

博士論文要約

焼酎粕へキサン抽出物ならびにブトキシブチルアルコール  
による鶏骨格筋タンパク質分解抑制機構の解明

東北大学大学院農学研究科

応用生命科学専攻

神園 巴美

指導教員

豊水 正昭 教授

## 第一章 緒論

我々を取り巻く食料事情は著しく変化している。今後、世界の食料需要は世界人口の大幅な増加が見込まれているため、それに伴って増加すると考えられている。一方、食料供給においては、その安定的供給に懸念がある。このように、世界の食料需給は逼迫していくことが明らかである。ひるがえって、日本の食料需給に注目すると、食料自給率は供給熱量ベースで 40%前後にとどまっている。この低い食料自給率は、国内で自給可能な米の消費量が減少している一方で、輸入飼料原料に依存する傾向が高い畜産物の消費量が増加していることによると考えられる。このような背景から、畜産業界では、国内で飼料自給率を向上させて穀物国際相場に翻弄されない畜産経営を可能な限り実現させるため、余剰食品、調理・農場残渣ならびに食品製造副産物を利活用するエコフィード（飼料）が積極的に活用されるに至っている。

これまでに、エコフィード原料として、焼酎製造の際に生じる蒸留副産物である焼酎粕の積極的利用を目指した成長試験が行われてきた。すなわち、Mahfudz ら（1996a, b）は、少量の焼酎粕またはそのエーテル抽出物が肉用鶏の成長を促進することを明らかにした。さらに、鶏培養筋肉細胞を用いた実験から、焼酎粕のエーテル抽出物には骨格筋タンパク質分解を抑制してタンパク質含量を増加させる画分が含まれることを明らかにした（Mahfudz et al., 1997）。したがって、焼酎粕中には肉用鶏の骨格筋タンパク質分解を抑制してその成長を促進する物質が存在しており、その候補原因物質は、抽出物組成からブトキシブチルアルコール（BBA: 分子量 146,  $C_8H_{18}O_2$ ）である可能性が考えられた。とは言え、BBA 自体を肉用鶏に給与した実験報告はなく、BBA が骨格筋タンパク質分解および成長にどのように影響するかは明らかではない。

そこで本研究では、焼酎粕ヘキササン抽出物ならびにこれに含まれる BBA の肉用鶏の骨格筋成長に対する影響を栄養生化学的に明らかにすることを目的とし、まず、焼酎粕のヘキササン抽出物を肉用鶏に給与し、成長および骨格筋タンパク質分解に対する効果とその分解経路について検討した（第二章）。次に、化学合成した BBA を肉用鶏に給与し、BBA の成長および骨格筋タンパク質分解抑制作用を確認した。さらに、BBA による骨格筋タンパク質分解抑制の作用機序の一端を明らかにするために、分解経路と制御因子についても調査した（第三章）。

## 第二章 肉用鶏への焼酎粕へキサン抽出物給与の影響

### 第一節 成長および骨格筋タンパク質分解

#### 【背景および目的】

すでに焼酎粕には成長促進効果があることが明らかにされており (Mahfudz et al., 1996a)、その原因物質はエーテル可溶性である (Mahfudz et al., 1996b, 1997)。しかし、食品添加物として認められているヘキサン (ノルマルヘキサン) を用いた方が、焼酎粕エーテル抽出物よりももっと実用的な飼料添加物を調製できることになり、これを給与した動物を用いた実験結果により、焼酎粕抽出物による成長促進効果を実用化レベルで解析することができる。

