格筋量が増加する状態を骨格筋肥大とよび、通常この骨格筋肥大は成長または骨格筋に負荷をかけた抵抗性トレーニングの結果として認められる (Harridge, 2007)。骨格筋肥大の誘導様式は、筋線維増生および筋線維肥大の 2 つの型に分けることができる (新藤ら, 2004)。筋線維数は出生前後から出生直後までに決定され、それ以上は増加しないと考えられている。しかしながら、ラットやマウスなどの動物実験モデルでは、運動後に筋線維増生が生じるという報告もあり (Gonyea *et al.*, 1977; Gonyea, 1980; Ho *et al.*, 1980; Gonyea *et al.*, 1986; Tamaki, 1992)、骨格筋肥大が筋線維増生を

伴うか否かについては現在も議論されている（新藤ら, 2004）。一方、骨格筋肥大における筋線維肥大は、核数の増加および筋線維径の増大が認められる状態とされる。核数の増加は、筋線維の原形質膜と基底膜の間に存在する筋衛星細胞が、外部からの生理刺激により活性化され増殖し、既存の筋線維に融合することによる（Mauro, 1961; Appell *et al.*, 1988）。筋線維径の増大は、筋線維におけるタンパク質合成量の増加および分解量の減少の結果として生じる（Rennie *et al.*, 2004）。現在では、筋線維に含まれる核数が筋線維におけるタンパク質の合成量の決定要因となると考えられている（Kadi *et al.*, 2004; Petrella *et al.*, 2006）。

前述の通り、骨格筋肥大は、筋衛星細胞の活性化・増殖・融合の結果として、筋線維に含まれる核数の増加およびタンパク質蓄積量の増加により誘導される（Mauro, 1961; Appell *et al.*, 1988; Rennie *et al.*, 2004）。タンパク質の翻訳・合成が増加する過程では、AKT（protein kinase B）を介したシグナル経路が重要な働きを持つ（Glass, 2003）。すなわち、リン酸化により活性化された AKT は、mTOR（mechanistic target of rapamycin）を活性化させる（Scott *et al.*, 1998; Navé *et al.*, 1999）。活性化した AKT および mTOR は、p70 S6 kinase（70-kDa ribosomal protein S6 kinase）を介してタンパク質の翻訳ならびにタンパク質の合成を増加させ、骨格筋肥大を誘導する（Reynolds *et al.*, 2002）。

骨格筋におけるタンパク質分解量の増減も、正常な骨格筋の成長および骨格筋萎縮の両方に関連する（Goldspink *et al.*, 1976; Goldspink *et al.*, 1977）。骨格筋のタンパク質の分解量は、標的タンパク質に付加されたユビキチン鎖をプロテアソームが認識し、不可逆的に分解するシ

ステム（ユビキチン-プロテアソーム系タンパク質分解）によって調節される（Ciechanover *et al.*, 1998; Hershko *et al.*, 1998; Jagoe *et al.*, 2001; Lecker *et al.*, 2004; Lecker *et al.*, 2006）。骨格筋では、muscle atrophy F-box (atrogin-1/MAFbx) および muscle ring finger 1 (MuRF1) が骨格筋特異的ユビキチンリガーゼとして同定されている（Bodine *et al.*, 2001）。*Atrogin-1/MAFbx* および *MuRF1* の mRNA 発現量は、骨格筋におけるタンパク質分解量と正の相関を示し（Sacheck *et al.*, 2004）、その調節機構としてインスリン様成長因子（IGF-1）-AKT シグナルカスケードが知られている。すなわち IGF-1 がその受容体（IGF-1 レセプター）に結合すると、AKT がリン酸化され、forkhead box O (FoxO) 転写因子をリン酸化することにより核外へ移行させる（Daitoku *et al.*, 2011）。その結果、FoxO 転写因子の転写活性が低下し、*Atrogin-1/MAFbx* および *MuRF1* の mRNA 発現量が減少する（Sandori *et al.*, 2004; Stitt *et al.*, 2004）。

第 2 節 肉用鶏の骨格筋におけるタンパク質代謝の研究の意義

長期的な飼料穀物の需給のひっ迫が懸念される状況下で、ブロイラーや地鶏などの肉用鶏の生産には、産肉性や飼料効率の向上が求められている（農林水産省, 2015）。飼料効率が良く短期間の飼育で出荷できるように育種改良されてきたブロイラーは、生後約 50 日で出荷体重に達し、その飼料効率も 2.0 以下となっている。また、地鶏についても、日本農林規格に基づいた規格内で効率よく出荷できるように育種改良が進められている。一方、生産現場では肉用鶏の成長速度に大き

な個体差を生じることが知られている。例えば、初期成長期の成長速度が異なる個体間では、出荷日齢時（35日齢）の体重、および骨格筋重量に有意な差が生じる（島元未発表データ、図 1-2-1）。産肉性や飼料効率を向上させるために、このような成長速度の個体差を如何に制御するかが重要な課題となっている。

動物の成長は Logistic 曲線や Gompertz 曲線などに代表されるように、指数関数曲線で表現され、細胞数の増加が著しい胎児期や哺乳期が成長を左右する最も重要な時期であると考えられている。

動物の成長の主体はタンパク質の蓄積である。体タンパク質の合成と分解を同時に行いながら動物は体タンパク質を蓄積し成長を続けている。体タンパク質は、常に合成と分解を繰り返される動的状態にある。一般に、成熟動物では体タンパク質の合成と分解は同じだけ行われ動的平衡が保たれているが、合成と分解の速度は種々の要因によって変動し、合成側に傾くと成長が起こり、分解側に傾くと体タンパク質が消耗される。

骨格筋は、体タンパク質全体の 40%（西澤, 1983）を占める最大の組織であり、全身のタンパク質の代謝に及ぼす役割は大きい。すなわち、産肉性の向上とは、体タンパク質蓄積量の増加による骨格筋量の増大とみなすことができ、体タンパク質の蓄積は、タンパク質の合成量と分解量の差で表される。

ニワトリでは、骨格筋タンパク質分解速度は骨格筋の成長に影響する主要因の 1 つであると考えられてきた（前田, 1995）。加えて、発育性の向上を中心に改良されてきた肉用種と体型の小格化を目指して

改良されてきた卵用種の比較より、卵用種が肉用種に比べてタンパク質分解速度が高く、合成速度が低いことから、ニワトリでは、合成量よりも分解量が骨格筋量に大きく影響することが示唆されている (Hayashi *et al.*, 1985)。また、Maeda ら (1986) はニホンウズラを 60 世代に渡って体重が大きい方向 (LL) と小さい方向 (SS) への選抜を行い、そのタンパク質代謝回転速度を算出したところ、タンパク質分解速度と合成速度ともに SS と比較して LL で低い事を報告している。しかしながら、ニワトリの骨格筋におけるタンパク質の分解速度および合成速度の差の原因は不明である。

前節でも述べたように、IGF-1 やインスリンなどのホルモンは骨格筋において主要なタンパク質分解制御因子に位置づけられるが、これまでのところこれらのタンパク質分解の調節機構では骨格筋量の個体差を説明できておらず、肉用鶏の骨格筋量の個体差には、これまでに注目されていないタンパク質分解の調節機構の関与が推察される。

アドレナリンは、G タンパク質共役型受容体である 9 種のアドレナリン受容体 (α_1A 、 α_1B 、 α_1D 、 α_2A 、 α_2B 、 α_2C 、 β_1 、 β_2 、および β_3) を介して様々な組織において機能を発揮する。これら 9 種のサブタイプのうち、骨格筋では主に β アドレナリン受容体 (β_1 、 β_2 、 β_3 の 3 種のサブタイプに分類される) によって作用が伝達される (Grady *et al.*, 1997)。 β_2 アドレナリン受容体 (β_2 -AR) 作動薬であるクレンプテロールは、骨格筋重量を増加させることが知られている (Choo *et al.*, 1990; Kim and Sainz, 1992; Hinkle *et al.*, 2002; Joassard *et al.*, 2013)。また、これまでに本研究室では、ブロイラーヒナの骨格筋において β_2 -AR シグナルが

タンパク質分解を抑制することを明らかにした (Ijiri *et al.*, 2014)。このように、 β_2 -AR シグナルが骨格筋で同化作用を示すことは以前から知られていたが、アドレナリンがストレス応答性のホルモンに分類され、その作用として主に異化に関わる研究が多く報告されていることから、骨格筋の成長に対する β_2 -AR の作用は注目されていなかった。

第 3 節 本研究の目的と概要

本研究では、肉用鶏の骨格筋量の個体差に対する β_2 -AR シグナルの関与の解明と、加えて、骨格筋のタンパク質分解に対する β_2 -AR シグナルの詳細な作用機序の解明を目的とした。

本研究の第 2 章では、初期成長期 (1~5 日齢) の肉用鶏ヒナの成長速度が異なる個体間 (急速発育区と遅発育区) の体タンパク質代謝回転速度を比較した。第 2 章より、同品種・同系統内の肉用鶏ヒナの個体差において骨格筋タンパク質分解速度の関与が示唆されたため、第 3 章では肉用鶏ヒナの骨格筋タンパク質分解速度を支配する分子機構の解明を行なった。第 3 章で成長速度の個体差に関与する骨格筋タンパク質抑制シグナルとしてアドレナリンによる経路が示唆されたため、第 4 章では肉用鶏ヒナの骨格筋におけるアドレナリン受容体シグナルの作用について調べた。アドレナリン受容体のうち、 β_2 -AR の選択的作動薬 (クレンブテロール) 刺激により骨格筋のタンパク質分解が抑制されたため、第 5 章および第 6 章では鶏初代培養筋管細胞および C2C12 培養筋管細胞を用いて β_2 -AR シグナルによる骨格筋タンパク質分解抑制に関わる分子機構を調べた。

なお、本研究では、チャンキー系ブロイラーROSS308が、日本の肉用鶏の生産シェアの80%以上を占めていることから（橋本, 2016）、本種を用いることにした。また、本研究における動物実験は、鹿児島大学における動物実験に関する規則に基づき承認を受けた。

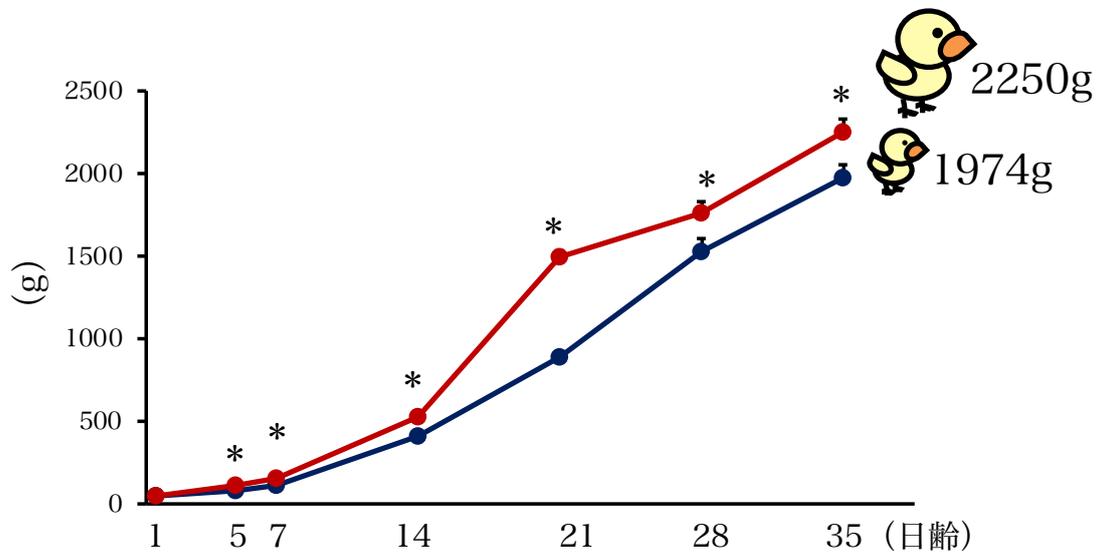


図 1-2-1.初期成長期の成長速度が異なるブロイラーヒナの出荷日齢までの成長曲線

赤：増体が早い群 青：増体が遅い群

*;P < 0.05

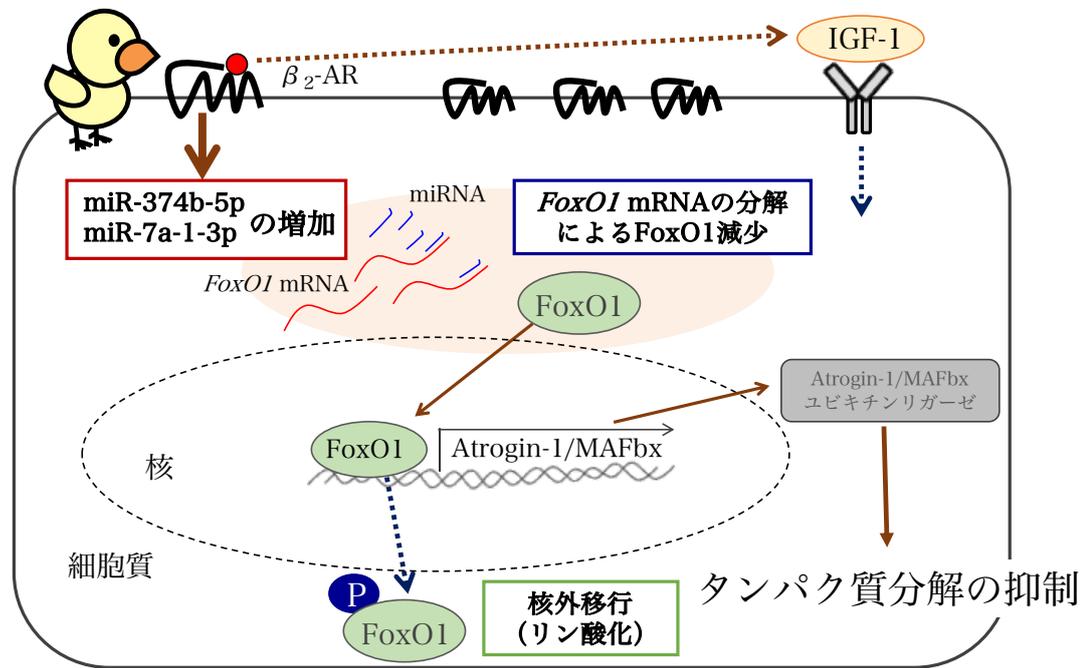


図 1-3-1. 本研究から示唆されたニワトリ骨格筋細胞における β₂-アドレナリン受容体シグナルによる骨格筋タンパク質分解抑制機構の模式図

β₂-AR: β₂ アドレナリン受容体

miRNA: microRNA

IGF-1: インスリン様成長因子

第 2 章 肉用鶏ヒナの成長速度の個体差と骨格筋タンパク質代謝回転速度との関連

動物の体内では、タンパク質の合成と分解が絶えず行われており、骨格筋タンパク質の蓄積はタンパク質の合成と分解の差で表すことができる。Asatoor ら (1967) は、尿中の 3-メチルヒスチジン (3-MeHis) の量を測定することにより、骨格筋タンパク質の代謝回転速度を求めることができることを報告した。3-MeHis はアミノ酸の一種であるヒスチジンが、筋原線維タンパク質 (アクチン、ミオシン) として合成に利用された後に翻訳後修飾 (メチル化) されたものである。3-MeHis は、骨格筋のアクチンおよびミオシンに微量に含まれる。例えば、ウサギアクチンでは 1 分子につき 1 箇所、ウサギミオシンでは 1 分子につき 2 箇所のヒスチジンがメチル化されている (Garrels and Gibson, 1976, Elzinga and Collins, 1977)。3-MeHis は、対応する RNA が存在しないため、筋原線維タンパク質に組み込まれた 3-MeHis は、タンパク質の分解によって遊離した後、タンパク質合成に再利用されず、またそれ以上分解されることなく尿から排泄される (Reporter, 1973; Morse *et al.*, 1975)。つまり、単位時間あたりに蓄積されたタンパク質と排泄された 3-MeHis の量を測定すれば、骨格筋タンパク質の合成速度および分解速度の測定が可能であると考えられている (Young and Munro, 1978; 西澤, 1983)。しかしながら、この測定方法を利用するためには、生体内に存在する 3-MeHis の大部分が骨格筋 (アクチン、ミオシン) に存在し、排泄物のほとんどが筋肉由来の 3-MeHis であることを証明する必要がある。これまでに、15 日齢のブロイラーの 3-MeHis の組織分布

を調べた結果、骨格筋には 57.1%存在していることが報告されている (Hayashi *et al.*, 1985)。これらの結果よりニワトリにおいても体内の 3-MeHis のほとんどが骨格筋由来であると考えられ、これまでにニワトリ体タンパク質の合成速度および分解速度の指標として利用されてきた。

本章では、ニワトリヒナの成長速度の個体差と骨格筋タンパク質代謝回転速度との関連を調べることを目的とし、先ず第 1 節として、初期成長期 (5 日齢) のブロイラーヒナにおける 3-MeHis の体組織分布を調べ、次いで、第 2 節では成長速度が異なるブロイラーヒナの骨格筋タンパク質分解の代謝回転速度の比較を行った。

第 1 節 初期成長期のブロイラーヒナにおける 3-MeHis の組織分布

2-1-1 目的

本研究では、初期成長期のニワトリヒナにおける 3-MeHis 分析の信頼性を保証するため、初期成長期のブロイラーヒナの各組織中の 3-MeHis の含量の組織分布を調べた。

2-1-2 材料および方法

(1) 供試動物と実験計画

1 日齢のブロイラー初生ヒナ (チャンキー系 ROSS308、オス) を加治木ヒナセンターから 100 羽導入し、5 日齢まで自由飲水、自由採食で飼育した (飼料組成は表 2-1-1 に示す)。1 日齢から 5 日齢までの増

体量が群の平均増体量 (41.33 ± 0.16 g) となる 6 羽を選抜し、屠殺した。血液はできるだけ全量回収し、羽毛+皮、骨+頭、骨格筋、心臓、肝臓、筋胃、消化管（内容物は除去）、その他の臓器（脾臓、腎臓など）の 9 項目に分けて全採取し重量測定後、分析するまで -80°C で保存した。

（2）血漿および組織中の 3-MeHis 含量の測定

本研究では、組織中の遊離 3-MeHis 濃度を HPLC 法によって分析した。

〈試薬〉

塩酸、過塩素酸、ピリジン、1-オクタンスルホン酸ナトリウム、ホウ酸、塩化カリウム、オルトフタルアルデヒド、メタノール、2-メルカプトエタノール、ホルムアルデヒドはナカライテスク（京都）、3-MeHis 標準品は和光純薬工業（大阪）より購入した。

・ 20%スルホサリチル酸

スルホサリチル酸 10 g を ddH₂O で 50 mL に fill up した。

・ 1.0 M ピリジン

99.5 %ピリジン原液 87 mL と ddH₂O 1000 mL を混合した。

・ 0.2 M ピリジン

1 M ピリジン 200 mL と ddH₂O 800 mL を混合した。

※ ピリジンは作成後に滴定を行い、濃度を確認した。

- 高速液体クロマトグラフ移動相 (Buffer A)

1-オクタスルホン酸ナトリウム 0.58 g、 KH_2PO_4 2.72 g をそれぞれビーカーに秤量し、 ddH_2O で溶解した。1000 mL に定容した後、10% CH_3COOH で pH を 4.3 に調整した。その後、0.45 μm フィルター (17822-K、sartorius、Göttingen, Germany) で減圧ろ過を行った。

- ホウ酸 buffer (pH10.4)

ホウ酸 26 g、KOH 20 g をビーカーに秤量し、 ddH_2O 約 900 mL に溶解した後、45% KOH で pH10.4 に調整し、1000 mL に定容した。

- オルトフタルアルデヒド (検出用蛍光試薬)

オルトフタルアルデヒド 0.8 g をビーカーに秤量し、メタノール 3 mL を加え、さらにドラフト内で 2-メルカプトエタノール 1 mL を加えてできるだけ溶解した。ホウ酸 buffer を加えて完全に溶解した後、500 mL に定容した。

※オルトフタルアルデヒドは、冷蔵庫にて保管すれば数週間はあるが、発色感度は作製後 72 時間を過ぎると急激に低下するので、使用直前に作製した。

- ホルムアルデヒド (ヒスチジンの蛍光抑制剤)

ホルムアルデヒド 37.5 mL をメスシリンダーで量りとり、ホウ酸 buffer で 500 mL に定容した。

・ 3-MeHis 標準品

MeHis 標品を 10.8 ng/ μ L の濃度で Buffer A を用いて調整した。

〈各組織中 3-MeHis 濃度測定の前処理（除タンパク質処理）〉

各組織は、解凍後ミキサーでミンチにし、栓付き試験管に約 1g（心臓は約 0.5g）秤量し、6N HCl を 20 mL 加え、105 °C、24 時間オートクレーブで加水分解した。加水分解した試料液をろ紙でろ過し、100 mL ナス型フラスコに回収した。栓付き試験管およびろ紙は ddH₂O で 2 回洗浄し、100 mL 容ナス型フラスコに回収した。運転条件を水、30 hPa、50°C としたロータリーエバポレーターで減圧乾固した。減圧乾固した 100 mL 容ナス型フラスコに 0.2 M ピリジンを 9 mL 加え、これをサンプル溶液とした。

〈血漿中 3-MeHis 濃度測定の前処理（除タンパク質処理）〉

2 mL 容マイクロチューブに血漿 500 μ L と 20%スルホサリチル酸 170 μ L を入れてよく混合し、氷中に置いた。4°C、9,700 \times g、5 分間遠心分離した後、チューブは直ちに氷中に置いた。沈殿物が入らないように上清 500 μ L を 30 mL 容ナス型フラスコに移した。運転条件を水、30 hPa、50°C としたロータリーエバポレーターで減圧乾固した。除タンパク処理で減圧乾固した 30 mL 容ナス型フラスコに 0.2 M ピリジンを 3 mL 加え、これをサンプル溶液とした。

〈カラムクロマトグラフィーによる MeHis の粗分離〉

3-MeHis の粗分離には、強酸性型陽イオン交換樹脂（DOWEX 50W-X8、200-400mesh pyridine form、BIO-RAD）を使用した。樹脂をポリプロピレン製ミニカラム（内径 7 mm、長さ 60 mm、10 mL 液流層付き）に最終体積として 2 mL になるように充填し、下部と上部に綿栓をして 0.2 M ピリジン 6 mL を流した。

サンプル溶液全量をミニカラムに注入した。サンプル溶液がカラムから完全に流出した後、さらに 0.2 M ピリジン 20 mL をカラムにとおして、中性および酸性アミノ酸を溶出させた。0.2 M ピリジンがカラムから完全に流出した後、1 M ピリジン 20 mL をカラムにとおして、塩基性アミノ酸を溶出させ、これを 100 mL 容ナス型フラスコに完全回収した（3-MeHis は塩基性アミノ酸である）。ロータリーエバポレーターで乾固し、Buffer A を 1 mL 加えて溶解した。1 mL シリンジとシリンジ用 0.45 μ m フィルター（Minisart RC4 / Sartorius stedim）でフィルターろ過し、HPLC 用サンプル瓶に回収し、HPLC により分析した。

〈3-MeHis の同定および計算〉

3-MeHis 同定には、3-MeHis 標準品を standard として用い、HPLC に注入してからピークが現れるまでの保持時間を測定し、その保持時間を以ってサンプル中の 3-MeHis を同定した。サンプルの 3-MeHis 含量はピーク面積から算出した。

2-1-3 結果

結果を表 2-1-2 に示した。5 日齢時点の平均骨格筋重量は、 16.88 ± 0.91 g であり、骨格筋中の 3-MeHis 含量は 81.0 ± 6.07 μmol だった。筋胃の重量は、 3.44 ± 0.23 g であり、筋胃中の 3-MeHis 含量は 13.9 ± 2.93 μmol だった。また心臓中は 1.6 ± 0.14 μmol 、肝臓中は 1.9 ± 0.33 μmol の 3-MeHis が含まれていた。羽毛と皮はまとめて測定した結果、3-MeHis 含量は 5.2 ± 1.18 μmol 、血液 + 骨 + 頭をまとめて測定した結果、 12.87 ± 2.11 μmol となった。さらに、その他の臓器は 6.9 ± 1.35 μmol の 3-MeHis が含まれていた。

表 2-1-1. 本研究で用いた基礎飼料の組成

成分 (g/100g)		
	トウモロコシ	57.90
	大豆粕	34.00
	コーンオイル	4.30
	CaCO ₃	0.66
	CaHPO ₄	2.00
	NaCl	0.50
	DL-メチオニン	0.14
	ミネラル・ビタミンミックス	0.50
計算値		
	粗タンパク質含量 (%)	20.0
	代謝エネルギー量 (MJ/kg)	3.1

表 2-1-2. 5 日齡ブロイラーヒナ (n=6) の各組織中の 3-MeHis 含量

	絶対重量 (g)		3-MeHis			
			(μ mol)		(%)	
	Mean	SE	Mean	SE		
骨格筋	16.88	± 0.91	81.02	± 6.07	64.42	
筋胃	3.44	± 0.23	13.95	± 2.93	14.17	
心臓	0.66	± 0.04	1.62	± 0.14	1.06	
肝臓	2.92	± 0.11	1.88	± 0.33	1.03	
皮+羽	7.34	± 0.20	5.19	± 1.18	3.59	
血液+頭+骨	22.99	± 0.64	12.87	± 2.11	6.95	
その他組織	13.45	± 0.57	6.93	± 1.35	8.78	

2-1-4 考察

翻訳後修飾によりメチル化された筋原線維タンパク質中のヒスチジン (3-MeHis) は、タンパク質の分解によって遊離した後、タンパク質合成に再利用されず、またそれ以上分解することなく全て排泄される (Reporter, 1973; Morse *et al.*, 1975)。つまり、単位時間あたりに蓄積されたタンパク質と排泄された 3-MeHis の量を測定すれば、骨格筋タンパク質の合成速度および分解速度を測定することが可能であると考えられている。しかしながら、この測定方法を利用するためには、生体内に存在する 3-MeHis の大部分が骨格筋 (アクチン、ミオシン) に存在し、排泄物のほとんどが筋肉由来の 3-MeHis であることを証明する必要がある。

実験 1 の結果より、骨格筋中の 3-MeHis 含量は 81.02 μmol だった。また、筋胃、その他の臓器などに比較的多く含まれていた。これを全体の 3-MeHis 含量に対する割合で示すと、5 日齢では骨格筋に 64.42%、筋胃に 14.17%、その他臓器に 8.78% となった (表 2-1-2)。羽毛と皮はまとめて測定した結果、5.19 μmol であったが、以前の研究結果より、11 日齢のブロイラーの羽中に 3-MeHis はほとんど含まれていないことが明らかとされている (品川卒論、1981)。したがって、本実験で明らかとなった 5.19 μmol のほとんどは皮由来であると考えられる。また、血液+骨+頭をまとめて測定した結果、10.81 μmol となったが、骨中にも 3-MeHis はほとんど含まれていないことが明らかとなっている (品川卒論、1981)。さらに、血液のみの 3-MeHis 濃度を測定した結

果、 $1.15 \mu\text{mol}$ と極めて少ない。したがって、血液+骨+頭に含まれる 3-MeHis のほとんどが、解体時に骨もしくは頭から採取しきれなかった骨格筋に由来するものだと考えられる。これまでに、15 日齢の肉用鶏の 3-MeHis の組織分布を調べた結果、骨格筋には 57.1% 存在していることが報告されている (Hayashi *et al.*, 1985)。5 日齢の肉用鶏ヒナの体全体の 3-MeHis 含量に対する%で示すと骨格筋は 64.42% 以上となり大部分の 3-MeHis は骨格筋に含まれていると考えられた。本実験の結果より、5 日齢ブロイラーの骨格筋中の 3-MeHis 含量は、Hayashi ら (1985) が報告した 15 日齢ブロイラーにおける骨格筋中の 3-MeHis 含量である 57.1% を上回ったことから体タンパク質の合成速度および分解速度の指標として利用可能であると判断した。

第 2 節 成長速度が異なるブロイラーヒナの骨格筋タンパク質分解の代謝回転速度の比較

2-2-1 目的

本節では、初期成長期（1 日齢～5 日齢）の増体が速い区と遅い区の骨格筋タンパク質の合成速度（ K_s ）および分解速度（ K_d ）を比較した。

2-2-2 材料および方法

（1）供試動物と実験計画

1 日齢のブロイラー初生ヒナ（チャンキー系 ROSS308、オス）を加治木ヒナセンターから 100 羽導入し、5 日齢まで自由飲水、自由採食で飼育した。1 日齢から 5 日齢までの増体量が速い急速発育区 24 羽と遅い遅発育区 24 羽を選抜した。その後、各区 4 羽 1 ケージの計 6 ケージで飼育し、増体量、飼料摂取量を求めた。また、排泄物の回収は屠殺 2 日前からケージごとに全量回収し冷凍保存した。屠殺後、骨格筋を全採取し重量を測定し、 -80°C で凍結保存した。

（2）骨格筋中および排泄物中の 3-MeHis 含量の測定

本研究では、骨格筋中および排泄物中の遊離 3-MeHis 濃度を HPLC 法によって分析した。第 2 章第 1 節と同様に試薬を調製した。

〈骨格筋中 3-MeHis 濃度測定の前処理（除タンパク質処理）〉

第 2 章第 1 節と同様に行った。

〈糞および飼料中 3-MeHis 濃度測定の前処理（除タンパク質処理）〉

糞は解凍後、全量をミキサーに入れ 200 mL の ddH₂O を加え攪拌した。栓付き試験管に約 5 g 秤量し、6N HCl を 20 mL 加え、105 °C、24 時間オートクレーブで加水分解した。飼料は栓付き試験管に約 1 g 秤量し、6N HCl を 20 mL 加え、105 °C、24 時間オートクレーブで加水分解した。加水分解した試料液をろ紙でろ過し、100 mL ナス型フラスコに回収した。栓付き試験管およびろ紙は ddH₂O で 2 回洗浄し、100 mL ナス型フラスコに回収した。運転条件を水、30 hPa、50°C としたロータリーエバポレーターで減圧乾固した。減圧乾固した 100 mL ナス型フラスコに 0.2 M ピリジンを 9 mL 加え、これをサンプル溶液とした。

〈カラムクロマトグラフィーによる MeHis の粗分離〉

第 2 章第 1 節と同様に行った。

〈3-MeHis の同定および計算〉

第 2 章第 1 節と同様に行った。

(3) 骨格筋タンパク質代謝回転速度の算出

本研究では、骨格筋および体タンパク質の合成・分解速度を求める際に、次の 3 項目を仮定し、それぞれについて以下の計算式を用いて算出した。

- ① 糞中の 3-MeHis が全て筋肉由来のもの
- ② 3-MeHis を含む全ての組織の体タンパク質が、全て同じ速度で合成・分解される

③ ニワトリの骨格筋以外の組織の 3-MeHis 排泄量に対する寄与率が、
ラットと同等である

また、飼料中に含まれる 3-MeHis 含量はわずかであったため飼料中の 3-MeHis を無視して計算を行った。

$$\text{分解速度定数 } K_d = \frac{\text{3-MeHisの1日の排泄量}}{P}$$

$$\text{合成速度定数 } K_s = \frac{K_d(P - P_0 e^{-K_d t})}{P(1 - e^{-kdt})}$$

P:体内の3-MeHisのプール量 (μmol)
P₀:0時の体内の3-MeHisのプール量 (μmol)

(4) 統計処理

データは平均値±標準誤差として表した。得られたデータの平均値の差の検定は、Student's の t 検定法を用いて遅発育区との差異を調べた。

2-2-3 結果

結果は表 2-2-1 に示した。試験開始日齢（5 日齢）から試験終了日齢（7 日齢）までの体重は急速発育区で有意に重く、飼料摂取量と増体量は、遅発育区と比較して急速発育区が多かった。同様に、7 日齢時点の骨格筋重量および排泄物重量は、遅発育区と比較して急速発育区が多かった。また、骨格筋中の 3-MeHis に差は認められなかったが、排泄物中の 3-MeHis 濃度は、急速発育区と比較して遅発育区で高い傾向を示した。7 日齢ブロイラーヒナの骨格筋中のタンパク質分解速度 (Kd) を計算すると、遅発育区で 1.38%、急速発育区で 0.84% となり、遅発育区と比較して急速発育区で有意に低い値を示した。一方、タンパク質合成速度 (Ks) は、遅発育区で 9.99%、急速発育区で 11.39% となり、遅発育区と比較して急速発育区で高い傾向を示したが、有意な差は認められなかった (P=0.09)。

表 2-2-1. 7 日齢ブロイラーヒナの成長速度に対する骨格筋中のタンパク質合成および分解速度

	遅発育区 (n=24)		急速発育区 (n=24)	
	Mean	SE	Mean	SE
開始体重 (g)	40.37	± 0.95	42.03	± 0.61
終体重 (g)	103.33	± 0.99	134.39	± 3.99 *
日増体量 (g/day)	9.45	± 0.40	14.25	± 0.46 *
飼料摂取量 (g/day)	18.85	± 0.65	23.21	± 0.50 *
骨格筋重量 (g)	20.55	± 1.36	29.84	± 1.48 *
骨格筋1g中の3-MeHis (μ mol/g muscle)	0.41	± 0.03	0.39	± 0.01
骨格筋中の3-MeHisプール量 (μ mol)	8.31	± 0.52	11.78	± 0.86 *
排泄物重量 (g/d)	20.92	± 1.07	28.22	± 2.55 *
排泄物1g中の3-MeHis (nmol/g)	18.15	± 0.94	21.06	± 1.22
排泄物中の3-MeHis含量 (μ mol/d)	0.44	± 0.04	0.52	± 0.06
骨格筋タンパク質合成速度 (Ks, %/d)	13.59	± 0.36	14.33	± 0.25
骨格筋タンパク質分解速度 (Kd, %/d)	4.14	± 0.30	3.33	± 0.15 *

*; P<0.05

2-2-4 考察

本節の結果より、7日齢ブロイラーヒナの骨格筋中のタンパク質分解速度を計算すると、遅発育区と比較して急速発育区で有意に低い値を示した。一方、タンパク質合成速度は、遅発育区と比較して急速発育区で高い傾向を示したが、有意な差は認められなかった。これらの結果より、成長速度の差には、骨格筋のタンパク質分解速度の差が合成速度と比較してより大きく寄与することが示された。第1章で述べたように、ニワトリやウズラを用いた研究より、体格差のある系統間の比較では、体格が小さい個体は大きい個体よりタンパク質分解速度が高く、合成速度が低いことから、合成量よりも分解量が骨格筋量に大きく影響することが示唆されている (Hayashi *et al.*, 1985; Maeda *et al.*, 1986)。これらの結果と同様に、同品種・同系統内の肉用鶏においても成長速度の個体差には、タンパク質合成よりも分解速度の差がより強く影響することが示唆された。また、本節の結果より、遅発育区と比較して急速発育区は1日の飼料摂取量が有意に高かった。短期間の絶食に応答した骨格筋量の減少は、骨格筋タンパク質の合成と分解率に依存することから (Millward *et al.*, 1976)、遅発育区と急速発育区の飼料摂取量の差が骨格筋タンパク質分解速度の差に影響を与えている可能性が考えられた。

しかしながら、同品種・同系統内のニワトリの骨格筋におけるタンパク質の分解速度の差の原因は不明である。第3章では、骨格筋タンパク質分解速度を支配する分子機構の解明を行った。

第 3 章 肉用鶏ヒナの骨格筋タンパク質分解速度を支配する分子機構の解明

骨格筋のタンパク質の分解量は、標的タンパク質に付加されたユビキチン鎖をプロテアソームが認識し、不可逆的に分解するシステム(ユビキチン-プロテアソーム系タンパク質分解)によって調節される(Ciechanover *et al.*, 1998; Hershko *et al.*, 1998; Jagoe *et al.*, 2001; Lecker *et al.*, 2004; Lecker *et al.*, 2006)。骨格筋では、骨格筋特異的ユビキチンリガーゼとして同定されている *Atrogin-1/MAFbx* の mRNA 発現量が骨格筋におけるタンパク質分解量と正の相関を示すことが報告されている(Bodine *et al.*, 2001; Sacheck *et al.*, 2004; Ohtsuka *et al.*, 2011)。また、*Atrogin-1/MAFbx* の遺伝子発現量は FoxO 転写因子によって調節されており、FoxO の転写活性は、リン酸化に伴う細胞内局在の変化により低下する(Sandori *et al.*, 2004; Stitt *et al.*, 2004; Daitoku *et al.*, 2011)。

