Glycative Stress Research

Online edition : ISSN 2188-3610
Print edition : ISSN 2188-3602
Received : March 18, 2020
Accepted : April 5, 2020
Published online : June 30, 2020
doi:10.24659/gsr.7.2_110

Review article

Homeostasis of skeletal muscle function and a functional food ingredient: Citrus limonoid nomilin.

Ryuichiro Sato

Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of agricultural and Life Sciences,
The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Glycative Stress Research 2020; 7 (2): 110-115
(c) Society for Glycative Stress Research

（総説論文：日本語翻訳版）

骨格筋機能の維持と機能性食品成分：柑橘成分ノミリン

佐藤隆一郎

東京大学大学院農学生命科学研究科・応用生命化学専攻

要旨

高齢社会において、高齢者の健康寿命を延伸させることは喫緊の課題と言える。健康寿命は自立した生活を送れる身体機能の維持にほかならないことから、筋量・筋力を増進するメカニズムの解明が求められている。筆者らはコレステロール異化産物である胆汁酸の機能解析研究の過程で、胆汁酸受容体 TGR5 の機能に着目して研究を進めてきた。特に骨格筋における TGR5 機能を複数種の遺伝子改変マウスを解析することにより明らかにすることを試みた。その結果、骨格筋で胆汁酸による TGR5 活性化が、骨格筋肥大、筋力増強方向へと導くことを見出した。さらに胆汁酸に代わり TGR5 を活性化する食品成分を探索する評価系を構築し、食品成分の中から柑橘成分ノミリンが TGR5 アゴニスト活性を持つことを見出した。本総説では、胆汁酸の新たな生理機能と共に、食品成分による骨格筋機能維持の可能性について論じる。

KEY WORDS: コレステロール、胆汁酸、TGR5、骨格筋、ノミリン（nomilin）

連絡先：教授 佐藤隆一郎
東京大学大学院農学生命科学研究科・応用生命化学専攻
〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1
TEL：03-5841-5136
e-mail：aroysato@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

(c) Society for Glycative Stress Research

はじめに

65 歳以上の高齢者の総人口に占める割合、高齢化率はまもなく 30％に到達し、今世紀の半ば過ぎには 40％ 台になると予想されている。要支援・要介護人口の増大に伴う介護費用の膨大化を防ぐためにも、そして何より活力ある高齢者が構成する社会を実現するために、健康寿命の延伸、特に身体機能の維持が重要となる。健康寿命とは自立した生活ができる生存期間を意味することから、骨格筋機能を維持し、支援・介護を必要としない状態を長く継続させることが望まれる。骨格筋機能の維持には、適切な食習慣と適度な運動が求められるが、加齢と共に運動習慣の継続は困難となる。このような時にこそ、骨格筋機能増進効果を有する食品成分を見出し、それらを食生活を通じて活用していく試みが期待される。筆者らはコレステロール異化産物である胆汁酸の機能解析を行う研究の過程において、その特異的受容体 TGR5 の骨格筋における役割について注目して研究を進めた。その結果、骨格筋 TGR5 は血液中の胆汁酸をリガンドとして結合、活性化し、筋肥大、筋力増加効果を有することが明らかになった[1]。さらに日常的な食生活の中で筋量を維持することを目的に TGR5 アゴニスト活性を有する食品成分を探索する評価系を構築した。数百種類の食品成分化合物の中から、柑橘類に含まれるリモノイドの 1 種であるノミリンに TGR5 アゴニスト活性を見出した[2]。