そこで、本節では甘藷焼酎粕 (上清濃縮液) から調製したヘキサン抽出物の肉用鶏成長および骨格筋タンパク質分解に対する影響を調べた。

#### 【材料および方法】

15 日齢雄肉用鶏 16 羽を供試し、基礎飼料 (CP 22%, 12.66 MJ ME/kg) を給与した対照区、および焼酎粕へキサン抽出物 (hexane extract of shochu distillery by-product, HSDBP; 甘藷焼酎粕 4% 給与相当) を基礎飼料に添加した飼料を給与した HSDBP 区の 2 区に分け、各試験飼料で 27 日齢まで飼育した。試験終了時には炭酸ガス麻酔後に断頭して、血漿サンプルを得るために採血した。さらに、解体して浅胸筋、心臓、肝臓および腹腔内脂肪を採取し、その重量を測定した。解体後に、骨格筋タンパク質分解の指標となる排泄物および血漿中の  $N^{\epsilon}$ -メチルヒスチジン含量は、ミニカラムを用いて粗分離した後、HPLC により測定した。

#### 【結果および考察】

体重は対照区と比較して HSDBP 区で増加傾向 ( $P = 0.117$ ) を示したが、飼料摂取量は対照区と比較して HSDBP 区で有意な差は認められなかった。それらの結果、飼料効率 (weight gain : feed intake) は対照区と比較して HSDBP 区で有意に増加した ( $P < 0.05$ )。さらに、浅胸筋重量は、対照区と比較して HSDBP 区で有意に増加したが ( $P < 0.01$ )、心臓、肝臓および腹腔内脂肪重量は HSDBP 給与により変化しなかった。これらの結果は、HSDBP が成長、特に骨格筋成長を促進することを示している。

骨格筋タンパク質分解の指標である  $N^{\epsilon}$ -メチルヒスチジンの排泄量は、対照区と比較して HSDBP 区でわずかに低下 (−21%) したものの有意差は認められなかった。一方、血漿  $N^{\epsilon}$ -メチルヒスチジン含量は、対照区と比較して HSDBP 区で有意に減少した ( $P < 0.01$ )。したがって、これらの結果は、HSDBP が骨格筋タンパク質分解を抑制することを示唆している。骨格筋タンパク質分解比速度は、 $N^{\epsilon}$ -メチルヒスチジンの排泄量ならびにその骨格筋中の含量を用いて計算により求められる。この骨格筋タンパク質分解比速度は、 $N^{\epsilon}$ -メチルヒスチジン含量の結果を反映して HSDBP 区でわずかに低下した。一方、タンパク質分解比速度に成長比速度 (1 日の増体量/最終体重) を加算して求めうる骨格筋タンパク質合成比速度は、HSDBP 給与により変化しなかった。したがって、HSDBP は骨格筋タンパク質の合成ではなく分解に影響していると考えられた。

以上から、HSDBP の肉用鶏への給与は、骨格筋においてタンパク質分解を抑制することによりその成長を促進することが明らかになった。

## 第二節 骨格筋タンパク質分解経路

### 【背景および目的】

動物のタンパク質分解は、高度に制御され、選択的かつ調節されたプロセスである。骨格筋においてカルパイン系、カスパーゼ系、ユビキチン・プロテアソーム系およびリソソーム系の4つの分解経路が存在することが知られているが、主にカルパイン系およびユビキチン・プロテアソーム系が働いていると考えられている (Goll et al., 2008)。すなわち、カルパイン系により筋原線維タンパク質が断片化 (タンパク質分解の初期段階) され、それらはユビキチン・プロテアソーム系によりペプチドおよびアミノ酸にまで分解 (タンパク質分解の最終段階) されると考えられている。前節において、HSDBP は骨格筋タンパク質分解を抑制し、成長を促進することを明らかにしたが、主要な骨格筋タンパク質分解経路であるカルパイン系およびユビキチン・プロテアソーム系にどのように関与しているかについては明らかでない。

そこで、本節では HSDBP 給与肉用鶏の浅胸筋を用い、カルパイン系およびユビキチン・プロテアソーム系の2つの分解経路に関わる因子の遺伝子発現を調べた。

### 【材料および方法】

第二章第一節の浅胸筋サンプル (採取後すぐに液体窒素で凍結) を用いた。総 RNA は RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出し、cDNA 合成後に real-time RT-PCR 法により各関連因子 [カルパイン系:  $\mu$ -および m-calpain large subunit; ユビキチン・プロテアソーム系: atrogin-1, ubiquitin および 20S proteasome C2 subunit; 内部標準: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)] の mRNA 発現量を測定した。