第 2 章より、同品種・同系統内の肉用鶏ヒナの個体差に骨格筋タンパク質分解速度の関与が示唆されたため、本章では骨格筋タンパク質分解速度を支配する分子機構の解明を行なった。第 1 章では、第 2 章と同様に、肉用鶏のヒナを初期成長期(1~5 日齢)の増体量が多い急速発育区(上位 20%)と増体量が少ない遅発育区(下位 20%)の 2 区に分け、骨格筋中の AKT と FoxO のリン酸化割合(リン酸化タンパク質/全タンパク質)、および *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量を比較した。*Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量の減少を介したタンパク質分解の抑制因子として、インスリン、IGF-1 およびアドレナリンが報告されて

いる。そこで第 2 章では、それぞれの血漿中濃度と骨格筋中の受容体の発現量を遅発育区と急速発育区で比較した。

第 1 節 成長速度が異なるブロイラーヒナの骨格筋タンパク質分解関連因子の比較

3-1-1 目的

本研究では、初期成長期の成長速度が異なる肉用鶏ヒナにおいて、骨格筋タンパク質分解速度が体格差の決定要因として示唆されたため、遅発育区と急速発育区の 2 区間の骨格筋中のタンパク質分解関連因子の発現量を比較した。

3-1-2 材料および方法

(1) 供試動物と実験計画

1 日齢のブロイラー初生ヒナ（チャンキー系 ROSS308、オス）を加治木ヒナセンターから 100 羽導入し、5 日齢まで自由飲水、自由採食で飼育した。飼料組成は表 2-2-1 に準じた。1 日齢から 5 日齢までの増体量を以って、増体が速い急速発育区と増体が遅い遅発育区から各 6 羽を選抜した。その後、5 時間絶食させたのち、屠殺し、解体を行った。屠殺後、血液、および浅胸筋、縫工筋、肝臓、心臓、大腿部を採取し重量測定後、 -80°C で凍結保存した。

(2) 血漿中の遊離 3-メチルヒスチジン (3-MeHis) 含量分析

〈試薬の調製〉

第 2 章第 1 節と同様に試薬の調製を行った。

〈血漿中 3-MeHis 濃度測定の前処理 (除タンパク質処理) 〉

第 2 章第 1 節と同様に行った。

〈カラムクロマトグラフィーによる MeHis の粗分離〉

第 2 章第 1 節と同様に行った。

〈MeHis の同定および計算〉

第 2 章第 1 節と同様に行った。

(3) 骨格筋中の遺伝子発現

〈試薬〉

ISOGEN II はニッポン・ジーン (東京)、p-Bromoanisole は和光純薬工業 (大阪)、UltraPure Water は caymanchemical company (Ann Arbor、MI、USA)、イソプロパノール、エタノールはナカライテスク (京都)、Prime Script RT reagent Kit はタカラバイオ (滋賀)、SYBR® Select Master Mix は Applied Biosystems (Foster City、CA、USA)、プライマーはファスマック (神奈川) より購入した。

〈組織からの mRNA 抽出〉

ジルコニアビーズと 1mL の ISOGEN II を入れた 2 mL 容破碎用チューブ（アシスト、東京）に約 80 mg の組織を量りとり、氷で冷やしながら超音波破碎機（Micro Smash™ MS-100、トミー精工、東京）で破碎ホモジナイズ（4,500 回転、15 秒×3 回）を行い、組織を溶解した。スピンドウンを行い、0.4 mL の UltraPure Water を加え、15 秒間激しく攪拌混合し、室温で 15 分間静置した。20,000 ×g で 5 分間の遠心分離を行い、不溶物を沈殿させた。上清 1 mL を 1.5 mL 容マイクロチューブに移した。p-Bromoanisole を 5 μL 加えて、15 秒間しっかりと攪拌し、20,000 ×g で 5 分間の遠心分離を行った。上清（水層）0.75 mL を別の 1.5 mL 容マイクロチューブに移し、イソプロパノールを 0.75 mL 加えて、30 秒間攪拌した。室温で 10 分間静置後、20,000 ×g で 5 分間の遠心分離を行った。上清をアスピレーターで吸引して完全に除き、75 % エタノールを 250 μL 添加し、ペレットが浮くまで軽く攪拌した。20,000 ×g で 1 分間の遠心分離を行い、上清をアスピレーターで吸引して完全に除いた後、75 % エタノール 0.5 mL を加えてペレットが浮くまで軽く攪拌し、20,000 ×g で 1 分間の遠心分離を行った。上清をアスピレーターで吸引して完全に除き、UltraPure Water を 200 μL 添加し、ペレットを溶解した。超微量紫外・可視分光光度計（NANO DROP LIFE、Thermo Scientific、Waltham、MA、USA）を用いて抽出サンプル中の RNA 含量を求めた。

〈cDNA の合成〉

RNA 濃度が 60 ng/ μ L となるように、UltraPure Water で希釈し、Prime Script RT reagent Kit を用いて cDNA を合成した。

〈Real Time PCR〉

PCR 反応に用いたプライマーを表 3-1-1 に示した。mRNA の発現量は、7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems、Foster City、CA、USA) を用いて分析した。PCR の反応は、50°C で 2 分、95°C で 2 分間反応させた後、95°C で 15 秒、55°C で 15 秒、72°C で 60 秒の反応を 60 回行った。各 mRNA の発現量は、両区間で発現量に差がないことを確認した 18S リボソーム RNA を内部標準として用いて補正した。mRNA の発現量は、遅発育区に対する発現比として表した。

(4) 骨格筋中のタンパク質発現分析

〈試薬〉

トリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris)、プロテアーゼインヒビターカクテル、ラウリル硫酸ナトリウム (SDS)、 β -メルカプトエタノール、塩化ナトリウム、グリセロールはナカライテスク (京都)、ブロモフェノールブルー (BPB)、ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート (Tween20) は和光純薬工業 (大阪)、Advanced Protein Assay Reagent は BIORAD (CA、USA)、ウシ血清アルブミン (BSA) は Sigma-Aldrich (MO、USA)、抗 AKT 抗体 (#9272)、抗リン酸化 AKT 抗体 (ser473) (#9271)、抗リン酸化 FoxO1/3 抗体 (#9464)、

抗 FoxO1 抗体 (#9454)、抗リン酸化 FoxO1 抗体 (ser256) (#9461) は Cell Signaling Technology (MA, USA)、抗 GAPDH 抗体 (Sc-20357) 抗ウサギ抗体 (Sc-2030) は Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)、抗ヤギ抗体 (ab97120) は abcam (CB, UK) EzWestLumi plus は ATTO (東京)、Can Get Signal は TOYOBO (大阪) より購入した。

〈全細胞タンパク質の抽出〉

500 mg の浅胸筋または縫工筋を氷冷した 5 mL の RIPA バッファー (50 mM Tris (pH 8.0)、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、40%NP.40、150 mM NaCl、0.1%SDS、1 mM EDTA、1%プロテアーゼインヒビターカクテル) が入ったファルコンチューブ (50 mL 容) に入れ、ハサミで細切した。その後、チューブを氷上に置きながら、ポリトロンホモジナイザー (Ø12 mm) でホモジェナイズした。ホモジェナイズしたサンプルをエッペンドルフチューブに移し、遠心分離機 (Model 3700、KUBOTA、東京) を用いて 4 °C、20,000 ×g で 10 分間遠心分離し、上清をウエスタンブロッティング用サンプルとし、分析まで -30 °C で保存した。

〈タンパク質量の測定〉

サンプル中のタンパク質量の測定は、Bradford 法に従って測定した (Bradford, 1976)。999 µL の Advanced Protein Assay Reagent に 1µL のウエスタンブロッティング用サンプルを加え、ボルテックスミックスした後、分光光度計 (SH-9000、コロナ電気、茨城) を用いて 595 nm

における吸光度を測定した。ウシ血清アルブミン (BSA) を 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で溶解させた溶液を用いて作成した標準曲線に基づいて、サンプル中のタンパク質量を求めた。

〈ウエスタンブロッティングに供するサンプル調整〉

タンパク質濃度の測定結果から、タンパク質量 15 μg 分を得るために必要な測定用サンプル量を算出した。タンパク質 15 μg 分の測定用サンプルをエッペンドルフチューブに入れ、その 3 分の 1 量の sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 用サンプルバッファー (240 mM Tris (pH 6.8)、8% (w/v) SDS、5% (v/v) β -メルカプトエタノール、40%グリセロール、0.04%BPB) と混和し、95 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分間加熱した後、氷上に 1 分以上静置し、これを SDS-PAGE 供した。

〈SDS-PAGE およびウエスタンブロッティング〉

10%濃度のアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行った。電流を 40 mA として、一定の電流になるよう設定した。SDS-PAGE 終了後、ゲルと polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (IPVH00010; Millipore Co., MA, USA) を重ね、電流をメンブレン 1 cm^2 あたり 1 mA となるよう設定して 90 分間通電し、ゲルからメンブレンにタンパク質を転写した。その後、5% (w/v) スキムミルク、1% Tween20 を含む TBS (以後 TBST、50 mM Tris, 140 mM NaCl, 1% Tween20) 中で、メンブレンを 1 時間振とうし、ブロッキングした。ブロッキング終了後、TBST

で3度洗浄した後、メンブレンを1次抗体液中に入れ、4°Cで12時間反応させた。1次抗体液は、抗AKT抗体、抗リン酸化AKT抗体、抗リン酸化FoxO1/3抗体、抗FoxO1抗体、抗リン酸化FoxO1抗体、または抗GAPDH抗体をCan Get Signal solution Iで2,500倍に希釈したものをそれぞれ用いた。1次抗体反応後、TBSTで3度洗浄した後、メンブレンを2次抗体液中に入れ、25°Cで2時間以上反応させた。2次抗体液は、抗ウサギ抗体または抗ヤギ抗体をCan Get Signal solution IIで5,000倍に希釈したものをそれぞれ用いた。2次抗体反応後、TBSTで5回洗浄し、メンブレンにEzWestLumi plusを用いて発光させ、画像検出装置（Ez-Capture MG、AE-9300H、アトー株式会社、東京）を用いて検出した。検出した画像から相対的なバンドの強度をImageJソフトウェア（National Institutes of Health、MA、USA）を用いて定量した。

（5） 統計処理

データは平均値±標準誤差として表した。得られたデータの平均値の差の検定は、Student'sのt検定法を用いて遅発育区との差異を調べた。

3-1-3 結果

導入時（1日齢）の体重は、遅発育区（ 40.6 ± 1.6 g）と急速発育区（ 41.3 ± 1.3 g）の間で差はなかったが、5日齢時の体重は遅発育区（ 65.9 ± 3.0 g）と比較して急速発育区（ 86.6 ± 2.7 g）で有意に重かった（表 3-1-2）。5日齢ヒナの浅胸筋および縫工筋重量は遅発育区と比較して急速発育区で有意に重かったが、体重に対する浅胸筋および縫工筋重量の割合（相対重量）は、浅胸筋のみで遅発育区と比較して急速発育区で大きかった（表 3-1-2）。また、大腿部、心臓、肝臓、筋胃重量も遅発育区と比較して急速発育区で有意に重かったが、腹腔内脂肪重量に2区間で差は認められなかった（表 3-1-2）。さらに、5日齢のブロイラーヒナにおける骨格筋タンパク質分解の指標である血漿中の3-MeHis濃度は、遅発育区と比較して急速発育区で有意に低く、浅胸筋中の *Atrogin-1* / *MAFbx* mRNA の発現量は、遅発育区と比較して急速発育区で有意に低かった（図 3-1-1）。

FoxO1 および FoxO3 タンパク質を検出できる抗体を用いた予備試験より、浅胸筋におけるリン酸化 FoxO1 および FoxO3 のタンパク質発現を調べた結果、FoxO3 と比べて FoxO1 の発現がより強く検出されたことから（図 3-1-2）、本研究では、FoxO1 に着目して研究を行い、リン酸化 FoxO1 タンパク質の検出にはリン酸化 FoxO1 (#9461) の抗体を用いた。浅胸筋中の AKT および FoxO1 のリン酸化割合（全タンパク質に対するリン酸化タンパク質の割合）は遅発育区と比較して、急速発育区で有意に高いことが明らかとなった（図 3-1-3A、B）。一方、縫工筋中の *Atrogin-1* / *MAFbx* mRNA 発現量、AKT および FoxO1 のリン

酸化割合に両区間で差は認められなかった（図 3-1-4）。

表 3-1-1. 本節で用いたプライマーとその配列 (*Gallus gallus domesticus*)

遺伝子名		Sequence (5'-3')
<i>Atrogin-1/MAFbx</i>	Forward	CCA ACA ACC CAG AGA CCT GT
	Reverse	GGA GCT TCA CAC GAA CAT GA
18S リボソーム RNA	Forward	AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG
	Reverse	CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA

表 3-1-2. 5 日齡ブロイラーヒナの体重および骨格筋重量

	遅発育区 (n = 6)	急速発育区 (n = 6)	
1日齡体重 (g)	40.60 ± 1.60	41.30 ± 1.30	
5日齡体重 (g)	65.87 ± 3.03	86.57 ± 2.74	*
浅胸筋重量 (g)	1.89 ± 0.44	3.51 ± 0.36	*
縫工筋重量 (g)	0.16 ± 0.02	0.21 ± 0.04	*
大退部重量 (g)	4.97 ± 0.28	6.65 ± 0.41	*
心臓重量 (g)	0.20 ± 0.05	0.62 ± 0.03	*
肝臓重量 (g)	0.47 ± 0.15	2.62 ± 0.10	*
筋胃重量 (g)	3.20 ± 0.19	3.74 ± 0.12	*
腹腔内脂肪重量 (g)	0.17 ± 0.06	0.26 ± 0.14	
浅胸筋 相对重量 (g/100 g体重)	2.85 ± 0.50	4.02 ± 0.60	*
縫工筋 相对重量 (g/100 g体重)	0.23 ± 0.01	0.25 ± 0.04	

*; P<0.05

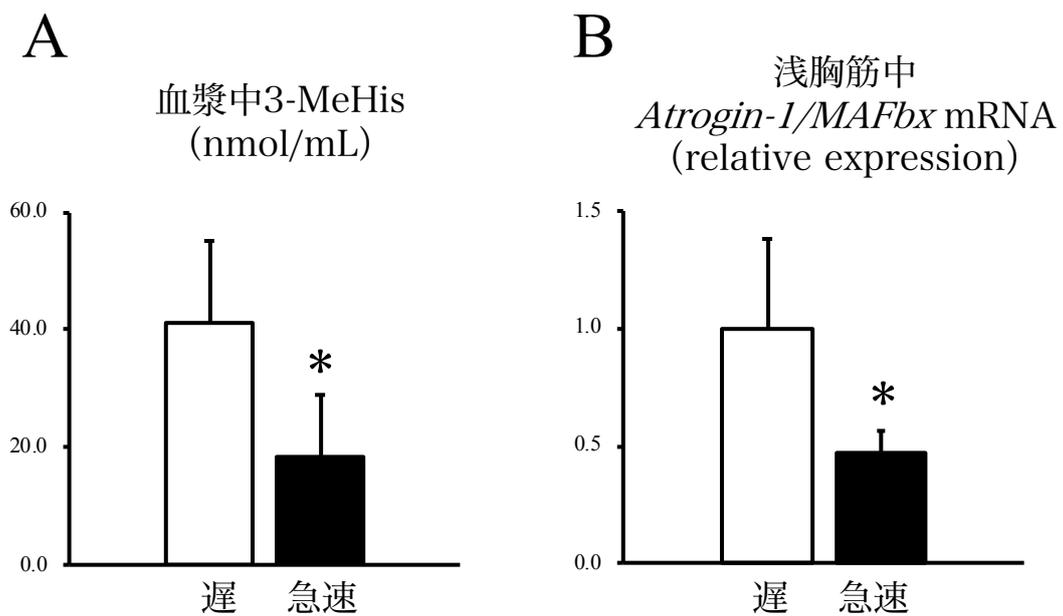


図 3-1-1. 初期成長速度の異なるブロイラーヒナにおける血漿中 3-MeHis 濃度および浅胸筋中の *Atrogin-1 mRNA* 発現量の比較

*;P<0.05 遅：遅発育区 急速：急速発育区

抗リン酸化FoxO1/3抗体

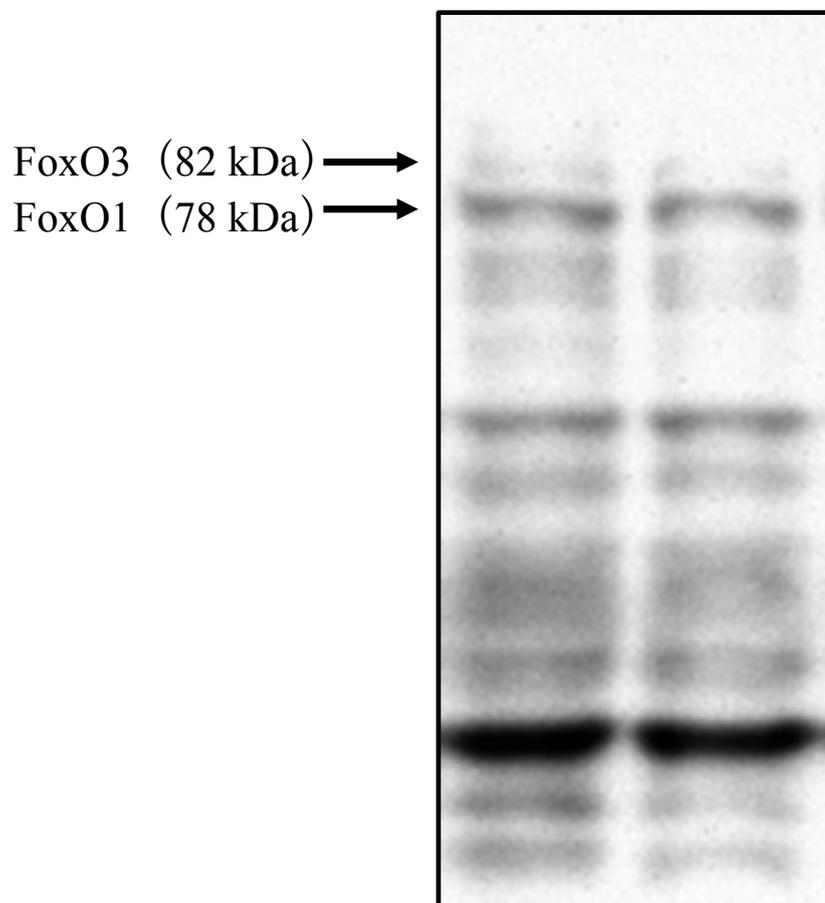


図 3-1-2.ブロイラーヒナの浅胸筋中のリン酸化 FoxO1 およびリン酸化 FoxO3 タンパク質の発現量

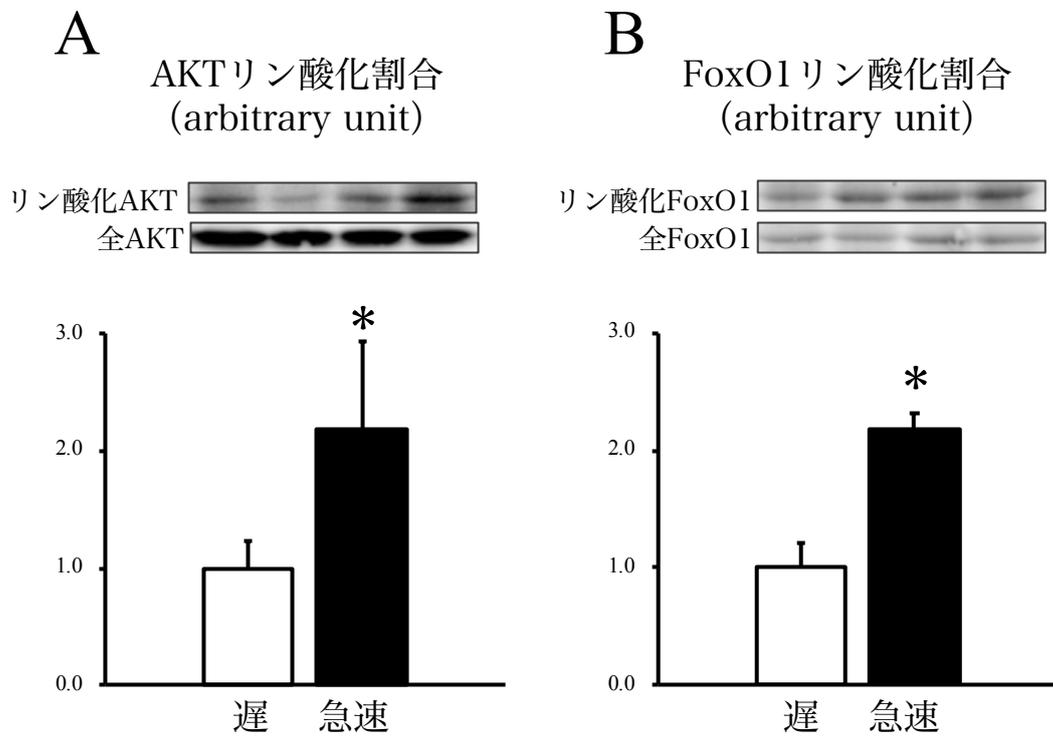
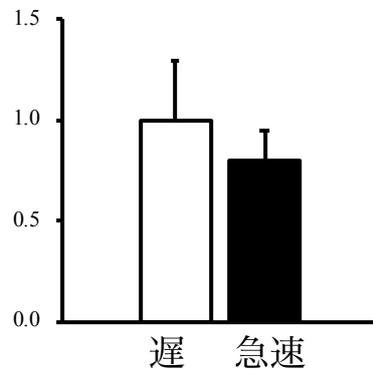


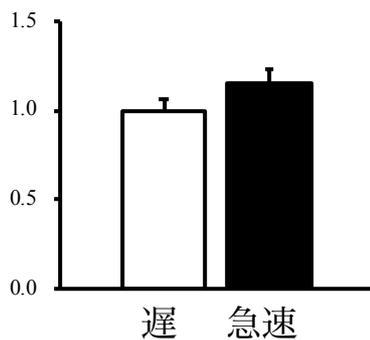
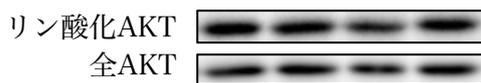
図 3-1-3. 初期成長速度の異なるブロイラーヒナにおける浅胸筋中の AKT および FoxO1 タンパク質のリン酸化割合の比較

*;P<0.05 遅：遅発育区 急速：急速発育区

A *Atrogin-1/MAFbx* mRNA
(relative expression)



B AKTリン酸化割合
(arbitrary unit)



C FoxO1リン酸化割合
(arbitrary unit)

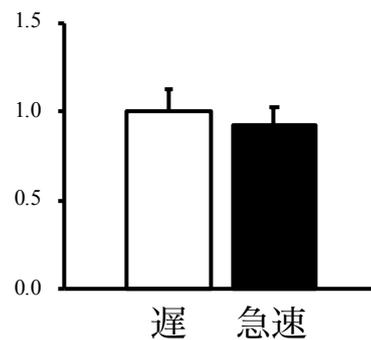
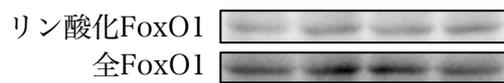


図 3-1-4. 初期成長速度の異なるブロイラーヒナにおける縫工筋中の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量および AKT と FoxO1 タンパク質のリン酸化割合の比較

*;P<0.05 遅：遅発育区 急速：急速発育区

3-1-4 考察

本節の結果より、骨格筋タンパク質分解の指標である血漿中の 3-MeHis 濃度が遅発育区と比較して急速発育区で有意に低かったことから、第 1 章の結果と同様に急速発育区は遅発育区と比較して、タンパク質分解が低く維持されていることが示唆された。また、遅発育区と比較して急速発育区の浅胸筋中の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量が有意に低かった。哺乳動物およびニワトリ骨格筋において *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量はタンパク質分解速度と正の相関を示すため (Sacheck *et al.*, 2004; Ohtsuka *et al.*, 2011)、急速発育区の骨格筋タンパク質分解速度の低さは、浅胸筋中の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量が低いことが影響していると考えられる。

さらに、本研究において、5 日齢ブロイラーヒナの浅胸筋中の AKT および FoxO1 タンパク質のリン酸化割合は、遅発育区と比較して有意に高かった。AKT はリン酸化により活性化し、FoxO1 をリン酸化させることで、FoxO1 タンパク質は核から細胞質へと移動することが知られている (Daitoku *et al.*, 2011)。その結果、FoxO1 の標的遺伝子である *Atrogin-1* mRNA 発現は減少する (Sandori *et al.*, 2004; Stitt *et al.*, 2004)。本節の結果より、初期成長期の増体が速い急速発育区は浅胸筋中の AKT のリン酸化割合が高く、FoxO1 タンパク質をリン酸化し、FoxO1 転写因子の細胞内局在を変化させることによって、その転写活性が低下した結果、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA 発現が減少し、タンパク質分解がより抑制されることが示唆された。

一方、5 日齢ヒナの縫工筋重量は、遅発育区と比較して急速発育区

で重かったが、体重に対する縫工筋重量の割合は、両区間に差はなかった。本節の結果より、縫工筋中における *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量、AKT および FoxO1 タンパク質のリン酸化割合にも両区間で差は認められなかった。これらの結果より、成長が著しい時期のブロイラーヒナの縫工筋におけるタンパク質分解速度は急速発育区および遅発育区との間に差がない可能性が考えられた。

しかしながら、急速発育区と遅発育区間のタンパク質分解の差異が浅胸筋と縫工筋で違う理由は不明である。考えられる可能性の1つとして、浅胸筋と縫工筋の成長率の違いが示唆される。Saneyasu ら (2017) は、体重に対する浅胸筋重量の割合が3日齢から5日齢までに著しく増加することを報告した。加えて、我々はこれまでに体重に対する浅胸筋重量割合が1日齢から5日齢までで約340%増加したのに対し、縫工筋重量の割合は30%減少することを確認した。これらの結果は、浅胸筋の成長速度が縫工筋と比較してより高いことを示した。さらに、浅胸筋におけるタンパク質合成速度およびタンパク質分解速度が縫工筋よりも約10倍高いことから (Tesseraud *et al.*, 1996)、浅胸筋におけるタンパク質代謝回転が縫工筋より高いことが考えられた。それゆえに、成長が著しい時期は縫工筋と比較して浅胸筋がよりタンパク質分解の抑制が成長に影響を与えやすいことが示唆された。

次節では、骨格筋において主要なタンパク質分解制御因子と骨格筋量の個体差との関連を明らかにするために、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量の減少を惹起しタンパク質分解を抑制する因子として報告されている、インスリン、IGF-1 およびアドレナリンの血漿中濃度と骨格筋

中の受容体の発現量を遅発育区と急速発育区で比較した。

第 2 節 成長速度が異なるブロイラーヒナにおけるタンパク質分解抑制シグナルの比較

3-2-1 目的

前節でも述べたように、これまでに *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量の減少を介してタンパク質分解を抑制する因子が複数報告されている。例えば、哺乳動物およびニワトリの骨格筋および培養骨格筋細胞において、AKT のリン酸化を介して FoxO1 の転写を阻害し、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現を抑制することがインスリン (Suryawan *et al.*, 2007; Duchêne *et al.*, 2008; Timmerman *et al.*, 2010; Saneyasu *et al.*, 2017) または IGF-1 (Frayn and Maycock, 1979; Sackeck *et al.*, 2004; Stitt *et al.*, 2004; Nakashima *et al.*, 2017) の刺激により惹起されることが報告されている。また、アドレナリンも骨格筋タンパク質分解を抑制することが報告されている (Navegantes *et al.*, 2002)。Silveira ら (2014) は、アドレナリンの投与が AMP-PKA シグナルの活性化によって FoxO1 の転写活性を阻害し、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量を減少させることを報告している。さらに、第 1 章で述べた通り、アドレナリンは G タンパク質共役型受容体である 9 種の AR ($\alpha 1A$ 、 $\alpha 1B$ 、 $\alpha 1D$ 、 $\alpha 2A$ 、 $\alpha 2B$ 、 $\alpha 2C$ 、 β_1 、 β_2 、および β_3) を介して様々な組織において機能を発揮する。これら 9 種のサブタイプのうち、骨格筋では主に β -AR (β_1 、 β_2 、 β_3 の 3 種のサブタイプに分類される) によって作用が伝達される (Grady *et al.*, 1997)。

本節では、インスリン、IGF-1 およびアドレナリンそれぞれの血漿中濃度と骨格筋中の受容体の発現量を遅発育区と急速発育区で比較した。

3-2-2 材料および方法

(1) 供試動物と実験計画

第2章第1節に準じ、同様のヒナを用いて分析した。

(2) 骨格筋中の遺伝子発現

試薬は第3章第1節に準じて購入した。

〈組織からの mRNA 抽出〉

mRNA の抽出は第3章第1節に準じて行った。

〈cDNA の合成〉

cDNA の合成は第3章第1節に準じて行った。

〈Real Time PCR〉

PCR 反応に用いたプライマーを表 3-2-1 に示した。mRNA の発現量は第3章第1節に準じて行った。

(3) 血漿中インスリン濃度測定

レビス®ブタインスリン由来の ELISA キット (AKRIN-013T、和光純薬工業株式会社、大阪) のマニュアルの指示に従って使用した。

(4) 血漿中のアドレナリン濃度測定

本研究では、血漿中のアドレナリン濃度を蛍光検出を用いた HPLC 法によって分析した (Mitsui *et al.*, 1985; Yuniyant *et al.*, 1998)。

〈試薬〉

水酸化リチウム、塩酸、エタノール、アセトニトリル、塩化カリウム、メタノール、トリス、還元型グルタチオン、イソプロパノール、酒石酸アドレナリン、酒石酸水素ノルエピネフェリンはナカライテスク(京都)、1,2-ジフェニルエチレンジアミンは東京化成(東京)、フェリシアン化カリウムは島久薬品(大阪)で購入した。

・還元型グルタチオン溶液

還元型グルタチオン 200 mg を 15 mL チューブに秤量し、2 mL の ddH₂O を用いて溶解した。

・2.0 M 水酸化リチウム

水酸化リチウム 21 g をビーカーに秤量し、ddH₂O で溶解後、250 mL に定容した。

・12 M 塩酸：エタノール (1 : 9、v/v)

ddH₂O 900 mL にエタノール 100 mL を混合した。

・0.2 M リン酸リチウム緩衝液 (pH 5.8)

(A) 水酸化リチウム 2.098 g をビーカーに秤量し、ddH₂O で溶解後、

200 mL に定量した (0.25 M)。

(B) 濃リン酸 0.68 mL を 50 mL に定量する (0.2 M)

(A) を 160 mL と (B) を 40 mL 定量し混合する。濃リン酸を用いて pH 5.8 に調整する。

・ アセトニトリル水溶液 (1 : 1、v/v)

ddH₂O 500 mL とアセトニトリル 500 mL を混合した。

・ 溶出 buffer (0.6 M 塩化カリウム-アセトニトリル (1 : 1、v/v)、0.6 M フェリシアン化カリウム)

塩化カリウム 4.47 g とフェリシアン化カリウム 19.75 mg をそれぞれビーカーに秤量し、ddH₂O で溶解した後、100 mL に定容した。その後アセトニトリル 100 mL と混合した。

・ 1, 2-ジフェニルエチレンジアミン (DPE) (蛍光試薬)

DPE 0.637 g ビーカーに秤量し、15 mL エタノールで溶解した。これに 15 mL の ddH₂O を加え、1 N 塩酸で pH 6.7 に調整した。

・ 高速液体クロマトグラフ移動相

(A) Tris 1.51 g をビーカーに秤量し、ddH₂O で溶解後、250 mL に定容し、50 mM トリス溶液を作成した。

(B) 塩酸 1.04 mL を ddH₂O で 250 mL に定容し、50 mM 塩酸を作成した。

(C) (A) と (B) を pH 7.0 になるように混ぜ合わせる。

アセトニトリル 500 mL とメタノール 100 mL、(C) 400 mL を混合して 1000 mL とした。その後、0.45 μm フィルター (JHWP04700、Merck、DE) で減圧ろ過を行った後、超音波洗浄機で脱気した。

・イソプロパノール溶液

イソプロパノール標品を 10 pM の濃度で ddH₂O を用いて調整した。

・アミン混合標準液 (STD)

酒石酸アドレナリン、イソプロパノール、酒石酸水素ノルエピネフェリンをそれぞれ 10 mM に調整し、1/1000 ずつ希釈し、10 pM まで調整した。

〈血漿の採取〉

血液をヘパリンおよび還元型グルタチオン溶液を 50 μL ずつ分注した 15 mL フェルコンチューブに回収し、氷冷した。4 °C、20,000 $\times g$ で 15 分間の遠心分離を行った後、上清の血漿を 2 mL チューブに採取し、分析に用いるまで -80 °C で保存した。

〈カラムの前処理 (洗浄) 〉

カラムは TOYOPAK IC-SP カートリッジ (0008489、東ソ株式会社、東京) を用いた。カラムに 5 mL のシリンジを取り付け、2.0 M 水酸化リチウムを 2 mL (1 mL \times 2)、ddH₂O 10 mL (5 mL \times 2) を流した。その

後、12 M 塩酸：エタノール混合液を 2 mL (1 mL×2) 流し、再び ddH₂O 10 mL (5 mL×2) を流した。最後に、0.2 M リン酸リチウム緩衝液 (pH 5.8) 3 mL (1 mL×3) を充填した。

〈血漿の前処理〉

1.5 mL のチューブに融解した血漿を 1 mL 分注した。また、内部標準物質として 10 pM イソプロテレノールを 25 μL 分注した。その後、0.5 M リン酸リチウム緩衝液 (pH 5.8) 500 μL を加え、ボルテックスミックスし、これをサンプル溶液とした。

〈アミンの分離溶出〉

前処理したカラムに 1 mL のシリンジを取り付け、サンプル溶液を全量注入した。ゆっくりシリンジを押し、サンプル溶液がカラムから完全に流出させた。その後、ddH₂O を 10 mL (5 mL×2)、ddH₂O：アセトニトリル混合液 2 mL をおとした (シリンジで押さずに、自然落下させることで、アミンのみがカラムに吸着する)。完全に流出した後、溶出 Buffer 300 μL をとおした。再び、溶出緩衝液 300 μL をカラムに通し、溶出されたものを 1.5 mL チューブに回収した。

〈アミンの蛍光誘導体化〉

完全に回収したサンプルに DPE を 50 μL 添加し、ボルテックスミックスした。40 °C に設定したヒートブロックで 40 分間インキュベートした。その後、氷冷中に移し反応を停止させた。1 mL シリンジとシリ

ンジ用 0.45 μm フィルター (Minisart RC4 / Sartorius stedim) でフィルターろ過し、HPLC 用サンプル瓶に回収し、8 時間以内に HPLC により分析した。

〈アドレナリンの同定および計算〉

アドレナリンは流速 0.8 mL/分の時に 6.2 分、イソプロテレノールは 9.7 分で溶出される。アドレナリン濃度は、以下の式を用いて計算を行った。

アドレナリン (pmol/mL) = 血漿中に入れたイソプロテレノール (内部標準) の量 (10 pM) × (サンプル中のアドレナリンの高さ/サンプル中のイソプロテレノールの高さ) × (アミン混合 STD 中のイソプロテレノールの高さ/アミン混合 STD 中のアドレナリンの高さ)/血漿の量(0.5 mL)

(6) 血漿中の成長ホルモン (GH) の測定

ニワトリ成長ホルモン ELISA キット (E-EL-Ch2116-96T、Elabscience®、TX、USA) のマニュアルの指示に従って使用した。

(5) 統計処理

データは平均値 ± 標準誤差として表した。得られたデータの平均値の差の検定は、Student's の t 検定法を用いて対照区との差異を調べた。

3-2-3 結果

5 日齢ブロイラーヒナの成長速度が異なる 2 区間における血漿中のインスリン濃度、および浅胸筋中のインスリン受容体 mRNA の発現量に差は認められなかった (図 3-2-1)。同様に、浅胸筋中の *IGF-1* mRNA の発現量にも 2 区間での差は認められなかった (図 3-2-2A)。IGF-1 は GH より肝臓で合成が惹起される。しかしながら、血漿中の GH 濃度にも差はなく、肝臓中の *IGF-1* mRNA 発現量にも 2 区間の差は認められなかった (図 3-2-2B、C)。また、浅胸筋中の *IGF-1* 受容体 mRNA の発現量にも差は認められなかった (図 3-2-2D)。