健康寿命と食品機能

高齢社会日本において、高齢者の健康寿命を延伸することとは、社会的要請度のきわめて高い試みといえる。平均寿命と健康寿命の差は、男性でおよそ 9 年、女性で 12 ～ 13 年であり、この差を限りなく縮めることは生活の質（QOL）を上昇させることからも強く望まれる。こうして健康寿命を終え、要支援・要介護が必要になった原因を見ると、脳血管疾患が第 1 位を占めるものの、虚弱、関節疾患、転倒・骨折をまとめるとおよそ 35％ 程度になることが報告されており（厚生労働省「国民生活基礎調査」2016 年）、高齢者の身体機能維持の重要性がうかがえる。加齢に従い、運動習慣により身体機能を維持することが困難になることを考えると、身体ロコモーション機能を維持・改善する機能性食品の開発は喫緊の課題ともいえる。同時に、そのような機能を有する食品成分を豊富に含む次世代農林水産物の開発は、輸出をも視野に入れた日本農業の振興へと結びつくことも期待される。

骨格筋

我々の体は体重の 40 ～ 50％を占める骨格筋により支えられ、保護されている。こうした役割と同時に骨格筋は代謝組織としても重要な働きをしている。食後の血糖値上昇に伴いインスリンが分泌されると，血糖値の減少が引き起こされるが、血中グルコースの 75％ 近くを骨格筋組織が取り込むことにより達成される。加齢とともに骨格筋量は減少するが、この事実は身体ロコモーション機能の低下をもたらすことを意味すると同時に、血糖維持を介した代謝制御機能の脆弱化をも引き起こすことを物語っている。高齢者においては、1 年に 1 ～ 2％程度骨格筋量が減少すると報告されている。したがって高齢者が骨格筋量の減少を抑制し、適切な筋量を保持し、自立活動を可能にする身体ロコモーション機能を維持することは、健全な代謝制御機能を維持して健康維持にも結び付くことを意味する。そしてこのことが健康寿命の延伸へと直結する。

筋量の制御

筋量は骨格筋蛋白質量の増減により決定される。寝たきり、低重力での宇宙滞在などでは筋量が低下するが、この場合は蛋白質分解が亢進した結果と言える。筋蛋白質の分解は，蛋白質のユビキチン修飾によるプロテアソームでの分解が深く関与している。実験動物を用い、石膏で下肢をギプス固定すると、1 週間程度で有意に筋肉量は低下する。この時、ユビキチンを基質に付加する酵素活性を持つ複数の E3 ligase、Atrogin-1 と MuRF1 などの遺伝子発現が上昇し、ligase 活性も増加する。したがって、E3 ligase の発現もしくは活性を抑制する食品成分には、蛋白質分解を阻害し、筋量低下を穏やかにする効果が期待される。一方，蛋白質合成を増加させる試みとして、分枝鎖アミノ酸の有効性が示されている。骨格筋蛋白質中の分枝鎖アミノ酸の含量は高く、ロイシン、イソロイシン、バリンといった分枝鎖アミノ酸を供給することで筋蛋白質の合成が上昇する。ヒト試験において、大量の ω 3 脂肪酸を投与することにより骨格筋蛋白質合成量増加が確認されている[3]。

新たな胆汁酸の生理機能

ヒトは肝臓において 1 日 1 g 程度のコレステロールを合成する。食事由来のコレステロールの吸収量は 150 ～ 200 mg 程度であると推測されている。コレステロールは脂質成分であるが、体内でこれをエネルギー源として燃焼、分解することはできない。唯一、肝臓においてこれを胆汁酸へと異化する。コレステロールは炭素数 27 の化合物であり複雑な構造をしている。肝臓で炭素原子 3 個を取り除き、炭素数 24 の胆汁酸へと異化し、最終的には糞へと排出することにより、体内のコレステロール出納は均衡を保っている。肝臓で異化された胆汁酸は胆嚢に蓄積され、摂食刺激に伴い胆嚢が収縮し、そこに含まれる胆汁酸が小腸上部へと分泌される。こうして食事由来の脂溶性成分は胆汁酸により乳化（ミセル形成）され、脂質分解酵素による消化を受けることができるようになる。胆汁酸は脂溶性成分の消化・吸収を促しながら小腸下部にたどり着き、そこで特異的な輸送体 IBAT（ileal bile acid transporter）によりおよそ 95％ 程度が門脈へと吸収される。そののち、肝臓へと輸送され、新たに異化された胆汁酸とともに再び小腸へと分泌される。こうした腸肝循環を 10 回程度繰り返したのちに、胆汁酸は糞へと排泄される。