### 【結果および考察】

$\mu$ -Calpain large subunit の mRNA 発現量は、対照区と比較して HSDBP 区で有意に低下したが ( $P < 0.05$ )、m-calpain large subunit の mRNA 発現量は、対照区と比較して HSDBP 区で変化は認められなかった。ユビキチン・プロテアソーム系の律速酵素であるユビキチンリガーゼの atrogin-1 および ubiquitin の mRNA 発現量は、対照区と比較して HSDBP 区で有意に低下したが ( $P < 0.05$ )、20S proteasome C2 subunit の mRNA 発現量には、HSDBP 給与による有意な差は認められなかった。これらの結果から、HSDBP がタンパク質分解の初期段階であるカルパイン系、ならびに最終段階であるユビキチン・プロテアソーム系を低下させていることが示唆された。さらに、atrogin-1 の発現量が HSDBP により 50%程度まで低下していることから、特にユビキチン化の過程を大きく抑制していることが考えられた。

以上から、HSDBP 給与による骨格筋タンパク質分解の抑制は、カルパイン系およびユビキチン・プロテアソーム系関連因子の遺伝子発現の低下による可能性が示された。

### 第三章 肉用鶏への合成ブトキシブチルアルコール給与の影響

#### 第一節 成長および骨格筋タンパク質分解

##### 【背景および目的】

前章から、焼酎粕に含まれ肉用鶏の骨格筋成長を促進する物質は、ヘキサンにより抽出されていることが明らかとなった。さらに、その成長促進効果が、骨格筋タンパク質分解の抑制によることも示された。これらの結果は、焼酎粕のエーテル抽出物中には骨格筋タンパク質分解を抑制する因子が含まれているとの報告 (Mahfudz et al., 1997) と一致している。本研究における焼酎粕ヘキサン抽出物のクロマトグラムにはいくつかのピークが存在するが、その 1 つは化学合成したブトキシブチルアルコール (BBA: 分子量 146,  $C_8H_{18}O_2$ ) に一致した。

そこで、本節では、焼酎粕に含まれる BBA に成長促進効果やタンパク質分解抑制効果があるかを明らかにするため、合成 BBA を肉用鶏に給与し、成長および骨格筋タンパク質分解に対する影響について調査した。

##### 【材料および方法】

本節では 3 つの動物実験 (Expts. 1–3) を行い、排泄物および血漿中の  $N^{\epsilon}$ -メチルヒスチジン含量を測定した。動物実験の詳細は以下の通りである。

##### ・ Expt. 1

供試動物および試験日程は第二章第一節に準じた。BBA 区飼料には、エタノールおよびスクロースを用いて BBA 30 mg を基礎飼料 (CP 22%, 12.66 MJ ME/kg) 1 kg に混合した。なお、対照区飼料には、BBA 区飼料と等量のエタノールおよびスクロースを混合した。

##### ・ Expt. 2 および Expt. 3

0 日齢雄肉用鶏 40 羽 (Expt. 2) または 50 羽 (Expt. 3) を供試し、無作為に 2 区 (対照区および BBA 区) に分け、Expt. 1 で述べた各試験飼料の給与を開始した。9 日齢時には、それぞれの区から 8 羽 (Expt. 2) もしくは 6 羽 (Expt. 3) を選び、1 個体ずつケージに移して 25–27 日齢まで飼育した。試験終了時には炭酸ガス麻酔後に断頭して、血漿サンプルを得るため採血した。さらに、解体して浅胸筋、深胸筋および脚部 (大腿部+下腿部、骨なし) を採取し、その重量を測定した。