5 日齢ブロイラーヒナの成長速度が異なる 2 区間における血漿中のアドレナリン濃度に差は認められなかった (図 3-2-3A)。浅胸筋中の β_1 -AR mRNA および β_3 -AR mRNA の発現量に 2 区間の差は認められなかったものの、 β_2 -AR mRNA の発現量は遅発育区と比較して急速発育区で有意に高かった (図 3-2-3B-D)。

表 3-2-1. 本節で用いたプライマーとその配列 (*Gallus gallus domesticus*)

遺伝子名		Sequence (5'-3')
インスリン受容体	Forward	GAC TCT CCA ACG AAC AGG TG
	Reverse	TCA GCA TCT CAA TGA CCT CAA
<i>IGF-I</i>	Forward	CTT CAG TTC GTA TGT GGA GAC A
	Reverse	GAT TTA GGT GGC TTT ATT GGA G
<i>IGF-I</i> 受容体	Forward	CTG TGT CCG ACA AAT GGG GA
	Reverse	TGA CGG TCA GTT TCG GGA AG
β_1 -アドレナリン受容体	Forward	TTA GTG TCC CGG TTG CTG TC
	Reverse	AGC TTG GTG CTC TAG CTT GG
β_2 -アドレナリン受容体	Forward	GAC GCC GGA ACG CTG AG
	Reverse	GAA GAC AGT GAC CAG CAC GA
β_3 -アドレナリン受容体	Forward	ATC GGC AAG GAC AAG GTG AG
	Reverse	CCC ATG ATG ATG CCC AAG GT
<i>18S</i> リボソーム RNA	Forward	AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG
	Reverse	CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA

IGF-1:インスリン様成長因子-1

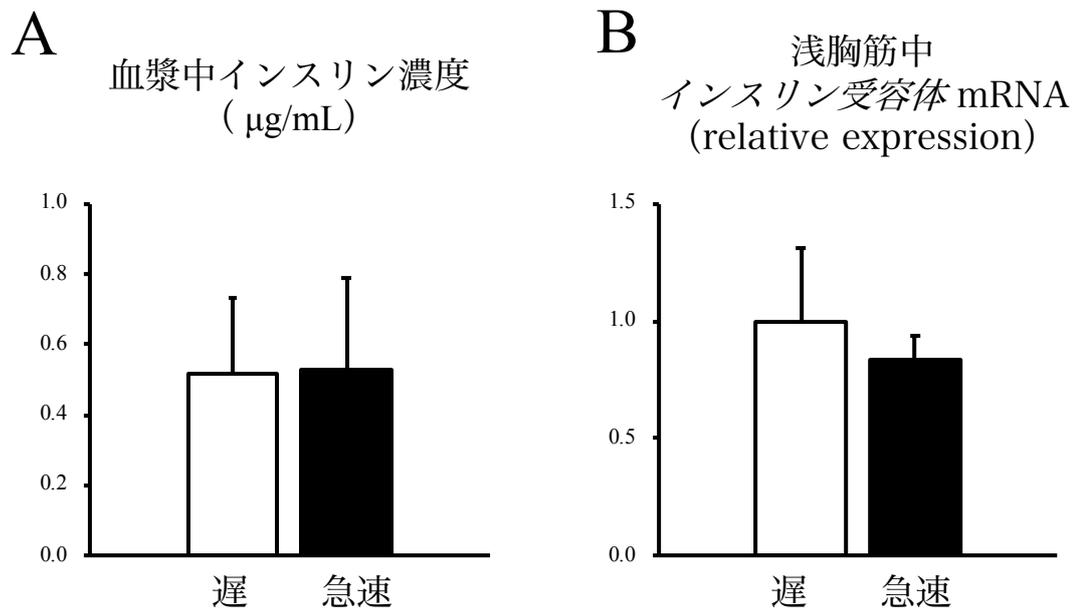


図 3-2-1. 初期成長速度の異なるブロイラーヒナにおける血漿中のインスリン濃度および浅胸筋中のインスリン受容体 mRNA の発現量の比較
 遅：遅発育区 急速：急速発育区

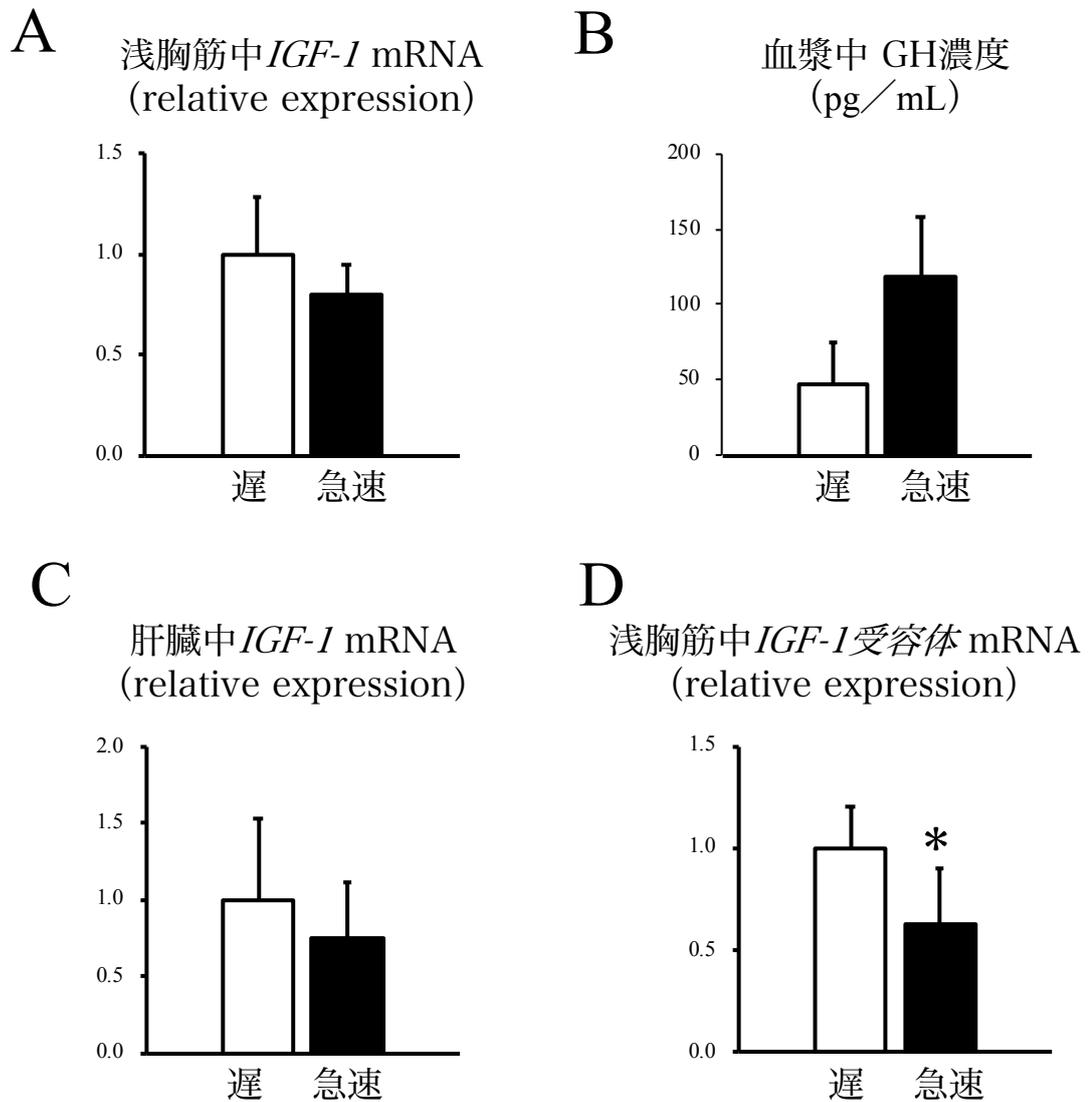


図 3-2-2. 初期成長速度の異なるブロイラーヒナにおける組織中の IGF-1 および IGF-受容体 mRNA の発現量と血漿中 GH 濃度の比較
 *;P<0.05 遅：遅発育区 急速：急速発育区
 IGF-1:インスリン様成長因子; GH:成長ホルモン

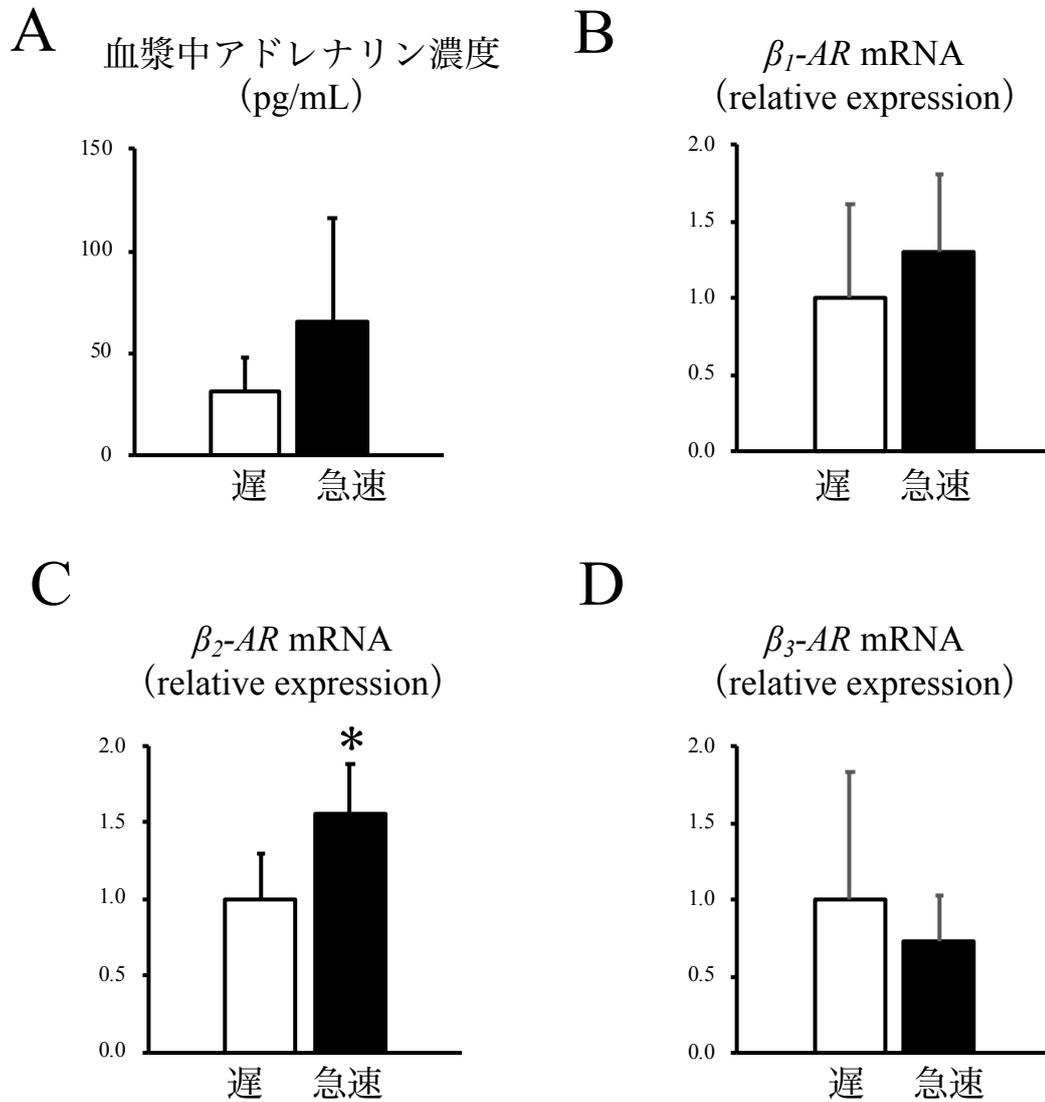


図 3-2-3. 初期成長速度の異なるブロイラーヒナにおける血漿中アドレナリン濃度と浅胸筋中の β -AR 受容体 mRNA の発現量との比較

*;P<0.05 遅：遅発育区 急速：急速発育区

β -AR: β アドレナリン受容体

3-2-4 考察

前章の結果より、増体速度の異なる 2 区間で体タンパク質分解速度に有意な差があること、ならびにその差は浅胸筋中の *Atrogin-1/MAFbx mRNA* の発現量が関与することが示された。哺乳動物およびニワトリの骨格筋および培養骨格筋細胞において、インスリンまたは IGF-1 の刺激が AKT のリン酸化を介して FoxO1 の転写を阻害し、*Atrogin-1/MAFbx mRNA* の発現を抑制することが報告されている (Frayn and Maycock, 1979; Satchek *et al.*, 2004; Stitt *et al.*, 2004; Nakashima *et al.*, 2017; Saneyasu *et al.*, 2017)。しかしながら、本節の結果より、増体速度が異なる急速発育区と遅発育区の 2 区間の血中のインスリン濃度、および浅胸筋中のインスリン受容体 mRNA 発現量に差は認められなかった。同様に、浅胸筋中の *IGF-1 mRNA* の発現量に 5 日齢における急速発育区と遅発育区との間に差は認められなかった。血中の IGF-1 濃度を測定するには、ELISA 法やラジオアイソトープ実験をする必要があるが、現時点でニワトリに適合した ELISA キットがないことと、ラジオアイソトープ実験の技術取得が困難であったため、本実験では測定が不可能であると判断し、IGF-1 濃度に関与すると考えられる GH 濃度の測定を試みた。血液中の IGF-1 濃度は GH およびインスリンによって調節されており (Thissen *et al.*, 1994)、肝臓で主に産生されている。しかしながら、血漿中の GH およびインスリン濃度は、成長速度が異なる 2 区間で同等レベルであった。さらに、肝臓中の *IGF-1 mRNA* 発現量に差はなく、*IGF-1* 受容体 mRNA の発現量は遅発育区と比較して急速発育区で低くなった。以上の結果より、初期成長期のブロイラ

ーヒナの骨格筋タンパク質分解レベルに対するインスリンおよび IGF-1 の寄与は大きくないと考えられた。

また、アドレナリンも *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量を減少させ骨格筋タンパク質分解を抑制することが報告されている (Navegantes *et al.*, 2001; Silveira *et al.*, 2014)。さらに、第 1 章で述べた通り、アドレナリンは G タンパク質共役型受容体である 9 種の AR のサブタイプのうち、骨格筋では主に β -AR (β_1 、 β_2 、 β_3 の 3 種のサブタイプに分類される) によって作用が伝達される (Grady *et al.*, 1997)。本節では、血漿中のアドレナリン濃度および各 β -AR mRNA 発現量を遅発育区と急速発育区で比較した。その結果、血漿中のアドレナリン濃度に差はなく、また、 β_1 および β_3 -AR mRNA の発現量に差は認められなかった。一方、 β_2 -AR mRNA 発現量のみ遅発育区と比較して急速発育区で有意に高かったことから、急速発育区のタンパク質分解速度の低さは、 β_2 -AR mRNA の発現量と相関する可能性が示唆された。

本章の結果より、骨格筋タンパク質抑制とシグナルと β_2 -AR mRNA 発現量との関連が示唆されたため、第 4 章ではブロイラーヒナの骨格筋における AR シグナルの作用について調べた。

第4章 肉用鶏ヒナの骨格筋におけるアドレナリンシグナルの作用

第3章の結果より、肉用鶏の骨格筋タンパク質分解の個体差を支配する要因として β_2 -AR mRNA の発現量の関与が示唆された。アドレナリンは、骨格筋タンパク質分解を抑制することが報告されており (Navegantes *et al.*, 2002)、Silveira ら (2014) はアドレナリンの投与が AMP-PKA シグナルの活性化によって FoxO1 の転写活性を阻害し、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量を減少させることを報告している。しかしながら、アドレナリンはストレス応答性のホルモンに分類され、その作用として主に異化に関わる研究が多く報告されていることから、骨格筋タンパク質分解の抑制メカニズムについては注目されていなかった。

前章で述べてきたように、アドレナリンは9種の受容体 ($\alpha 1A$ 、 $\alpha 1B$ 、 $\alpha 1D$ 、 $\alpha 2A$ 、 $\alpha 2B$ 、 $\alpha 2C$ 、 β_1 、 β_2 、および β_3) を介して様々な組織において機能を発揮する。これら9種のサブタイプのうち、骨格筋では主に β -AR (β_1 、 β_2 、 β_3 の3種のサブタイプに分類される) によって作用が伝達される (Grady *et al.*, 1997)。これまでに本研究室では、1日齢のブロイラーヒナに β_2 -AR 作動薬であるクレンプテロールを腹腔内投与すると骨格筋タンパク質分解の指標である 3-MeHis 含量および *Atrogin-1/MAFbx* mRNA 発現量が縫工筋で減少することを報告している (Ijiri *et al.*, 2014) が、その他 β -AR サブタイプが骨格筋のタンパク質分解に関与しているかは不明である。

本章では、Ijiri ら (2014) のモデルを用いて、先ず、第1節として1

日齢のブロイラーヒナにアドレナリンまたは非選択的 β 受容体作動薬であるイソプロテレノールを腹腔内投与し、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量に与える影響を調べた。続いて第 2 節では、1 日齢ブロイラーヒナに β -AR サブタイプそれぞれの作動薬を腹腔内投与し、アドレナリンによる *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現制御に関わるサブタイプの同定を行なった。

第 1 節 アドレナリンおよびイソプロテレノールの腹腔内投与がブロイラーヒナの骨格筋における *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現に及ぼす影響

4-1-1 目的

本研究では、1 日齢ブロイラーヒナにアドレナリンまたは非選択的 β -AR 作動薬であるイソプロテレノールを腹腔内投与し、縫工筋中の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量に与える影響を調べた。

4-1-2 材料および方法

(1) 供試動物と実験計画

1 日齢のブロイラー初生ヒナ（チャンキー系 ROSS308、オス）を加治木ヒナセンターから 18 羽導入し、3 区に分け、PBS（対照区）、アドレナリン（01019-21、ナカライテスク、京都）、イソプロテレノール（19703-04、ナカライテスク、京都）を腹腔内に単回投与した。予備試験の結果、投与濃度は 0.1 mg/kg 体重に設定し、また、最もアドレナリンの効果が示された投与 3 時間後に屠殺し、解体を行った。屠殺後、

血液、および縫工筋を採取し重量測定後、 -80°C で凍結保存した。

(2) 縫工筋中の遺伝子発現

試薬は第3章第1節に準じて購入した。

〈組織からの mRNA 抽出〉

mRNA の抽出は第3章第1節に準じて行った。

〈cDNA の合成〉

cDNA の合成は第3章第1節に準じて行った。

〈Real Time PCR〉

PCR 反応に用いたプライマーを表 3-1-2 に示した。mRNA の発現量は第3章第1節に準じて行った。

(3) 統計処理

データは平均値±標準誤差として表した。得られたデータの平均値の差の検定は、Dunnet's の多重比較検定法を用いて対照区との差異を調べた。

4-1-3 結果

結果は、図 4-1-1 に示した。1 日齢ブロイラーヒナに対するアドレナリンの腹腔内への単回投与は、投与 3 時間後の縫工筋中の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量を有意に減少させた。また、アドレナリンと同様に、非選択的 β -AR 作動薬であるイソプロテレノールの腹腔内単回投与も、投与 3 時間後の縫工筋中の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量を有意に減少させた。

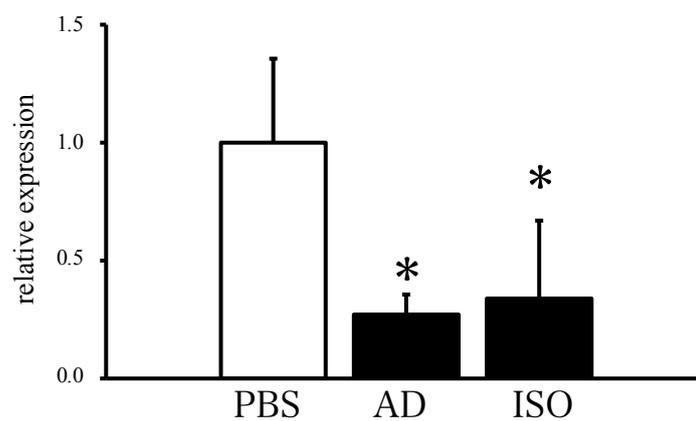


図 4-1-1. 1 日齢ブロイラーヒナへのアドレナリンおよびイソプロテレノールの投与が縫工筋中の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量に対する影響

*; $P < 0.05$, PBS : 対照区 ; AD : アドレナリン区 ; ISO : イソプロテレノール区

4-1-4 考察

哺乳類においてアドレナリンは、骨格筋中の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量を減少させ、骨格筋タンパク質分解を抑制することが報告されている (Navegantes *et al.*, 2001; Silveira *et al.*, 2014)。本節の結果より、ニワトリヒナにおいてもアドレナリンの投与は投与 3 時間後の縫工筋中の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量を有意に減少させた。このことから、鳥類の骨格筋においてもアドレナリンは *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現調節に関わるホルモンであることが示唆された。また、骨格筋において β 型の AR がアドレナリンの作用を伝達する受容体であると報告されていることから (Grady *et al.*, 1997)、本節ではニワトリヒナの腹腔内に β -AR 非選択的作動薬であるイソプロテレノールの投与を行なった。その結果、アドレナリンと同様に、投与 3 時間後の縫工筋中の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量は有意に減少した。本節の結果より、ニワトリヒナの骨格筋においてアドレナリンは β -AR シグナル伝達を介して *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現を調節することが明らかとなった。

次節では、 β -AR のサブタイプ (β_1 、 β_2 、 β_3) の選択的作動薬を 1 日齢ブロイラーヒナに腹腔内投与し、縫工筋における *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現に与える影響を調べた。

第 2 節 アドレナリンによる *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現制御に関わる β アドレナリン受容体サブタイプの同定

4-2-1 目的

前節の結果より、ニワトリヒナの骨格筋においてアドレナリンは β -AR を介して *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現を調節することが示唆された。本研究では、各 β -AR サブタイプ (β_1 、 β_2 、 β_3) の選択的作動薬の腹腔内投与がブロイラーヒナの骨格筋における *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現に及ぼす影響を調べ、アドレナリンによる *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現減少を惹起する受容体の同定を行なった。

4-2-2 材料および方法

(1) 供試動物および実験計画

実験 1 : 1 日齢のブロイラー初生ヒナ (チャンキー系 ROSS308、オス) を加治木ヒナセンターから 24 羽導入し、4 区に分け、PBS (対照区)、 β_1 -AR 作動薬 (ドブタミン; D0676、Sigma-Aldrich、MO、USA)、 β_2 -AR 作動薬 (クレンブテロール; C5423、Sigma-Aldrich)、 β_3 -AR 作動薬 (BRL37344 ; Sc-200154、Santa Cruz、CA、USA) を腹腔内に単回投与した。予備試験の結果、投与濃度は全て 0.1 mg/kg 体重に設定した (図 4-2-1)。投与 3 時間後に屠殺し、解体を行った。屠殺後、血液、および縫工筋を採取し重量測定後、 -80°C で凍結保存した。

実験 2 : 1 日齢のブロイラー初生ヒナ (チャンキー系 ROSS308、オス) を加治木ヒナセンターから 24 羽導入し、アドレナリン投与区または PBS 投与区に分けた。次に、それぞれの処理区の 6 羽は、アドレナ

リンまたは PBS 投与の 30 分前に β_2 -AR 遮断薬(ブトキサミン;B1385、Sigma-Aldrich) を投与し、残りの 6 羽には PBS を投与した。その後、アドレナリン (0.1 mg/kg 体重) または PBS を腹腔内に単回投与した。投与の 3 時間後に屠殺し解体した。屠殺後、血液、および縫工筋を採取し重量測定後、-80°C で凍結保存した。

(2) 縫工筋中の遺伝子発現

試薬は第 3 章第 1 節に準じて購入した。

〈組織からの mRNA 抽出〉

mRNA の抽出は第 3 章第 1 節に準じて行った。

〈cDNA の合成〉

cDNA の合成は第 3 章第 1 節に準じて行った。

〈Real Time PCR〉

PCR 反応に用いたプライマーを表 3-1-2 に示した。mRNA の発現量は第 3 章第 1 節に準じて行った。

(3) 統計処理

データは平均値±標準誤差として表した。得られたデータの平均値の差の検定は、Dunnet's の多重比較検定法を用いて対照区との差異を調べた。

4-2-3 結果

結果は図 4-2-2 に示した。ブロイラーヒナへの β_1 -AR 作動薬ドブタミンの腹腔内投与は、縫工筋中の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量に影響を与えなかったが、 β_2 -AR 作動薬クレンブテロールの投与は *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量を有意に減少させた。一方、 β_3 -AR 作動薬 BRL37344 の投与は *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量を有意に増加させた。

また、ブロイラーヒナへのアドレナリンの投与は、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量を有意に減少させた（図 4-2-3）。一方、 β_2 -AR 遮断薬であるブトキサミンの前投与は、アドレナリンによる *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現減少を抑制した（図 4-2-3）。

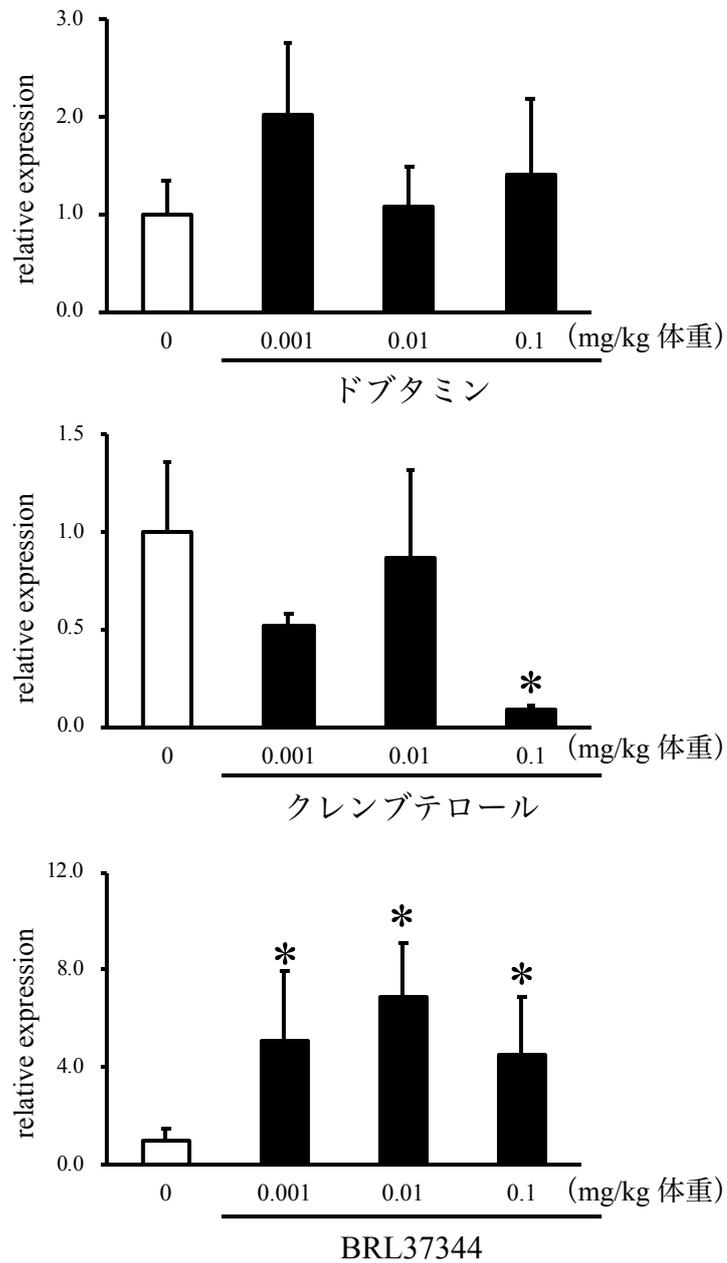


図 4-2-1. 1 日齢ブロイラーヒナへの β アドレナリン受容体サブタイプの選択的作動薬の投与が縫工筋中の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量に与える影響 (投与濃度決定の予備試験)

*; $P < 0.05$

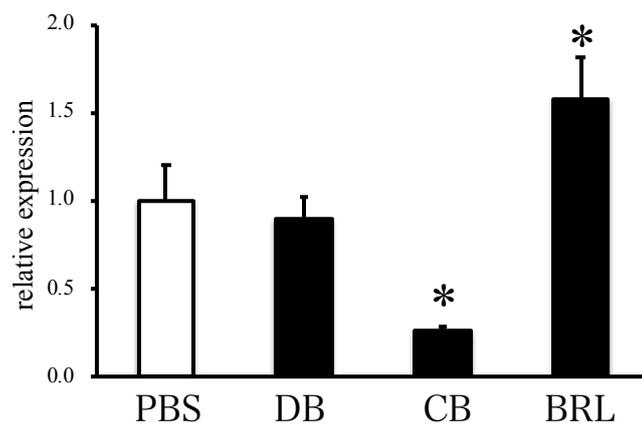


図 4-2-2. 1 日齢ブロイラーヒナへの β アドレナリン受容体サブタイプの選択的作動薬の投与が縫工筋中の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量に与える影響

*; $P < 0.05$, PBS : 対照区 ; DB : ドブタミン区 ; CB: クレンブテロール区 ; BRL : BRL37344 区

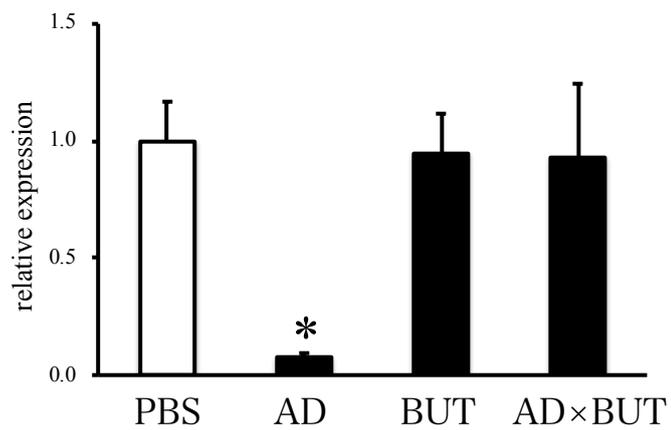


図 4-2-3. 1 日齢ブロイラーヒナへの β_2 アドレナリン受容体選択的遮断薬の前投与が縫工筋中の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量に与える影響

*; $P < 0.05$, PBS: 対照区; AD: アドレナリン区; BUT: ブトキサミン区; AD×BUT: アドレナリン×ブトキサミン区

4-2-4 考察

本節の結果より、 β_2 -AR 作動薬であるクレンブテロールの投与は、投与 3 時間後の縫工筋において *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量を有意に減少させた。一方で、 β_1 -AR 作動薬であるドブタミンや β_3 -AR 作動薬である BRL37344 の投与による *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の減少は認められなかった。また、 β_2 -AR 遮断薬であるブトキサミンの前投与は、アドレナリン投与による *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現減少を抑制した。これまでに哺乳類において、クレンブテロールの投与が骨格筋中の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現を減少させることが報告されている (Koopman *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2013)。さらに、本研究室では 1 日齢ブロイラーヒナにおけるクレンブテロールの投与が、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量減少を介して縫工筋のタンパク質分解を抑制することを報告している (Ijiri *et al.*, 2014)。これらの結果より、ブロイラーヒナにおいてアドレナリンは、 β_2 -AR シグナルの活性化を介して骨格筋における *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現を調節し、タンパク質分解を抑制することが示唆された。

一方、ニワトリヒナへの BRL37344 の投与は縫工筋中の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現を有意に増加させた。しかしながら、骨格筋における β_3 -AR の役割に関する情報が不十分であるため、BRL37344 が *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量を増加させるメカニズムは不明のままである。さらに、ラットの骨格筋および C2C12 培養骨格筋細胞において β_3 -AR は生理学的に有意な量の発現はしていないことが報告されている (Liu *et al.*, 1998; Ngala *et al.*, 2008)。したがって、骨格筋にお

ける BRL37344 の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量に与える影響は、 β_3 -AR を介した作用ではない可能性が示唆された。

第 3 章の結果より、初期成長期の増体速度が早い急速発育区では遅発育区と比較して β_2 -AR mRNA の発現量が高かったことから、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現減少に伴う骨格筋のタンパク質分解の抑制は β_2 -AR シグナルがより強く活性化された結果であることが考えられた。第 3 節では、ニワトリヒナの骨格筋における β_2 -AR シグナルによるタンパク質分解抑制メカニズムのさらなる解明を目的とし、クレンブテロールの単回投与が骨格筋に与える影響を詳細に調べた。

第3節 ニワトリヒナの骨格筋における β_2 -AR シグナルによるタンパク質分解抑制メカニズムのさらなる解明

4-3-1 目的

第2節より、ブロイラーヒナにおけるクレンプテロールの腹腔内投与による β_2 -AR の活性化は、縫工筋の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA 発現量を減少させることにより、タンパク質分解を抑制することが示された。前章でも述べている通り、FoxO 転写因子は *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の転写に重要な役割を果たしており (Sandori *et al.*, 2004)、インスリンや IGF-1 によるタンパク質分解抑制シグナルは、AKT のリン酸化が FoxO1 転写因子を阻害することによって *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現を抑制することはよく知られている (Sandori *et al.*, 2004; Stitt *et al.*, 2004)。FoxO 転写因子は AKT によるリン酸化を受け、核内から細胞質へ移行することでその転写活性が抑制される (Daitoku *et al.*, 2011)。これまでに、哺乳類においてクレンプテロールによる β_2 -AR の活性化は、AKT のリン酸化を介して *Atrogin-1/MAFbx* の発現を減少させることが報告されている (Koopman *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2012)。しかしながら、ニワトリヒナの骨格筋における β_2 -AR の活性化が AKT のリン酸化および FoxO1 転写因子のリン酸化状態や細胞内局在に及ぼす影響については、未だ解明されていない。

本節では、ブロイラーヒナを用いてクレンプテロール投与による β_2 -AR の活性化が、AKT-FoxO1 シグナルを介した骨格筋タンパク質分解抑制機構に与える影響を調べた。

4-3-2 材料および方法

(1) 供試動物および実験計画

1日齢のブロイラー初生ヒナ（チャンキー系 ROSS308、オス）12羽を加治木ヒナセンターから導入し、6羽ずつ体重が均等になるように2区に分け、対照区とクレンブテロール投与区の2区に分けた。対照区にはPBSを投与し、クレンブテロール投与区には0.1 mg/kg体重に濃度を調整したクレンブテロールを投与した。投与3時間後に屠殺し、解体した。屠殺後、血液、および縫工筋を採取し重量測定後、-80°Cで凍結保存した。

(2) 縫工筋中の遺伝子発現

試薬は第3章第1節に準じて購入した。

〈組織からの mRNA 抽出〉

mRNAの抽出は第3章第1節に準じて行った。

〈cDNA の合成〉

cDNAの合成は第3章第1節に準じて行った。

〈Real Time PCR〉

PCR反応に用いたプライマーを表4-3-1に示した。mRNAの発現量は第3章第1節に準じて行った。

(3) 血漿中の遊離 3-MeHis 濃度分析

本研究では、血漿中の遊離 3-MeHis 濃度を HPLC 法によって分析した。第 2 章第 1 節に準じて試薬を調製した。

〈骨格筋中 3-MeHis 濃度測定の前処理（除タンパク質処理）〉

第 2 章第 1 節と準じて行った。

〈血漿中 3-MeHis 濃度測定の前処理（除タンパク質処理）〉

第 2 章第 1 節と準じて行った。

〈カラムクロマトグラフィーによる MeHis の粗分離〉

第 2 章第 1 節に準じて行った。

〈3-MeHis の同定および計算〉

第 2 章第 1 節に準じて行った。

(4) 骨格筋中のタンパク質発現分析

試薬は第 3 章第 1 節に準じて購入した。

〈全細胞タンパク質の抽出〉

第 3 章第 1 節に準じて行った。

〈核タンパク質と細胞質タンパク質の抽出〉

約 500 mg の縫工筋を氷冷した 1 mL の Lysis バッファー (10 mM HEPES (pH 7.9)、1.5 mM MgCl₂、10 mM KCl、10 mM DTT、1 % プロテアーゼインヒビターカクテル) が入ったエッペンドルフチューブに入れ、ハサミで細切した。その後、チューブを氷上に置きながら、ポリトロンホモジナイザーでホモジェナイズした。遠心分離機 (Model 3700、KUBOTA、東京) を用いて 4 °C、10,000 ×g で 20 分間遠心分離し、上清を細胞質タンパク質サンプルとし、分析まで -30 °C で保存した。