2000 年代に入り胆汁酸の役割について画期的な発見

が相次いだ。胆汁酸は核内受容体FXR（farnesoid X receptor）の内因性リガンドであり、FXRは胆汁酸結合により活性型となり、種々の遺伝子発現を制御することが明らかにされた。活性型FXRはその応答遺伝子であるSHP（small heterodimer partner）発現を上昇させ、その結果、胆汁酸合成の律速酵素であるCYP7A1の遺伝子発現を低下させる。こうして胆汁酸合成が盛んになり十分量の胆汁酸が肝臓へと戻ると、ネガティブフィードバック制御機構としてコレステロールから胆汁酸への異化は抑制される[4)]。

また、胆汁酸は肝臓へと再吸収される際に一部全身血流にも流れ出し、10 µM程度の濃度で血液中に存在しており、この胆汁酸を結合する受容体TGR5（7回膜貫通領域を有するG蛋白質共役受容体（GPCR））が発見された[5,6)]。TGR5に胆汁酸が結合すると、細胞内cAMP濃度が上昇し、それに呼応して蛋白質キナーゼAが活性化、さらに転写因子CREB（cAMP response element-binding protein）が活性型となり下流へとシグナルを伝達する（*Fig. 1*）。小腸・大腸のL細胞においては新規ペプチドホルモンのインクレチンGLP-1（glucagon-like peptide-1）の分泌を促し[7)]、インスリン分泌を促進し、全身のインスリン感受性を向上させる。一方、ヒト骨格筋、げっ歯類の褐色脂肪では、細胞内で不活性型の甲状腺ホルモンT_3を活性型のT_4に変換する酵素DIO_2（type II iodothyronine deiodinase）の遺伝子発現を上昇させる。同時にPGC-1α（peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1α）遺伝子発現も上昇させ、ミトコンドリア活性を亢進し、双方の効果により熱産生を促進することが明らかにされた[8)]。つまり、胆汁酸は胆汁酸-TGR5経路を介してインクレチン作用によりインスリン抵抗性を改善し、さらに熱産生亢進により抗肥満効果を発揮する。

骨格筋におけるTGR5の新たな機能

骨格筋には複数のGPCRが発現しており、リガンド結合により細胞内cAMP濃度を上昇させるGPCRには筋量を増強させる効果が示されている[9)]。中でも骨格筋での発現が比較的高い$β_2$アドレナリン受容体は筋量増強効果の強いことが知られている。合成リガンドであるクレンブテロール（clenbuterol）は、実験動物、ヒトに投与すると筋量増強を招くことが確かめられている[10)]。それゆえ、クレンブテロールはドーピング禁止薬物の一つに挙げられている。TGR5は骨格筋に発現しており、$β_2$アドレナリン受容体と同様、細胞内cAMP濃度を上昇させることから、筋量増加効果が期待される。そこで我々は胆汁酸受容体TGR5の骨格筋での機能を明らかにする目的で、複数の遺伝子改変マウスを解析した。一つは骨格筋にヒトTGR5を過剰発現させたトランスジェニック（Tg）マウスを開発し、解析した。恒常的なTGR5発現上昇は腓腹筋、大腿四頭筋において筋量を10～15%程度増加させ、実際筋力も有意に上昇することが明らかになった[1)]。高脂肪食を負荷して耐糖能異常マウスを用意し、血糖のクリアランスを調べる経口糖負荷試験（oral glucose tolerance test: oGTT）を行うと、筋量増加に伴いTgマウスでは速やかに血糖値が低下することが認められ、糖代謝を改善することも明らかになった。同時に、TGR5ノックアウトマウスを入手し、同様の解析を行った。Tgマウスとは反対に、筋量が有意に低下し、筋力の減少が確認された。つまり胆汁酸が骨格筋のTGR5に結合すると、シグナルが伝達され、筋蛋白質量が上昇することを意味している（*Fig. 2*）。