##### 【結果および考察】

体重は、Expt. 1 において対照区と比較して BBA 区で有意な増加は確認できなかったが、Expt. 2 および 3 においては BBA 区で有意に増加した ( $P < 0.05$ )。一方、飼料摂取量はいずれの実験においても BBA 給与による変化は認められなかった。飼料効率はいずれの実験においても対照区と比較して BBA 区で有意に増加した ( $P < 0.05$ )。浅胸筋重量は、対照区と比較して BBA 区で有意な増加 (Expt. 1,  $P < 0.05$ )、もしくは増加する傾向を示した (Expt. 2,  $P = 0.059$ ; Expt. 3,  $P = 0.051$ )。さらに、深胸筋重量は対照区と比較して BBA 区で有意な増加 (Expt. 2,  $P < 0.01$ )、もしくは増加する傾向を示した (Expt. 3,  $P = 0.087$ )。また、脚部重量は BBA 給与により有意に増加した (Expt. 2,  $P < 0.01$ ; Expt. 3,  $P < 0.05$ )。これらの結果より、BBA に成長、特に骨格筋に対する成長促進効果

があることが示唆された。

*N*<sup>ε</sup>-メチルヒスチジンの排泄量は、対照区と比較して BBA 区で有意に減少した ( $P < 0.05$ )。また、血漿 *N*<sup>ε</sup>-メチルヒスチジン含量も BBA 区で有意に減少した ( $P < 0.05$ )。したがって、BBA 給与により骨格筋タンパク質分解が抑制されていることが示された。骨格筋タンパク質分解比速度は、対照区と比較して BBA 区で有意に低下したが ( $P < 0.05$ )、骨格筋タンパク質合成比速度には、対照区と BBA 区との間に有意な差は認められなかった。これらの結果から、BBA は骨格筋のタンパク質合成過程ではなく分解過程に影響を及ぼしていると考えられた。

以上の結果から、BBA の肉用鶏への給与は、骨格筋においてタンパク質分解を抑制することによりその成長を促進することが明らかになった。

## 第二節 骨格筋タンパク質分解経路

### 【背景および目的】

前節の結果から、BBA は骨格筋タンパク質分解を抑制して成長を促進することが明らかとなった。第二章の焼酎粕ヘキササン抽出物の結果から、カルパイン系およびユビキチン・プロテアソーム系の遺伝子発現が低下していることが予想される。さらに、その他の系、すなわち、カスパーゼ系およびリソソーム系が関与している可能性も否定できない。カスパーゼ系は、アポトーシスの際の骨格筋タンパク質分解に関与しており、主にシステインプロテアーゼである caspase-3 が制御している (Goll et al., 2008)。また、リソソーム系は、リソソーム内部に存在する酸性システインプロテアーゼである cathepsin 類が関与している (Goll et al., 2008)。カルパイン系およびカスパーゼ系は、骨格筋タンパク質のチチンならびにネブリン (Goll et al., 2003)、アクトミオシンおよびアクチン (Du et al., 2004) をそれぞれ切断する。その後、生じた切断断片はリソソーム系およびユビキチン・プロテアソーム系によって分解されることが知られている (Goll et al., 2008)。これらの知見に基づくと、骨格筋タンパク質分解の初期段階はカルパイン系およびカスパーゼ系、その最終段階はリソソーム系とユビキチン・プロテアソーム系が担うと考えられる。

そこで、本節では BBA による骨格筋タンパク質分解経路に対する影響を精査するために、カルパイン系、カスパーゼ系、ユビキチン・プロテアソーム系およびリソソーム系の 4 つの分解経路に関わる因子の遺伝子発現を調べた。

### 【材料および方法】

第三章第一節の Expt. 2 の深胸筋サンプル（採取後、液体窒素中でパウダリング）を用いた。総 RNA は TRIzol<sup>®</sup> (Life Technologies) を用いて抽出し、cDNA 合成後に real-time RT-PCR 法により各関連因子（カルパイン系:  $\mu$ -および m-calpain large subunit; カスパーゼ系: caspase-3; ユビキチン・プロテアソーム系: atrogin-1, MuRF1, ubiquitin および 20S proteasome C2 subunit; リソソーム系: cathepsin B; 内部標準: 18S rRNA) の mRNA 発現量を測定した。