上清を回収した後のペレットに、140 μL の Extraction バッファー (20 mM HEPES (pH 7.9)、1.5 mM MgCl₂、420 mM NaCl、0.2 mM EDTA、25 % (v/v) グリセロール、1 % プロテアーゼインヒビターカクテル) を加え、超音波ホモジナイザーを用いて再懸濁した。その後、遠心分離機 (Model 3700、KUBOTA、東京) で 4 °C、20,000 ×g で 20 分間遠心分離し、上清を核タンパク質サンプルとし、分析まで -30 °C で保存した。

〈タンパク質量の測定〉

第 3 章第 1 節に準じて行った。

〈ウエスタンブロッティングに供するサンプル調整〉

第 3 章第 1 節に準じて行った。

〈SDS-PAGE およびウエスタングロブリング〉

第3章第1節に準じて行った。

(5) 統計処理

データは平均値±標準誤差として表した。得られたデータの平均値の差の検定は、Student's の t 検定法を用いて対照区との差異を調べた。

4-3-3 結果

体重、縫工筋重量にクレンプテロール投与による影響は認められなかった。血漿中の 3-MeHis 濃度はクレンプテロール投与により有意に減少した（図 4-3-1A）。また、縫工筋における *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量は、クレンプテロール投与により対照区と比較して有意な減少が認められた（図 4-3-1B）。

縫工筋中の全 AKT のタンパク質発現量には、クレンプテロール投与による影響は認められなかったが、リン酸化 AKT のタンパク質発現量は対照区に対して有意に増加した（図 4-3-2）。その結果、縫工筋中の全 AKT 発現に対するリン酸化 AKT の発現比は、クレンプテロール投与によって有意に増加した（図 4-3-2）。続いて、クレンプテロールが FoxO1 タンパク質の細胞内局在に与える影響を調べるために、核タンパク質と細胞質タンパク質をそれぞれ抽出し、FoxO1 タンパク質の発現を調べた。クレンプテロールを投与したヒナの縫工筋の細胞質タンパク質では全 FoxO1 の発現に差はなかったが、リン酸化 FoxO1 の有意な増加が認められた（図 4-3-3A）。一方、核タンパク質において、FoxO1 タンパク質の有意な減少が認められた（図 4-3-3B）。

さらに、ニワトリヒナの骨格筋ではクレンプテロール投与により *FoxO1* mRNA の発現量が有意に減少することが明らかとなった（図 4-3-4A）。また、*IGF-1* mRNA の発現量は有意に増加した（図 4-3-4B）。

表 4-3-1 本節で用いたプライマーとその配列 (*Gallus gallus domesticus*)

遺伝子名		Sequence (5'-3')
<i>Atrogin-1/MAFbx</i>	Forward	CCA ACA ACC CAG AGA CCT GT
	Reverse	GGA GCT TCA CAC GAA CAT GA
<i>FoxO1</i>	Forward	TCT GGT CAG GAG GGA AAT GG
	Reverse	GCT TGC AGG CCA CTT TGA G
<i>IGF-I</i>	Forward	CTT CAG TTC GTA TGT GGA GAC A
	Reverse	GAT TTA GGT GGC TTT ATT GGA G
<i>18S</i> リボソーム RNA	Forward	AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG
	Reverse	CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA

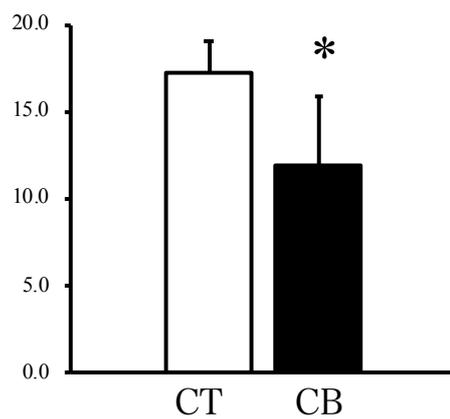
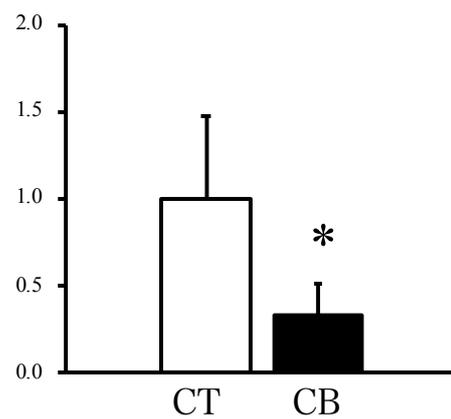
A血漿中3-MeHis 濃度
(nmol/mL)**B***Atrogin-1/MAFbx* mRNA
(relative expression)

図 4-3-1. 1 日齢ブロイラーヒナへのクレンプテロールの投与が血漿中の 3-MeHis 濃度および縫工筋中の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量に与える影響

*; $P < 0.05$, PBS : 対照区 ; CB : クレンプテロール区

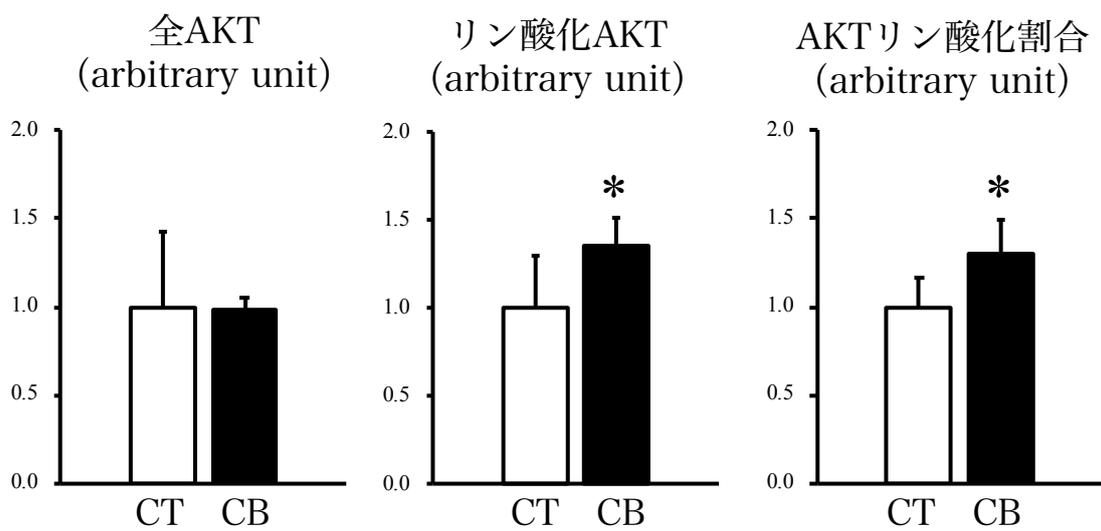
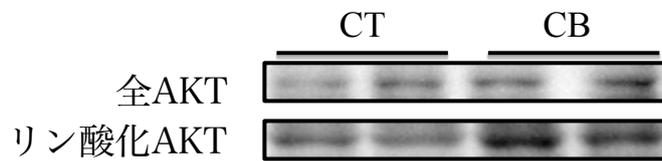


図 4-3-2. 1 日齢ブロイラーヒナへのクレンブテロールの投与が縫工筋中の AKT タンパク質の発現量に与える影響

*; P<0.05, PBS : 対照区 ; CB : クレブテロール区

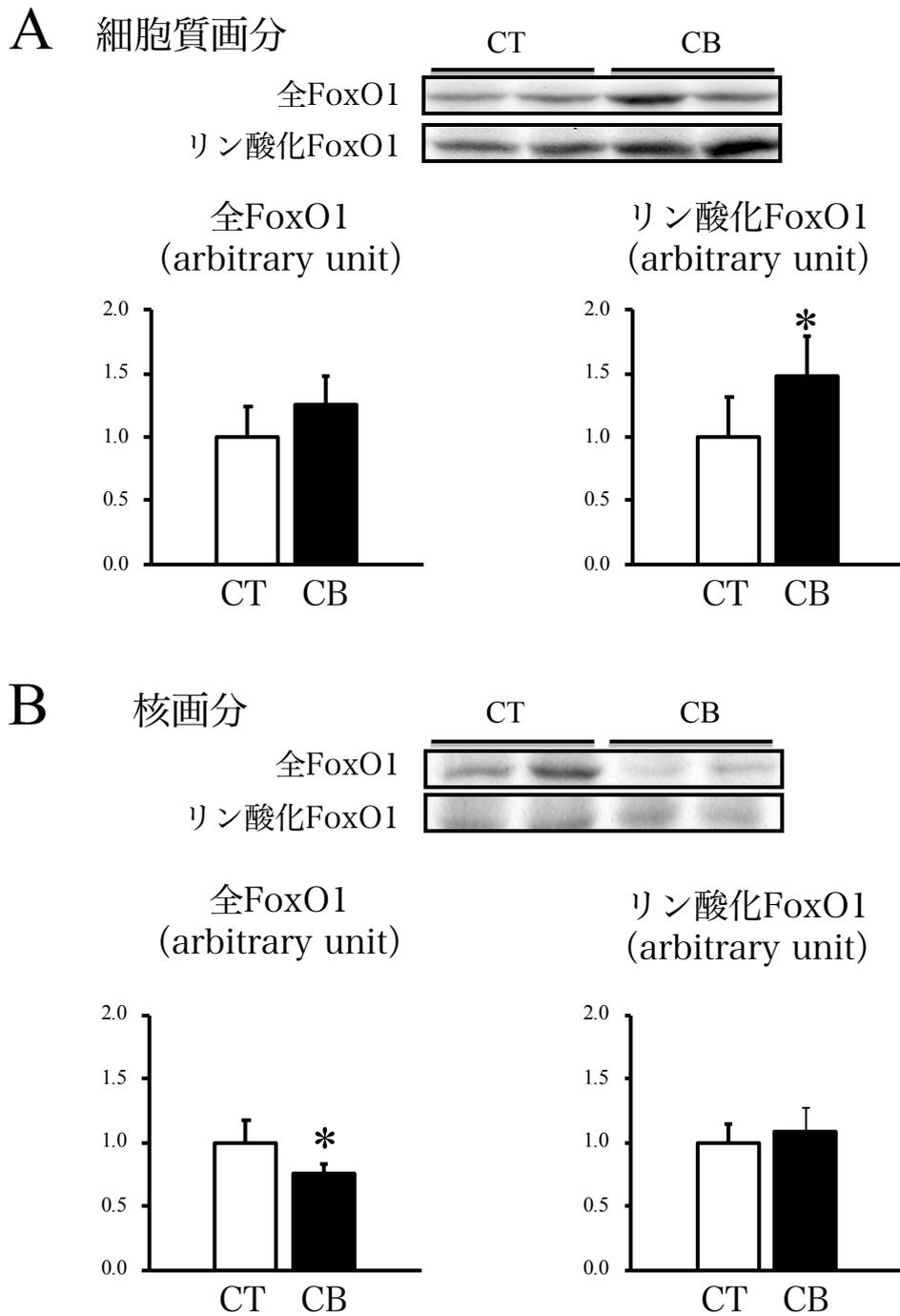
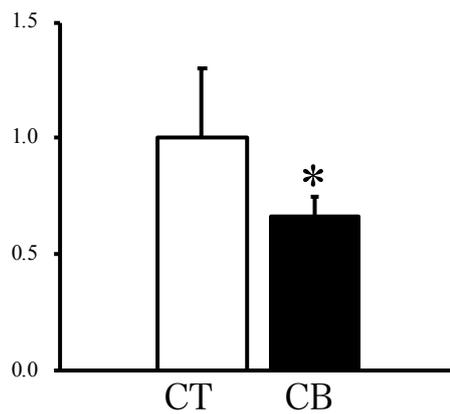


図 4-3-3. 1 日齢ブロイラーヒナへのクレンプテロールの投与が縫工筋中の FoxO1 タンパク質の局在に与える影響

*; $P < 0.05$, PBS : 対照区 ; CB : クレンプテロール区

A

FoxO1 mRNA
(relative expression)



B

IGF-1 mRNA
(relative expression)

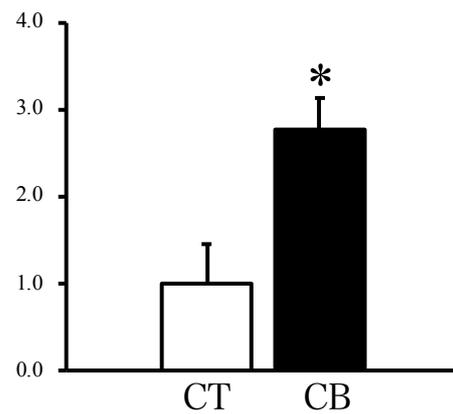


図 4-3-4. 1 日齢ブロイラーヒナへのクレンプテロールの投与が縫工筋中の *FoxO1* および *IGF-1* mRNA の発現量に与える影響

*; $P < 0.05$, PBS : 対照区 ; CB : クレンプテロール区 ; IGF-1 : インスリン様成長因子

4-3-4 考察

本節の結果より、ニワトリヒナに対するクレンプテロールの腹腔内投与は、骨格筋の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量を減少させ、タンパク質分解を抑制することが明らかとなった。

骨格筋中の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現減少が認められたクレンプテロール投与 3 時間後の縫工筋中の AKT のリン酸化割合は、クレンプテロール投与によって有意に増加した。哺乳類において、 β_2 -AR シグナルの活性化は、AKT のリン酸化を介して骨格筋特異的なユビキチンリガーゼである *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現を減少させることから (Koopman *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2012)、哺乳類と同様にニワトリヒナの骨格筋においても、 β_2 -AR シグナルの活性化は、AKT のリン酸化を介することが示唆された。

骨格筋のタンパク質分解調節機構として IGF-1-AKT シグナルカスケードがよく知られている。すなわち IGF-1 が IGF-1 受容体に結合すると、AKT がリン酸化され、FoxO 転写因子をリン酸化することにより核外へ移行させる (Daitoku *et al.*, 2011)。しかしながら、 β_2 -AR シグナルの活性化が、FoxO1 転写因子のリン酸化状態や細胞内局在に及ぼす影響については、未だ解明されていなかった。本節では、クレンプテロールを投与した 3 時間後のヒナの骨格筋の細胞質タンパク質におけるリン酸化 FoxO1 の有意な増加が認められた。一方、核タンパク質において、FoxO1 タンパク質の有意な減少が認められた。本節の結果より、 β_2 -AR シグナルの活性化は、AKT のリン酸化割合を増加させ、細胞質におけるリン酸化 FoxO1 タンパク質の発現を増加させることが明

らかとなった。 β_2 -AR シグナルにより FoxO1 転写因子の細胞内局在が変化し、標的遺伝子に対する FoxO1 の転写活性が低下した結果として *Atrogin-1/MAFbx* mRNA 発現が減少し、タンパク質分解が抑制されたと考えられる。

加えて、クレンプテロールの投与により、骨格筋における *FoxO1* mRNA の発現量の減少と、核タンパク質中の FoxO1 タンパク質の発現減少が認められた。これらの結果より、ニワトリヒナへのクレンプテロールの腹腔内投与が骨格筋の *FoxO1* mRNA およびタンパク質の発現量を減少させることにより、結果的に FoxO1 の転写活性を低下させる可能性も推察される。そこで第 5 章以降は、ニワトリ初代培養筋管細胞および C2C12 培養筋管細胞を用いてクレンプテロールによる β_2 -AR シグナルの活性化が FoxO1 転写因子の mRNA 発現量を減少させる作用機序について調べることを目的とした。

第 5 章 培養骨格筋細胞における β_2 -AR シグナルによる FoxO1 転写活性抑制分子機構の解明

第 4 章の結果より、ニワトリヒナを β_2 -AR の作動薬であるクレンプテロールで刺激すると、骨格筋タンパク質分解を抑制することが示唆された。また、その誘導メカニズムは、既存のタンパク質分解抑制シグナルとして知られているインスリンや IGF-1 と同様に骨格筋の AKT のリン酸化と FoxO1 のリン酸化（局在変化）を伴うことが明らかとなった。加えて、ニワトリヒナに対するクレンプテロールの腹腔内投与は、FoxO1 のリン酸化のみならず骨格筋における *FoxO1* mRNA の発現を減少させることを明らかにした。この β_2 -AR による *FoxO1* mRNA の発現量の減少は今までに知られていない新規の作用機序の可能性が高い。

本章では、第 1 節と第 2 節でニワトリ初代培養筋管細胞を、第 3 節と第 4 節では C2C12 培養筋管細胞を用いて、クレンプテロールによる β_2 -AR シグナルの活性化が FoxO1 転写因子の転写活性を減少させる機構の解明を目的とした。

第 1 節 ニワトリ初代培養筋管細胞の培地へのクレンプテロール添加条件の検討

5-1-1 目的

ニワトリ初代培養筋管細胞を用いて、クレンプテロールによる β_2 -AR シグナルの活性化が FoxO1 転写因子の mRNA に及ぼす影響を調べ

るために、クレンプテロールの適切な添加濃度を決定した。

5-1-2 材料および方法

(1) 供試細胞と実験計画

〈試薬〉

Medium 199 (199 培地)、仔ウシ血清、ペニシリンストレプトマイシン (PS) は、Life Technologies (NY、USA) より購入した。

〈ニワトリ初代培養筋管細胞の培養条件〉

13日卵齢のニワトリ胚の大腿筋から筋芽細胞を単離した(Nakashima *et al.*, 2016)。199 培地に仔ウシ血清を 15%、ニワトリ胚抽出液を 2.5% 添加した培地で 7 日間培養し、筋管を形成させた。クレンプテロールの添加培地は、Wannenes *et al.* (2012) の条件を参考にし、0.01、0.1、および 1 μM の濃度で添加した 199 培地 (無血清、5%PS) を用いた。比較対照として、溶媒 (PBS) のみを添加した 199 培地 (無血清、5%PS) を用いた。クレンプテロールの添加の 3 時間後に細胞の total RNA を回収した。

(2) 骨格筋細胞中の遺伝子発現

〈試薬〉

試薬は、第 3 章第 1 節に準じて購入した。

〈細胞からの mRNA 抽出〉

0.5 mL の ISOGEN II を入れた 1.5 mL 容マイクロチューブに細胞の回収液を移し、氷で冷やししながらピペッティングにより細胞を溶解した。スピンドウンを行い、0.2 mL の UltraPureWater を加え、15 秒間激しく攪拌混合し、室温で 15 分間静置した。20,000 ×g で 5 分間の遠心分離を行い、不溶物を沈殿させた。上清 0.5 mL を 1.5 mL 容マイクロチューブに移した。p-Bromoanisole を 2.5 μL 加えて、15 秒間しっかりと攪拌し、20,000 ×g で 5 分間の遠心分離を行った。上清（水層）0.325 mL を別の 1.5 mL 容マイクロチューブに移し、イソプロパノールを 0.325 mL 加えて、30 秒間攪拌した。室温で 10 分間静置後、20,000 ×g で 5 分間の遠心分離を行った。上清をアスピレーターで吸引して完全に除き、75 %エタノールを 250 μL 添加し、ペレットが浮くまで軽く攪拌した。20,000 ×g で 1 分間の遠心分離を行い、上清をアスピレーターで吸引して完全に除いた後、75%エタノール 0.5 mL を加えてペレットが浮くまで軽く攪拌し、20,000 ×g で 1 分間の遠心分離を行った。上清をアスピレーターで吸引して完全に除き、UltraPure Water を 30 μL 添加し、ペレットを溶解した。超微量紫外・可視分光光度計を用いて。抽出サンプル中の RNA 含量を求めた。

〈cDNA の合成〉

cDNA の合成は、第 3 章第 1 節に準じて行った。

〈Real Time PCR〉

PCR 反応に用いたプライマーは表 4-3-1 に準じた。mRNA の発現量は、第 3 章第 1 節に準じて行った。

(3) 統計処理

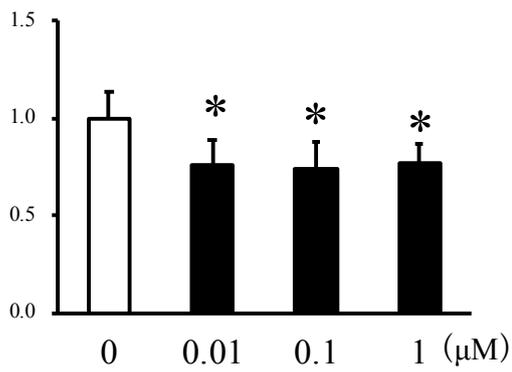
データは平均値±標準誤差として表した。得られたデータの平均値の差の検定は Dunnet's の多重比較検定法を用いて対照区との差異を調べた。

5-1-3 結果

ニワトリ初代培養筋管細胞の培地へクレンプテロールを 0.01、0.1、および 1 μ M の濃度で添加すると、*FoxO1* と *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量が有意に減少した（図 5-1-1）。

A

FoxO1 mRNA
(relative expression)



B

Atrogin-1/MAFbx mRNA
(relative expression)

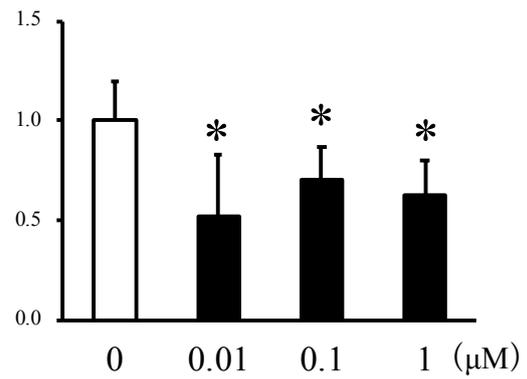


図5-1-1. ニワトリ初代培養筋管細胞へのクレンプテロールの添加が *FoxO1* および *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量に与える影響

*; P<0.05

5-1-4 考察

0.1 および 1 μM のクレンプテロール刺激は、*FoxO1* mRNA の発現量を減少させた。また、0.1 および 1 μM でのクレンプテロール刺激は、ニワトリ初代培養筋管細胞において、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA 発現量を減少させた。0.1 および 1 μM の濃度は、C2C12 培養筋管細胞に対するクレンプテロールの刺激により *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量減少を報告した Wannenes ら (2012) の結果と一致した。本研究の以降の実験ではニワトリ初代培養筋管細胞の培地へ 1 μM の濃度でクレンプテロールを添加した。

第 2 節 ニワトリ初代培養筋管細胞に対するクレンプテロールの添加が AKT-FoxO シグナルならびに *FoxO1* mRNA の発現量に及ぼす影響

5-2-1 目的

ニワトリ初代培養筋管細胞を用いて、クレンプテロールによる β_2 -AR シグナルの活性化が AKT および FoxO1 のリン酸化状態へ及ぼす影響を調べることを目的とした。

5-2-2 材料および方法

(1) 供試細胞と実験計画

〈試薬〉

試薬は、第 5 章第 1 節に準じて購入した。

〈ニワトリ初代培養筋管細胞の培養条件〉

筋管の形成は第 5 章第 1 節に準じて行った。クレンプテロールの添加培地は、第 5 章第 1 節の結果より、1 μ M の濃度で添加した 199 培地（無血清、5% PS）を用いた。比較対照として、PBS のみを添加した 199 培地（無血清、5% PS）を用いた。クレンプテロール添加の 3 時間後に細胞の全細胞タンパク質を回収した。また、クレンプテロールが *FoxO1* および *Atrogin-1/MAFbx* mRNA 発現量へ与える影響を経時的に調べるために、クレンプテロール添加の 1 および 3 時間後に細胞の total RNA を回収した。

(2) 骨格筋細胞中の遺伝子発現

骨格筋細胞中の遺伝子発現は、第3章第1節に準じて行った。

(3) 骨格筋細胞中のタンパク質発現分析

〈試薬〉

試薬は、第3章第1節に準じて購入した。

〈全細胞タンパク質の抽出〉

6 well dish から回収した初代培養筋管細胞を氷冷した 0.5 mL の RIPA バッファー (50 mM Tris (pH 8.0)、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、40%NP.40、150 mM NaCl、0.1 %SDS、1 mM EDTA、1%プロテアーゼインヒビターカクテル) が入った 1.5 mL 容マイクロチューブへ移し、ピペティングで細胞を溶解させた。遠心分離機 (H-2000B、コクサン) を用いて 4°C、20,000 ×g で 10 分間遠心分離し、上清をウエスタンブロットティング用サンプルとし、分析まで-30°C で保存した。

〈タンパク質量の測定〉

サンプル中のタンパク質量の測定は、第3章第1節に準じて行った。

〈ウエスタンブロットティングに供するサンプル調整〉

ウエスタンブロットティングに供するサンプル調整は、第3章第1節に準じて行った。

〈SDS-PAGE およびウエスタンブロッティング〉

SDS-PAGE およびウエスタンブロッティングは、第 3 章第 1 節に準じて行った。

(4) 統計処理

データは平均値±標準誤差として表した。得られたデータの平均値の差の検定は、Student's の t 検定法を用いて対照区との差異を調べた。

5-2-3 結果

クレブテロール添加 3 時間後のリン酸化 AKT および全 AKT のタンパク質発現量に、クレブテロール添加の影響は認められず、リン酸化割合にも影響は認められなかった。(図 5-2-1)。一方、リン酸化 FoxO1 および全 FoxO1 のタンパク質発現量は対照区と比較して有意に減少したが、リン酸化割合にクレブテロールによる影響は認められなかった(図 5-2-2)。また、*FoxO1* mRNA の発現は、クレブテロール添加 1 時間および 3 時間ともに対照区と比較して有意に減少した(図 5-2-3A)。*Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量は、添加 1 時間後にはクレブテロールの影響は認められなかったが、添加 3 時間後の発現量は対照区と比較して有意に減少した(図 5-2-3B)。一方、*IGF-1* mRNA の発現量は、クレブテロール添加 1 時間および 3 時間後ともにクレブテロールによる影響は認められなかった(図 5-2-3C)。

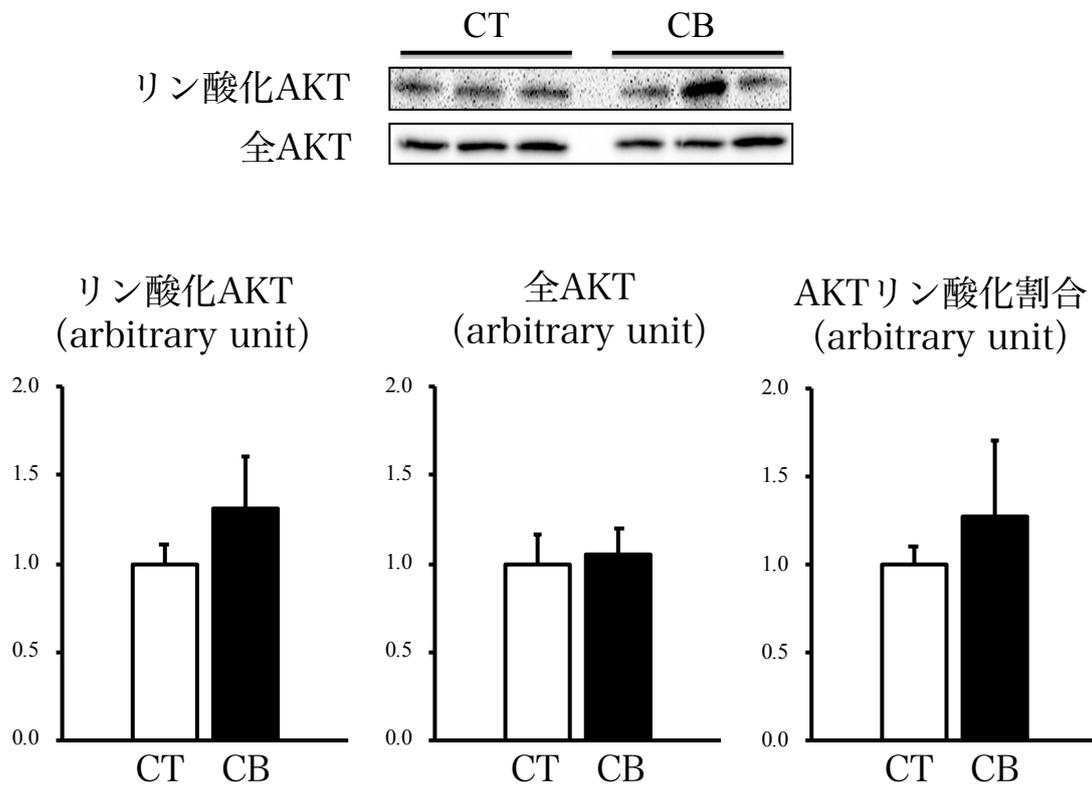


図 5-2-1. ニワトリ初代培養筋管細胞へのクレンプテロールの添加が AKT タンパク質の発現量に与える影響

*; $P < 0.05$ CT : 対照区 ; CB : クレンプテロール区

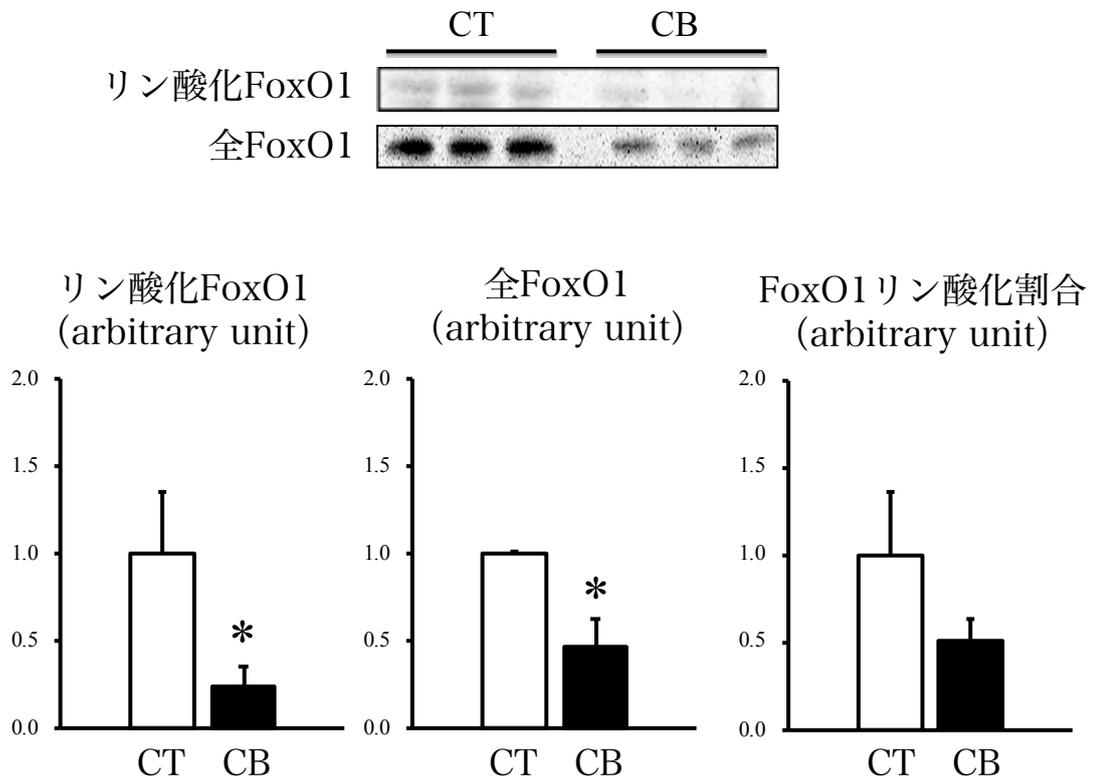


図5-2-2. ニワトリ初代培養筋管細胞へのクレンブテロールの添加がFoxO1タンパク質の発現量に与える影響
 *; $P < 0.05$ CT: 対照区; CB: クレブテロール区

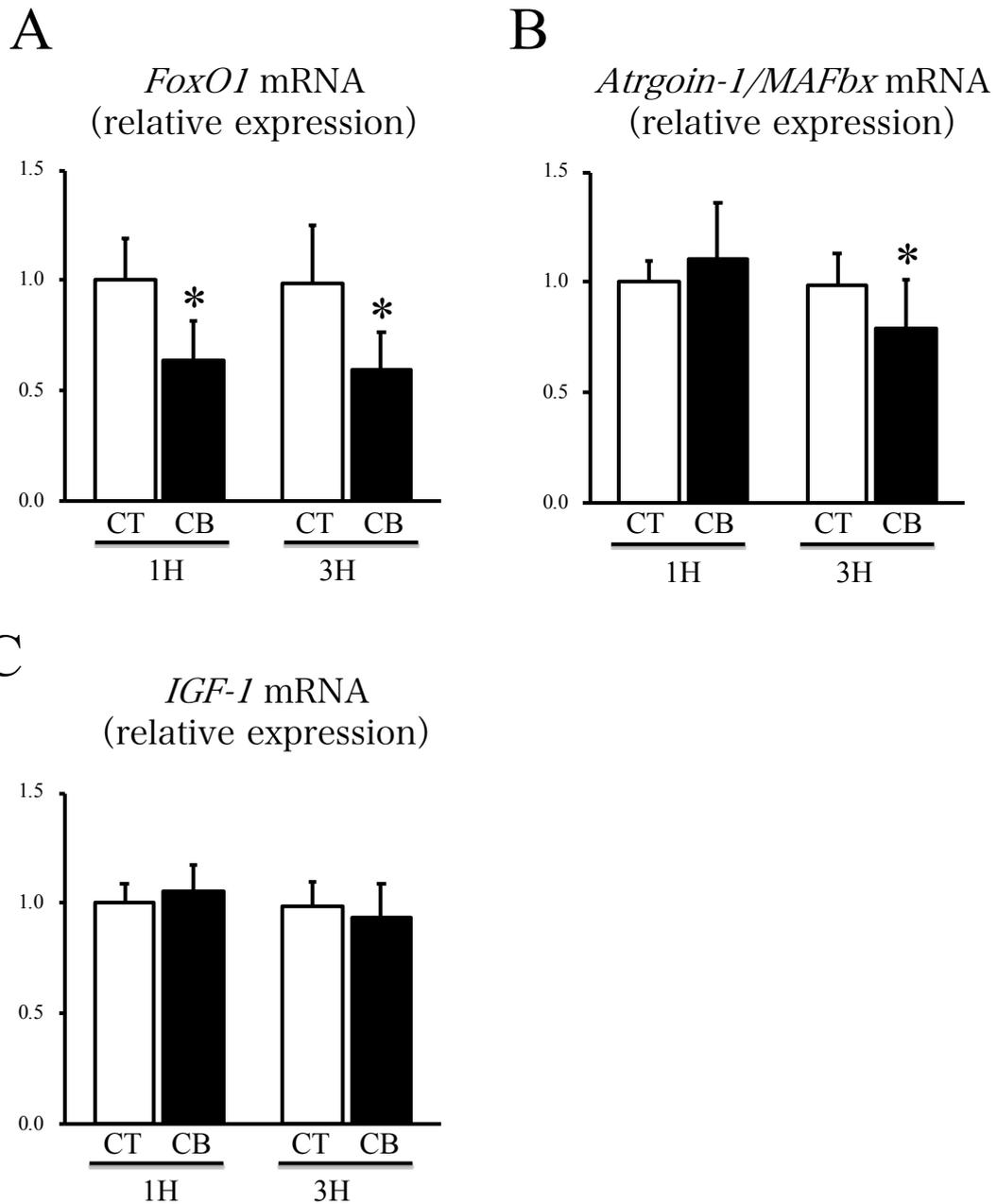


図 5-2-3. ニワトリ初代培養筋管細胞へのクレンプテロールの添加が mRNA の発現量に与える影響

*; $P < 0.05$ CT: 対照区; CB: クレンプテロール区; IGF-1: インスリン様成長因子

5-2-4 考察

in vivo での実験結果より、哺乳類において、 β_2 -AR シグナルの活性化は、AKT-FoxO1 のリン酸化を介して骨格筋特異的なユビキチンリガーゼである *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現を減少させることが報告されている (Koopman *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2012)。また、第 4 章第 3 節の結果より、ニワトリ初生ヒナにおいても AKT および FoxO1 のリン酸化を介した *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現減少が示された。しかしながら、ニワトリ初代培養筋管細胞へのクレンプテロールの添加は、AKT および FoxO1 のリン酸化に影響は与えなかった。それにも関わらず、クレンプテロール添加の 3 時間後に *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量が減少した。これらの結果より、ニワトリ初代培養筋管細胞へのクレンプテロール添加により活性化された β_2 -AR シグナルは、AKT のリン酸化を介さず *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現を減少させることが示唆された。

