総 説

筋肉タンパク質の分解機構に関する栄養生化学的研究[†]

長 澤 孝 志

岩手大学農学部応用生物学科

Nutritional and Biochemical Studies on Muscle Protein Degradation

Takashi NAGASAWA

*Department of Bioscience and Technology, Faculty of Agriculture,
Iwate University, Morioka 020*

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 48, 347~355 (1995)

Skeletal muscle protein is very important for protein and amino acid metabolism in the homeostasis of the whole body, because skeletal muscle accounts for the largest amount of tissue. Therefore, it is necessary to measure the rate of muscle protein synthesis and degradation. Urinary *N*¹-methylhistidine (MeHis) is used as an index of myofibrillar protein degradation. It was demonstrated in this study using rats that 75% of MeHis in urine originated from skeletal muscle and that 25% originated from skin and intestine. Furthermore, it was suggested that there was a rapid turnover of myofibrils, because the specific radioactivity of MeHis in urine and muscle protein differed after administration of radioactive methionine. Several factors influencing muscle protein degradation were studied using MeHis release from perfused hindquarter muscles and isolated muscles. Insulin, known to be an anabolic hormone, it inhibited the degradation of muscle protein, particularly myofibrillar protein, in diabetic rats. Cysteine proteinases might be involved in muscle protein degradation, because leupeptin inhibited the release of MeHis and tyrosine from isolated muscle. Muscle protein degradation was also affected by the modification of muscle protein by active oxygen species or free radicals by feeding rats a vitamin E-deficient diet or iron overload. In these studies, a new method for determination of MeHis was developed, capable of measuring low concentrations of MeHis in plasma and medium. This method would allow acute changes in muscle protein degradation to be evaluated.

Key Words protein degradation, insulin, proteinase, oxidative stress, skeletal muscle.

(Received July 10, 1995)

1. 結 言

動物が生きていくためには常に食糧を確保し、外敵から身を守らねばならない。そのために体を動かし餌を探し、あるいは敵から逃れるために素早く行動するという運動能力が備わっている。運動は骨格筋の収縮により起こる現象であり、骨格筋はその能力を生かすために高度に組織化され、また運動に必要なエネルギーを得るために、他の組織には見られない多くの特徴をもった組織である¹⁾。一方、骨格筋は体の中で40%を占める最大の組織であることから²⁾、収縮という運動作用の他に、体全体のタンパク質、アミノ酸代謝において量的に他の組織よりは

るかに大きな寄与があると考えられる³⁾。たとえば、動物が絶食になると体重は著しく減少する。エネルギーだけではなく、タンパク質合成の素材としてのアミノ酸の外部からの供給もなくなるため、体は体タンパク質をも分解してエネルギーとする。このときおもに筋肉タンパク質が使われ、その結果筋肉の著しい減少が起こる⁴⁾。このように、骨格筋タンパク質は他の組織タンパク質と同様に生理的状態に敏感に反応して動物の恒常性維持のために働く⁵⁾。したがって、骨格筋タンパク質の合成速度と分解速度（代謝回転速度）を求めることはタンパク質の必要量を求める際に必要であり、骨格筋タンパク質の代謝回転の調節メカニズムを知ることは、その量が他のタンパク質に比べ非常に多いことから、種々の生理的状態における体タンパク質量の調節にきわめて重要であると

[†] 本総説は平成7年度奨励賞の受賞の対象となったものである。

考えられる。ところが、骨格筋タンパク質は肝臓などの他の組織タンパク質に比べその代謝回転速度が遅いため⁵⁾、速度の測定あるいは代謝回転メカニズムに関する研究は遅れていた。近年になり新たな合成速度の測定法が開発され⁶⁾、いろいろな生理的条件における骨格筋タンパク質の合成の調節機構が明らかにされつつあるが、骨格筋タンパク質の分解については、速度論的なものは得られるようになってきたものの、そのメカニズムについてはほとんど不明である。本論文では骨格筋タンパク質の分解速度測定法としての N^3 -メチルヒスチジン法⁷⁾を中心に、骨格筋タンパク質の分解メカニズムに関する研究成果を述べるとともに、今後の展望についても言及したい。

2. N^3 -メチルヒスチジンの由来と骨格筋タンパク質の代謝の二相性

先にも述べたように、*in vivo* におけるタンパク質の合成速度と分解速度を測定することはきわめて重要なことであることから、多くの方法が考案されている。原理的にはラベルアミノ酸（あるいはその前駆体）を動物に投与してタンパク質への取込み速度から合成速度を、ラベルされたタンパク質からのラベルアミノ酸の放出速度から分解速度を求めることができる⁸⁾。しかし、実際にはアミノ酸は生体にとって貴重なものであるため、タンパク質が分解して生成したアミノ酸はすぐに酸化してエネルギーとはせずに、その相当量はタンパク質合成に再利用されてしまう⁹⁾。ラベルアミノ酸もこの例外ではないため、合成速度と分解速度は過小評価される。これを防ぐために、タンパク質の合成速度の測定においては定速注入法¹⁰⁾と大量投与法¹¹⁾が開発された。どちらも前駆体のアミノ酸プールの比放射能（安定同位体においては比存在量）を一定にさせようとするものである。現在では後者の大量投与法が、あるアミノ酸を大量に投与するという問題点があるにしろ、最も多く用いられているようである¹²⁾。