骨格筋における胆汁酸受容体TGR5発現の制御

上述した骨格筋特異的TGR5発現マウスとTGR5欠損マウスの解析より、骨格筋量の制御に胆汁酸受容体が一定の役割を演じていることが明らかとなった。そこで次の問いかけとして、種々の生理変動により骨格筋TGR5発現が変化し、筋量が増減する可能性について解析を進めた。培養筋管細胞C2C12を種々の阻害剤、代謝変動化合物等で培養し、内因性のTGR5 mRNA量が変動するかを追跡した。その結果、小胞体ストレスを惹起する化合物

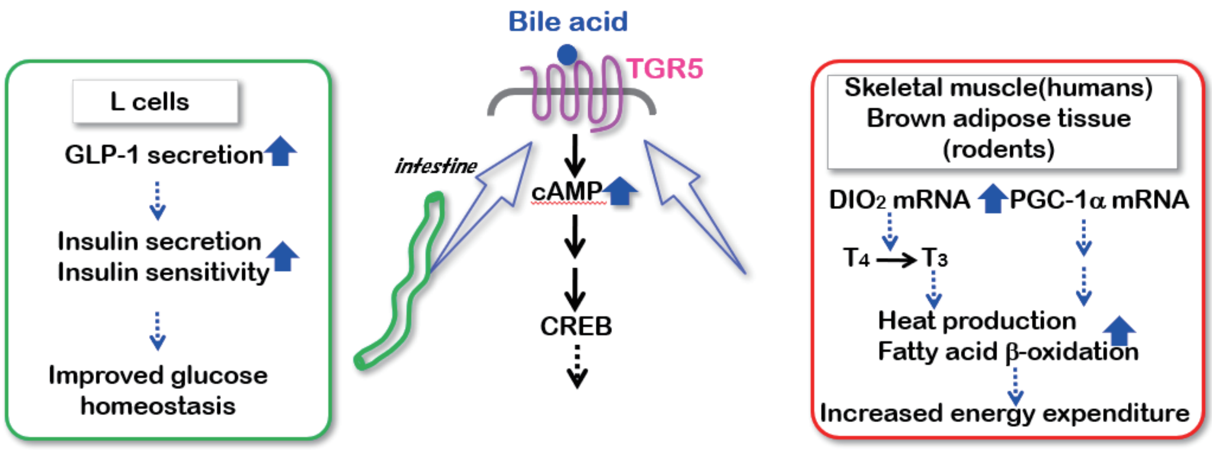

Fig. 1. **The elevation of insulin sensitivity and anti-obese effect by bile acid-TGR5 axis: An overview.**