本節 (*in vitro*) の結果は、*in vivo* の実験系で得られたクレンプテロール投与による AKT のリン酸化の増加 (第 4 章第 3 節、Koopman *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2012) と矛盾した結果となった。その理由として、IGF-1 の関与が考えられる。第 4 章第 3 節の結果より、ニワトリヒナへのクレンプテロールの投与は骨格筋中の *IGF-1* mRNA の発現量を有意に増加させた。IGF-1 が IGF-1 受容体に結合すると、AKT をリン酸化し活性化させ、FoxO 転写因子をリン酸化することにより核外へ移行させる (Daitoku *et al.*, 2011)。一方、ニワトリ初代培養筋管細胞において *IGF-1* mRNA の発現量は、クレンプテロール

添加 1 時間および 3 時間後ともにクレンプテロールによる影響は認められなかった。さらに、*in vitro* において培地へのクレンプテロール添加は AKT および FoxO1 のリン酸化に直接影響を与えなかった。これらの結果は、 β_2 -AR シグナルが骨格筋細胞の AKT のリン酸化と直接的には関連しない可能性を支持する。第 4 章第 3 節で認められたニワトリ初生ヒナ骨格筋における AKT および FoxO1 のリン酸化は *IGF-1* mRNA の発現増加を介して誘導される可能性が示唆された。

さらに、クレンプテロール添加による *FoxO1* mRNA の発現量の減少は、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA の減少に先行して起こった。加えて、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA が減少したクレンプテロール添加 3 時間後には、全 FoxO1 タンパク質の減少が確認された。これらの結果から、ニワトリ初代培養筋管細胞においてクレンプテロールは *FoxO1* mRNA の発現減少を介して *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現を抑制することが示唆された。

これまでに、クレンプテロールを用いた β_2 -AR の活性化を介した *FoxO1* mRNA およびタンパク質減少作用は *in vivo* および *in vitro* どちらにおいても確認された。第 3 節では、 β_2 -AR の活性化が FoxO1 転写因子の転写活性調節に与える影響を哺乳類（マウス）由来の骨格筋細胞である C2C12 培養筋管細胞を用いて調べた。

第 3 節 C2C12 培養筋管細胞の培地へのクレンプテロール添加条件の検討

5-3-1 目的

C2C12 培養筋管細胞を用いて、クレンプテロールによる β_2 -AR シグナルの活性化が FoxO1 転写因子のリン酸化状態と *FoxO1* mRNA が及ぼす影響を調べるために、クレンプテロールの適切な添加濃度を決定することを目的とした。

5-3-2 材料および方法

(1) 供試細胞と実験計画

〈試薬〉

Dulbecco's Modified Eagle's medium (DME 培地) は、和光純薬工業 (大阪)、ウシ胎児血清 (FBS)、ウマ血清 (HS)、ペニシリンストレプトマイシン (PS) は、Life Technologies (NY、USA) より購入した。

〈C2C12 培養筋管細胞の培養条件〉

C2C12 培養筋管細胞を DME 培地に FBS を 10%、PS を 5% 添加した増殖培地でコンフルエントに達するまで培養した。その後、DME 培地に HS を 2%、PS を 5% 添加した分化培地で筋管を形成させた。クレンプテロールの添加培地は、第 3 章第 1 節の条件を参考にし、0.01、0.1、および 1 μ M の濃度で添加した DME 培地 (無血清、5%PS) を用いた。比較対照として、溶媒 (PBS) のみを添加した DME 培地 (無血清、5%PS) を用いた。クレンプテロールの添加の 3 時間後に細胞の total RNA を

回収した。

(2) 骨格筋細胞中の遺伝子発現

〈試薬〉

試薬は、第3章第1節に準じて購入した。

〈細胞からの mRNA 抽出〉

細胞からの mRNA の抽出は本章の第1節に準じて行った。

〈cDNA の合成〉

cDNA の合成は、第3章第1節に準じて行った。

〈Real Time PCR〉

PCR 反応に用いたプライマーを表 5-3-1 に示した。mRNA の発現量は、第3章第1節に準じて行った。

(3) 統計処理

データは平均値±標準誤差として表した。得られたデータの平均値の差の検定は Dunnet's の多重比較検定法を用いて対照区との差異を調べた。

5-3-3 結果

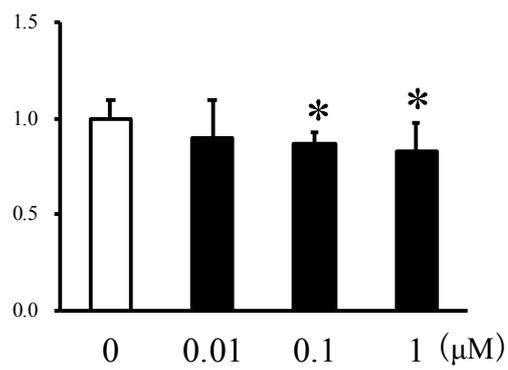
C2C12 培養筋管細胞の培地へクレンプテロールを 0.1 および 1 μM の濃度で添加すると、*FoxO1* mRNA の有意な減少が認められた (図 5-3-1A) また、クレンプテロールを 0.1 および 1 μM の濃度で添加すると、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA の有意な減少が認められた (図 5-3-1B)。

表 5-3-1. 本節で用いたプライマーとその配列 (*Mus musculus*)

遺伝子名		Sequence (5'-3')
<i>Atrogin-1/MAFbx</i>	Forward	GCA AAC ACT GCC ACA TTC TCT C
	Reverse	CTT GAG GGG AAA GTG AGA CG
<i>FoxO1</i>	Forward	GCT GGG TGT CAG GCT AAG AG
	Reverse	GGA CTG CTC CTC AGT TCC TG
<i>IGF-1</i>	Forward	GCT TGC TCA CCT TCA CCA GC
	Reverse	TTG GGC ATG TCA GTG TGG
18S リボソーム RNA	Forward	ACT CAA CAC GGG AAA CCT CAC C
	Reverse	CCA GAC AAA TCG CTC CAC CAA C

A

FoxO1 mRNA
(relative expression)



B

Atrgoin-1/MAFbx mRNA
(relative expression)

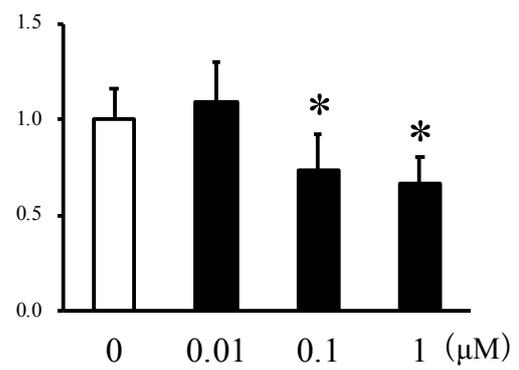


図 5-3-1. C2C12 培養筋管細胞へのクレンプテロールの添加が mRNA の発現量に与える影響

*; P<0.05 CT : 対照区 ; CB : クレンプテロール区

5-3-4 考察

第5章第1節のニワトリ初代培養筋管細胞の結果と同様に、0.1 および 1 μM でのクレンプテロール刺激は C2C12 培養筋管細胞において、*FoxO1* mRNA の発現量を減少させた。さらに、0.1 および 1 μM のクレンプテロール刺激は、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA 発現量を減少させた。本研究の以降の実験では、C2C12 培養筋管細胞の培地へ 1 μM の濃度でクレンプテロールを添加した。

第4節 C2C12培養筋管細胞に対するクレンプテロールの添加が AKT-FoxO シグナルに及ぼす影響

5-4-1 目的

C2C12 培養筋管細胞を用いて、クレンプテロールによる β_2 -AR シグナルの活性化が AKT および FoxO1 のリン酸化状態へ及ぼす影響を調べることを目的とした。

5-4-2 材料および方法

(1) 供試細胞と実験計画

〈試薬〉

試薬は、第5章第1節に準じて購入した。

〈C2C12 培養筋管細胞の培養条件〉

筋管の形成は本章第3節に準じて行った。クレンプテロールの添加培地は、本章第3節の結果より、1 μ M の濃度で添加した DME 培地（無血清、5 %PS）を用いた。比較対照として、PBS のみを添加した DME 培地（無血清、5 %PS）を用いた。クレンプテロールの添加の3時間後に細胞の全細胞タンパク質を回収した。また、クレンプテロールが *Atrogin-1/MAFbx* および *FoxO1* の mRNA 発現へ与える影響を経時的に調べるために、クレンプテロール添加の1および3時間後に細胞の total RNA を回収した。

(2) 骨格筋細胞中の遺伝子発現

骨格筋細胞中の遺伝子発現は、第3章第1節に準じて行った。

(3) 骨格筋細胞中のタンパク質発現分析

〈試薬〉

試薬は、第3章第1節に準じて購入した。

〈全細胞タンパク質の抽出〉

本章第2節に準じて行った。

〈タンパク質量の測定〉

サンプル中のタンパク質量の測定は、第3章第1節に準じて行った。

〈ウエスタンブロッティングに供するサンプル調整〉

ウエスタンブロッティングに供するサンプル調整は、第3章第1節に準じて行った。

〈SDS-PAGE およびウエスタンブロッティング〉

SDS-PAGE およびウエスタンブロッティングは、第3章第1節に準じて行った。

(4) 統計処理

データは平均値±標準誤差として表した。得られたデータの平均値

の差の検定は、Student's の t 検定法を用いて対照区との差異を調べた。

5-4-3 結果

クレンプテロール添加 3 時間後のリン酸化 AKT および全 AKT のタンパク質発現量に、クレンプテロール添加の影響は認められず、リン酸化割合にも影響は認められなかった。(図 5-4-1)。クレンプテロール添加 3 時間後の全 FOXO1 タンパク質量は有意に減少し、一方で、リン酸化 FoxO1 タンパク質量は有意に増加した結果、リン酸化割合も有意に増加した(図 5-4-2)。また、*FoxO1* mRNA の発現量は、クレンプテロール添加 1 時間および 3 時間後ともに有意に減少した(図 5-4-3A)。*Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量は、添加 1 時間後ではクレンプテロールの影響は認められなかったが、添加 3 時間後には対照区と比較して有意に減少した(図 5-4-3B)。

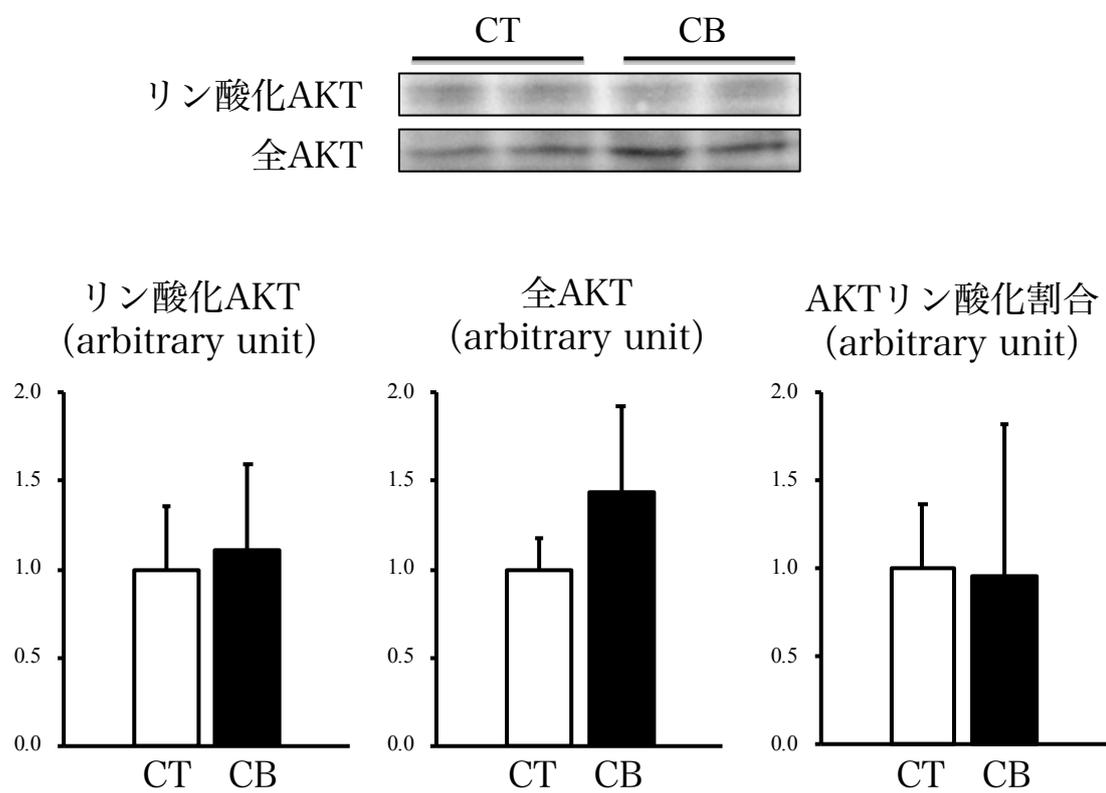


図 5-4-1. C2C12 培養筋管細胞へのクレンプテロールの添加が AKT タンパク質の発現量に与える影響

*; $P < 0.05$ CT : 対照区 ; CB : クレンプテロール区

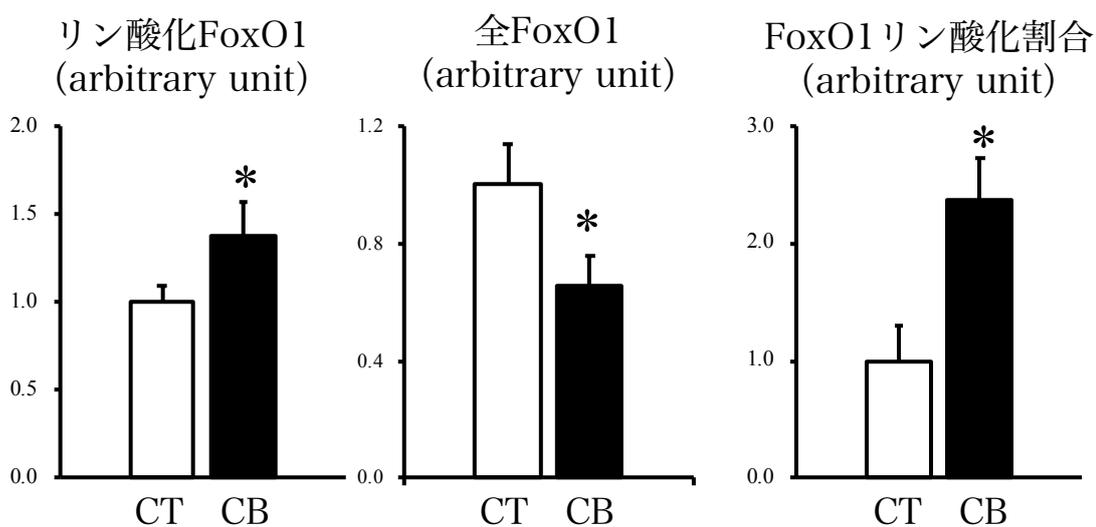
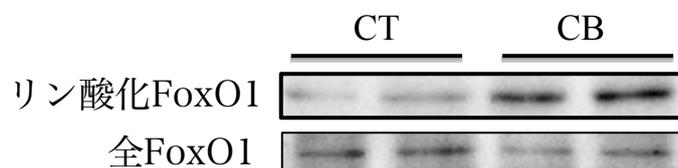


図 5-4-2. C2C12 培養筋管細胞へのクレンプテロールの添加が FoxO1 タンパク質の発現量に与える影響

*; $P < 0.05$ CT : 対照区 ; CB : クレンプテロール区

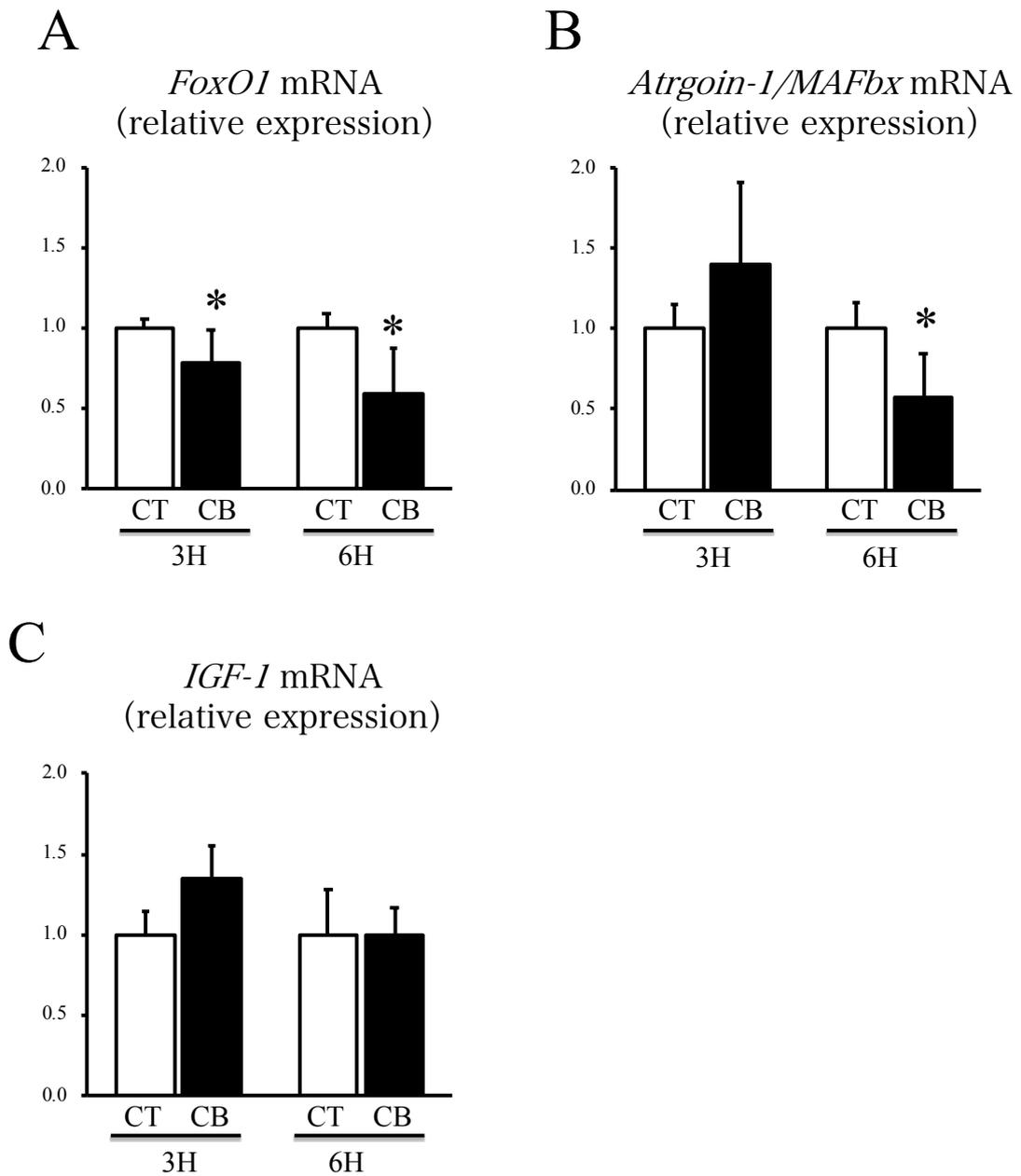


図 5-4-3. C2C12 培養筋管細胞へのクレンプテロールの添加が mRNA の発現量に与える影響

*; $P < 0.05$ CT: 対照区; CB: クレンプテロール区; IGF-1: インスリン様成長因子

5-4-4 考察

本章第 2 節で得られたニワトリ初代培養筋管細胞に対するクレンプテロール添加の影響と同様に、C2C12 培養筋管細胞においてもクレンプテロールの添加は、AKT をリン酸化させなかった。また、*IGF-1* mRNA の発現量においてもニワトリ初代培養筋管細胞と同様に、クレンプテロール添加 1 時間および 3 時間後ともにクレンプテロールによる影響は認められなかった。本章第 2 節で述べたとおり、*in vivo* の実験系で認められるクレンプテロール投与による AKT のリン酸化は、*IGF-1* シグナルを介した間接的な作用である可能性が高い。

一方、*FoxO1* mRNA の発現量は、クレンプテロール添加 1 時間後から有意に減少した。*Atrogin-1/MAFbx* mRNA の減少よりも、*FoxO1* mRNA の発現減少の方が先行して起こることから、C2C12 培養筋管細胞においてもクレンプテロールは *FoxO1* mRNA の発現減少を介して *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現を抑制することが示唆された。

しかしながら、ニワトリ初代培養筋管細胞とは異なり、C2C12 培養筋管細胞において *FoxO1* タンパク質のリン酸化割合は有意に増加した。AKT 以外に *FoxO1* タンパク質をリン酸化する経路として PKA シグナルがある。PKA は *Gs* タンパク質共役型受容体であるアドレナリン受容体の活性化により、アデニル酸シクラーゼの活性化および細胞内 cAMP レベルの上昇により活性化する。PKA は直接 *FoxO1* をリン酸化するキナーゼであり、AKT と同様に *FoxO1* の 3 つリン酸化部位（スレオニン 24 番目、セリン 256 番目、およびセリン 319 番目）をリン酸化することが報告されている (Lee *et al.*, 2011)。本研究で用いたリン酸

化 FoxO1 の抗体はセリン 256 番目がリン酸化された FoxO1 を検出している。これらのことから、本節の結果で認められた FoxO1 のリン酸化は PKA を介している可能性が考えられる。また、ニワトリ初代培養筋管細胞において FoxO1 のリン酸化が増加しなかった理由として、cAMP の活性や PKA シグナルに哺乳類と鳥類の違いがある可能性が考えられる。鳥類において PKA シグナルの知見は乏しいためさらなる検証が必要である。

FoxO タンパク質の転写活性は様々な翻訳後修飾（リン酸化、アセチル化、モノユビキチン化およびポリユビキチン化）の影響を受ける。リン酸化は主要な翻訳後修飾メカニズムとしてよく知られており、FoxO のリン酸化は、細胞内局在からサイトゾルへと変化し、その DNA 結合活性を低下させ、その転写活性を抑制する (Biggs *et al.*, 1999; Kops *et al.*, 1999; Nakae *et al.*, 1999; Nasrin *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002)。さらに、FoxO タンパク質の変化は細胞機能に大きな影響を与えると考えられており、FoxO タンパク質の欠損は哺乳動物の癌の増加と関連する (Borkhardt *et al.*, 1997; Paik *et al.*, 2003)。本章の結果より、培養骨格筋細胞においてクレンプテロールによる β_2 -AR の活性化は、FoxO1 タンパク質のリン酸化による細胞内局在の変化に加えて、FoxO1 mRNA およびタンパク質の発現を減少させたことから、新たな骨格筋のタンパク質分解抑制シグナル経路であると考えられる。

第 6 章では、クレンプテロールにより活性化された β_2 -AR シグナルが培養骨格筋細胞における FoxO1 転写因子の mRNA 発現を減少させる作用機序の解明を目的とした。より詳細なメカニズムを明らかにす

るため、今後は C2C12 培養骨格筋細胞を用いて遂行した。

第 6 章 培養骨格筋細胞における β_2 -AR シグナルによる microRNA を介した FoxO1 転写活性の抑制分子機構の解明

FoxO タンパク質の転写活性は、リン酸化、アセチル化、ならびにユビキチン化などの様々な翻訳後修飾によって影響を受ける (Calnan and Brunet, 2008; Daikoku *et al.*, 2011)。FoxO タンパク質のリン酸化は、その細胞内局在を核からサイトゾルへと変化させ、その DNA 結合活性を低下させ、それによってその転写活性を抑制する (Biggs *et al.*, 1999; Daitoku *et al.*, 2011)。第 4 章第 3 節において、ニワトリヒナにおける クレンプテロールの投与は、骨格筋のリン酸化 FoxO1 タンパク質の細胞内局在を変化させ、核タンパク質の存在量を減少させ、その結果、ニワトリ骨格筋におけるタンパク質分解を減少させた。加えて、第 5 章において培養骨格筋細胞におけるクレンプテロールの添加は、*FoxO1* mRNA と FoxO1 タンパク質の発現量を有意に減少させた。これらの結果は、 β_2 -AR シグナルが、リン酸化だけでなく骨格筋におけるタンパク質存在量も制御することによって FoxO1 転写活性を調節する役割を果たす可能性を示した。Qin ら (2010) はグルココルチコイドが *FoxO1* mRNA 発現量と核タンパク質の存在量を増加させることを報告している。しかしながら、*FoxO1* mRNA および FoxO タンパク質量の減少のメカニズムは不明な点が多い。

第 6 章では、クレンプテロールにより活性化された β_2 -AR シグナルが C2C12 培養骨格筋細胞における FoxO1 転写因子の mRNA 発現およびタンパク質量を減少させる作用機序の解明を目的とした。

第 1 節 β_2 -AR シグナルによる *FoxO1* mRNA 発現抑制に関わる microRNA の同定

6-1-1 目的

FoxO1 転写因子の mRNA の減少は、*FoxO1* 遺伝子の転写抑制、または、*FoxO1* mRNA が分解される可能性が考えられる。第 5 章で得られた結果より、培養骨格筋管細胞においてクレンブテロール誘導性の *FoxO1* mRNA の発現量が 1 から 3 時間後に減少することが認められた。このように急速な mRNA の発現減少は、*FoxO1* mRNA が分解されている可能性が高いと考え、*FoxO1* mRNA の分解に関わる microRNA (miRNA) に着目した。miRNA は、タンパク質をコードしない低分子の RNA であり、シード配列と呼ばれる領域の 6、7 塩基と相補的な配列を持つ標的 mRNA と結合する。多くの場合が標的 mRNA の 3'UTR と部分的な複合体を形成し、miRNA が結合した標的 mRNA は、ポリ A 鎖が短縮され、不安定化し、最終的には分解される。*FoxO* の転写後調節因子として過去 10 年間で多くの micro RNA (miRNA) が同定されている (Urbánek and Klotz, 2017)。本節では C2C12 培養筋管細胞における *FoxO1* mRNA 発現の調節に関与する miRNA を同定するためにマイクロアレイ分析を行った。

6-1-2 材料および方法

(1) 供試細胞と実験計画

〈試薬〉

試薬は、第 5 章第 1 節に準じて購入した。

〈C2C12 培養筋管細胞の培養条件〉

筋管への形成は本章第 3 節に準じて行った。クレンプテロールの添加培地は、本章第 3 節の結果より、1 μM の濃度で添加した DME 培地（無血清、5 %PS）を用いた。比較対照として、PBS のみを添加した DME 培地（無血清、5 %PS）を用いた。クレンプテロールの添加の 1 時間後に mirVana™ miRNA Isolation Kit（Ambion、TX、USA）を用いて細胞の total RNA および miRNA を回収した。

（2）骨格筋細胞中の micro RNA のマイクロアレイ

〈試薬〉

UltraPure Water は caymanchemical company（Ann Arbor、MI、USA）、エタノールはナカライテスク（京都）より購入した。

〈細胞からの mRNA 抽出〉

total RNA および miRNA の抽出は、mirVana™ miRNA Isolation Kit（Ambion、TX、USA）の手順に準じて行った。UltraPure Water を 100 μL 添加し、ペレットを溶解した。超微量紫外・可視分光光度計を用いて、抽出サンプル中の RNA 含量を求めた。

〈RNA の希釈〉

miRNA のマイクロアレイ分析用に RNA 濃度が 3 $\text{ng}/\mu\text{L}$ となるように、UltraPure Water で希釈し分析するまで -80°C で保存した。

〈マイクロアレイ〉

本実験では、Filgen 株式会社（愛知）の GeneChip™ miRNA Array 受託解析を利用した。

6-1-3 結果

1 μ M クレブテロールで1時間刺激した C2C12 培養筋管細胞における miRNA の発現をマイクロアレイ分析により調べた。その結果、3163 個の miRNA が C2C12 培養筋管細胞において検出された。そのうち、対照区との間に有意差が認められた miRNA を図 6-1-1 にヒートマップで示した（増加した miRNA を赤色、減少した miRNA を青色で示した）。合計で 103 個の miRNA に有意差があり、クレブテロール添加1時間後の C2C12 培養筋管細胞において 64 個の miRNA が増加し、39 個の miRNA が減少した。

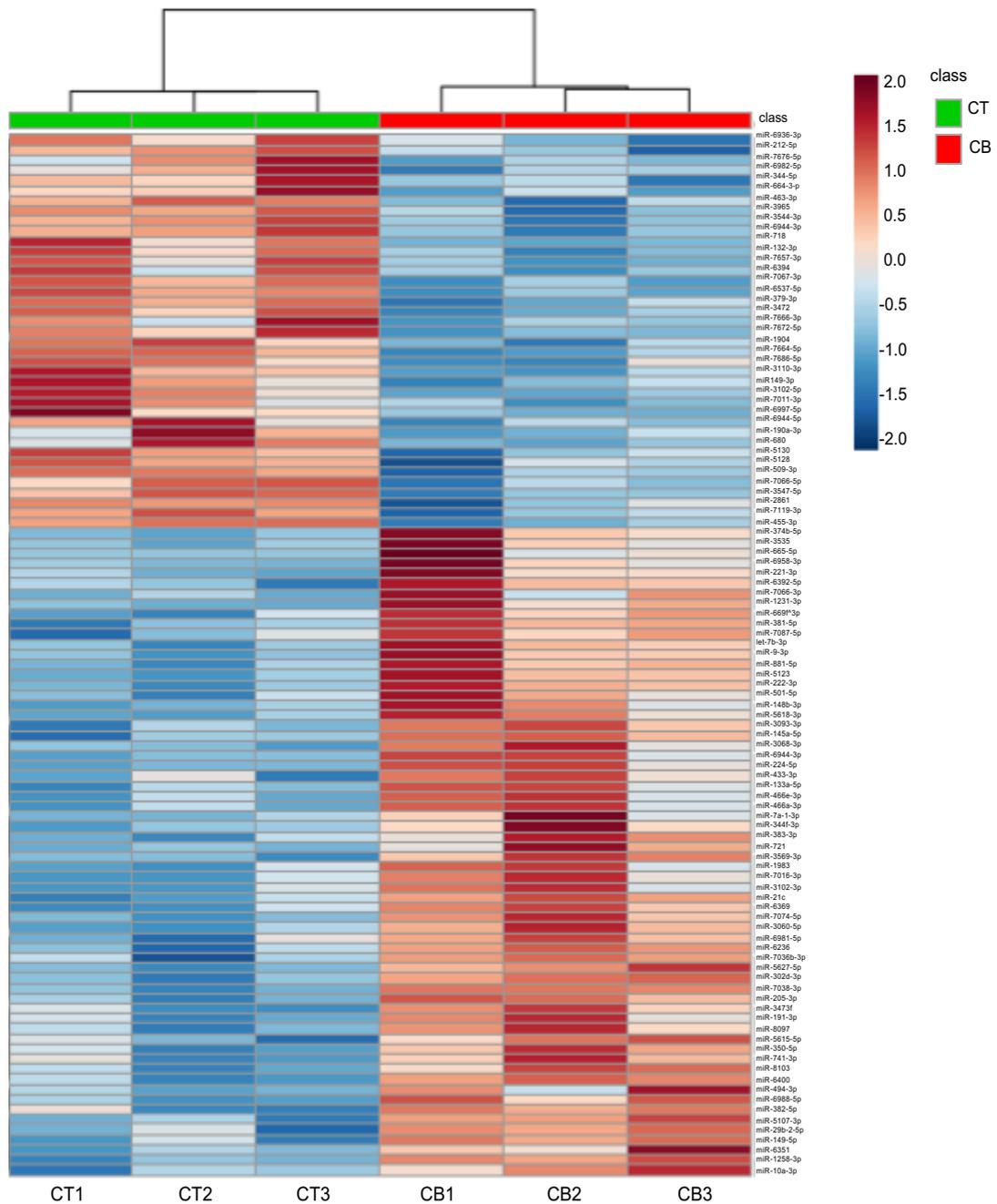


図 6-1-1. C2C12 培養筋管細胞へのクレンプテロールの添加により発現量に有意差が認められた miRNA

*; $P < 0.05$ CT : 対照区 ; CB : クレンプテロール区

6-1-4 考察

C2C12 培養筋管細胞へのクレンプテロールの添加により合計 103 個の miRNA を同定され、そのうち 64 個の miRNA がクレンプテロール刺激の 1 時間後に増加し、39 個の miRNA が減少した。増加した miRNA のうち、miR-9、miR-21、および miR-222 は、癌細胞において *FoxO1* mRNA の 3'UTR 領域に結合することによって *FoxO1* mRNA の発現を調節することが報告されている (Go *et al.*, 2015; Myatt *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2017)。本節より、C2C12 培養筋管細胞においてクレンプテロールによる β_2 -AR の活性化により増加したこれら 3 つの miRNA は、*FoxO1* mRNA の減少に寄与している可能性が示された。

さらに、マイクロアレイにより得られた結果から対照区と比較して有意に増加しており、かつその発現量が 2 倍以上の miRNA のうち、Target Scan (Agarwell *et al.*, 2015) により、4 つの miRNA (miR-374b-5p、miR-7038-3p、miR-7016-3p および miR-7a-1-3p) が *FoxO1* の 3'UTR 領域に結合することが予測された(図 6-1-2)。次節ではこれらの miRNA の機能活性を調べるために、miRNA mimic をトランスフェクトした C2C12 培養筋管細胞における *FoxO1* mRNA およびタンパク質発現を調べた。

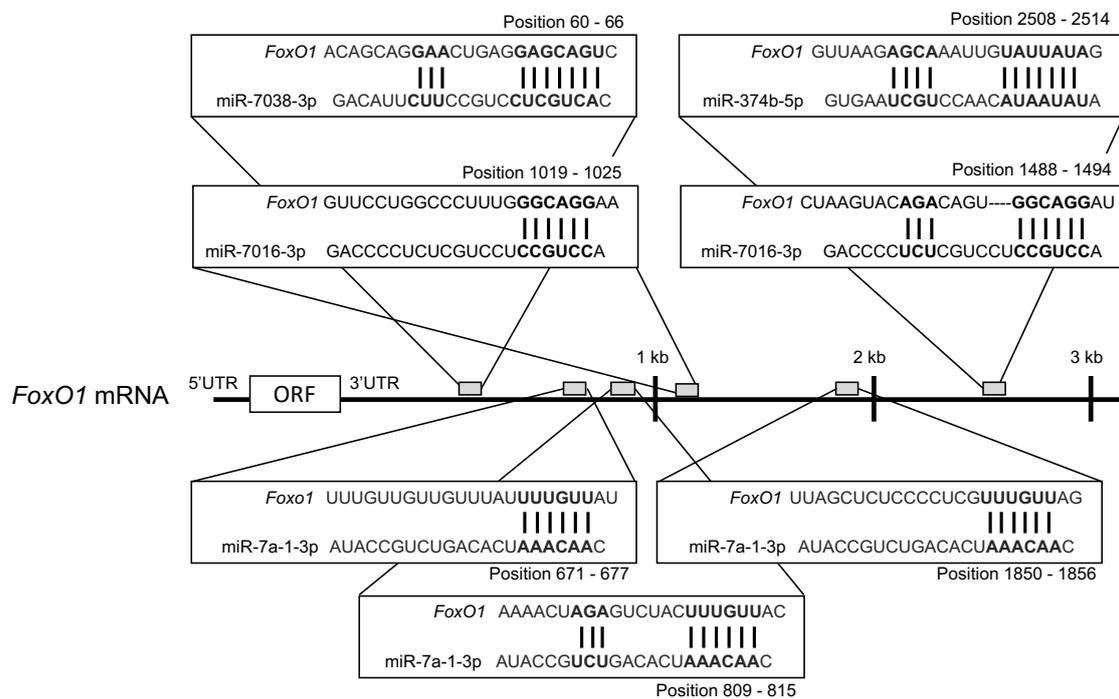


図 6-1-2. *FoxO1* mRNA の 3'UTR における予測される miR-374b-5p、miR-7038-3p、miR-7016-3p、および miR-7a-1-3p の標的部
miR : microRNA

第 2 節 C2C12 培養筋管細胞における β_2 -AR シグナルにより増加する microRNA の導入が FoxO1 転写活性に与える影響

6-2-1 目的

前節より、クレンブテロールの添加により C2C12 培養筋管細胞で増加が認められた miRNA うち、Target Scan (Agarwell *et al.*, 2015) によって、4 つの miRNA (miR-374b-5p、miR-7038-3p、miR-7016-3p および miR-7a-1-3p) が FoxO1 の 3'UTR 領域に結合することが予測された。本節では、これらの miRNA の機能活性を調べるために、miRNA mimic をトランスフェクトした C2C12 培養筋管細胞における FoxO1 の mRNA およびタンパク質発現を調べた。