### 【結果および考察】

$\mu$ -Calpain large subunit の mRNA 発現量は、対照区と比較して BBA 区で有意に低下したが ( $P <$

0.05)、m-calpain large subunit および caspase-3 の mRNA 発現量は、対照区と比較して BBA 区で変化しなかった。ユビキチンリガーゼにおいては、atrogin-1 の mRNA 発現量は対照区と比較して BBA 区で顕著に低下したが ( $P < 0.05$ )、MuRF1 の mRNA 発現量には BBA 給与による有意な差は認められなかった。Ubiquitin および 20S proteasome C2 subunit の mRNA 発現量は BBA 給与により有意に低下したが ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )、cathepsin B の発現量は BBA 給与により変化しなかった。したがって、これらの結果は、タンパク質分解の初期段階としてはカルパイン系、最終段階としてはユビキチン・プロテアソーム系が関与することを示している。またさらに、atrogin-1 の発現量が BBA により 50%程度まで低下していることから、BBA の給与は特に、ユビキチン化の過程を大きく抑制していることが考えられた。

以上から、BBA 給与による骨格筋タンパク質分解の抑制には、カルパイン系およびユビキチン・プロテアソーム系関連因子の遺伝子発現の低下が関与している可能性が示された。

### 第三節 骨格筋タンパク質分解の制御因子

#### 【背景および目的】

第三章第二節までの実験結果から、焼酎粕および BBA による骨格筋タンパク質分解の抑制効果には、最も atrogin-1 の遺伝子発現の低下が影響していると考えられた。Atrogin-1 の遺伝子発現には、転写因子 forkhead box O (FoxO) 1 および 3 が関与しており (Sandri et al., 2004; Schiaffino et al., 2013; Sanchez et al., 2014)、これらの機能は遺伝子発現や翻訳後修飾 (リン酸化など) により制御されると考えられている。

FoxO1 および 3 の遺伝子発現量は、グルココルチコイドによって増加することが報告されている (Cho et al., 2010; Furuyama et al., 2003; Imae et al., 2003; Shimizu et al., 2011)。さらに、FoxO1 および 3 のリン酸化による不活性化は、インスリン様成長因子 1 (IGF-1) シグナリングが関与している。すなわち IGF-1 は IGF-1 レセプター (IGF1R) を介して、Akt をリン酸化して活性化型にし、それが FoxO1 および 3 の特定部位 (FoxO1 では Thr24、Ser256 および Ser319、FoxO3 では Thr32、Ser253、および Ser315) をリン酸化する (Tran et al., 2003; Barthel et al., 2005; Sanchez et al., 2014)。それらリン酸化 FoxO1 および 3 は、核外に移行して不活性化する (Brunet et al., 1999, 2001; Stitt et al., 2004)。

なお、atrogin-1 の遺伝子発現は、上記シグナル伝達経路とは別経路と考えられるリポ多糖体投与時などの酸化ストレス誘導時に増加することが報告されている (Dehoux et al., 2003; Jin & Li, 2007; Doyle et al., 2011)。さらに、酸化ストレスをもたらし活性酸素種 (ROS) の一種である過酸化水素の投与によっても atrogin-1 の遺伝子発現が増加することが報告されている (Li et al., 2003; Ogawa et al., 2013)。