分解速度の測定においては、アミノ酸のタンパク質合成への再利用の問題がさらに大きなものとなる。ある組織では代謝されないアミノ酸、たとえば肝臓ではバリニン¹³⁾、筋肉ではチロシン¹⁴⁾やフェニルアラニン¹⁵⁾が使われるが、これらは *in vitro* の系でしか用いられない。*in vivo* では一般的に合成速度と成長速度（体全体だけではなくある器官も含めて）の差から分解速度を求めることもあるが⁹⁾、間接的なものであるため誤差は避けられないと考える。

分解速度の測定法の一つとして、代謝されないアミノ酸の利用がある。チロシンなどと異なり、どの組織でも代謝されずに尿中に排泄されれば、その尿中排泄量から

分解速度を推定できる。骨格筋においては N^3 -メチルヒスチジン（3-メチルヒスチジン；MeHis）が使われている。MeHis は骨格筋の主要構成タンパク質であるミオシンとアクチンに特異的に含まれるアミノ酸で、これらのタンパク質が分解した後もタンパク質合成には再利用されずに定量的に尿中に排泄されることから、多くの研究者が尿中の MeHis を指標として骨格筋タンパク質の分解速度を測定してきた（西澤の総説¹⁶⁾を参照されたい）。しかし MeHis にも大きな問題点がある¹⁷⁾。その一つが Harris and Milne¹⁸⁾ が指摘した、MeHis を含むジペプチドであるバレニンが筋原線維タンパク質の分解により生じた MeHis から生成することである。バレニンプールの大きさによっては、骨格筋が分解して生成した MeHis が尿中にただちに排泄されず、バレニンとなるので、尿中 MeHis は骨格筋の分解を反映しなくなる可能性がある。Harris and Milne はヒツジ¹⁸⁾やブタ¹⁹⁾などではバレニンプールが大きいため尿中に排泄される MeHis は骨格筋タンパク質の分解速度を反映しないと報告している。われわれは絶食に伴うヤギ血漿中のバレニン濃度を測定したところ、MeHis 濃度は絶食に伴い著しい変化を示したものの、バレニン濃度には顕著な変化が見られなかったことから、バレニンプールが栄養条件では変化しにくいことを示唆した²⁰⁾。しかし、バレニンプールの大きさの変化については種々の生理的条件下においてさらに検討が必要である。

もう一点は MeHis が骨格筋だけではなく他の組織、とくに皮膚と消化管にも存在することである。Nishizawa ら²¹⁾は体の中の 90% の MeHis は骨格筋に存在するが、5% は皮膚の筋肉、2% は消化管の平滑筋に存在することを示した。もしこれらの組織タンパク質の分解速度が速ければ、尿中の MeHis は骨格筋の分解速度を反映しなくなる。そこで尿中の MeHis の起源を定量的に測定することを試みた²²⁾。

ラットに毎日一定量の [3 H-メチル- 14 C] メチオニンを食餌に混ぜ与え、5, 10, 15, および 20 日後に屠殺し、骨格筋（後肢筋）、皮膚、および消化管の MeHis の比放射能を測定し、それぞれの組織タンパク質の分解速度を求めた。継続的な MeHis の前駆体である [3 H-メチル- 14 C] メチオニンの経口投与は、ラベルアミノ酸のタンパク質合成への再利用を最小限に抑えるためである⁹⁾。その結果、Table 1 に示すように各組織の MeHis の存在量と分解比速度（fractional degradation rate）の積から MeHis の flux を求めたところ、骨格筋が 75.6%、皮膚が 22.2%、消化管が 2.2% であった。この結果は Nishizawa らが求めた少なくとも 16.6% が骨格筋以外の組織由来であるという結果²³⁾と一致した。ところが、Millward ら²⁴⁾²⁵⁾は定速注入法を用いて尿中 MeHis の 75% が骨格筋以外の組

Table 1. Contributions of N^+ -methylhistidine (MeHis) from skeletal muscle, intestine and skin to urinary MeHis of rat.

Tissues	MeHis content ($\mu\text{mol}/100\text{ g BW}$)	Fractional degradation rate (%/day)	Contribution	
			($\mu\text{mol}/\text{day}$)	(%)
Skeletal muscle	$27.95 \pm 1.21^*$	2.87	0.804	75.6
Intestine	0.43 ± 0.02	5.99	0.024	2.2
Skin	2.71 ± 0.14	8.72	0.236	22.2

* Values are means $\pm$ SE ($n=4$).

Fig. 1. Changes in the specific radioactivities of N^+ -methylhistidine (MeHis) in skeletal muscle and urine.

Rats were given a diet containing [methyl- ^{14}C] methionine daily. MeHis was extracted by the methods of Nishizawa *et al.*⁷²⁾ Values are mean $\pm$ SE of 4 rats.

Fig. 2. The specific radioactivities of N^+ -methylhistidine (MeHis) in skeletal muscle, perfusate and urine.

Rats were administered [methyl- ^{14}C] methionine 4 days before the hindquarter perfusion. Values are shown as % of the specific radioactivity of protein bound MeHis. Values are mean $\pm$ SE of 4 rats. ** $p < 0.01$ vs. protein.