6-2-2 材料および方法

(1) 供試細胞と実験計画

〈試薬〉

試薬は、第 5 章第 1 節に準じて購入した。

〈C2C12 培養筋管細胞の培養条件〉

筋管への形成は本章第 3 節に準じて行った。

〈C2C12 培養筋管細胞への miRNA mimic 導入〉

Trans IT-X2 Dynamic Delivery System (MIR6003、Mirus、WI、USA) を用いて C2C12 培養筋管細胞に miRNA mimic を導入した。miRNA mimic は mirVanaTM miRNA mimic (miR-374b-5p、miR-7038-3p、miR-

7016-3p、または miR-7a-1-3p、invitrogen、MA、USA) または AccuTarget™ miRNA mimic (SMC-2001、Bioneer、Korea) をネガティブコントロールとし、各 miRNA mimic を培地中に 30 μM となるように調整し導入した。導入後、24 時間後に細胞の mRNA およびタンパク質を回収した。

(2) 骨格筋細胞中の遺伝子発現

〈試薬〉

試薬は、第 3 章第 1 節に準じて購入した。

〈細胞からの mRNA 抽出〉

RNA の抽出は、第 5 章第 3 節に準じた。

〈cDNA の合成〉

cDNA の合成は、第 5 章第 3 節に準じて行った。

〈Real Time PCR〉

PCR 反応に用いたプライマーは表 5-3-1 に準じた。mRNA の発現量は、第 3 章第 1 節に準じて行った。

(3) 骨格筋細胞中のタンパク質発現分析

〈試薬〉

試薬は、第 3 章第 1 節に準じて購入した。

〈全細胞タンパク質の抽出〉

細胞タンパク質の抽出は第 5 章第 2 節に準じて行った。

〈タンパク質量の測定〉

サンプル中のタンパク質量の測定は、第 3 章第 1 節に準じて行った。

〈ウエスタンブロッティングに供するサンプル調整〉

ウエスタンブロッティングに供するサンプル調整は、第 3 章第 1 節に準じて行った。

〈SDS-PAGE およびウエスタンブロッティング〉

SDS-PAGE およびウエスタンブロッティングは、第 3 章第 1 節に準じて行った。

(4) 統計処理

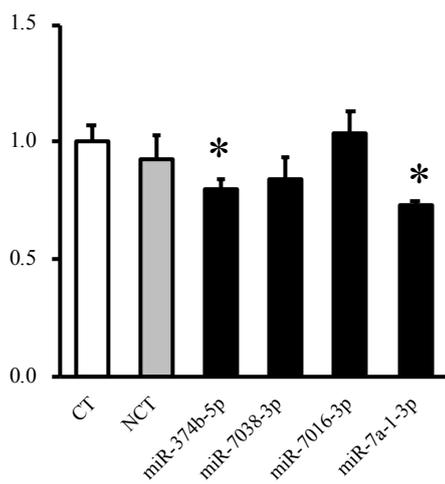
データは平均値±標準誤差として表した。得られたデータの平均値の差の検定は Dunnet's の多重比較検定法を用いて対照区との差異を調べた。

6-2-3 結果

FoxO1 mRNA の 3'UTR 領域に結合することが示唆された miRNA (miR-374b-5p、miR-7038-3p、miR-7016-3p、および miR-7a-1-3p) の mimic をそれぞれ C2C12 培養筋管細胞に導入した結果、miR-374b-5p および miR-7a-1-3p の導入で *FoxO1* および *Atrogin-1 / MAFbx* mRNA の発現量が有意に減少した (図 6-2-1)。同時に、miR-374b-5p および miR-7a-1-3p mimic の導入は *FoxO1* タンパク質の発現も有意に減少させた (図 6-2-2)。

A

FoxO1 mRNA
(relative expression)



B

Atrgoin-1/MAFbx mRNA
(relative expression)

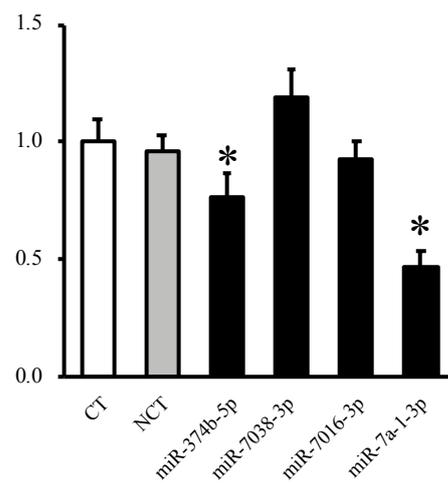


図 6-2-1. C2C12 培養筋管細胞に対する miR-374b-5p、miR-7038-3p、miR-7016-3p、および miR-7a-1-3p の導入が遺伝子発現量に与える影響
*; $P < 0.05$ 、CT : 対照区 ; NTC : ネガティブコントロール区 ;
miR : microRNA

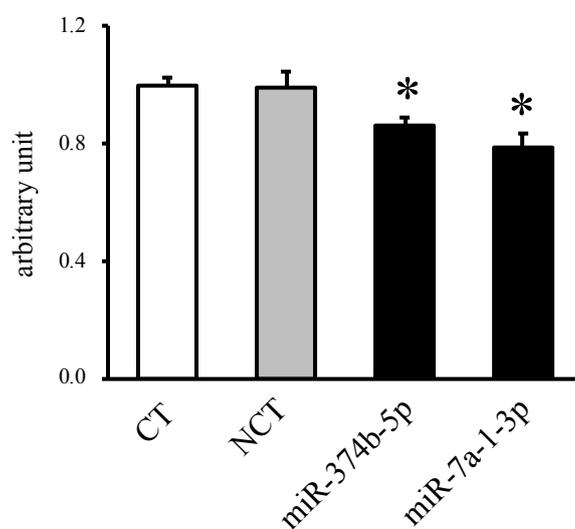
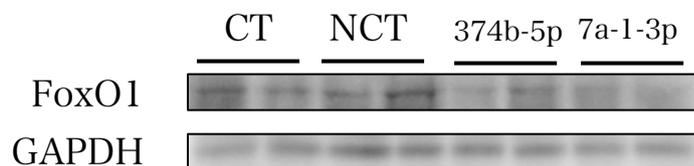


図 6-2-2. C2C12 培養筋管細胞に対する miR-374b-5p および miR-7a-1-3p の導入が FoxO1 タンパク質に与える影響

*; $P < 0.05$ 、 CT : 対照区 ; NCT : ネガティブコントロール区 ;
miR : microRNA

6-2-4 考察

本節では、本章第 1 節において C2C12 培養筋管細胞へのクレンプテロール添加の 1 時間後に変動した miRNA のうち Target Scan (Agarwell *et al.*, 2015) により *FoxO1* mRNA の 3'UTR 領域との結合が推察された 4 種の miRNA mimic (miR-374b-5p、miR-7039-3p、miR-7016-3p および miR-7a-1-3p) を C2C12 培養筋管細胞に導入し、*FoxO1* mRNA および FoxO1 タンパク質の発現量を調べた。導入した 4 つの miRNA mimic のうち、miR-374b-5p または miR-7a-1-3p が C2C12 培養筋管細胞における *FoxO1* mRNA の発現量を減少させた。加えて、これら 2 つの miRNA mimic の導入は FoxO1 タンパク質量も有意に減少させた。さらに、miR-374b-5p および miR-7a-1-3p mimic の導入は *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量も減少させた。miRNA は、タンパク質をコードしない低分子の RNA であり、シード配列と呼ばれる領域の 6、7 塩基と相補的な配列を持つ標的 mRNA と結合する。多くの場合が標的 mRNA の 3'UTR と部分的な複合体を形成し、miRNA が結合した標的 mRNA は、ポリ A 鎖が短縮され、不安定化し、最終的には分解される。これらの結果は、これまでに *FoxO1* mRNA の発現量を調節することが報告されている miRNA (miR-9、miR-21 および miR-222 ; Go *et al.*, 2015; Myatt *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2017) に加えて、miR-374b-5p および miR-7a-1-3p が骨格筋細胞における *FoxO1* mRNA の分解に関与している可能性が考えられる。本節の結果より、C2C12 培養筋管細胞においてクレンプテロールによる β_2 -AR の活性化は、miR-374b-5p および miR-7a-1-3p などの microRNA の発現量を急激に増加し、*FoxO1* mRNA の分解を亢進させ

ることが示唆された。その結果、FoxO1 タンパク質の存在量が減少し、*Atrogin-1/MAFbx* に対する FoxO1 の転写活性が低下し、タンパク質分解が抑制される可能性が考えられた。

第7章 総合考察

産肉性の向上とは、体タンパク質の蓄積増加による骨格筋量の増大とみなすことができ、体タンパク質の蓄積は、タンパク質の合成量と分解量の差で表される。ニワトリでは、体格の異なる系統である肉用鶏と卵用鶏の比較より、合成量よりも分解量が骨格筋量に大きく影響することが示唆されている (Hayashi *et al.*, 1985)。しかしながら、これまでのところ既知のタンパク質分解の調節機構では骨格筋量の個体差を説明できておらず、肉用鶏の骨格筋量の個体差には、これまでに注目されていないタンパク質分解の調節機構の関与が推察される。

アドレナリンは、骨格筋では主に β -AR 受容体 (β_1 、 β_2 、 β_3 の3種のサブタイプに分類される) によって作用が伝達される。アドレナリンは、ストレス応答性のホルモンに分類され、その作用として主に異化に関わる研究が多く報告されていることから、骨格筋のタンパク質分解の調節機構に対するアドレナリンの作用は注目されていなかった。しかしながら、本研究室では肉用鶏の骨格筋において β_2 -AR シグナルによるタンパク質分解の抑制作用を見出したことから (Ijiri *et al.*, 2014)、本研究では骨格筋における β_2 -AR シグナルに着目した。本研究では、肉用鶏の骨格筋量の個体差に対する β_2 -AR シグナルの関与を解明と、加えて、骨格筋のタンパク質分解に対する β_2 -AR シグナルの詳細な作用機序の解明を目的とした。

先ず、第2章では、初期成長期 (1~5日齢) の肉用鶏ヒナの成長速度が異なる個体間 (急速発育区と遅発育区) の体タンパク質代謝回転

速度を比較した。単位時間あたりに蓄積されたタンパク質と排泄された 3-MeHis の量を測定すれば、骨格筋タンパク質の合成速度および分解速度の測定が可能であると考えられている (Young and Munro, 1978; 西澤, 1983) が、この測定方法を利用するためには、生体内に存在する 3-MeHis の大部分が骨格筋 (アクチン、ミオシン) に存在し、排泄物のほとんどが筋肉由来の 3-MeHis であることを証明する必要がある。第 2 章では、5 日齢のブロイラーの 3-MeHis の組織分布を調べた結果、骨格筋中の 3-MeHis 含量は $81.0 \mu\text{mol}$ となり、筋胃、消化管、その他の臓器などにも比較的多く含まれていた。これを全体の 3-MeHis 含量に対する割合で示すと、5 日齢では骨格筋に 67.4%、筋胃に 10.6%、消化管に 9.8%、その他臓器に 10.9% となった (表 2-1-2)。羽毛と皮はまとめて測定した結果、 $5.2 \mu\text{mol}$ であったが、以前の研究結果より、11 日齢のブロイラーの羽中に 3-MeHis はほとんど含まれていないことが明らかとされている (品川卒論, 1981)。したがって、本実験で明らかとなった $5.2 \mu\text{mol}$ のほとんどは皮由来であると考えられる。また、血液+骨+頭をまとめて測定した結果、 $10.8 \mu\text{mol}$ となったが、骨中にも 3-MeHis はほとんど含まれていないことが明らかとなっている (品川卒論, 1981)。さらに、血液のみの 3-MeHis 濃度を測定した結果、 $1.1 \mu\text{mol}$ と極めて少ない。したがって、血液+骨+頭に含まれる 3-MeHis のほとんどが、解体時に骨もしくは頭から採取しきれなかった骨格筋に由来するものだと考えられる。5 日齢の肉用鶏ヒナの体全体の 3-MeHis 含量に対する%で示すと骨格筋は 67.4%以上となり大部分の 3-MeHis は骨格筋に含まれていることが示唆された。

第2章の結果より、5日齢ブロイラーの骨格筋中の3-MeHis含量は、Hayashiら（1985）が報告した15日齢ブロイラーにおける骨格筋中の3-MeHis含量である57.1%を上回ったことから体タンパク質の合成速度および分解速度の指標として利用可能であると判断し、急速発育区と遅発育区の体タンパク質代謝回転速度を比較した。7日齢ブロイラーヒナの骨格筋中のタンパク質分解速度を計算すると、遅発育区と比較して急速発育区で有意に低い値を示した。一方、タンパク質合成速度は、遅発育区と比較して急速発育区で高い傾向を示したが、有意な差は認められなかった。これらの結果より、成長速度の差には、骨格筋のタンパク質分解速度の差が合成速度と比較してより大きく寄与することが示された。ニワトリやウズラを用いた研究より、体格差のある系統間の比較では、体格が小さい個体は大きい個体よりタンパク質分解速度が高く、合成速度が低いことから、合成量よりも分解量が骨格筋量に大きく影響することが示唆されている（Hayashi *et al.*, 1985; Maeda *et al.*, 1986）。これらの結果と同様に、同品種・同系統内の肉用鶏においても成長速度の個体差には、タンパク質合成よりも分解速度の差がより強く影響することが示唆された。

第3章では、初期成長期の肉用鶏ヒナにおける骨格筋タンパク質分解速度を支配する分子機構の解明を行った。骨格筋のタンパク質の分解量は、標的タンパク質に付加されたユビキチン鎖をプロテアソームが認識し、不可逆的に分解するシステム（ユビキチン-プロテアソーム系タンパク質分解）によって調節される（Ciechanover *et al.*, 1998; Hershko *et al.*, 1998; Jagoe *et al.*, 2001; Lecker *et al.*, 2004; Lecker *et al.*,

2006)。また、*Atrogin-1/MAFbx* の遺伝子発現量は FoxO 転写因子によって調節されており、FoxO の転写活性は、AKT によるリン酸化を受け、細胞内局在が変化することにより低下する (Sandori *et al.*, 2004; Stitt *et al.*, 2004; Daitoku *et al.*, 2011)。初期成長期の肉用鶏ヒナの成長速度が異なる急速発育区と遅発育区において、骨格筋タンパク質分解の指標である血漿中の 3-MeHis 濃度が遅発育区と比較して急速発育区で有意に低かったことから、第 2 章の結果と同様に急速発育区は遅発育区と比較して、タンパク質分解が低く維持されていることが示唆された。また、遅発育区と比較して急速発育区の浅胸筋中の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量が有意に低かった。哺乳動物およびニワトリの骨格筋において *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量はタンパク質分解速度と正の相関を示すため (Sacheck *et al.*, 2004; Ohtsuka *et al.*, 2011)、急速発育区の骨格筋タンパク質分解速度の低さは、浅胸筋中の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量の低さに起因すると考えられた。さらに、5 日齢ブロイラーヒナの浅胸筋中の AKT および FoxO1 タンパク質のリン酸化割合は、遅発育区と比較して有意に高かった。第 3 章の結果より、初期成長期の増体が速い急速発育区は浅胸筋中の AKT のリン酸化割合を増加させ、細胞質におけるリン酸化 FoxO1 タンパク質の発現を増加させることで、FoxO1 転写因子の細胞内局在が変化し、標的遺伝子に対する FoxO1 の転写活性が低下した結果として *Atrogin-1/MAFbx* mRNA 発現が減少し、タンパク質分解が抑制されたと示唆された。

これまでに *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量の減少を介してタンパク質分解を抑制する因子が複数報告されている。例えば、哺乳動物お

よびニワトリの骨格筋および培養骨格筋細胞において、AKT のリン酸化を介して FoxO1 の転写を阻害し、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現を抑制することがインスリン (Suryawan *et al.*, 2007; Duchêne *et al.*, 2008; Timmerman *et al.*, 2010; Saneyasu *et al.*, 2017) および IGF-1 (Frayn and Maycock, 1979; Scheck *et al.*, 2004; Stitt *et al.*, 2004; Nakashima *et al.*, 2017) の刺激により惹起されることが報告されている。また、アドレナリンも骨格筋タンパク質分解を抑制することが報告されている (Navegantes *et al.*, 2002)。Silveira ら (2014) は、アドレナリンの投与が AMP-PKA シグナルの活性化によって FoxO1 の転写活性を阻害し、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量を減少させることを報告している。そこで第 3 章では、タンパク質分解を抑制する因子として報告されている、インスリン、IGF-1 およびアドレナリンの血漿中濃度と骨格筋中の受容体の発現量も遅発育区と急速発育区で比較した。その結果、増体速度が異なる急速発育区と遅発育区の 2 区間の血中のインスリン濃度、およびアドレナリン濃度に差は認められなかった。血中の IGF-1 濃度を測定するには、ELISA 法やラジオアイソトープ実験をする必要があるが、現時点でニワトリに適合した ELISA キットがないことと、ラジオアイソトープ実験の技術取得が困難であったため、第 3 章では測定が不可能と判断し、IGF-1 濃度に関与すると考えられる GH 濃度の測定を試みた。血液中の IGF-1 濃度は GH およびインスリンによって調節されており (Thissen *et al.*, 1994)、肝臓で主に産生されている。しかしながら、インスリンと同様に、血漿中の GH 濃度は成長速度が異なる 2 区間で差は認められなかった。また、浅胸筋中のインスリン受

容体および IGF-1 受容体 mRNA の発現量にも差はなかった。さらに前述の通り、IGF-1 は主に肝臓で合成されるため、肝臓中の IGF-1 mRNA の発現量に差はなく、IGF-1 受容体 mRNA の発現量は遅発育区と比較して有意に減少した。以上の結果より、インスリンおよび IGF-1 は初期成長期のブロイラーヒナの骨格筋タンパク質分解レベルへの寄与は低いと考えられた。

続いて、遅発育区と急速発育区の 2 区間における各 β -AR mRNA 発現量を比較した。その結果、 β_1 および β_3 -AR mRNA の発現量に差は認められなかった。一方、 β_2 -AR mRNA 発現量のみ遅発育区と比較して急速発育区で有意に高かった。本研究室では肉用鶏の骨格筋において β_2 -AR シグナルが *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現を減少させ、タンパク質分解することを明らかにしている (Ijiri *et al.*, 2014)。これらの結果より、急速発育区のタンパク質分解速度の低さは、 β_2 -AR mRNA の発現量と相関することが示唆された。しかしながら、本研究では初期成長期のタンパク質分解速度が異なる 2 区間における β_2 -AR mRNA の発現量に差が生じる理由については明らかにできなかった。 β_2 -AR mRNA の発現量に差が生じる理由として、2 区間に有意な差があった飼料摂取量の関与について検討した。しかしながら急速発育区の飼料摂取量を遅発育区の飼料摂取量と同等に制限給餌したにも関わらず、急速発育区の β_2 -AR mRNA 発現量およびタンパク質分解レベルも変化は認められなかった。これらの結果より、 β_2 -AR mRNA の発現量には少なくとも飼料摂取量は関与しない可能性が示唆された (未発表データ)。

第 4 章では、ブロイラーヒナの骨格筋における AR シグナルのタン

パク質分解抑制作用について調べた。第3章の結果より、肉用鶏の骨格筋タンパク質分解の個体差を支配する要因としてアドレナリンの関与が示唆された。アドレナリンは、骨格筋タンパク質分解を抑制することが報告されているが (Navegantes *et al.*, 2002; Silveira *et al.*, 2014)、アドレナリンはストレス応答性のホルモンに分類され、その作用として主に異化に関わる研究が多く報告されていることから、骨格筋タンパク質分解の抑制メカニズムについては注目されていなかった。前述の通りアドレナリンは受容体を介して様々な組織において機能を発揮する。骨格筋では主に β -AR (β_1 、 β_2 、 β_3 の3種のサブタイプ) によって作用が伝達される (Grady *et al.*, 1997)。1日齢のブロイラーヒナにアドレナリンまたは非選択的 β 受容体作動薬であるイソプロテレノールを腹腔内投与し、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量に与える影響を調べた。その結果、ニワトリヒナにおいてもアドレナリンの投与は投与3時間後の縫工筋中の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量を有意に減少させた。また、ニワトリヒナの腹腔内に β -AR 非選択的作動薬であるイソプロテレノールの投与を行なった。その結果、アドレナリンと同様に、投与3時間後の縫工筋中の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量は有意に減少した。これらの結果より、ニワトリヒナの骨格筋においてアドレナリンは β -AR シグナル伝達を介して *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現を調節することが明らかとなった。続いて、1日齢ブロイラーヒナに β -AR サブタイプそれぞれの作動薬を腹腔内投与し、アドレナリンによる *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現制御に関わるサブタイプの同定を行なった。 β_2 -AR 作動薬であるクレンブテロールの投与は、投与3時

間後の縫工筋において *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量を有意に減少させた。一方で、 β_1 -AR 作動薬であるドブタミンや β_3 -AR 作動薬である BRL37344 の投与による *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の減少は認められなかった。さらに、 β_2 -AR 遮断薬であるブトキサミンの前投与は、アドレナリン投与による *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現減少を抑制した。これまでに哺乳類においても、クレンプテロールの投与が骨格筋中の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現を減少させることが報告されている (Koopman *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2013)。これらの結果より、ブロイラーヒナにおいてアドレナリンは、 β_2 -AR シグナルの活性化を介して骨格筋における *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現を調節し、タンパク質分解を抑制することが示唆された。

第 3 章の結果より、初期成長期の増体速度が速い急速発育区では遅発育区と比較して β_2 -AR mRNA の発現量が高かったことから、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現減少に伴う骨格筋のタンパク質分解の抑制は β_2 -AR シグナルがより強く活性化された結果であることが考えられた。以降の実験では、骨格筋における β_2 -AR シグナルによるタンパク質分解抑制メカニズムのさらなる解明を目的とし、先ず、ニワトリヒナに対するクレンプテロールの単回投与が骨格筋に与える影響を詳細に調べた。その結果、ニワトリヒナにおけるクレンプテロールの腹腔内投与は、縫工筋中の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量を減少させ、タンパク質分解を抑制することが明らかとなった。また、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現減少が認められたクレンプテロール投与 3 時間後の縫工筋中の AKT のリン酸化割合は、クレンプテロール投与によって有意に

増加した。哺乳類において、 β_2 -AR シグナルの活性化は、AKT のリン酸化を伴って *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現を減少させることから (Koopman *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2012)、哺乳類と同様にニワトリヒナの骨格筋においても、 β_2 -AR シグナルの活性化に、AKT のリン酸化が関わることを示唆された。骨格筋のタンパク質分解調節機構として IGF-1-AKT シグナルカスケードがよく知られている。すなわち IGF-1 が IGF-1 受容体に結合すると、AKT がリン酸化され、FoxO 転写因子をリン酸化することにより核外へ移行させる (Daitoku *et al.*, 2011)。しかしながら、 β_2 -AR シグナルの活性化が、FoxO1 転写因子のリン酸化状態や細胞内局在に及ぼす影響については、未だ解明されていなかった。クレンプテロールを投与した 3 時間後のヒナの骨格筋の細胞質タンパク質におけるリン酸化 FoxO1 の有意な増加が認められた。一方、核タンパク質において、FoxO1 タンパク質の有意な減少が認められた。これらの結果より、 β_2 -AR シグナルの活性化は、AKT のリン酸化割合を増加させ、細胞質におけるリン酸化 FoxO1 タンパク質の発現を増加させることが明らかとなった。また、FoxO1 転写因子の細胞内局在が変化し、標的遺伝子に対する FoxO1 の転写活性が低下した結果として *Atrogin-1/MAFbx* mRNA 発現が減少し、タンパク質分解が抑制されたと考えられる。加えて、クレンプテロールの投与により、骨格筋における *FoxO1* mRNA の発現量の減少と、核タンパク質中の FoxO1 タンパク質の発現減少が認められた。これらの結果より、ニワトリヒナへのクレンプテロールの腹腔内投与が骨格筋の *FoxO1* mRNA およびタンパク質の発現量を減少させることにより、結

果的に FoxO1 の転写活性を低下させる可能性も推察された。そこで第 5 章以降は、ニワトリ初代培養筋管細胞および C2C12 培養筋管細胞を用いてクレンプテロールによる β_2 -AR シグナルの活性化が FoxO1 転写因子の mRNA 発現量を減少させる作用機序について調べた。

哺乳類および第 4 章の結果より、 β_2 -AR シグナルの活性化は、AKT のリン酸化を伴って *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現を減少させる (Koopman *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2012)。しかしながら、第 5 章においてニワトリ初代培養筋管細胞および C2C12 培養筋管細胞を用いた培地へのクレンプテロールの添加は、AKT のリン酸化に影響は与えなかった。またニワトリ初代培養筋管細胞へのクレンプテロールの添加は FoxO1 のリン酸化にも影響を与えなかった。それにも関わらず、クレンプテロール添加の 3 時間後に *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量が減少した。これらの結果より、培養筋管細胞へのクレンプテロール添加により活性化された β_2 -AR シグナルは、AKT のリン酸化を介さず *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現を減少させることが示唆された。

第 5 章においてニワトリ初代培養筋管細胞および C2C12 培養筋管細胞共に、クレンプテロール添加による *FoxO1* mRNA の発現量の減少は、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA の減少に先行して起こった。加えて、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA が減少したクレンプテロール添加 3 時間後には、全 FoxO1 タンパク質の減少が確認された。これらの結果から、培養骨格筋細胞においてクレンプテロールは *FoxO1* mRNA の発現減少を介して *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現を抑制することが示唆された。これまで

に、クレンブテロールを用いた β_2 -AR の活性を介した *FoxO1* mRNA およびタンパク質減少作用は *in vivo* および *in vitro* どちらにおいても確認された（第 4 章および第 5 章）。また、 β_2 -AR の活性を介した *FoxO1* mRNA およびタンパク質減少作用は、これまでに報告されていない β_2 -AR シグナルの新規経路であると考えられる。FoxO タンパク質の発現量は細胞機能に大きな影響を与えると考えられており、FoxO タンパク質の欠損は哺乳動物の癌の増加と関連する（Borkhardt *et al.*, 1997; Paik *et al.*, 2003）。これらの結果より、培養骨格筋細胞においてクレンブテロールによる β_2 -AR の活性化は、FoxO1 タンパク質のリン酸化による細胞内局在の変化に加えて、*FoxO1* mRNA およびタンパク質の発現を減少させる、新たな骨格筋のタンパク質分解抑制シグナル経路によりタンパク質の分解を抑制すると考えられる。

第 5 章において、 β_2 -AR シグナルが、FoxO1 のリン酸化による細胞内局在の変化だけでなく骨格筋におけるタンパク質存在量も制御することによって転写活性を調節する役割を果たす可能性を示した。Qin ら（2010）はグルココルチコイドが *FoxO1* mRNA 発現量と核タンパク質の存在量を増加させることを報告している。しかしながら、*FoxO1* mRNA および FoxO タンパク質量の減少のメカニズムはほとんど解明されていない。FoxO1 転写因子の mRNA の減少は、FoxO1 遺伝子の転写抑制、または、*FoxO1* mRNA が分解される可能性が考えられる。第 5 章で得られた結果より、培養骨格筋管細胞においてクレンブテロール誘導性の *FoxO1* mRNA の発現量が 1 から 3 時間後に減少することが認められた。このように急速な mRNA の発現減少は、*FoxO1* mRNA が

分解されている可能性が高いと考え、第 6 章では、*FoxO1* mRNA の分解に関わる microRNA (miRNA) に着目した。C2C12 培養筋管細胞における *FoxO1* mRNA 発現の調節に関与する miRNA を同定するためにマイクロアレイ分析を行った。C2C12 培養筋管細胞へのクレンプテロールの添加により合計 103 個の miRNA を同定され、そのうち 64 個の miRNA がクレンプテロール刺激の 1 時間後に増加し、39 個の miRNA が減少した。増加した miRNA のうち、miR-9、miR-21、および miR-222 は、癌細胞において *FoxO1* mRNA の 3'UTR 領域に結合することによって *FoxO1* mRNA の発現を調節することが報告されている (Go *et al.*, 2015; Myatt *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2017)。C2C12 培養筋管細胞においてクレンプテロールによる β_2 -AR の活性化により増加したこれら 3 つの miRNA は、*FoxO1* mRNA の減少に寄与している可能性が示された。

さらに、マイクロアレイにより得られた結果から対照区と比較して有意に増加しており、かつその発現量が 2 倍以上の miRNA のうち、Target Scan (Agarwell *et al.*, 2015) により、4 つの miRNA (miR-374b-5p、miR-7038-3p、miR-7016-3p および miR-7a-1-3p) が *FoxO1* の 3'UTR 領域に結合することが予測された。これら 4 つの miRNA の機能を調べるために、miRNA mimic をトランスフェクトした C2C12 培養筋管細胞における *FoxO1* mRNA およびタンパク質発現を調べた。導入した 4 つの miRNA mimic のうち、miR-347b-5p または miR-7a-1-3p が C2C12 培養筋管細胞における *FoxO1* mRNA の発現量を減少させた。加えて、これら 2 つの miRNA mimic の導入は *FoxO1* タンパク質量も有意に減少させた。さらに、miR-347b-5p および miR-7a-1-3p mimic の導入は

Atrogin-1/MAFbx mRNA の発現量も減少させた。これらの結果は、これまでに *FoxO1* mRNA の発現量を調節することが報告されている miRNA (miR-9、miR-21 および miR-222 ; Go *et al.*, 2015; Myatt *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2017) に加えて、miR-374b-5p および miR-7a-1-3p が骨格筋細胞における *FoxO1* mRNA の分解に関与している可能性が考えられる。培養筋管細胞においてクレンプテロールによる β_2 -AR の活性化は、miR-374b-5p および miR-7a-1-3p などの microRNA の発現量を急激に増加し、*FoxO1* mRNA の分解を亢進させることが示唆された。その結果、FoxO1 タンパク質の存在量が減少し、*Atrogin-1/MAFbx* に対する FoxO1 の転写活性が低下し、タンパク質分解が抑制される可能性が考えられた。

本研究で明らかとなった事実をまとめると、初期成長期(1~5日齢)の増体が速いヒナは遅いヒナと比較して、骨格筋のタンパク質分解速度が遅いことが明らかとなった。また、増体が速いヒナのタンパク質分解の低さは、骨格筋に発現するアドレナリン受容体のうち β_2 -AR 発現量の高さが関与している可能性が示された。加えて、骨格筋における β_2 -AR のタンパク質分解抑制作用は、FoxO1 転写因子の細胞内局在の変化と複数の miRNA の発現増加による *FoxO1* mRNA の分解亢進の2つの経路を介した、核内 FoxO1 タンパク質量の減少により *Atrogin-1/MAFbx* mRNA に対する FoxO1 の転写活性を低下させた結果、タンパク質分解を抑制することが示唆された。これまでに、ニワトリの成長差の解明を目的とした研究は、国内外で競合的に行われているが、その多くが「ブロイラーとレイヤーなど成長速度の異なる品種間」の比

較研究であり、「同品種内での差」は研究されてなかった。また、骨格筋において既知のタンパク質分解の調節機構では骨格筋量の個体差を説明できていなかったが、本研究の結果より肉用鶏ヒナの骨格筋量の個体差に β_2 -AR シグナルの関与が推察された。

本研究室では、クレンブテロールに構造が類似している化合物であるカプサイシンを飼料に添加すると、ブロイラーの骨格筋重量が増加することを明らかにしている（石丸修論、2016）。また、Chikazawa と Sato（2018）は、マウスまたはヒトの β_2 -AR において作動薬様の活性を示す植物由来の化合物をいくつか報告している（大麦属に含まれるグラミンや柑橘類に含まれるホルデニンなど）。本研究により、骨格筋の β_2 -AR シグナルのタンパク質分解抑制の作用機序が十分に解明されたことから、これらの化合物を含む飼料資材により β_2 -AR を活性化させることで骨格筋タンパク質分解の抑制による肉用鶏の成長改善が期待される。特に鹿児島県は多くの柑橘類の産地であることから、柑橘類の生産副産物が多く発生することが予想される。前述の通り、柑橘類に含まれるホルデニンが β_2 -AR の活性を示すことから（Chikazawa and Sato, 2018）、これらの副産物をブロイラーまたは地鶏への飼料資材に活用することを検討したい。

さらに、本研究より初期成長期の増体速度の個体差または骨格筋タンパク質分解の個体差に骨格筋の β_2 -AR mRNA の発現量が関わることを示唆された。 β_2 -AR mRNA 発現量の個体差は、遺伝的要因または環境的要因により決定されると考えられる。遺伝的な要因として考えられる肉用鶏の β_2 -AR 遺伝子とそのプロモーター領域における一塩基多型

(Single Nucleotide Polymorphism : SNP) に着目し、 β_2 -AR mRNA 発現量の差の原因となる DNA 変異を検出する。得られたデータによって遺伝育種学的に選抜することで、生産現場へ還元を目指すことが可能となる。

一方で、初期成長期の環境的要因が骨格筋の β_2 -AR mRNA の発現量、タンパク質分解量の個体差を生じさせる可能性も考えられる。これまでに本研究室では、肉用鶏ヒナの孵化後の飼料給与の開始を実験的に2日遅らせると、初期成長期の成長速度および、出荷日齢の骨格筋において抗酸化酵素の遺伝子発現が低下し、脂質過酸化物量の増加、ドロップロスの増加、ならびに味覚特性の変化（旨味の低下）が起こることを明らかにした（井尻ら, 2018）。これらの結果から、孵化後の飼料摂取の開始時期は初期成長期の増体速度と関連することが示唆される。今後、飼料摂取の開始時期が骨格筋の β_2 -AR mRNA 発現量ならびにタンパク質分解速度の個体差に及ぼす影響について検討することで、環境要因と骨格筋の β_2 -AR mRNA 発現量との関連性を明らかにできると考えられる。

我が国における畜産をめぐる情勢は、国際環境の変化（経済連携交渉の進展や飼料原料価格の上昇など）および消費者ニーズの多様化（少子高齢化や健康志向の高まりなど）を受け、日々刻々と変化している。今後は、これまで以上に「品質」および「価格」の面で「強みのある畜産物」を安定的に供給することが求められている（農林水産省, 2015）。近年では、畜産物の品質を向上させる方策として、畜産物の呈味成分や機能性成分の増強などの数多くの取組が試みられ、銘柄家畜・銘柄

食肉が作出されている。一方、家畜の生産現場では、個体の遺伝的能力や飼養環境により家畜の成長速度や乳肉卵などの生産能力に個体差が生じることは周知の事実であるが、畜産物の品質のばらつきについての研究は、十分に行われているとは言えない。したがって、肉用鶏の成長速度の個体差の研究成果は、ブロイラーのみならず全国で生産される地鶏の多くに還元可能であると考えられる。成長速度の個体差の最小化により安定的な鶏肉の生産が実現できれば、輸入鶏肉に対しても対抗できる産業として成長させられると期待できる。畜産物の品質にばらつきが生じる原因の解明と斉一性を高める技術の開発は、今後、我が国の市場に出回る国産畜産物を強化するためのブレイクスルーとなると考える。

摘要

第1章 緒言

第1節 研究の背景

長期的な飼料穀物の需給のひっ迫が懸念される状況下で、ブロイラーや地鶏などの肉用鶏の生産には、産肉性や飼料効率の向上が求められている。飼料効率が良く短期間の飼育で出荷できるように育種改良されてきたブロイラーは、生後約 50 日で出荷体重に達し、その飼料効率も 2.0 以下となっている。また、地鶏についても、日本農林規格に基づいた規格内で効率よく出荷できるように育種改良が進められている。一方、生産現場では、肉用鶏の成長に大きな個体差が生じることは公知の事実である。したがって、ブロイラーや地鶏の産肉性を向上させるためには、体重や骨格筋量の個体差を最小化し、斉一性を高めることが必要である。

骨格筋は外部からの生理刺激に対する反応として、その量または質が可逆的に変化する組織である。産肉性の向上とは、体タンパク質蓄積量の増加による骨格筋量の増大とみなすことができ、体タンパク質の蓄積は、タンパク質の合成量と分解量の差で表される。肉用鶏と卵用鶏の比較より、ニワトリでは、合成量よりも分解量が骨格筋量に大きく影響する。しかしながら、同品種・同系統内の肉用鶏の個体差とタンパク質代謝との関連は不明である。