そこで本節では、BBA 給与による骨格筋タンパク質分解抑制を中心的に担うと考えられる制御因子 atrogin-1 遺伝子の発現制御因子に着目した。まず、atrogin-1 の転写因子 FoxO の遺伝子発現ならびにそれらの制御に関与するグルココルチコイドに対する BBA の影響について検討した。次に、FoxO のタンパク質発現量ならびにリン酸化状態を調べ、さらに、FoxO の翻訳後修飾 (特にリン酸化) に関与する IGF-1 シグナリング関連因子に対する BBA の影響を調査した。加えて、

atrogin-1 遺伝子発現に関わる酸化ストレス状態に対する BBA の影響についても調べた。

### 【材料および方法】

第三章第一節の Expt. 3 の深胸筋および血漿サンプルを用い、real-time RT-PCR 法により各因子 (FoxO1, FoxO3, IGF-1, IGF1R および 18S rRNA [内部標準]) の mRNA 発現量を測定した。さらに、ELISA 法により血漿中グルココルチコイド (鶏ではコルチコステロン) 含量、ウェスタンブロット法により各因子 (総ならびにリン酸化 FoxO1, FoxO3, Akt, mTOR および vinculin [内部標準]) のタンパク質発現量を測定した。また、酸化ストレス指標であるチオバルビツール酸反応物質 (TBARS) ならびにカルボニル化タンパク質含量も測定した。

### 【結果および考察】

Atrogin-1 の転写因子である FoxO1 および 3 の mRNA 発現量は、対照区と比較して BBA 区で有意に低下した ( $P < 0.05$ )。さらに、FoxO の遺伝子発現を制御する血漿中のコルチコステロン含量は、対照区と比較して BBA 区で有意に低下した ( $P < 0.05$ )。これらの結果から、BBA 給与によってコルチコステロン分泌量が低下し、これにより FoxO の遺伝子発現が低下して atrogin-1 の遺伝子発現低下に至ったと考えられた。

次に、FoxO1 および 3 のタンパク質発現量ならびにリン酸化状態に対する BBA 給与の影響について調べた。リン酸化状態にある p-FoxO1 (Thr24) のタンパク質発現量は、対照区と比較して BBA 区で増加する傾向を示し ( $P = 0.070$ )、total FoxO1 のタンパク質発現量は BBA 給与により有意に低下した ( $P < 0.05$ )。このため、FoxO1 の活性化状態を示す p-FoxO1 (Thr24) /total FoxO1 比は BBA 給与により有意に増加した ( $P < 0.05$ )。一方、リン酸化状態にある p-FoxO3 (Thr32) のタンパク質発現量には、BBA 給与による変化は認められなかった。これらの結果から、BBA が FoxO1 の転写抑制を介してタンパク質発現を抑制し、さらに、FoxO1 を不活性化することで、atrogin-1 の転写を抑制していることが考えられた。また、FoxO1 および 3 のリン酸化に関わる IGF-1 シグナリング関連因子に対する BBA の影響についても調べたが、p-Akt (Ser473) および total Akt のタンパク質発現量ならびに p-Akt (Ser473) /total Akt 比には、対照区および BBA 区の間で差は認められなかった。さらに、IGF-1 および IGF1R の mRNA 発現量に対しても BBA 給与による有意な差は認められなかった。これらの結果から、BBA による FoxO1 の不活性化は IGF-1 シグナリングを介していないことが示唆された。

なお、p-mTOR (Ser2481) および total mTOR のタンパク質発現量、p-mTOR (Ser2481) /total mTOR 比には BBA 給与による影響は認められなかった。これらの結果から、BBA は骨格筋タンパク質合成系の翻訳レベルには関与していないことが示唆された。したがって、BBA の骨格筋タンパク質増大効果はタンパク質分解抑制に基づくものと予想されることが再確認された。

さらに、atrogin-1 遺伝子発現に関わる酸化ストレス状態に対する BBA の影響を調べた。血漿において、脂質過酸化の指標である TBARS 含量は BBA 区で対照区と比較して有意に低下した ( $P < 0.05$ )。また、タンパク質酸化の指標であるカルボニル化タンパク質含量も BBA 給与によって有意に低下した ( $P < 0.01$ )。一方、深胸筋において、TBARS 含量は対照区と比較して BBA 区で有意差は認められなかったものの低い値を示し、カルボニル化タンパク質含量は BBA 給与により有