織、とくに消化管の寄与が大きいと報告した。われわれの結果との大きな相違は骨格筋タンパク質の分解比速度の違いであり、Harris²⁶⁾はMillwardら²⁴⁾の求めた骨格筋タンパク質の分解比速度は過小評価していると述べている。体全体に対するMeHisの存在量のほとんどが骨格筋であるから、分解比速度のわずかな違いが大きな差として現れるのである。したがって、臨床的な判断材料として用いる場合には、尿中に排泄されるMeHisはおよその骨格筋タンパク質(筋原線維タンパク質)の分解を反映しているものと考えている。

ところで、われわれが骨格筋の尿中MeHisに対する寄与を求めた実験において、興味深い結果を見出すことができた。もし、骨格筋のMeHisが尿中MeHisを反映しているのならば、ラベルしたときに両者の比放射能は一致するはずである。ところがFig. 1に示すように、尿中のほうが骨格筋のMeHisより常に高い比放射能値を示した。皮膚や消化管を考慮に入れても高い比放射能値であった。この結果は骨格筋、皮膚および消化管以外

に代謝回転の非常に速いMeHisプールが存在する可能性が考えられた。そこで、骨格筋以外の他の組織の影響を受けない後肢筋灌流系³⁾を用いて、灌流液と骨格筋のMeHisの比放射能を比較した。ラットに[メチル- ^{14}C]メチオニンをパルス投与し、4日後に後肢筋の灌流を行った。すると、灌流液中のMeHisの比放射能値は骨格筋より高い値を示し、これは尿や骨格筋の遊離MeHisのそれに近かった(Fig. 2)。これは、骨格筋以外の代謝回転の速いMeHisプールが尿中MeHisの比放射能値を高めているのではなく、骨格筋の中に高い比放射能値を示すMeHisプールが存在することを示唆している。Morkin²⁷⁾は新しく合成されたフィラメントはラベルが多く取り込まれ、筋原線維の外側が活発にタンパク質の合成を行っていることを示した。そこでわれわれは一つの可能性としてFig. 3に示すような筋原線維タンパク質の代謝の二相性を考えた²⁸⁾。筋原線維の外側は内側に比べ代謝回転が速いためラベルの取込みも速く、し

Fig. 3. Biphasic turnover of myofibrillar protein.

たがって MeHis の比放射能値が高くなる。筋原線維が分解すると、血液、尿にはこの比放射能の高い MeHis が入る。一方、骨格筋の MeHis は代謝回転の速い外側と内側の混合物であるので、比放射能値は低く示されるという考えである。以上の推論の他に、骨格筋の種類により代謝回転速度が違うという考え方もあるが²⁹⁾³⁰⁾、いずれにしても、骨格筋には従来考えられているより速く代謝回転する部分、すなわち生理的な条件の変化に敏感に回答できる部分があることを強く示唆しているものと考えられ、体全体のタンパク質代謝を考える上で、骨格筋タンパク質の重要性が再確認されたものと思われる。

3. 骨格筋タンパク質の分解の調節機構

後肢筋灌流系は骨格筋以外の組織の影響を受けない評価系であり、かつ生理的な状態もかなり良く維持されている³⁾。後肢筋灌流系において MeHis の筋肉から灌流液への放出量は、尿中の MeHis と異なり、骨格筋だけの筋原線維タンパク質の分解を反映する。また、骨格筋中ではチロシンは代謝されないで、灌流液中へのチロシンの放出量は骨格筋タンパク質全体の分解を反映する。一方、ラットなどから摘出した比較的薄い筋肉である長指伸筋やヒラメ筋、横隔膜などを一定時間緩衝液中でインキュベーションし、緩衝液中に放出されるアミノ酸量、主にチロシン、フェニルアラニンまたは MeHis から分解速度を測定するという単純な系である摘出筋肉のインキュベーション系¹⁴⁾³¹⁾も *in vitro* では骨格筋タンパク質の分解速度を評価するのに適した系である。本法は動物から筋肉を分離しているため当然のことながら全体的に異化に傾いているが、相対的には分解をよく反映することが確認されている³²⁾。この方法は実験が容易であり、また筋肉の種類の違い（速筋、遅筋）も評価できる点で優

Fig. 4. Effect of insulin on the degradation rate of skeletal muscle protein in normal and streptozotocin-induced diabetic rats.

Hindquarters of rats were perfused for 2 h and the tyrosine and *N*-methylhistidine (MeHis) in the perfusate were measured. Values are mean $\pm$ SE of 4 rats. * $p < 0.05$ vs. control. ** $p < 0.01$ vs. control.

れた方法である。しかし、チロシンはタンパク質合成へ再利用されるため、通常はタンパク質合成の阻害剤であるシクロヘキシミドを灌流液やインキュベーション緩衝液に入れ、タンパク質合成を停止した状態で行うか、あるいは合成速度を測定し、放出量と合成量の合計から分解量を求める³²⁾。そこでわれわれは、これらの方法を用いてインスリンの骨格筋タンパク質の分解に及ぼす影響と、分解に関与するプロテアーゼについて若干の検討を行った。

インスリンは多様な生理作用をもつ、同化を促進し異化を抑制するホルモンとしてよく知られている。インスリンのタンパク質代謝に及ぼす影響についても多くの研究がなされ、筋肉タンパク質の合成に促進的に働くことが示されている³³⁾³⁴⁾ (*in vivo* では否定的な結果も得られている³⁵⁾)。最近そのメカニズムについてもタンパク質合成の翻訳段階で調節していることが示されている³⁶⁾³⁷⁾。一方、インスリンは筋肉タンパク質の分解に対しては抑制的な作用を示す³⁸⁾。われわれはこのインスリンの筋肉タンパク質の分解に及ぼす影響が筋原線維タンパク質の分解が抑制されたため明らかにする目的で以下の実験を行った³⁹⁾⁴⁰⁾。正常ラットとストレプトゾトシン糖尿病ラットにおいて後肢筋灌流法を用い、灌流液中にインスリンを加え、インスリンの筋肉タンパク質の分解に及ぼす影響を検討した (Fig. 4)。その結果、正常ラットにおいてはインスリンは筋肉タンパク質全体の分解（チロシンの放出量）を抑制したが筋原線維タンパク質の分解（MeHis の放出量）は抑制しなかった。一方、糖尿病ラッ