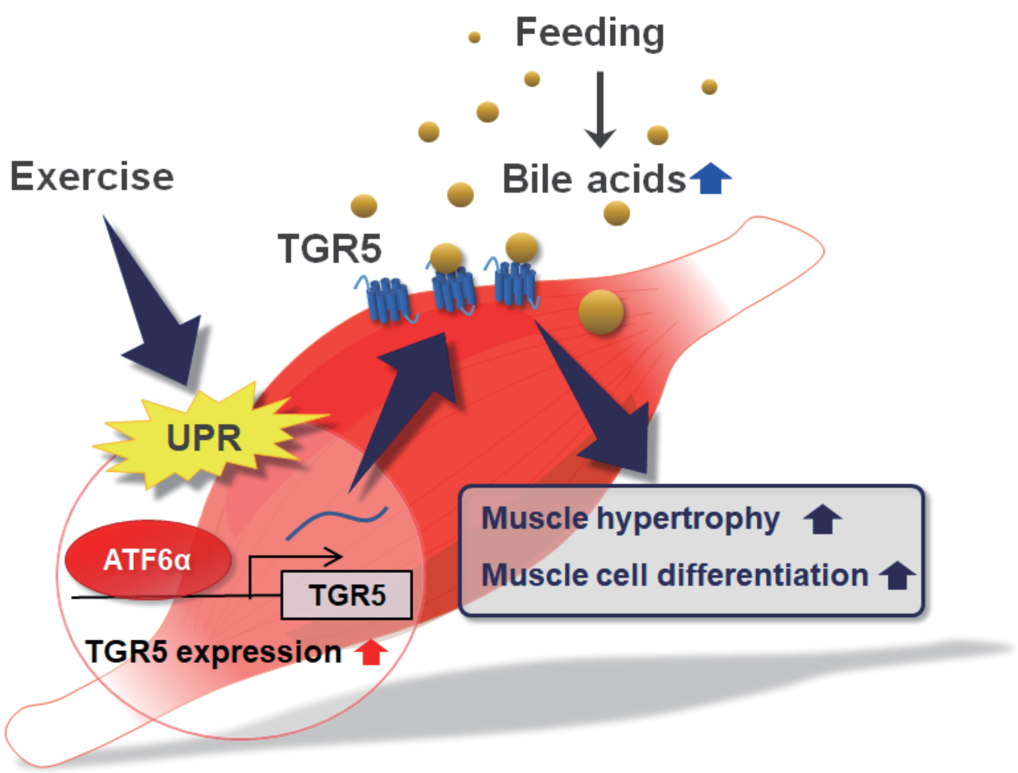

Fig. 2. **The muscle hypertrophy and the promotion of muscle differentiation by bile acid-TGR5 axis in the skeletal muscle.**
UPR, unfolded protein response.

であるツニカマイシン（tunicamycin）、サプシガルジン（thapsigargin）を培地に添加すると、TGR5発現が有意に上昇することが確認された[1]。野生型マウスの大腿四頭筋にこれら2種類の薬物をそれぞれ筋注し、その後に筋肉を可溶化し、蛋白質発現量をTGR5抗体でウエスタンブロット解析すると蛋白質発現レベルでも上昇が確認された。先行論文によるとマウスを一過的に中程度以上の負荷の運動をさせると、骨格筋にUPR（unfolded protein response：小胞体ストレス応答）の生じることが示されている[11]。そこで野生型マウスにトレッドミルを用いて約1時間の運動を間欠的に行わせ、その後腓腹筋を回収し、TGR5 mRNA量を解析したところ、予想通りに運動によりmRNA量は有意に増加していた。小胞体ストレスは複数の経路で伝達されるが、中でもATF6（activating transcription factor 6）を介した遺伝子発現経路は重要な働きをしている。そこでマウスTGR5遺伝子の転写開始点上流を精査すると、ATF6応答配列に類似する配列が見出された。この配列に変異を入れたレポーター遺伝子を複数作成し、レポーターアッセイを行った結果、小胞体ストレスに応じて活性化したATF6がこの配列を介してTGR5遺伝子発現を亢進させることが明らかになった。さらにATF6-/-マウスを入手し、野生型と並べて同様の運動負荷をかけた。その結果、野生型マウスでは運動後に腓腹筋TGR5 mRNA量の上昇が確認されたが、ATF6-/-では変動しなかった。運動により上昇するSik1（salt inducible kinase 1）、PGC-1αmRNAは両群で有意に上昇していた。

胆汁酸は摂食応答により小腸へと分泌され、摂食後に血中濃度は高値になる[12]。したがって筆者らは血中胆汁酸を摂食シグナルの一つと考えている。つまり摂食後の血中胆汁酸濃度の上昇は骨格筋に筋量増大を促すシグナルとして働く。一方運動直後には、受容体TGR5の発現が上昇して、胆汁酸-TGR5シグナルが作動し、筋量増加へと導いている。以上、血液中胆汁酸と骨格筋TGR5の新たな機能連関を明らかにすることができた（*Fig. 2*）。これらの知見は、これまで不明であった血中胆汁酸の生理的意義を明らかにすると共に、血中胆汁酸濃度の重要性、さらには胆汁酸機能を模倣する食品成分の筋量増強への有効性を物語っている。