意に低下した ( $P < 0.05$ )。これらの結果から、BBA が全般的に酸化ストレスを軽減し、atrogin-1 の遺伝子発現を低下させている可能性も考えられた。

以上から、BBA は、コルチコステロン分泌量を低下させて FoxO 発現量を制御し、さらに、リン酸化状態にある FoxO1 の比率を増大させ、結果として FoxO1 を不活性化させるに至っていること、また、酸化ストレスを軽減させることによって atrogin-1 の遺伝子発現を低下させる可能性が考えられた。

## 第四章 総合考察

本研究では、焼酎粕による成長促進作用の本質が「骨格筋タンパク質分解抑制」にあることを明らかにした。すなわち、焼酎粕ヘキササン抽出物およびその主要化合物 **BBA** を肉用鶏に給与し、成長および骨格筋タンパク質分解とそれに関連する経路に対する影響、ならびに骨格筋タンパク質分解の制御因子の動態を調査した。その結果、焼酎粕ヘキササン抽出物および **BBA** はともに主要な骨格筋タンパク質分解経路のカルパイン系およびユビキチン・プロテアソーム系の関連因子の遺伝子発現の低下を誘導してタンパク質分解を抑制し、これにより成長が促進されることを明らかにした。**BBA** がこのヘキササン主要抽出物であること、また、焼酎粕ヘキササン抽出物と **BBA** の給与実験結果が矛盾なく一致していることを考え合わせると、焼酎粕による成長促進効果の核心の一部は **BBA** が担っている可能性が示された。なお、本研究では、焼酎粕ヘキササン抽出物および **BBA** による骨格筋タンパク質分解抑制の主要因子は、ユビキチン・プロテアソーム系の律速酵素であるユビキチンリガーゼの **atrogen-1** であること、また、**BBA** の **atrogen-1** の遺伝子発現の低下には、グルココルチコイド分泌量の低下を介した「**FoxO** 発現量の低下や **FoxO1** の相対的な不活性化」、ならびに「酸化ストレスの軽減」が関係しており、それにより骨格筋タンパク質分解を抑制して成長を促進した可能性を明らかにした。

これまでの焼酎粕に関連する多くの研究は実用化に向けた応用研究に限られていたが、本研究のような基礎的な研究、すなわち遺伝子レベルでの作用機構の解明にまで追究したものはない。本研究では、飼料原料としての焼酎粕の有効性を実証するとともに、焼酎粕に含まれる主成分 **BBA** の栄養特性、特に骨格筋に対する作用を明らかにした。**BBA** は麹や酵母による発酵の副産物の一つと考えられるため、本研究は今後、発酵産物などの未利用資材を飼料源として積極的に利活用する上で重要な情報を提供すると考えられる。