トでは筋肉タンパク質の分解も筋原線維タンパク質の分解も正常ラットに比べ増加し、さらにインスリンは筋原線維タンパク質の分解を強く抑制した。したがって、インスリンは筋漿タンパク質よりも筋原線維タンパク質の分解を強く抑制することが明らかとなった。この結果についてはKadowakiらによりさらに詳細に確認された⁴¹⁾。しかし、インスリンは筋原線維タンパク質の分解は抑制しないという報告もあり⁴²⁾、統一見解を得るには至っていない。インスリンのタンパク質分解抑制作用のメカニズムは明確ではない。一般的には autophagosome の数を減少させることによりリソソームにおけるタンパク質の分解を抑制すると考えられている⁴³⁾。

次に、タンパク質分解酵素阻害剤の分解に及ぼす影響を検討した⁴⁴⁾。実験にはラットから横隔膜を分離し、シクロヘキシミド存在下、緩衝液中にロイペプチンあるいはペプスタチンを添加し、横隔膜からの MeHis とチロシンの放出速度を調べた。Fig. 5 に示すように、MeHis とチロシンの放出速度はロイペプチン添加により有意に低下し、ペプスタチン添加では変化がなかった。したがって、カテプシン L などのようなロイペプチンで阻害されるプロテアーゼ⁴⁵⁾が筋肉タンパク質の分解に関与していることが示唆された。最近インスリンと IGF-I が培養筋細胞のタンパク質分解を抑制する原因がリソソームのカテプシン B と L の活性の減少であることが報告され⁴⁶⁾、筋肉タンパク質の分解にこれらの酵素が関与していることが示唆されている。細胞内タンパク質の分解については長寿命タンパク質はリソソームで、短寿命タンパク質は細胞質のプロテアソームで分解されるといわれ

ている⁴⁷⁾が、筋原線維タンパク質はプロテアソームにより分解されるという報告⁴⁸⁾もあり、また、カルパインが筋原線維タンパク質の分解に関与しているという知見もあり⁴⁹⁾、まだ一定の見解は得られていない。高度に組織化された筋肉組織においてリソソームだけで筋肉タンパク質、とくに筋原線維タンパク質を分解できるか不明の点が多く、現在さらに詳細に検討を進めている。

4. 活性酸素と筋肉タンパク質

活性酸素は生体高分子を攻撃し、修飾したり、あるいは非酵素的な分解を引き起こすことが脂質や核酸においてよく研究されている⁵⁰⁾。タンパク質は活性酸素や、それにより生じた脂質ラジカルなどにより修飾され、タンパク質の機能が低下することが *in vitro* で確認されている⁵¹⁾。また、修飾されたタンパク質はプロテアーゼに対する感受性が増加する、すなわち速く分解することが知られている⁵²⁾。一方、老化⁵³⁾やがん⁵⁴⁾など多くの疾病においても活性酸素が関与していることが示唆されており、活性酸素によるタンパク質の機能の劣化を生理的に明らかにすることは重要である。しかし、活性酸素のタンパク質に及ぼす影響は脂質や核酸において観察されるような *in vivo* の知見は少なく、とくに体重の 40% を占める骨格筋の知見はほとんどない。さらに、骨格筋タンパク質は肝臓などのタンパク質に比べ半減期が長いので、修飾されたタンパク質が蓄積されやすく⁵⁵⁾、その結果、筋肉の機能に重大な影響を与えられとされる。そこで、活性酸素などが筋肉タンパク質に及ぼす影響、とくに分解

Fig. 5. Effect of proteinase inhibitors on the degradation rate of diaphragm.

Diaphragm of rats were incubated for 2h and the released tyrosine and *N*¹-methylhistidine (MeHis) in the incubation medium was measured. Values are mean±SE of 4 rats. * $p < 0.05$ vs. control.

Fig. 6. Thiobarbituric acid reactive material (TBARS) of liver and skeletal muscle and protein carbonyl content of skeletal muscle of rats fed on a vitamin E deficient diet.

Rats were fed vitamin E deficient diet for 9 weeks. Values are mean±SE of 7 rats. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control.

に及ぼす影響について検討を行い、修飾タンパク質と分解の関わりについて考察した。

ビタミンEはラジカスカベンジャーとして働く脂溶性ビタミンである⁵⁶⁾。ラットを2カ月間ビタミンE欠乏飼料で飼育すると血液、肝臓、筋肉などのビタミンE濃度は顕著に低下する。このとき、骨格筋のチオバルビツール酸反応物質量(TBARS)は増加し、骨格筋組織に含まれる脂質の過酸化が示唆された。また、タンパク質の酸化修飾の指標として用いられるカルボニル基含量もビタミンE欠乏により増加した(Fig. 6)。さらに、骨格筋タンパク質の分解速度を長指伸筋を後肢筋から分離して緩衝液中でインキュベーションしてチロシンとMeHisの放出量から求めた結果、MeHisの放出量には差は認められなかったが、ビタミンE欠乏によりチロシンの放出量が増加した(Fig. 7)。これはビタミンE欠乏による活性酸素あるいはラジカルは、筋原線維の分解には変化を及ぼさなかったが、その他の筋肉タンパク質の分解を促進させたことを示唆している⁵⁷⁾。

鉄は活性酸素の発生に関わる金属として知られている。ラットに鉄を鉄ニトリロ三酢酸⁵⁸⁾という形で腹腔内投与して3時間後には骨格筋の脂質画分にラジカルの発生が認められ、骨格筋タンパク質のカルボニル基含量が有意に増加し、タンパク質の酸化修飾が起こっていることが示唆された(長澤ら、未発表)。また筋肉タンパク質の分解速度も筋原線維タンパク質以外で増加した(Fig.