タンパク質の翻訳・合成が増加する過程では、AKT を介したシグナ

ル経路が重要な働きを持つ。すなわち、リン酸化により活性化された AKT は、mTOR および p70 S6 kinase を介してタンパク質の翻訳ならびにタンパク質の合成を増加させ、骨格筋肥大を誘導する。一方、骨格筋のタンパク質の分解は、標的タンパク質に付加されたユビキチン鎖をプロテアソームが認識し不可逆的に分解するシステム（ユビキチン-プロテアソーム系タンパク質分解）によって調節される。骨格筋では、Atrogin-1/MAFbx が骨格筋特異的ユビキチンリガーゼとして同定されている。Atrogin-1/MAFbx mRNA 発現量は、骨格筋におけるタンパク質分解量と正の相関を示すことが報告されている。

第 2 節 本研究の目的と概要

本研究では、肉用鶏の骨格筋量の個体差に対する β_2 -アドレナリン受容体 (AR) シグナルの関与の解明と、加えて、骨格筋のタンパク質分解に対する β_2 -AR シグナルの詳細な作用機序の解明を目的とした。本研究の第 2 章では、初期成長期 (1~5 日齢) の肉用鶏ヒナの成長速度が異なる個体間 (急速発育区と遅発育区) の体タンパク質代謝回転速度を比較した。第 2 章より、同品種・同系統内の肉用鶏ヒナの個体差において骨格筋タンパク質分解速度の関与が示唆されたため、第 3 章では肉用鶏ヒナの骨格筋タンパク質分解速度を支配する分子機構の解明を行なった。第 3 章で成長速度の個体差に関与する骨格筋タンパク質抑制シグナルとしてアドレナリンによる経路が示唆されたため、第 4 章では肉用鶏ヒナの骨格筋におけるアドレナリン受容体シグナルの作用について調べた。アドレナリン受容体のうち、 β_2 -AR の選択的

刺激により骨格筋のタンパク質分解が抑制されたため、第 5 章および第 6 章では鶏初代培養筋管細胞および C2C12 培養筋管細胞を用いて β_2 -AR シグナルによる骨格筋タンパク質分解抑制に関わる分子機構を調べた。

第 2 章 肉用鶏ヒナの成長速度の個体差と骨格筋タンパク質分解速度との関連

肉用鶏では、生後 1 週目の体重と出荷前の最終体重の間には、正の相関があることが報告されているため、本章では、肉用鶏のヒナを初期成長期（1～5 日齢）の増体量が多い急速発育区と増体量が少ない遅発育区の 2 区に分け、成長速度が異なる個体間の体タンパク質代謝回転速度を調べた。骨格筋中および排泄物中の 3-メチルヒスチジン（3-MeHis）濃度を分析し、骨格筋タンパク質の代謝回転速度の算出に利用した。急速発育区は遅発育と比較して、終体重、増体量、および骨格筋重量は重かった。遅発育区と比較して急速発育区でタンパク質合成速度が高い傾向を示し（ $p=0.09$ ）、一方で、タンパク質分解速度は有意に低くなった（ $p<0.05$ ）。Hayashi ら（1985）は、肉用鶏と卵用鶏の比較より、ニワトリでは、合成量よりも分解量が骨格筋量に大きく影響することを報告していることから、同品種・同系統内の肉用鶏においても成長速度の個体差には、タンパク質合成速度よりも分解速度の差がより強く影響することが示唆された。

第 3 章 肉用鶏ヒナの骨格筋タンパク質分解速度を支配する分子機構の解明

第 2 章より、同品種・同系統内の肉用鶏ヒナの個体差に骨格筋タンパク質分解速度の関与が示唆されたため、第 3 章では骨格筋タンパク質分解速度を支配する分子機構の解明を行なった。第 2 章と同様に、肉用鶏のヒナを初期成長期（1～5 日齢）の増体量が多い急速発育区と増体量が少ない遅発育区の 2 区に分け、骨格筋中の AKT と FoxO1 のリン酸化割合（リン酸化タンパク質/全タンパク質）、および *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量を比較した。遅発育区と比較して急速発育区で AKT と FoxO1 のリン酸化割合は有意に高くなった。一方、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量は急速発育区で有意に低くなった。これらの結果より、遅発育区と比較して急速発育区は AKT により転写因子 FoxO1 の活性が低下し、その標的遺伝子である *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現が減少し、結果的にタンパク質分解が抑制される可能性が示唆された。

AKT のリン酸化を惹起しタンパク質分解を抑制する因子として、インスリン、IGF-1 およびアドレナリンが報告されている。そこで、それぞれの血漿中濃度と骨格筋中の受容体の発現量を遅発育区と急速発育区で比較した。血漿中のインスリン濃度と骨格筋中のインスリン受容体 mRNA の発現量に成長速度が異なる 2 区間に差が認められなかった。同様に、骨格筋中の *IGF-1* mRNA および *IGF-1* 受容体 mRNA の発現量にも 2 区間に差が認められなかった。一方、血漿中のアドレナリン濃度、および、骨格筋中の β_1 、 β_3 -AR mRNA 発現量は成長速度が異

なる 2 区間に差が認められなかったが、 β_2 -AR mRNA 発現量は遅発育区と比較して急速発育区で有意に高かった。以上の結果より、急速発育区のタンパク質分解速度の低さは β_2 -AR を介したアドレナリンシグナルが関与する可能性が示唆された。

第 4 章 肉用鶏ヒナの骨格筋におけるアドレナリンシグナルの作用

アドレナリンは、骨格筋において *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量を減少させることが報告されている。アドレナリンには、9 種類の受容体が存在しているが、骨格筋では、主に β 型受容体 (β_1 、 β_2 および β_3) が発現している。本章では、ニワトリヒナ骨格筋において、アドレナリンによる *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現制御に関わる β -AR サブタイプを調べた。

1 日齢の肉用鶏ヒナ 18 羽を 3 区に分け、PBS、アドレナリン、および非選択的 β -AR 作動薬であるイソプロテレノールを投与した。肉用鶏ヒナの骨格筋における *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量は、アドレナリン投与後 3 時間で有意に減少した。同様に、イソプロテレノールの投与は、投与 3 時間後の骨格筋における *Atroign-1/MAFbx* mRNA の発現量を減少させた。これらの結果より、アドレナリンが肉用鶏ヒナの骨格筋において β -AR シグナル伝達を介して *Atrogin-1/MAFbx* mRNA 発現量を調節することが明らかとなった。続いて、1 日齢の肉用鶏ヒナ 24 羽を 4 区に分け、PBS、 β_1 -AR 作動薬（ドブタミン）、 β_2 -AR 作動薬（クレンブテロール）、 β_3 -AR 作動薬（BRL37344）を投与した。 β_1 -AR 作動薬の投与は、*Atrogin-1/MAF* mRNA の発現量に影響は与えな

かった。一方、 β_2 -AR 作動薬の投与は、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量を減少させた。 β_3 -AR 作動薬の投与は、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量を増加させた。さらに、1 日齢の肉用鶏ヒナ 24 羽をアドレナリン投与区または PBS 投与区に分けた。それぞれの処理区の 6 羽は、アドレナリンまたは PBS 投与の 30 分前に β_2 -AR 遮断薬（ブトキサミン）を投与し、残りの 6 羽には PBS を投与した。アドレナリンの投与は、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量を減少させた。一方、 β_2 -AR 遮断薬の前投与は、アドレナリンによる *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現減少を抑制した。これらの結果より、肉用鶏ヒナの骨格筋において、アドレナリンによる *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現は β_2 -AR を介して抑制されることが示唆された。

本章の結果より、 β_2 -AR 作動薬（クレンプテロール）により、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量が減少したことから、肉用鶏ヒナの骨格筋を用いてメカニズムのさらなる検証を行った。1 日齢の肉用鶏ヒナ 18 羽を 3 区に分け、そのうちの 2 区にクレンプテロールを投与し、1 または 3 時間後に解体した。対照区には PBS を投与した。骨格筋中の全 AKT のタンパク質発現量には、クレンプテロール投与による影響は認められなかったが、リン酸化 AKT のタンパク質発現量は、クレンプテロール投与の 1 および 3 時間後に対照区に対して有意に増加した。その結果、骨格筋中の全 AKT 発現に対するリン酸化 AKT の発現比は、クレンプテロール投与の 1 および 3 時間後に有意な増加を示した。骨格筋中のリン酸化 FoxO1 の発現量は、クレンプテロール投与の 3 時間後に有意な増加を示した。また、クレンプテロールを投与した初生ヒ

ナの骨格筋では、核内タンパク質中の FoxO1 に対する細胞質タンパク質中の FoxO1 の発現比に有意な増加が認められた。加えて、クレンプテロール投与 3 時間後に、*FoxO1* および *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量が減少した。これらの結果から、肉用鶏ヒナの骨格筋においてクレンプテロールにより活性化された β_2 -アドレナリン受容体シグナルは、AKT を介して FoxO1 をリン酸化し、核外へ移行させることが示唆された。また、FoxO1 転写因子が細胞質側へ移行した結果として、クレンプテロール投与 3 時間後の *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現量が減少し、タンパク質分解を抑制させ、骨格筋重量を増加することが示唆された。

第 5 章 骨格筋細胞における β_2 -AR シグナルによる FoxO1 転写活性抑制分子機構の解明

第 4 章の結果より、骨格筋を β_2 -AR の作動薬であるクレンプテロールで刺激すると、骨格筋タンパク質分解の抑制を介して骨格筋量が増加することが示唆された。また、その誘導メカニズムは、IGF-I と同様に骨格筋の AKT のリン酸化を介した FoxO の転写活性の低下を伴うこと明らかとなった。加えて、肉用鶏初生ヒナに対するクレンプテロールの腹腔内投与は、投与 3 時間後の骨格筋における *FoxO1* および *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の発現が減少することを明らかにした。本研究では、鶏初代培養筋管細胞および C2C12 筋管細胞を用いて、クレンプテロールが *FoxO1* mRNA の発現に及ぼす影響とその機序を調べた。

13 日齢鶏胚の大腿筋から調整した筋芽細胞を筋管に形成させた後、

クレンブテロール (1 μ M) を添加して 1 または 3 時間培養した。鶏初代培養筋管細胞において、クレンブテロールは AKT および FoxO1 のリン酸化割合に影響しなかったが、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA を有意に減少させた。加えて、*FoxO1* mRNA は、クレンブテロール添加の 1 および 3 時間後に有意に減少し、FoxO1 タンパク質はクレンブテロール添加の 3 時間後に減少した。

C2C12 筋芽細胞を筋管に形成した後、C2C12 筋管細胞にクレンブテロール (1 μ M) を添加して 1 または 3 時間培養した。C2C12 筋管細胞において、クレンブテロールは AKT のリン酸化割合に影響しなかったが、FoxO1 のリン酸化割合は有意に増加させ、*Atrogin-1/MAFbx* mRNA を有意に減少させた。加えて、ニワトリ初代培養筋管細胞と同様に、*FoxO1* mRNA は、クレンブテロール添加の 1 および 3 時間後に有意に減少し、FoxO1 タンパク質は、クレンブテロール添加の 3 時間後に減少した。

これらの結果より、クレンブテロールによる β_2 -AR の活性化は、鶏初代培養筋管細胞と C2C12 筋管細胞において、AKT のリン酸化割合の増加を介さずに *Atrogin-1/MAFbx* mRNA を減少させることが明らかとなった。一方、どちらの細胞においてもクレンブテロール添加により *FoxO1* mRNA およびタンパク質が減少した。したがって、クレンブテロールによる *Atrogin-1/MAFbx* mRNA の減少は、FoxO1 タンパク質のリン酸化による転写活性の調節だけではなく、転写因子 FoxO1 タンパク質の量的な減少にも起因すると考えられた。

第 6 章 骨格筋細胞における microRNA を介した FoxO1 転写活性の抑制機構の解明

β_2 -アドレナリン受容体の活性化による *FoxO1* mRNA およびタンパク質の量的な減少の作用機序をより詳細に調べるために、C2C12 筋管細胞を用いて検証した。第 5 章で確認されたクレンブテロールによる急速な *FoxO1* mRNA の発現減少の理由として、microRNA (miRNA) による *FoxO1* mRNA の分解亢進が考えられたため、C2C12 筋管細胞にクレンブテロールを添加して 1 時間培養し、発現が変動する miRNA をマイクロアレイ法により調べた。加えて、変動が認められた miRNA のうち Target Scan により *FoxO1* mRNA の 3'UTR との結合が推測された 4 種の miRNA mimic を C2C12 筋管細胞に導入し、*FoxO1* mRNA の発現を調べた。C2C12 筋管細胞において、クレンブテロール添加により 64 種の miRNA が有意に増加した。増加した miRNA のうち *FoxO1* mRNA の 3'UTR に結合することが推測された miR374b-5p、miR7038-3p、miR7016-3p、および miR7a-1-3p の miRNA mimic を C2C12 筋管細胞に導入した結果、miR374b-5p および miR7a-1-3p で *FoxO1* mRNA を有意に減少させた。以上の結果より、*FoxO1* タンパク質が減少した作用機序として、miR374b-5p および miR7a-1-3p の発現量増加により *FoxO1* mRNA の分解が亢進したことが示唆された。その結果、*FoxO1* タンパク質の発現量が減少し、Atrogin-1/MAFbx に対する *FoxO1* の転写活性が低下し、骨格筋のタンパク質分解が抑制されると考えられた。

まとめ

初期成長期の肉用鶏ヒナの成長差には、骨格筋のタンパク質分解速度が強く関与しており、特に、 β_2 -AR シグナルによるタンパク質分解抑制メカニズムが関与することが示唆された。また、 β_2 -AR シグナルは microRNA の発現増加による FoxO1 転写因子の mRNA を分解する経路と、FoxO1 転写因子のリン酸化による転写活性を低下させる経路の 2 つの経路を介することで、タンパク質分解を抑制することが示唆された。

謝辞

本研究の遂行および本論文の取りまとめに際して、終始懇切丁寧なご指導、ご鞭撻を賜った鹿児島大学農学部栄養生化学・飼料化学研究室教授大塚彰先生、准教授井尻大地先生に深く感謝いたします。

本論文の取りまとめに際して、懇切丁寧なご指導を頂きました佐賀大学農学部食品栄養化学分野教授永尾晃治先生、琉球大学農学部熱帯生物圏研究センター応用生命情報学部門教授屋宏典先生、鹿児島大学農学部家畜育種学研究室准教授下桐猛先生に厚くお礼申し上げます。また、本研究にご協力、ご助言頂いた国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門上級研究員中島一喜様、鹿児島県立短期大学生活科学科食物栄養専攻准教授多田司先生、京都大学農学部動物栄養科学分野助教友永省三先生に深甚なる感謝の意を捧げます。また、川口真奈さん、井之上弘樹さん、興柊瑠香奈さん、西木場菜央さんには、本研究に対し深い理解のもとに多大なるご援助ならびに数々のご助言を賜りました。本研究遂行にあたって様々なご支援、ご協力を頂きました栄養生化学・飼料化学研究室内の皆様に深く感謝いたします。

最後になりましたが、これまでの学生生活を支援してくれた父と母に心より感謝の意を捧げます。

引用文献

Agarwell V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife* 4: e05005, 2015.

Aluberts B, Jhonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell* (fifth edition) Garland Science 2007.

Appell HJ, Forsberg S, Hollmann W. Satellite cell activation in human skeletal muscle after training: evidence for muscle fiber neof ormation. *Int J Sports Med* 9: 297–299, 1988.

Asatoor AM, Armstrong MD. 3-methylhistidine, a component of actin. *Biochem Biophys Res Commun* 26: 168–174, 1967.

Biggs WH 3rd, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC. Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7421–7426, 1999.

Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. Identification of

ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294: 1704–1708, 2001.

Borkhardt A, Repp R, Haas OA, Leis T, Harbott J, Kreuder J, Hammermann J, Henn T, Lampert F. Cloning and characterization of AFX, the gene that fuses to MLL in acute leukemias with a t (X;11) (q13;q23). *Oncogene* 14: 195–202, 1997.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254, 1976.

Calnan DR, Brunet A. The FoxO code. *Oncogene* 27: 2276–2288, 2008.

Chikazawa M, Sato R. Identification of Functional Food Factors as β_2 -Adrenergic Receptor Agonists and Their Potential Roles in Skeletal Muscle. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 64; 68–74, 2018.

Choo JJ, Horan MA, Little RA, Rothwell NJ. Effects of the β_2 -adrenoceptor agonist, clenbuterol, on muscle atrophy due to food deprivation in the rat. *Metab* 39: 647–650, 1990.

Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell

life. *EMBO J* 17: 7151–7160, 1998.

Daitoku H, Sakamaki J, Fukamizu A. Regulation of FoxO transcription factors by acetylation and protein-protein interactions. *Biochim Biophys Acta* 1813: 1954–1960, 2011.

Duchêne S, Métayer S, Audouin E, Bigot K, Dupont J, Tesseraud S. Refeeding and insulin activate the AKT/p70S6 kinase pathway without affecting IRS1 tyrosine phosphorylation in chicken muscle. *Domest Anim Endocrinol* 34: 1–13, 2008.

Elzinga M, Collins JH. Amino acid sequence of a myosin fragment that contains SH-1, SH-2, and Ntau-methylhistidine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74: 4281–4284, 1977.

Frayn KN, Maycock PF. Regulation of protein metabolism by a physiological concentration of insulin in mouse soleus and extensor digitorum longus muscles. Effects of starvation and scald injury. *Biochem J* 184: 323–330, 1979.

Garrels JI, Gibson W. Identification and characterization of multiple forms of actin. *Cell* 9: 793–805, 1976.

Glass DJ. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat Cell Biol* 5: 87–90, 2003.

Go H, Jang JY, Kim PJ, Kim YG, Nam SJ, Paik JH, Kim TM, Heo DS, Kim CW, Jeon YK. MicroRNA-21 plays an oncogenic role by targeting FOXO1 and activating the PI3K/AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget* 20: 15035–15049, 2015.

Goldspink DF. The effects of denervation on protein turnover of rat skeletal muscle. *Biochem J* 156: 71–80, 1976.

Goldspink DF, Goldspink G. Age-related changes in protein turnover and ribonucleic acid of the diaphragm muscle of normal and dystrophic hamsters. *Biochem J* 162: 191–194, 1977.

Gonçalves DA, Silveira WA, Lira EC, Graça FA, Paula-Gomes S, Zanon NM, Kettelhut IC, Navegantes LC. Clenbuterol suppresses proteasomal and lysosomal proteolysis and atrophy-related genes in denervated rat soleus muscles independently of Akt. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* 302: 123–133, 2012.

Gonyea W, Ericson GC, Bonde-Petersen F. Skeletal muscle fiber splitting induced by weight-lifting exercise in cats. *Acta Physiol Scand* 99: 105–109,

1977.

Gonyea WJ. Role of exercise in inducing increases in skeletal muscle fiber number. *J Appl Physiol* 48: 421–426, 1980.

Gonyea WJ, Sale DG, Gonyea FB, Mikesky A. Exercise induced increases in muscle fiber number. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 55: 137–141, 1986.

Grady EF, Böhm SK, Bunnett NW. Turning off the signal: mechanisms that attenuate signaling by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol* 273: G586–601, 1997.

Harridge SD. Plasticity of human skeletal muscle: gene expression to in vivo function. *Exp Physiol* 92: 783–797, 2007.

橋本信一郎. 最近のブロイラー産業における病気. *動薬研究* 72: 1–9, 2016.

Hayashi K, Tomita Y, Maeda Y, Shinagawa Y, Inoue K, Hashizume T. The rate of degradation of myofibrillar proteins of skeletal muscle in broiler and layer chickens estimated by N τ -methylhistidine in excreta. *Br J Nutr* 54: 157–163, 1985.

Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67: 425–479, 1998.

Hinkle RT, Hodge KM, Cody DB, Sheldon RJ, Kobilka BK, Isfort RJ. 2002. Skeletal muscle hypertrophy and anti-atrophy effects of clenbuterol are mediated by the beta2-adrenergic receptor. *Muscle Nerve* 25: 729–734, 2002.

Ho KW, Roy RR, Tweedle CD, Heusner WW, Van Huss WD, Carrow RE. Skeletal muscle fiber splitting with weight-lifting exercise in rats. *Am J Anat* 157: 433–440, 1980.

石丸善貴. 初生ヒナへのカプサイシン添加飼料の給与がブロイラーの成長に及ぼす影響. 修士論文, 2016.

Ijiri D, Ishitani K, Shimamoto S, Ishimaru Y, Ohtsuka A. The effects of intraperitoneal clenbuterol injection on protein degradation and myostatin expression differ between the sartorius and pectoral muscles of neonatal chicks. *Gen Comp Endocrinol* 206: 111–117. 2014.

井尻大地, 宝蔵直樹, 島元紗希, 川口真奈, 古川愛理, 多田 司, 友永省三, 中島一喜, 大塚 彰. ブロイラー初生ヒナへの飼料給与の開始日齢が鶏肉の脂質過酸化, ドリップ量, 肉色, 低分子代謝産物濃度, および味認識装置により測定された味覚特性に及ぼす影響. 日本畜産学

会報 89: 191–198, 2018.

Jagoe RT, Goldberg AL. What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 4: 183–190, 2001.

Joassard OR, Amirouche A, Gallot YS, Desgeorges MM, Castells J, Durieux AC, Berthon P, Freyssenet DG. Regulation of Akt-mTOR, ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways in response to formoterol administration in rat skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 45: 2444–2455, 2013.

Kadi F, Schjerling P, Andersen LL, Charifi N, Madsen JL, Christensen LR, Andersen JL. The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles. *J Physiol* 558: 1005–1012, 2004.

Kim YS, Sainz RD. β -adrenergic agonists and hypertrophy of skeletal muscles. *Life Sci* 50: 397–407, 1992.

Koopman R, Gehrig SM, Léger B, Trieu J, Walrand S, Murphy KT, Lynch GS. Cellular mechanisms underlying temporal changes in skeletal muscle protein synthesis and breakdown during chronic β -adrenoceptor stimulation in mice. *J Physiol* 588: 4811–4823, 2010.

Kops GJ, de Ruiter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL, Burgering BM. Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* 398: 630–634, 1999.

Lecker SH, Jagoe RT, Gomes M, Baracos V, Bailey JL, Price SR, Mitch WE, Goldberg AL. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J* 18: 39–51, 2004.

Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol* 17: 1807–1819, 2006.

Lee JW, Chen H, Pullikotil P, Quon MJ. Protein kinase A- α directly phosphorylates FoxO1 in vascular endothelial cells to regulate expression of vascular cellular adhesion molecule-1 mRNA. *J Biol Chem* 286: 6423–6432, 2011.

Liu X, Pérusse F, Bukowiecki LJ. Mechanisms of the antidiabetic effects of the β_3 -adrenergic agonist CL-316243 in obese Zucker-ZDF rats. *Am J Physiol* 274: R1212–1219, 1998.

Maeda Y, Hayashi K, Hashiguchi T, Okamoto S. Genetic studies on the

muscle protein turnover rate of coturnix quail. *Biochem Genet* 24: 207–216, 1986.

前田芳實. 家禽における筋肉蛋白質代謝制御の育種学的考察. *日本家禽学会誌* 32: 311–319, 1995.

Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 9: 493–495, 1961.

Millward DJ, Garlick PJ, Nnanyelugo DO, Waterlow JC. The relative importance of muscle protein synthesis and breakdown in relation to muscle mass. *Biochem J* 156: 185–188, 1976.

Mitsui A, Nohta H, Okura Y. High-performance liquid chromatography of plasma catecholamines using 1,2-diphenylethylenediamine as precolumn fluorescence derivatization reagent. *J Chromatogr* 344: 61–70, 1985.

Morse RK, Vergnes JP, Malloy J, McManus IR. Sites of biological methylation of proteins in cultured chick muscle cells. *Biochemistry* 14: 4316–4325, 1975.

Myatt SS, Wang J, Monteiro LJ, Christian M, Ho KK, Fusi L, Dina RE, Brosens JJ, Ghaem-Maghami S, Lam EW. Definition of microRNAs that

repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer. *Cancer Res* 70: 367–377, 2010.

Nakae J, Park BC, Accili D. Insulin stimulates phosphorylation of the forkhead transcription factor FKHR on serine 253 through a Wortmannin-sensitive pathway. *J Biol Chem* 274: 15982–15985, 1999.

Nakashima K, Ishida A, Ijiri D, Ohtsuka A. Effect of dexamethasone on the expression of atrogen-1/MAFbx in chick skeletal muscle. *Anim Sci J* 87: 405–410, 2016.

Nakashima K, Ishida A, Shimamoto S, Ijiri D, Ohtsuka A. Effects of insulin-like growth factor-I on the expression of atrogen-1/MAFbx in chick myotube cultures. *J Poult Sci* 54: 247–252, 2017.

Nasrin N, Ogg S, Cahill CM, Biggs W, Nui S, Dore J, Calvo D, Shi Y, Ruvkun G, Alexander-Bridges MC. DAF-16 recruits the CREB-binding protein coactivator complex to the insulin-like growth factor binding protein 1 promoter in HepG2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10412–10417, 2000.

Navé BT, Ouwens M, Withers DJ, Alessi DR, Shepherd PR. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of

a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J* 344: 427–431, 1999.

Navegantes LC, Resanino NMX, Migliorini RH, Kettelhut I. Catecholamines inhibit Ca^{2+} -dependent proteolysis in rat skeletal muscle through β_2 -adrenoceptors and cAMP. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: 449–454, 2001.

Navegantes LC, Migliorini RH, do Carmo Kettelhut I. Adrenergic control of protein metabolism in skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5: 281–286, 2002.

Ngala RA, O'Dowd J, Wang SJ, Agarwal A, Stocker C, Cawthorne MA, Arch JR. Metabolic responses to BRL37344 and clenbuterol in soleus muscle and C2C12 cells via different atypical pharmacologies and β_2 -adrenoceptor mechanisms. *Br J Pharmacol* 395–406, 2008.

西澤直行. N^1 -メチルヒスチジン (3-メチルヒスチジン) による骨格筋ミオフィブリルタンパク質の分解速度の測定方法の確立とその応用. *日本栄養・食糧学会誌* 36: 409–423, 1983.

農林水産省. 家畜改良増殖目標, 2015. [homepage on the Internet]. 東京; [cited 10 May 2019]. Available from URL:

http://www.maff.go.jp/j/chikusan/kikaku/lin/l_hosin/pdf/h27_katiku_moku_hyo.pdf

Ohtsuka A, Kawatomi N, Nakashima K, Araki T, Hayash K. Gene expression of muscle-specific ubiquitin ligase, atrogen-1/MAFbx, positively correlates with skeletal muscle proteolysis in food-deprived broiler chickens. *J Poult Sci* 48: 92–96, 2011.

岡田泰伸・赤須崇・上田陽一・岡田幸雄・河原克雅・菅野富夫・倉智嘉久・黒澤美枝子・桑木共之・小西真人・佐久間康夫・佐藤俊英・鈴木裕一・秦羅雅登・多久和陽・照井直人・福田康一郎・前田信治・宮本賢一・八尾寛・矢田俊彦・山本哲郎 共訳：ギャノン生理学(原著 22 版) 丸善株式会社 pp. 67–75, 2004.

Paik JH, Kollipara R, Chu G, Ji H, Xiao Y, Ding Z, Miao L, Tothova Z, Horner JW, Carrasco DR, Jiang S, Gilliland DG, Chin L, Wong WH, Castrillon DH, DePinho RA. FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. *Cell* 128: 309–323, 2007.

Petrella JK, Kim JS, Cross JM, Kosek DJ, Bamman MM. Efficacy of myonuclear addition may explain differential myofiber growth among resistance-trained young and older men and women. *Am J Physiol*

Endocrinol Metab 291: 937–946, 2006.

Qin W, Pan J, Wu Y, Bauman WA, Cardozo C. Protection against dexamethasone-induced muscle atrophy is related to modulation by testosterone of FOXO1 and PGC-1 α . Biochem Biophys Res Commun 403: 473–478, 2010.

Rennie MJ, Wackerhage H, Spangenburg EE, Booth FW. Control of the size of the human muscle mass. Annu Rev Physiol 66: 799–828, 2004.

Reporter M. Protein synthesis in cultured muscle cells: methylation of nascent proteins. Arch Biochem Biophys 158: 577–585, 1973.

Reynolds TH 4th, Bodine SC, Lawrence JC Jr. Control of Ser 2448 phosphorylation in the mammalian target of rapamycin by insulin and skeletal muscle load. J Biol Chem 277: 17657–17662, 2002.

Sacheck JM, Ohtsuka A, McLary SC, Goldberg AL. 2004. IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. Am J Physiol Endocrinol Metab 287: 591–601, 2004.

Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K,

Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL. FoxO transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 117: 399–412, 2004.

Saneyasu T, Tsuchii N, Nakano Y, Kitashiro A, Tsuchihashi T, Shindo H, Honda K, Kamisoyama H. Effects of short-term fasting on the Akt-mediated pathway involved in protein metabolism in chicken skeletal muscle. *Domest Anim Endocrinol* 61: 54–61, 2017.

Sato S, Shirato K, Kizaki T, Ohno H, Tachiyashiki K, Imaizumi K. Effects of β_2 -agonists and exercise on β_2 -adrenergic receptor signaling in skeletal muscles. *Jpn J Phys Fit Sport* 1: 139–144, 2012.

Sato S, Shirato K, Mitsuhashi R, Inoue D, Kizaki T, Ohno H, Tachiyashiki K, Imaizumi K. Intracellular β_2 -adrenergic receptor signaling specificity in mouse skeletal muscle in response to single-dose β_2 -agonist clenbuterol treatment and acute exercise. *J Physiol Sci* 63: 211–218, 2013.

Scott PH, Brunn GJ, Kohn AD, Roth RA, Lawrence JC Jr. Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7772–7777, 1998.

Shen H, Wang D, Li L, Yang S, Chen X, Zhou S, Zhong S, Zhao J, Tang J. MiR-222 promotes drug-resistance of breast cancer cells to adriamycin via modulation of PTEN/Akt/FOXO1 pathway. *Gene* 596: 110–118, 2017.

品川義之. 鶏の筋肉タンパク質の合成分解速度に関する研究. 卒業論文, 1981.

新藤恵一郎, 近藤国嗣, 里宇明元. 筋線維の増生と再生. *リハビリテーション医学* 41: 313–323, 2004.

Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyva Y, Kline WO, Gonzalez M, Yancopoulos GD, Glass DJ. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell* 14: 395–403, 2004.

Silveira WA, Gonçalves DA, Graça FA, Andrade-Lopes AL, Bergantin LB, Zanon NM, Godinho RO, Kettelhut IC, Navegantes LC. Activating cAMP/PKA signaling in skeletal muscle suppresses the ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis: implications for sympathetic regulation. *J Appl Physiol* 117: 11–19, 2014.

Suryawan A, Orellana RA, Nguyen HV, Jeyapalan AS, Fleming JR, Davis TA. Activation by insulin and amino acids of signaling components leading

to translation initiation in skeletal muscle of neonatal pigs is developmentally regulated. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E1597–1605, 2007.

Tamaki T. A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. *Med Sci Sport Exerc* 24: 881–886, 1992.

Tesseraud S, Peresson R, Chagneau AM. Age-related changes of protein turnover in specific tissues of the chick. *Poult Sci* 75: 627–631, 1996.

Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood EL. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev* 15: 80–101, 1994.

Timmerman KL, Lee JL, Dreyer HC, Dhanani S, Glynn EL, Fry CS, Drummond MJ, Sheffield-Moore M, Rasmussen BB, Volpi E. Insulin stimulates human skeletal muscle protein synthesis via an indirect mechanism involving endothelial-dependent vasodilation and mammalian target of rapamycin complex 1 signaling. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 3848–3857, 2010.

Urbánek P, Klotz LO. Posttranscriptional regulation of FOXO expression: microRNAs and beyond. *Br J Pharmacol* 174: 1514–1532, 2016.

Wannenes F, Magni L, Bonini M, Dimauro I, Caporossi D, Moretti C, Bonini S. In vitro effects of Beta-2 agonists on skeletal muscle differentiation, hypertrophy, and atrophy. *World Allergy Organ J* 5: 66–72, 2012.

Young VR, Munro HN. Ntau-methylhistidine (3-methylhistidine) and muscle protein turnover: an overview. *Fed Proc* 37: 2291–2300, 1978.

Yuniant VD, Higuchi K, Ohtsuka A, Hayashi K. Effect of environmental temperature on plasma levels of catecholamines in pair-fed broiler chickens. *J Poult Sci* 35: 1–8, 1998.

Zhang X, Gan L, Pan H, Guo S, He X, Olson ST, Mesecar A, Adam S, Unterman TG. Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms. Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding. *J Biol Chem* 277: 45276–45284, 2002.