## 引用文献

- Barthel, A., Schmoll, D. & Unterman, T. G. (2005). FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **16**, 183-189.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J. & Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-868.
- Brunet, A., Park, J., Tran, H., Hu, L. S., Hemmings, B. A. & Greenberg, M. E. (2001). Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHRL1 (FOXO3a). *Molecular and Cellular Biology* **21**, 952-965.
- Cho, J. E., Fournier, M., Da, X. & Lewis, M. I. (2010). Time course expression of Foxo transcription factors in skeletal muscle following corticosteroid administration. *Journal of Applied Physiology* **108**, 137-145.
- Dehoux, M. J. M., van Beneden, R. P., Fernández-Celemín, L., Lause, P. L. & Thissen, J. P. M. (2003). Induction of MafBx and Murf ubiquitin ligase mRNAs in rat skeletal muscle after LPS injection. *FEBS Letters* **544**, 214-217.
- Doyle, A., Zhang, G., Abdel Fattah, E. A., Eissa, N. T. & Li, Y. P. (2011). Toll-like receptor 4 mediates lipopolysaccharide-induced muscle catabolism via coordinate activation of ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways. *FASEB Journal* **25**, 99-110.
- Du, J., Wang, X., Miereles, C., Bailey, J. L., Debigare, R., Zheng, B., Price, S. R. & Mitch, W. E. (2004). Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *Journal of Clinical Investigation* **113**, 115-123.
- Furuyama, T., Kitayama, K., Yamashita, H. & Mori, N. (2003). Forkhead transcription factor FOXO1 (FKHR)-dependent induction of PDK4 gene expression in skeletal muscle during energy deprivation. *Biochemical Journal* **375**, 365-371.
- Goll, D. E., Neti, G., Mares, S. W. & Thompson, V. F. (2008). Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *Journal of Animal Science* **86** (Suppl.), E19-E35.
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W. & Cong, J. (2003). The calpain system. *Physiological Reviews* **83**, 731-801.
- Imae, M., Fu, Z., Yoshida, A., Noguchi, T. & Kato, H. (2003). Nutritional and hormonal factors control the gene expression of FoxOs, the mammalian homologues of DAF-16. *Journal of Molecular Endocrinology* **30**, 253-262.
- Jin, B. & Li, Y. P. (2007). Curcumin prevents lipopolysaccharide-induced atrogin-1/MAFbx upregulation and muscle mass loss. *Journal of Cellular Biochemistry* **100**, 960-969.
- Li, Y. P., Chen, Y., Li, A. S. & Reid, M. B. (2003). Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **285**, C806-C812.
- Mahfudz, L. D., Hayashi, K., Ikeda, M., Hamada, K., Ohtsuka, A. & Tomita, Y. (1996a). The effective use

- of shochu distillery by-product as a source of broiler feed. *Japanese Poultry Science* **33**, 1-7.
- Mahfudz, L. D., Hayashi, K., Otsuji, Y., Ohtsuka, A. & Tomita, Y. (1996b). Separation of growth promoting factor of broiler chicken from shochu distillery by-product. *Japanese Poultry Science* **33**, 96-103.
- Mahfudz, L. D., Nakashima, K., Ohtsuka, A. & Hayashi, K. (1997). Growth factors for a primary chick muscle cell culture from shochu distillery by-products. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **61**, 1844-1847.
- Ogawa, M., Kariya, Y., Kitakaze, T., Yamaji, R., Harada, N., Sakamoto, T., Hosotani, K., Nakano, Y. & Inui, H. (2013). The preventive effect of  $\beta$ -carotene on denervation-induced soleus muscle atrophy in mice. *British Journal of Nutrition* **109**, 1349-1358.
- Sanchez, A. M. J., Candau, R. B. & Bernardi, H. (2014). FoxO transcription factors: their roles in the maintenance of skeletal muscle homeostasis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **71**, 1657-1671.
- Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., Walsh, K., Schiaffino, S., Lecker, S. H. & Goldberg, A. L. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* **117**, 399-412.
- Schiaffino, S., Dyar, K. A., Ciciliot, S., Blaauw, B. & Sandri, M. (2013). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS Journal* **280**, 4294-4314.
- Shimizu, N., Yoshikawa, N., Ito, N., Maruyama, T., Suzuki, Y., Takeda, S., Nakae, J., Tagata, Y., Nishitani, S., Takehana, K., Sano, M., Fukuda, K., Suematsu, M., Morimoto, C. & Tanaka, H. (2011). Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. *Cell Metabolism* **13**, 170-182.
- Stitt, T. N., Drujan, D., Clarke, B. A., Panaro, F., Timofeyva, Y., Kline, W. O., Gonzalez, M., Yancopoulos, G. D. & Glass, D. J. (2004). The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Molecular Cell* **14**, 395-403.
- Tran, H., Brunet, A., Griffith, E. C. & Greenberg, M. E. (2003). The many forks in FOXO's road. *Science Signaling* **2003**, re5.