8)。したがって、酸化ストレスが筋肉タンパク質を酸化修飾し、また分解も速くなることが明らかとなった⁵⁷⁾。

以上の実験から、ビタミンE欠乏あるいは鉄の過剰投与により活性酸素やラジカルが発生し、これらは筋肉タンパク質を酸化修飾することが明らかとなった。また、修飾された筋肉タンパク質はATPaseの活性低下などその機能が低下したことを認めた(渡辺ら、未発表)。一方、酸化ストレスは筋肉タンパク質の分解速度を増加させた。すなわち機能の低下した修飾タンパク質は速やかに除かれるのである。しかし、この結果がタンパク質が修飾されたことによりプロテアーゼに対する感受性が増加したためか⁵⁹⁾⁵⁹⁾、あるいはプロテアーゼの活性自体が増加した⁶⁰⁾⁶⁰⁾のか現在検討中であるが、もし前者ならば、筋肉タンパク質の分解は基質の状態でも調節されることが考えられ、興味深い。

1970年代前半に、Dehlinger and Schimke⁶¹⁾およびDiceら⁶²⁾⁶³⁾はタンパク質の分解に関して次のような仮説を提唱した。すなわち、分子量の大きいタンパク質のほうが小さいものより速く分解し、また酸性タンパク質のほうが塩基性より速く分解するというものであった。われわれもこの現象を骨格筋タンパク質で確認した⁶⁴⁾。その後、タンパク質の分解の調節機構についてはおもにどの酵素が分解に関与するかが中心に論じられ、近年数々の注目すべき結果が得られているが、最近になり細胞内タンパク質の分解が非リソソーム系のユビキチンに依存した高分子量多機能プロテアーゼ(プロテアソーム)

Fig. 7. Degradation rate of skeletal muscle protein of rats fed on a vitamin E deficient diet.

Extensor digitorum longus muscle was isolated from rat fed on a vitamin E deficient diet for 9 weeks and was incubated in Krebs-Henseleit bicarbonate buffer for 2 h. Tyrosine and *N*⁺-methylhistidine (MeHis) in the incubation medium were measured. Values are mean±SE of 7 rats. ** *p*<0.01 vs. control.

Fig. 8. Carbonyl content and degradation rate of skeletal muscle protein of rats injected Fe-nitriilotriacetic acid (FeNTA).

Rats were injected FeNTA 3 h before isolating soleus and extensor digitorum longus (EDL) muscle. Both muscles were incubated in Krebs-Henseleit bicarbonate buffer for 2 h. Protein carbonyl content of muscles were measured. Tyrosine and *N*⁺-methylhistidine (MeHis) release in the incubation medium were measured. Values are mean±SE of 6 rats. * *p*<0.05 vs. control.

により分解される系でも行われるという知見が多く得られてきた⁶⁵⁾⁶⁶⁾。ユビキチンがタンパク質に結合することによりプロテアーゼのターゲットになるのである。興味深いことに、修飾タンパク質はこの系により分解されると報告されている⁵¹⁾⁶⁷⁾⁶⁸⁾。最近 Shang and Taylor⁶⁵⁾ は酸化ストレスの直後にユビキチンが強く発現し、プロテアソームの基質になることを認めたが、修飾タンパク質にユビキチンがどのように選択的に結合するかは不明である。ところで、上記の仮説によれば、非酵素的に修飾され、機能が低下したタンパク質は選択的に除去されることになり、生体にとって合理的なことであるように考えられる。ある種のアミノ酸配列 (PEST 配列⁶⁹⁾, KFERQ 配列⁷⁰⁾ など) がタンパク質分子中に存在すると分解されやすいという報告もあり、分解に選択性があることが近年多く示唆されている。しかし、一般のタンパク質の分解は一次反応に従う確率的なものであり⁷¹⁾、決して選択的なものではない。今後、酸化修飾された筋肉タンパク質がどのタンパク質分解系で分解されるのか、分解に選択性があるのかについてさらに検討を進める必要がある。

5. MeHis の測定法とその応用

以上の研究には、MeHis の微量定量法の進歩が重要であった。MeHis はその発見以来、おもに陽イオン交換樹脂を用いた分離法⁷²⁾ により他のアミノ酸と分別し定量されてきた。アミノ酸自動分析計もこの一つである。しかし、陽イオン交換樹脂を用いた分離法は時間がかかり、検出をニンヒドリンで行うと尿中の MeHis は測定できるが、血液や分離筋肉のインキュベーションにおける緩衝液中の MeHis の測定には感度が十分ではない。比色法⁷³⁾⁷⁴⁾、ガスクロマトグラフィー (GC)⁷⁵⁾、液体クロマトグラフィー (HPLC)⁷⁶⁾⁷⁷⁾、あるいは RIA⁷⁸⁾ による方法などが報告されているが、われわれは基本的に二つのプレカラム法による逆相 HPLC により微量の MeHis を定量した。一つは Wassner ら⁷⁹⁾ により考案されたフルオレスカミン誘導体を ODS で分離する方法である。この方法は MeHis とヒスチジン以外に蛍光を出すアミノ酸が非常に少なく、選択性の高い方法である。感度も 5 pmol 程度まで簡単に測定できるため、最もよく使われている方法である。しかし、反応が複雑で、また注入試料がカラムに与えるダメージが大きいため、再現性に若干の問題があることが判明した⁸⁰⁾。