付表

第2章第1節

		組織1g中のMeHis (umol/g tissue)	解体時の組織重量(g)	組織中のMeHis含量(umol/g tissue)
骨格筋	1	5.30	17.62	93.47
	2	4.58	18.94	86.83
	3	4.76	18.11	86.22
	4	4.45	18.02	80.28
	5	3.86	14.18	54.70
	6	5.86	14.43	84.61
	平均	4.80	16.88	81.02
	標準偏差	0.70	2.04	13.58
	標準誤差	0.31	0.91	6.07
筋肉	1	5.80	3.15	18.27
	2	4.23	3.37	14.27
	3	7.69	2.84	21.85
	4	2.71	3.18	8.63
	5	3.92	4.23	16.60
	6	1.05	3.86	4.05
	平均	4.24	3.44	13.95
	標準偏差	2.32	0.51	6.55
	標準誤差	1.04	0.23	2.93
心臓	1	3.14	0.56	1.76
	2	2.95	0.66	1.95
	3		0.64	
	4	2.24	0.61	1.37
	5	1.79	0.68	1.22
	6	2.21	0.82	1.81
	平均	2.47	0.66	1.62
	標準偏差	0.56	0.09	0.31
	標準誤差	0.25	0.04	0.14
肝臓	1	0.70	3.04	2.12
	2	0.24	2.74	0.65
	3	0.74	2.50	1.85
	4	0.72	3.08	2.22
	5	0.81	3.16	2.57
	6		3.02	
	平均	0.64	2.92	1.88
	標準偏差	0.23	0.25	0.73
	標準誤差	0.10	0.11	0.33
羽と皮膚	1	0.93	7.90	7.33
	2	1.04	7.72	8.04
	3	0.64	6.71	4.28
	4	0.13	7.02	0.93
	5	0.89	7.26	6.49
	6	0.55	7.42	4.07
	平均	0.70	7.34	5.19
	標準偏差	0.33	0.44	2.63
	標準誤差	0.15	0.20	1.18
骨+頭+血漿	1		24.57	
	2	0.72	22.07	14.63
	3	0.27	24.66	6.96
	4	0.71	22.11	14.15
	5	0.94	23.31	19.06
	6	0.46	21.20	9.53
	平均	0.62	22.99	12.87
	標準偏差	0.26	1.43	4.72
	標準誤差	0.12	0.64	2.11
その他組織	1	0.84	2.86	2.40
	2	1.66	5.37	8.90
	3	2.72	3.68	10.01
	4	1.84	4.26	7.82
	5	1.82	3.04	5.54
	6		5.78	
	平均	1.77	4.17	6.93
	標準偏差	0.67	1.21	3.03
	標準誤差	0.30	0.54	1.35

第 2 章 第 2 節

	単位	1日肺体重		5日肺体重		1日あたりの増 体量		1日あたりの飼 料摂取量		解体時の 骨格筋重量		骨格筋1g中の MeHis		骨格筋中の3-MeHis ブール量(P)		1日あたりの 糞の排泄量		糞中3-MeHis量		1日あたりの糞中 3-MeHis排泄量		タンパク質 合成速度		タンパク質 分解速度	
		g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	μmol/g	μmol	g	g	mmol	μmol	%/day	%/day						
漣	1	39.15	92.45	9.13	17.46	22.99	0.36	8.22	17.70	19.32	0.34	12.67	3.53												
	2	38.35	97.53	10.11	19.44	22.32	0.33	7.33	19.27	17.85	0.34	13.50	3.91												
	3	38.40	101.93	10.90	20.03	23.61	0.40	9.49	21.48	25.85	0.56	14.97	5.23												
	4	40.48	104.05	7.98	17.63	16.78	0.43	7.25	20.11	21.77	0.44	13.11	4.21												
	5	42.90	108.95	8.92	17.66	16.88	0.45	7.58	22.62	21.03	0.48	14.01	4.52												
	6	42.93	115.10	9.68	20.86	20.74	0.48	9.97	24.34	20.52	0.50	13.28	3.43												
平均		40.37	103.33	9.45	18.85	20.55	0.41	8.31	20.92	21.06	0.44	13.59	4.14												
標準偏差		2.12	8.06	1.01	1.46	3.04	0.06	1.16	2.39	2.72	0.09	0.81	0.67												
標準偏差		0.95	3.60	0.45	0.65	1.36	0.03	0.52	1.07	1.22	0.04	0.36	0.30												
急漣	1	39.95	134.18	12.92	21.55	25.69	0.39	10.08	21.94	19.78	0.43	14.42	3.68												
	2	41.35	139.90	13.13	22.84	27.28	0.35	9.67	22.57	15.42	0.35	13.54	2.90												
	3	41.5	149.00	13.51	23.65	28.26	0.38	10.74	25.33	15.57	0.39	13.76	3.02												
	4	43.5	124.08	14.34	22.78	31.54	0.40	12.60	33.93	18.89	0.64	14.87	3.73												
	5	42.5	128.68	14.95	23.54	31.82	0.41	13.03	30.67	20.05	0.62	14.57	3.36												
	6	43.4	130.50	16.63	24.89	34.48	0.42	14.59	34.86	19.16	0.67	14.85	3.29												
平均		42.03	134.39	14.25	23.21	29.84	0.39	11.78	28.22	18.15	0.52	14.33	3.33												
標準偏差		1.37	8.92	1.39	1.11	3.30	0.02	1.93	5.70	2.10	0.14	0.56	0.33												
標準偏差		0.61	3.99	0.62	0.50	1.48	0.01	0.86	2.55	0.94	0.06	0.25	0.15												

第 3 章 第 1 節

	1日齢体重		5日齢体重		浅胸筋		縦工筋		大腿部		心臓		肝臓		筋胃		腹腔内脂肪		浅胸筋 (相対)		縦工筋 (相対)			
	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g/100g体重	g/100g体重	g/100g体重	g/100g体重		
遅	1	35.10	53.30	1.45	0.12	3.78	1.87	0.56	3.30	0.04	2.72	2.82	0.23	44.80	69.60	1.96	0.18	5.35	2.66	0.56	3.68	0.17	2.82	0.26
	2	44.80	69.60	1.96	0.18	5.35	2.66	0.56	3.68	0.17	2.82	0.26	43.90	71.00	2.22	0.17	4.96	2.50	0.55	3.56	0.40	3.13	0.24	
	3	43.90	71.00	2.22	0.17	4.96	2.50	0.55	3.56	0.40	3.13	0.24	38.40	66.00	2.64	0.16	5.57	2.25	0.51	3.71	0.13	3.71	0.22	
	4	38.40	66.00	2.64	0.16	5.57	2.25	0.51	3.71	0.13	3.71	0.22	40.10	74.00	1.74	0.16	5.03	2.32	0.49	2.69	0.22	2.64	0.24	
	5	40.10	74.00	1.74	0.16	5.03	2.32	0.49	2.69	0.22	2.64	0.24	41.30	64.10	1.35	0.14	5.13	1.77	0.32	2.66	0.08	2.11	0.22	
	6	41.30	64.10	1.35	0.14	5.13	1.77	0.32	2.66	0.08	2.11	0.22	平均	40.60	65.87	1.89	0.16	4.97	2.20	0.47	3.20	0.17	2.88	0.23
急速	1	1.60	3.03	0.22	0.01	0.28	0.15	0.05	0.19	0.06	0.24	0.01	3.780	79.40	2.49	0.22	5.40	2.42	0.50	4.13	0.42	3.14	0.28	
	2	42.30	84.50	3.20	0.18	6.56	2.73	0.67	3.72	0.27	3.79	0.21	37.80	42.30	3.88	0.26	7.56	2.68	0.72	3.96	0.16	4.44	0.30	
	3	37.80	42.30	3.88	0.26	7.56	2.68	0.72	3.96	0.16	4.44	0.30	41.10	80.90	3.17	0.19	6.14	2.29	0.57	3.48	0.30	3.92	0.23	
	4	41.10	80.90	3.17	0.19	6.14	2.29	0.57	3.48	0.30	3.92	0.23	45.30	93.80	4.84	0.26	7.89	2.66	0.60	3.66	0.16	5.16	0.28	
	5	45.30	93.80	4.84	0.26	7.89	2.66	0.60	3.66	0.16	5.16	0.28	平均	43.30	93.40	3.46	0.17	6.35	2.93	0.63	3.50	0.26	3.70	0.18
	6	43.30	93.40	3.46	0.17	6.35	2.93	0.63	3.50	0.26	3.70	0.18	標準偏差	41.27	86.57	3.51	0.21	6.65	2.62	0.62	3.74	0.26	4.02	0.25
標準偏差	3.02	6.12	0.80	0.04	0.93	0.23	0.08	0.26	0.08	0.26	0.08	標準偏差	1.35	2.74	0.36	0.02	0.41	0.10	0.10	0.12	0.04	0.31	0.02	
標準偏差	1.35	2.74	0.36	0.02	0.41	0.10	0.03	0.12	0.04	0.12	0.03													

	血液中の3-Methyls濃度		浅胸筋中 <i>Argon-1/ALPbx</i> mRNA		縦工筋中 <i>Argon-1/ALPbx</i> mRNA		浅胸筋中 AKT mRNA 相対発現		浅胸筋中 FoxO1 mRNA 相対発現		縦工筋中 AKT mRNA 相対発現		縦工筋中 FoxO1 mRNA 相対発現	
	nmol/L	relative expression	relative expression	arbitrary unit	arbitrary unit	arbitrary unit	arbitrary unit	arbitrary unit	arbitrary unit	arbitrary unit	arbitrary unit	arbitrary unit	arbitrary unit	
遅	1	28.40	1.56	0.79	1.46	0.94	0.67	0.53	0.99	1.00	0.13	12.20	0.50	
	2	17.00	1.49	0.57	0.88	1.22	0.66	0.83	1.00	0.13	7.20	0.50		
	3	42.60	0.82	1.52	0.91	0.82	1.15	0.99	1.00	0.13	6.60	0.50		
	4	53.20	0.47	1.17	1.18	0.94	1.18	1.09	1.10	0.13	22.90	0.56		
	5	47.60	0.45	0.92	0.64	1.07	1.34	1.00	1.01	0.13	35.00	0.43		
	6	57.00	1.20	0.50	0.89	0.97	0.99	0.83	1.00	0.13	27.00	0.45		
平均	40.97	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	平均	18.48	
標準偏差	15.40	0.49	0.23	0.26	0.23	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	標準偏差	11.60	
標準偏差	6.89	0.22	0.32	0.12	0.10	0.06	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	標準偏差	5.19	
標準偏差	12.20	0.50	0.71	1.65	1.66	1.03	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	標準偏差	18.48	
標準偏差	7.20	0.59	0.92	2.31	1.93	1.00	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	標準偏差	11.60	
標準偏差	6.60	0.31	1.22	1.22	1.98	0.97	1.10	1.09	1.10	1.10	1.10	標準偏差	5.19	
標準偏差	22.90	0.56	1.96	1.96	2.10	1.40	1.09	1.09	1.09	1.09	1.09	標準偏差	18.48	
標準偏差	35.00	0.43	0.47	2.35	2.08	1.31	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	標準偏差	11.60	
標準偏差	27.00	0.45	0.54	3.62	2.01	1.18	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	標準偏差	5.19	
標準偏差	18.48	0.47	0.65	2.19	1.96	1.15	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	標準偏差	11.60	
標準偏差	5.19	0.10	0.16	0.82	0.16	0.18	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	標準偏差	5.19	
標準偏差	18.48	0.10	0.16	0.82	0.16	0.18	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	標準偏差	5.19	
標準偏差	5.19	0.04	0.07	0.37	0.07	0.08	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	標準偏差	5.19	

第 3 章 第 2 節

	単位	血液中インスリン濃度	血液中成長ホルモン濃度	血液中プロレチリン濃度	インスリン受容体mRNA	IGF-1 mRNA	IGF-1受容体 mRNA	β_1 -AR mRNA	β_2 -AR mRNA	β_3 -AR mRNA	肝臓中IGF-1 mRNA
	μg/mL	pg/mL	pg/mL	relative expression							
週	1	0.47	129.73	49.60	0.96	1.25	1.31	1.88	1.48	0.95	0.46
	2	0.49	36.85	44.10	1.02	1.25	0.90	0.72	1.15	0.12	1.66
	3	0.43	19.42	18.30	1.08	0.56	1.13	0.28	0.99	0.41	0.84
	4	0.27	15.18	8.80	0.54	0.60	0.71	0.51	0.62	0.27	1.79
	5	0.92	58.97	14.60	0.83	1.33	0.96	1.78	0.76	1.72	0.43
	6	0.52	20.94	49.90	1.57	1.01	0.96	0.83	0.76	2.52	0.83
平均	0.52	46.85	30.88	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
標準偏差	0.24	43.69	18.96	0.34	0.34	0.23	0.23	0.67	0.34	0.34	0.59
標準誤差	0.11	19.54	8.48	0.15	0.15	0.10	0.10	0.30	0.15	0.15	0.42
急性	1	0.25	235.18	143.10	0.69	0.77	0.87	1.32	1.01	0.69	0.46
	2	0.73	165.18	15.60	0.97	0.88	0.55	1.21	1.44	0.39	0.87
	3	0.29	55.64	117.80	0.85	0.70	0.15	0.60	1.49	0.23	0.24
	4	0.55	132.15	27.90	0.72	0.95	0.42	1.85	1.79	0.52	0.67
	5	0.98	57.45	72.00	0.83	0.84	0.86	0.81	2.07	0.39	0.91
	6	0.38	35.48	15.90	0.93	0.94	0.88	2.01	1.58	0.85	1.36
平均	0.53	113.52	63.38	0.83	0.85	0.62	1.30	1.56	0.51	0.75	
標準偏差	0.28	77.98	55.07	0.11	0.10	0.30	0.56	0.36	0.23	0.39	
標準誤差	0.13	34.87	24.63	0.05	0.04	0.13	0.25	0.16	0.10	0.18	

IGF-1インスリン様成長因子1 ARプロレチリン受容体

第 4 章 第 1 節

		<i>Atrogin-1/MAFbx</i> mRNA	
単位		relative expression	
PBS	1		0.72
	2		1.57
	3		1.18
	4		0.73
	5		0.69
	6		1.12
	平均		1.00
	標準偏差		0.35
	標準誤差		0.16
AD	1		0.39
	2		
	3		0.28
	4		0.32
	5		0.15
	6		0.19
	平均		0.26
	標準偏差		0.10
	標準誤差		0.04
ISO	1		0.45
	2		0.66
	3		0.12
	4		0.49
	5		0.39
	6		
	平均		0.42
	標準偏差		0.20
	標準誤差		0.09

PBS:対照区

AD:アドレナリン区

ISO:イソプロテレノール区

第 4 章 第 2 節

		<i>Arogin-1/M417x</i> mRNA (relative expression)			
作用薬 (mg/kg体重)		トクタミン	クレンテロール	BRL37344	
0	1	0.44	0.44	0.44	0.44
	2	1.20	1.20	1.20	1.20
	3	1.01	1.01	1.01	1.01
	4	1.35	1.35	1.35	1.35
平均	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
標準偏差	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
標準誤差	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
0.001	1	3.21	1.94	0.95	0.95
	2	2.01	1.41	1.27	1.27
	3	1.32	0.65	2.20	2.20
	4	1.57	1.44	1.53	1.53
平均	2.03	1.36	1.49	1.49	1.49
標準偏差	0.84	0.53	0.53	0.53	0.53
標準誤差	0.37	0.24	0.24	0.24	0.24
0.01	1	0.90	2.93	0.78	0.78
	2	0.93	3.03	1.22	1.22
	3	0.71	0.40	0.43	0.43
	4	1.79	0.87	0.63	0.63
平均	1.08	1.81	0.76	0.76	0.76
標準偏差	0.48	1.37	0.34	0.34	0.34
標準誤差	0.22	0.61	0.15	0.15	0.15
0.1	1	1.77	0.26	0.20	0.20
	2	0.93	0.15	0.17	0.17
	3	2.49	0.14	0.93	0.93
	4	0.46	0.33	0.34	0.34
平均	1.41	0.22	0.41	0.41	0.41
標準偏差	0.90	0.09	0.36	0.36	0.36
標準誤差	0.40	0.04	0.16	0.16	0.16

		<i>Arogin-1/M417x</i> mRNA	
単位	relative expression	単位	relative expression
1	1.71	1	1.71
2	1.44	2	1.44
3	0.53	3	0.53
4	0.73	4	0.73
5	0.78	5	0.78
6	0.81	6	0.81
平均	1.00	平均	1.00
標準偏差	0.46	標準偏差	0.46
標準誤差	0.21	標準誤差	0.21
1	1.18	1	1.18
2	0.83	2	0.83
3	0.98	3	0.98
4	0.57	4	0.57
5	0.61	5	0.61
6	1.21	6	1.21
平均	0.90	平均	0.90
標準偏差	0.28	標準偏差	0.28
標準誤差	0.12	標準誤差	0.12
1	0.31	1	0.31
2	0.17	2	0.17
3	0.25	3	0.25
4	0.24	4	0.24
5	0.33	5	0.33
6	0.26	6	0.26
平均	0.06	平均	0.06
標準偏差	0.03	標準偏差	0.03
標準誤差	0.03	標準誤差	0.03
1	2.37	1	2.37
2	1.03	2	1.03
3	1.96	3	1.96
4	1.09	4	1.09
5	1.56	5	1.56
6	1.47	6	1.47
平均	1.58	平均	1.58
標準偏差	0.51	標準偏差	0.51
標準誤差	0.23	標準誤差	0.23

		<i>Arogin-1/M417x</i> mRNA	
単位	relative expression	単位	relative expression
1	0.68	1	0.68
2	0.91	2	0.91
3	1.53	3	1.53
4	0.88	4	0.88
平均	1.00	平均	1.00
標準偏差	0.37	標準偏差	0.37
標準誤差	0.17	標準誤差	0.17
1	0.28	1	0.28
2	0.32	2	0.32
3	0.15	3	0.15
4	0.19	4	0.19
平均	0.23	平均	0.23
標準偏差	0.08	標準偏差	0.08
標準誤差	0.03	標準誤差	0.03
1	0.78	1	0.78
2	1.35	2	1.35
3	0.94	3	0.94
4	0.72	4	0.72
平均	0.95	平均	0.95
標準偏差	0.29	標準偏差	0.29
標準誤差	0.13	標準誤差	0.13
1	0.48	1	0.48
2	1.45	2	1.45
3	0.44	3	0.44
4	1.35	4	1.35
平均	0.93	平均	0.93
標準偏差	0.54	標準偏差	0.54
標準誤差	0.24	標準誤差	0.24

第 4 章 第 3 節

		血漿中3-MeHis 濃度	<i>Atroign-1/MAFbx</i> mRNA	<i>FoxO1</i> mRNA	<i>IGF-1</i> mRNA
単位		nmol/uL	relative expression	relative expression	relative expression
対照区	1	15.78	0.50	1.13	0.95
	2	18.83	0.77	1.59	0.36
	3	15.65	0.97	0.78	0.72
	4	20.48	1.56	0.82	1.75
	5	16.06	1.71	0.70	
	6	16.60	0.49	0.98	1.20
	平均	17.23	1.00	1.00	1.00
	標準偏差	1.98	0.52	0.33	0.52
	標準誤差	0.88	0.23	0.15	0.23
クレンブテロール区	1	15.51	0.16	0.74	
	2	3.56	0.38	0.65	
	3	12.66	0.11	0.55	2.97
	4	14.07	0.49	0.77	2.31
	5	11.20	0.20	0.60	3.22
	6	14.32	0.62		2.61
	平均	11.89	0.33	0.66	2.78
	標準偏差	4.34	0.20	0.09	0.40
	標準誤差	1.94	0.09	0.04	0.18

		リン酸化AKT	全AKT	AKTリン酸化割合	細胞質画分 リン酸化FoxO1	核画分 全FoxO1
単位		arbitrary unit	arbitrary unit	arbitrary unit	arbitrary unit	arbitrary unit
対照区	1	0.58	0.46	1.20	1.03	1.16
	2	0.84	0.75	1.06	0.82	1.27
	3	0.72	0.66	1.03	0.91	0.87
	4	1.28	1.05	1.15	0.90	1.04
	5	1.27	1.52	0.79	1.07	0.77
	6	1.30	1.57	0.78	1.26	0.89
	平均	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	標準偏差	0.32	0.46	0.18	0.16	0.19
	標準誤差	0.14	0.21	0.08	0.07	0.09
クレンブテロール区	1	1.13	1.05	1.01	1.08	0.82
	2	1.22	0.96	1.20	0.91	0.72
	3	1.47	0.86	1.60	1.03	0.90
	4	1.38	1.00	1.29	0.97	0.65
	5	1.28	1.00	1.20	1.10	0.72
	6	1.63	1.03	1.49	1.47	0.72
	平均	1.35	0.98	1.30	1.09	0.76
	標準偏差	0.18	0.07	0.22	0.20	0.09
	標準誤差	0.08	0.03	0.10	0.09	0.04

IGF-1:インスリン様成長因子

第 5 章第 1-2 節

単位	<i>FoxO1</i> mRNA		<i>Ahrngn-1/MAFbx</i> mRNA	
	relative expression	relative expression	relative expression	relative expression
0µM	1	1.18	0.86	
	2	1.14	0.74	
	3	0.99	1.00	
	4	1.00	1.12	
	5	0.85	1.29	
	6	0.84	0.99	
平均	1.00	1.00		
標準偏差	0.14	0.20		
標準偏差	0.06	0.09		
0.01µM	1	0.95	0.48	
	2	0.84	0.13	
	3	0.63	0.50	
	4	0.65	0.30	
	5	0.69	0.66	
	6	0.80	1.03	
平均	0.76	0.52		
標準偏差	0.13	0.31		
標準偏差	0.06	0.14		
0.1µM	1	0.90	0.44	
	2	0.88	0.61	
	3	0.69	0.71	
	4	0.59	0.84	
	5	0.59	0.88	
	6	0.65	0.75	
平均	0.74	0.71		
標準偏差	0.14	0.16		
標準偏差	0.06	0.07		
1µM	1	0.83	0.44	
	2	0.81	0.60	
	3	0.71	0.44	
	4	0.88	0.61	
	5	0.78	0.81	
	6	0.60	0.84	
平均	0.77	0.62		
標準偏差	0.10	0.17		
標準偏差	0.04	0.08		

単位	<i>Ahrngn-1/MAFbx</i> mRNA		<i>FoxO1</i> mRNA		<i>IGF-1</i> mRNA		
	relative expression	relative expression	relative expression	relative expression	relative expression	relative expression	
対照区	1時間	1.06	0.93	0.97	0.72	1.08	0.99
	3時間	0.82	0.89	1.22	1.04	1.07	1.07
	1時間	1.04	0.93	1.25	1.37	1.12	0.83
	3時間	1.08	1.18	0.93	0.93	0.88	0.93
	1時間	0.96	1.15	1.00	0.73	0.95	1.12
	3時間	1.06	0.84	0.79	1.04	0.94	1.06
平均	1.00	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	
標準偏差	0.10	0.14	0.19	0.26	0.09	0.11	
標準偏差	0.04	0.06	0.08	0.12	0.04	0.05	
クレソチテロール区	1時間	0.92	0.84	0.66	0.62	1.20	0.89
	3時間	1.03	0.72	0.76	0.73	0.93	0.80
	1時間	1.10	0.79	0.84	0.68	0.93	0.91
	3時間	1.07	0.90	0.73	0.73	1.02	0.89
	1時間	1.60	0.73	0.49	0.53	1.03	0.88
	3時間	0.91	0.78	0.37	0.27	1.20	1.23
平均	1.11	0.79	0.64	0.59	1.05	0.93	
標準偏差	0.25	0.07	0.18	0.18	0.12	0.15	
標準偏差	0.11	0.03	0.08	0.08	0.05	0.07	

単位	リン酸化AKT		全AKT		AKTリン酸化割合		リン酸化FoxO1		全FoxO1		FoxO1リン酸化割合	
	arbitrary unit											
対照区	1	1.12	1.15	0.97	1.12	1.39	0.89	0.99	0.99	1.40	0.89	0.89
	2	0.93	0.82	0.99	1.12	1.39	0.99	0.99	1.40	0.71	0.71	
	3	0.95	1.03	0.92	0.92	0.72	1.02	1.00	1.00	0.25	0.25	
クレソチテロール区	1	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.57	0.57	
	2	1.09	1.01	1.07	1.07	1.15	0.40	0.40	0.37	0.37	0.37	
	3	1.64	0.92	1.77	1.77	0.97	0.56	0.56	0.60	0.60		
平均	1.31	1.05	1.27	1.27	0.25	0.47	0.51	0.51	0.51			
標準偏差	0.30	0.15	0.44	0.44	0.12	0.16	0.13	0.13	0.13			
標準偏差	0.21	0.11	0.31	0.31	0.08	0.11	0.09	0.09	0.09			

IGF-1:インスリン様成長因子

第 5 章第 3-4 節

単位	FoxO1 mRNA		Atrogin-1/MiPbx mRNA	
	relative expression		relative expression	
0μM	1	0.97	1.27	
	2	1.18	1.02	
	3	0.91	0.87	
	4	1.00	0.97	
	5	0.99	1.03	
	6	0.95	0.84	
平均	1.00	1.00		
標準偏差	0.09	0.16		
標準誤差	0.04	0.07		
0.01 μM	1	0.55	0.97	
	2	1.01	1.27	
	3	0.98	1.19	
	4	0.90	0.98	
	5	1.16	1.32	
	6	0.57	0.78	
平均	0.90	1.09		
標準偏差	0.20	0.21		
標準誤差	0.09	0.09		
0.1 μM	1	0.89	0.98	
	2	0.95	0.43	
	3	0.83	0.72	
	4	0.81	0.74	
	5	0.92	0.88	
	6	0.81	0.65	
平均	0.87	0.73		
標準偏差	0.06	0.19		
標準誤差	0.03	0.09		
1 μM	1	1.02	0.50	
	2	0.85	0.90	
	3	0.65	0.62	
	4	0.66	0.64	
	5	0.89	0.62	
	6	0.90	0.75	
平均	0.83	0.67		
標準偏差	0.15	0.14		
標準誤差	0.07	0.06		

単位	Atrogin-1/MiPbx mRNA			FoxO1 mRNA			IGF-1 mRNA		
	1時間	3時間	1時間	3時間	1時間	3時間	1時間	3時間	
対照区	1	1.15	1.26	1.10	1.01	1.08	0.99		
	2	1.01	1.04	0.95	1.13	1.04	1.07		
	3	1.02	0.82	0.96	0.86	1.12	0.83		
	4	1.14	1.07	1.05	1.00	0.88	0.93		
	5	0.93	0.91	0.98	1.04	0.95	1.12		
	6	0.75	0.89	0.96	1.06	0.94	1.06		
平均	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00			
標準偏差	0.15	0.16	0.06	0.09	0.09	0.11			
標準誤差	0.07	0.07	0.03	0.04	0.04	0.05			
クレブテラロール区	1	1.00	0.51	1.00	0.69	1.20	0.89		
	2	0.95	0.76	0.94	0.91	0.93	0.80		
	3	0.96	0.72	0.75	0.55	0.93	0.91		
	4	2.12	0.64	0.42	0.62	1.02	0.89		
	5	1.81	0.04	0.85	0.07	1.03	0.88		
	6	1.57	0.75	0.73	0.70	1.20	1.23		
平均	1.40	0.57	0.78	0.59	1.05	0.93			
標準偏差	0.51	0.28	0.21	0.28	0.12	0.15			
標準誤差	0.23	0.12	0.09	0.13	0.05	0.07			

単位	リン酸化AKT		全AKT		AKTリン酸化割合		リン酸化FoxO1		全FoxO1		FoxO1リン酸化割合	
	arbitrary unit											
対照区	1	0.73	0.78	0.93	0.86	0.86	1.46	0.55				
	2	0.58	0.88	0.66	1.04	0.86	1.12					
	3	1.58	0.93	1.68	1.01	1.29	0.72					
	4	0.82	1.16	1.04	1.04	0.90	1.07					
	5	1.09	1.02	1.05	1.13	0.79	1.32					
	6	1.20	1.23	0.97	1.21	0.70	1.21					
平均	0.96	0.86	1.09	0.97	1.20	0.80						
標準偏差	0.53	0.08	0.53	0.09	0.31	0.29						
標準誤差	0.38	0.05	0.37	0.07	0.22	0.21						
クレブテラロール区	1	2.04	0.76	2.67	1.02	0.46	2.59					
	2	0.96	2.05	0.46	1.29	0.53	2.64					
	3	0.70	1.85	0.38	1.51	0.53	2.64					
	4	1.18	1.45	0.81	1.48	0.71	2.11					
	5	0.92	1.07	0.86	1.47	0.64	2.11					
	6	0.87	1.47	0.59	1.50	0.52	2.65					
平均	1.23	1.55	1.17	1.28	0.50	2.61						
標準偏差	0.71	0.69	0.24	0.30	0.03	0.03						
標準誤差	0.50	0.49	0.17	0.17	0.03	0.02						

第 6 章第 1 節

miRNA	Control		Clenbuterol		Fold-Change	Log ₂	P Value
	Mean	SD	Mean	SD			
miR-665-5p	2.70	0.42	31.79	26.11	11.77	3.56	0.01
miR-695b-3p	8.30	2.00	28.89	14.94	3.48	1.80	0.02
miR-3068-3p	3.73	1.00	11.67	3.85	3.13	1.65	0.01
miR-374b-5p	2.18	0.49	6.77	2.59	3.10	1.63	0.01
miR-6944-3p	9.71	1.85	29.52	9.92	3.04	1.60	0.01
miR-7038-3p	14.99	5.17	45.03	1.00	3.00	1.59	0.01
miR-7016-3p	21.50	12.63	61.63	18.23	2.87	1.52	0.04
miR-7066-3p	4.01	1.19	10.93	4.75	2.73	1.45	0.04
miR-7a-1-3p	3.14	0.85	8.56	4.17	2.73	1.45	0.04
miR-148b-3p	13.69	2.91	31.52	9.67	2.30	1.20	0.02
miR-1231-3p	1.62	0.15	3.67	1.01	2.26	1.18	0.01
miR-6236	6.07	2.45	12.90	0.95	2.12	1.09	0.04
miR-350-5p	2.50	0.97	5.27	0.91	2.11	1.07	0.03
miR-224-5p	1.94	0.14	4.00	0.89	2.06	1.04	0.01
miR-466a-3p	2.21	0.61	4.55	1.22	2.06	1.04	0.03
miR-466a-3p	2.21	0.61	4.55	1.22	2.06	1.04	0.03
miR-3473f	2.34	0.82	4.58	0.72	1.96	0.97	0.03
let-7b-3p	1.69	0.34	3.25	0.69	1.93	0.95	0.02
miR-3102-3p,2-3p	2.82	0.94	5.43	1.37	1.92	0.94	0.05
miR-494-3p	14.16	2.56	27.00	8.44	1.91	0.93	0.05
miR-3535	211.47	26.22	384.23	122.62	1.82	0.86	0.04
miR-1983	25.49	6.62	45.71	10.41	1.79	0.84	0.04
miR-191-3p	1.54	0.37	2.59	0.49	1.68	0.75	0.04
miR-501-5p	175.30	39.41	291.91	64.12	1.67	0.74	0.05
miR-6392-3p	1.21	0.19	1.85	0.26	1.53	0.61	0.03
miR-5627-5p	3.03	0.23	4.61	0.38	1.52	0.61	0.00
miR-8103	1.53	0.23	2.33	0.26	1.52	0.60	0.02
miR-5123	1.99	0.14	2.86	0.35	1.44	0.52	0.01
miR-6988-3p	1.84	0.16	2.60	0.24	1.42	0.50	0.01
miR-21c	2.15	0.25	2.98	0.16	1.39	0.47	0.01
miR-344f-3p	1.27	0.08	1.75	0.30	1.38	0.47	0.04
miR-6351	1.69	0.13	2.33	0.38	1.38	0.47	0.03
miR-5618-3p	1.25	0.08	1.70	0.19	1.36	0.44	0.02
miR-669f-3p	1.29	0.15	1.75	0.16	1.35	0.44	0.02
miR-29b-2-5p	9.61	1.41	12.95	0.42	1.35	0.43	0.03
miR-383-3p	1.48	0.14	1.98	0.24	1.34	0.42	0.03
miR-382-5p	1.40	0.22	1.86	0.06	1.34	0.42	0.03
miR-1258-3p	1.32	0.07	1.75	0.07	1.32	0.41	0.00
miR-133a-3p	2295.39	194.55	2998.78	346.81	1.31	0.39	0.04
miR-6981-5p	41.64	6.10	54.35	3.63	1.31	0.38	0.04
miR-7074-5p	1.49	0.06	1.94	0.14	1.30	0.37	0.00
miR-7036b-3p	5.38	0.72	6.94	0.17	1.29	0.37	0.03
miR-9-3p	1.53	0.07	1.96	0.21	1.28	0.36	0.02
miR-221-3p	3767.70	196.09	4819.17	691.17	1.28	0.36	0.05
miR-3093-3p	1.88	0.14	2.40	0.13	1.28	0.35	0.01
miR-6400	1.42	0.10	1.80	0.05	1.27	0.35	0.01
miR-10a-3p	1.35	0.10	1.67	0.13	1.24	0.31	0.03
miR-3060-5p	1.30	0.06	1.59	0.09	1.22	0.29	0.01
miR-222-3p	3199.05	131.08	3915.28	253.23	1.22	0.29	0.01
miR-381-5p	1.23	0.07	1.50	0.08	1.21	0.28	0.01
miR-741-3p	1.53	0.14	1.86	0.14	1.21	0.28	0.05
miR-721	1.62	0.03	1.95	0.19	1.20	0.27	0.03
miR-433-3p	1.49	0.13	1.78	0.12	1.20	0.26	0.04
miR-3569-3p	1.22	0.03	1.46	0.07	1.19	0.25	0.00
miR-6369	1.67	0.10	1.99	0.08	1.19	0.25	0.01
miR-7087-3p	1.64	0.14	1.94	0.11	1.18	0.24	0.04
miR-881-5p	1.23	0.05	1.45	0.09	1.18	0.24	0.02
miR-145a-5p	3525.92	178.44	4130.01	117.67	1.17	0.23	0.01
miR-149-5p	2151.77	123.68	2507.17	44.06	1.17	0.22	0.01
miR-5107-3p	1.45	0.06	1.68	0.04	1.16	0.21	0.01
miR-5615-5p	1.27	0.08	1.45	0.06	1.14	0.19	0.04
miR-205-3p	1.42	0.04	1.58	0.04	1.12	0.16	0.01
miR-8097	1.41	0.05	1.57	0.06	1.11	0.15	0.02
miR-302d-3p	1.41	0.03	1.56	0.02	1.11	0.15	0.00
miR-7067-3p	1.82	0.01	1.76	0.01	0.97	-0.05	0.00
miR-344-5p	1.57	0.04	1.48	0.03	0.94	-0.08	0.04
miR-6537-5p	1.62	0.03	1.43	0.03	0.88	-0.18	0.00
miR-7011-3p	1.52	0.10	1.34	0.04	0.88	-0.19	0.04
miR-379-3p	1.46	0.03	1.26	0.06	0.86	-0.22	0.01
miR-3544-3p	1.67	0.05	1.42	0.06	0.85	-0.23	0.01
miR-5128	287.56	9.18	243.09	23.49	0.85	-0.24	0.05
miR-509-3p	1.55	0.03	1.31	0.09	0.84	-0.25	0.01
miR-6936-3p	1.87	0.11	1.57	0.12	0.84	-0.25	0.03
miR-7119-3p	1.93	0.06	1.61	0.12	0.83	-0.27	0.02
miR-7664-5p	1.56	0.05	1.29	0.06	0.83	-0.28	0.00
miR-7657-3p	1.59	0.12	1.31	0.05	0.82	-0.28	0.02
miR-463-3p	1.67	0.06	1.35	0.11	0.81	-0.31	0.01
miR-217-5p	1.61	0.07	1.28	0.13	0.79	-0.33	0.02
miR-3965	1.66	0.06	1.29	0.12	0.78	-0.36	0.01
miR-137-3p	1.59	0.13	1.23	0.09	0.77	-0.38	0.01
miR-106b-5p	1790.54	136.07	1362.66	134.03	0.76	-0.39	0.02
miR-6944-5p	72.18	9.57	53.94	5.17	0.75	-0.42	0.04
miR-149-3p	1472.40	202.57	1075.83	127.04	0.73	-0.45	0.04
miR-6904-3p	2.00	0.14	1.42	0.14	0.71	-0.49	0.01
miR-7676-5p	1.86	0.34	1.32	0.10	0.71	-0.49	0.05
miR-664-3p	2.00	0.34	1.39	0.17	0.69	-0.53	0.04
miR-2861	4379.38	54.36	2959.62	721.04	0.68	-0.57	0.05
miR-6982-5p	21.37	4.03	14.05	2.44	0.66	-0.61	0.05
miR-3547-5p	498.25	39.14	326.20	39.10	0.65	-0.61	0.01
miR-6394	3.80	0.77	2.48	0.30	0.65	-0.62	0.04
miR-6997-5p	3.06	0.68	1.96	0.10	0.64	-0.64	0.03
miR-5130	977.93	95.57	619.37	142.81	0.63	-0.66	0.04
miR-718	4.73	0.79	2.77	0.10	0.58	-0.77	0.01
miR-465-3p	156.59	7.37	85.29	16.26	0.54	-0.88	0.01
miR-1904	3.71	0.57	1.90	0.53	0.51	-0.96	0.02
miR-7686-5p	165.80	28.38	83.69	36.36	0.50	-0.99	0.05
miR-190a-3p	3.55	1.25	1.68	0.51	0.47	-1.08	0.05
miR-3102-5p	124.71	28.95	58.82	8.62	0.47	-1.08	0.01
miR-3472	6.84	1.08	3.06	0.79	0.45	-1.16	0.01
miR-7666-3p	64.98	24.43	27.58	7.91	0.42	-1.24	0.05
miR-3110-3p	17.74	4.31	6.62	2.58	0.37	-1.42	0.02
miR-7672-5p	14.95	3.21	5.38	1.11	0.36	-1.47	0.00
miR-680	19.39	7.31	5.91	1.42	0.30	-1.71	0.01

第 6 章 第 2 節

		<i>FoxO1</i> mRNA	<i>Atroign-1/MAFbx</i> mRNA
単位		relative expression	relative expression
CT	1	1.12	0.92
	2	0.76	0.68
	3	0.95	1.10
	4	0.81	0.94
	5	1.28	1.32
	6	1.20	1.04
	平均	1.02	1.00
	標準偏差 標準誤差	0.21 0.10	0.21 0.10
NCT	1	1.27	1.03
	2	1.09	1.03
	3	0.63	0.84
	4	0.80	0.82
	5	0.76	0.88
	6	1.05	1.19
	平均	0.93	0.96
	標準偏差 標準誤差	0.24 0.11	0.15 0.06
miR374	7	0.88	0.39
	8	0.71	0.89
	9	0.76	0.81
	10	0.70	0.93
	11	0.79	0.94
	12	0.84	0.64
	平均	0.78	0.77
	標準偏差 標準誤差	0.07 0.03	0.22 0.10
miR7038	13	0.59	0.83
	14	0.78	1.44
	15	0.71	0.89
	16	1.06	1.43
	17	1.07	1.32
	18		1.23
	平均	0.84	1.19
	標準偏差 標準誤差	0.21 0.10	0.27 0.12
miR7016	19	1.27	0.63
	20	1.31	0.93
	21	0.81	1.03
	22	0.97	1.10
	23	0.86	0.94
	24	1.02	
	平均	1.04	0.92
	標準偏差 標準誤差	0.21 0.09	0.18 0.08
miR7	25	0.75	0.37
	26	0.76	0.23
	27	0.70	0.60
	28	0.74	0.64
	29	0.70	0.48
	30	0.76	0.52
	平均	0.73	0.47
	標準偏差 標準誤差	0.03 0.01	0.15 0.07

CT:対照区
NCT:ネガティブコントロール区

		全 <i>FoxO1</i>
単位		relative expression
CT	1	0.99
	2	1.07
	3	0.94
	4	1.04
	5	0.92
	6	1.03
	平均	1.00
	標準偏差 標準誤差	0.06 0.03
NCT	1	0.81
	2	0.95
	3	1.08
	4	1.02
	5	0.90
	6	1.17
	平均	0.99
	標準偏差 標準誤差	0.13 0.06
miR374	1	0.97
	2	0.87
	3	0.81
	4	0.80
	5	0.88
	6	0.84
	平均	0.86
	標準偏差 標準誤差	0.06 0.03
miR7	1	0.87
	2	0.63
	3	0.82
	4	0.92
	5	0.64
	6	0.82
	平均	0.78
	標準偏差 標準誤差	0.12 0.05