もう一つの方法は *o*-フタルアルデヒド (OPA) 誘導体を直接 ODS で分離し測定する方法である。この方法は先のフルオレスカミンを用いた方法と異なり、ほとんどすべてのアミノ酸と反応するため、ピークの分離が難しいが、われわれはイソクラティック溶出で MeHis を分

Fig. 9. Changes in plasma N^{ϵ} -methylhistidine (MeHis) and balenine concentrations during starvation and refeeding of goats.

●, MeHis concentration; ○, MeHis and creatinine ratio; □, balenine concentration.

離することに成功し、ルーチン化することができた⁸¹⁾。感度はフルオレスカミン法より高く (0.5 pmol), カラムに与えるダメージも少ない。

この方法を用いて、ヤギの血液中の MeHis 濃度を測定した⁸²⁾。濃厚飼料とアルファルファ乾草を給与しているヤギ (トカラ種, 体重 30 kg) を 4 日間絶食させたところ、Fig. 9 に示すように絶食に伴い血漿 MeHis 濃度は上昇した。また再給餌により MeHis 濃度は減少した。ラットにおいては絶食により尿中 MeHis 排泄量が増加し、骨格筋タンパク質の分解が増加することを認められている⁴¹⁾⁸²⁾。血漿 MeHis 濃度の変化もこれと同調しているものと推察される。したがって、血漿 MeHis 濃度の変化は骨格筋タンパク質の (筋原線維タンパク質) の分解を反映しているものと考えられる。尿中 MeHis により骨格筋タンパク質の分解速度を求める場合、スポット尿を用いてクレアチニンとの比から推定する方法⁸³⁾ もあるが、原則的に 1 日尿を必要とする。尿は飲水量によりその量も変化することもあり、尿中 MeHis 濃度に著しい差がでることも考えられる。また、尿はラットなどでは簡単に採取できるが、大動物やヒトでは血液の方が採取しやすい。そこで、次にウシの血漿 MeHis 濃度を経時的に測定し、骨格筋タンパク質の分解を検討した⁸⁴⁾。

ホルスタイン種の育成牛の血漿 MeHis 濃度を生後 1 か月から 22 か月まで毎月測定した結果を Fig. 10 に示した。生後 2 か月 (離乳期) まで血漿 MeHis 濃度は顕著に減少し、その後ゆっくりと減少した。この結果は加齢に伴い骨格筋タンパク質の分解速度が遅くなることを示しているものと考えている。このように血液中の MeHis は尿中の MeHis より簡単に骨格筋タンパク質の分解を評価できるものと考えられる。さらに、血液中の MeHis は短時間の骨格筋タンパク質の分解の変化を評価できる

Fig. 10. Changes in body weight and plasma N^+ -methylhistidine (MeHis) concentrations of Holstein steers.

Values are mean $\pm$ SE of 5 steers.

可能性もあり⁸⁵⁾、腎臓に障害がない限り⁸⁶⁾、血液中の MeHis を臨床などに応用する⁸⁷⁾ ことができよう。

本研究は東京農工大学農学部、東京大学農学部、宮崎大学農学部および岩手大学農学部において実施されたものである。研究テーマを与えてくださった前東京農工大学教授松引龍平先生、共立女子大学教授内藤 博先生、東京大学教授野口 忠先生に深く感謝申し上げます。また共同研究者であり、後肢筋の灌流などでお世話になった新潟大学助教授門脇基二先生、MeHis を用いた実験の基礎をご教授くださった岩手大学教授西澤直行先生、家畜を用いた研究をご指導くださった宮崎大学教授小野寺良次先生、片山英美先生、農林水産省畜産試験場松本光人博士、HPLC についていろいろご助言くださった宮崎大学農学部教授境 正先生、日本分光工業(株)山内芳雄博士に感謝いたします。研究に協力してくれた米倉利一、橋口尚子、石山えりか、畑山貴弘、竹原千絵、渡辺宣明、藤牧尚子の諸氏、ならびに研究室の卒業生、在学生の方々に深く感謝致します。また本総説を書く機会を与えてくださった日本栄養・食糧学会の会員の皆様に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 伏木 亨, 井上和生, 杉本悦郎: 化学と生物, 31, 787 (1993)
- 2) Miller, S.A.: Mammalian Protein Metabolism, Vol. 3 (Munro, H.N. ed.), 183 (1969), Academic Press (New York)
- 3) 門脇基二: 栄養誌, 44, 239 (1991)
- 4) Kettelhut, I.C., Wing, S.S. and Goldberg, A.L.: *Diabetes Metab. Rev.*, 8, 751 (1988)
- 5) Waterlow, J.C., Garlick, P.J. and Millward, D.J.: Protein Turnover in Mammalian Tissues and in the Whole Body, 443 (1978), North-Holland Publishing Company (Amsterdam, New York, Oxford)
- 6) 松引龍平: 化学と生物, 33, 267 (1995)
- 7) Young, V.R. and Munro, H.N.: *Fed. Proc.*, 37, 2291 (1978)
- 8) 松引龍平: *JJPEN*, 11, 719 (1989)
- 9) 松引龍平: 外科と代謝・栄養, 24, 1 (1990)
- 10) Waterlow, J.C., Garlick, P.J. and Millward, D.J.: Protein Turnover in Mammalian Tissues and in the Whole Body, 350 (1978), North-Holland Publishing Company (Amsterdam, New York, Oxford)
- 11) Garlick, P.J., McNurlan, M.A. and Preedy, V.R.: *Biochem. J.*, 192, 719 (1980)
- 12) Garlick, P.J., McNurlan, M.A., Essen, P. and Wernerman, J.: *Am. J. Physiol.*, 266, E 287 (1994)
- 13) Kadowaki, M., Venerando, R., Miotto, G. and Mortimore, G.E.: *J. Biol. Chem.*, 269, 3703 (1994)
- 14) Fulks, R.M., Li, J.B. and Goldberg, A.L.: *J. Biol. Chem.*, 250, 290 (1975)
- 15) Li, J.B., Higgins, J.E. and Jefferson, L.S.: *Am. J. Physiol.*, 236, E 222 (1979)
- 16) 西澤直行: 栄養誌, 36, 409 (1983)
- 17) 門脇基二, 野口 忠: 農化, 58, 419 (1984)
- 18) Harris, C.I. and Milne, G.: *Br. J. Nutr.*, 44, 129 (1980)
- 19) Harris, C.I. and Milne, G.: *Br. J. Nutr.*, 45, 423 (1981)
- 20) Nagasawa, T., Hashiguchi, N. and Onodera, R.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 517 (1993)
- 21) Nishizawa, N., Shimbo, M., Hareyama, S. and Funabiki, R.: *Br. J. Nutr.*, 37, 345 (1977)
- 22) Nagasawa, T. and Funabiki, R.: *J. Biochem. (Tokyo)*, 89, 1155 (1981)
- 23) Nishizawa, N., Noguchi, T., Hareyama, S. and Funabiki, R.: *Br. J. Nutr.*, 38, 149 (1977)
- 24) Millward, D.J., Bates, P.C., Grimble, G.K., Brown, J.G., Nathan, M. and Rennie, M.J.: *Biochem. J.*, 190, 225 (1980)
- 25) Rennie, M.J. and Millward, D.J.: *Clin. Sci.*, 65, 217 (1983)
- 26) Harris, C.I.: *Biochem. J.*, 194, 1011 (1981)
- 27) Morkin, E.: *Science*, 167, 1499 (1970)
- 28) Nagasawa, T., Kadowaki, M., Noguchi, T. and Naito, H.: *Agric. Biol. Chem.*, 48, 2583 (1984)
- 29) Dahlmann, B., Rutschmann, M. and Reinauer, H.: *Biochem. J.*, 234, 659 (1986)
- 30) Carpenter, C.E., Greaser, M.L. and Cassens, R.G.: *J. Anim. Sci.*, 64, 1574 (1987)
- 31) Goldberg, A.L., Tischler, M., DeMartino, G. and Griffin, G.: *Fed. Proc.*, 39, 31 (1980)
- 32) Baracos, V.E. and Goldberg, A.L.: *Am. J. Physiol.*, 251, C 588 (1986)
- 33) Garlick, P.J., Fern, M. and Preedy, V.R.: *Biochem. J.*, 210, 669 (1983)
- 34) Fuller, S.J. and Sugden, P.H.: *FEBS Lett.*, 201, 246 (1986)
- 35) Young, L.H., Stirewalt, W., McNulty, P.H., Revkin, J.H. and Barrett, E.J.: *Am. J. Physiol.*, 267, E 337 (1994)

- (1994)
- 36) Pause, A., Belsham, G.J., Gingras, A.-C., Donze, O., Lin, T.-A., Lawrence, J.C., Jr. and Sonenberg, N. : *Nature*, **371**, 762 (1994)
 - 37) Yoshizawa, F., Tonoguchi, A., Miura, Y., Yagasaki, K. and Funabiki, R. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 348 (1995)
 - 38) Sugden, P.H. and Fuller, S.J. : *Biochem. J.*, **273**, 21 (1991)
 - 39) Nagasawa, T., Kadowaki, M., Noguchi, T. and Naito, H. : *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 3023 (1982)
 - 40) Kadowaki, M., Nagasawa, T., Hirata, T., Noguchi, T. and Naito, H. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **31**, 431 (1985)
 - 41) Kadowaki, M., Harada, S., Takahashi, T., Noguchi, T. and Naito, H. : *J. Nutr.*, **119**, 471 (1989)
 - 42) Goodmann, M.N. : *Diabetes*, **36**, 100 (1987)
 - 43) Rannels, D.E., Kao, R. and Morgan, H.E. : *J. Biol. Chem.*, **250**, 1694 (1975)
 - 44) 長澤孝志, 松引龍平, 安藤明代 : 栄食誌, **37**, 366 (1984)
 - 45) Okitani, A., Matsukura, U., Kato, H. and Fujimaki, M. : *J. Biochem. (Tokyo)*, **87**, 1133 (1980)
 - 46) Tsujinaka, T., Ebisui, C., Fujita, J., Morimoto, T., Ogawa, A., Ishidoh, K., Kominami, E., Yano, M., Shiozaki, H. and Monden, M. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **208**, 353 (1995)
 - 47) 上野 隆, 木南英紀 : 現代化学 増刊 **22**, プロテアーゼと生体機能(鈴木敏一編), 115 (1993), 東京化学同人(東京)
 - 48) Mykles, D.L. and Haire, M.F. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **288**, 543 (1991)
 - 49) Yeh, J.-Y., Ou, B.-R. and Forsberg, N.E. : *J. Endocrinol.*, **141**, 209 (1994)
 - 50) 鈴木俊英, 宮澤陽夫 : 活性酸素と栄養(水上茂樹, 五十嵐脩編), 91 (1995), 光生館(東京)
 - 51) Stadtman, E.R. : *Biochemistry*, **29**, 6323 (1990)
 - 52) Davies, K.J.A. : *Biochem. Soc. Trans.*, **21**, 346 (1993)
 - 53) Agarwal, S. and Sohal, R.S. : *Mech. Ageing Dev.*, **75**, 11 (1994)
 - 54) Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J. and Hiai, H. : *FEBS Lett.*, **358**, 1 (1995)
 - 55) Shang, F. and Taylor, A. : *Biochem. J.*, **307**, 297 (1995)
 - 56) Niki, E. : Vitamin E. Its Usefulness in Health and in Curing Diseases (Mino, M., Nakamura, H., Diplock, A.T. and Kayden, H.J., eds.), 23 (1993), Japan Scientific Societies Press (Tokyo)
 - 57) Nagasawa, T., Hatayama, T., Watanabe, Y. and Nishizawa, N. : The 10th International Conference on Intracellular Protein Catabolism, Abstract, 75 (1994)
 - 58) Gordeuk, V.R., Bacon, B.R. and Brittenham, G.M. : *Annu. Rev. Nutr.*, **7**, 485 (1987)
 - 59) Awai, M., Marasaki, M., Yamanoi, Y. and Seno, S. : *Am. J. Pathol.*, **95**, 633 (1979)
 - 60) Cecha, O.M. and Fagan, J.M. : *J. Nutr.*, **122**, 2087 (1992)
 - 61) Dehlinger, P.J. and Schimke, R.T. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 1473 (1970)
 - 62) Dice, J.F., Dehlinger, P.J. and Schimke, R.T. : *J. Biol. Chem.*, **248**, 4220 (1973)
 - 63) Dice, J.F. and Goldberg, A.L. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3893 (1975)
 - 64) 長澤孝志, 松引龍平 : 生化学, **49**, 844 (1977)
 - 65) Ciechanover, A. : *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **375**, 565 (1994)
 - 66) Goldberg, A.L. : *Science*, **268**, 522 (1995)
 - 67) Davies, K.J.A. : *J. Biol. Chem.*, **262**, 9895 (1987)
 - 68) Fagan, J.M. and Waxman, L. : *J. Biol. Chem.*, **267**, 23015 (1992)
 - 69) Rogers, S., Welles, R. and Rechsteiner, M. : *Science*, **234**, 364 (1986)
 - 70) Neff, N., Bourret, L., Miao, P. and Dice, J.F. : *J. Cell. Biol.*, **91**, 184 (1981)
 - 71) Schimke, R.T. : Intracellular Protein Metabolism (Schimke, R.T. and Katunuma, N., eds.), 173 (1975), Academic Press (New York, San Francisco, London)
 - 72) Nishizawa, N., Noguchi, T., Hareyama, S. and Funabiki, R. : *J. Chromatogr.*, **151**, 424 (1978)
 - 73) Radha, E. and Bessman, S.P. : *Anal. Biochem.*, **121**, 170 (1982)
 - 74) Murray, A.J., Ballard, F.J. and Tomas, F.M. : *Anal. Biochem.*, **116**, 537 (1981)
 - 75) Vielma, H. and Mendez, J. : *J. Chromatogr.*, **196**, 166 (1980)
 - 76) Qureshi, G.A., Gutierrez, A. and Bergstrom, J. : *J. Chromatogr.*, **374**, 363 (1986)
 - 77) Ohtsuka, A., Hayashi, K., Noda, T. and Tomita, Y. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **38**, 83 (1992)
 - 78) Bachmann, K., Galeazzi, R., Millet, R. and Burger, A.G. : *Metabolism*, **33**, 107 (1984)
 - 79) Wassner, S.J., Schlitzer, J.L. and Li, J.B. : *Anal. Biochem.*, **104**, 284 (1980)
 - 80) 長澤孝志, 米倉利一, 小野寺良次, 片山英美 : ルーメン研究会報, **1**, 58 (1990)
 - 81) Nagasawa, T., Sakai, T. and Onodera, R. : *J. Chromatogr.*, **566**, 223 (1991)
 - 82) Nishizawa, N., Shimbo, M., Noguchi, T., Hareyama, S. and Funabiki, R. : *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 2083 (1978)
 - 83) Ballard, F.J. and Tomas, F.M. : *Clin. Sci.*, **65**, 209 (1983)
 - 84) Nagasawa, T., Nishizawa, N., Katayama, H., Onodera, R. and Matsumoto, M. : VII World Conference on Animal Production, Proceedings, Vol. 3, 156 (1993)
 - 85) Van Eijk, H.M.H., Deutz, N.E.P., Wagenmakers, A. J.M. and Soeters, P.B. : *Clin. Chem.*, **36**, 556 (1990)
 - 86) Hoffer, L.J. : *Metabolism*, **39**, 744 (1990)
 - 87) 川瀬光八郎, 吉田 貴, 森脇久隆, 武藤泰敏 : 肝臓, **34**, 50 (1993)

(1995年7月10日受理)