新規な筋量増加効果を有する運動機能性食品成分

TGR5を食品成分により活性化する目的で、胆汁酸と同様にTGR5アゴニスト活性を有する食品成分の探索を開始した。胆汁酸を食品に添加して食することは不可能なことも、代替化合物を探索する理由である。食品に含まれる化合物の精製標品を試薬として購入し、およそ140種類の化合物ライブラリーを自作した。さらに香料成分も300種類程度入手し、およそ500種類の化合物について評価系に供し、アゴニスト活性を定量した。具体的には、ヒトTGR5

遺伝子を組み込んだ発現ベクターで培養細胞表面にTGR5を発現させ、培地に添加した成分がTGR5に結合し、細胞内cAMPを上昇させるとluciferase蛋白質発現が上昇するアッセイ系を構築して、活性を測定した。このアッセイ系は高感度で、アゴニスト活性が見出されるとコントロールの数十倍のルシフェラーゼ（luciferase）活性が検出される。その結果、柑橘成分リモノイド類の一つであるノミリン（*Fig.3*）を発見した[2]。ノミリンをはじめとする柑橘リモノイド類には抗菌活性、抗HIV活性、発癌予防効果などが報告されており[13-15]、機能性食品成分としての評価を受けている。ノミリンを0.2％含む高脂肪食でC57BL/6マウスを77日間飼育すると、体重増加への強い抑制効果が確認された。経口糖負荷試験を行うと、ノミリン添加により血糖の速やかな消失が認められた。つまり想定された抗肥満、糖代謝改善効果が検証された。TGR5アゴニスト活性は他の食品成分トリテルペン類であるベツリン酸、オレアノール酸にも確認されている[16]。筋量増強効果としては、柑橘中でノミリンが代謝変換を受けた産物であるオバクノンを0.1％含む餌で4週間飼育したマウスにおいて、大腿四頭筋、腓腹筋量が有意に上昇することを見出している[17]。

さらに本来のリガンドである胆汁酸とノミリンはTGR5とどのような結合様式をするのかについて、コンピューターシミュレーションによる推定を試みた。さらにその結果に基づき、結合に関与していることが予想されるアミノ酸を逐次Ala残基に変異させ、結合に関与するか調べていった[18]。その結果、TGR5の7回膜貫通領域で形成される膜間ポケットに本来のリガンドである胆汁酸が埋め込まれるように結合するのに対し、本来のリガンドでないノミリンは分子の一端が膜間ポケットに入り込み、他端は細胞膜外に突き出た形でTGR5分子の細胞外ドメイン（第2膜貫通領域（TM2）と第3膜貫通領域（TM3）を結ぶループ部分）の2か所のアミノ酸残基（Gln77とArg80）と結合することが確かめられた（*Fig.3*）。

柑橘植物内でノミリンは主に、種、果皮に含まれ、一方我々が普段食する果肉部位にはノミリンに糖（グルコース）が結合した配糖体の形で存在する。果肉部位は水溶環境であり、糖が付加されることによりノミリンに親水性が付与される。そこで柑橘類の果肉部位から配糖体ノミリンを精製し、糖が付加していないノミリンアグリコンとTGR5アゴニスト活性を比較した。その結果、配糖体はアゴニスト活性が著しく低いことが判明した。従って、柑橘類の果肉部位を習慣的に摂取してもTGR5アゴニストとして機能する確率は低いことが予想される。糖部分が腸内で切断され吸収される可能性は否定できないが、血中へのノミリン出現率は低く、吸収率は低いことが知られている。さらに上述したTGR5とノミリンの結合様式から判断すると、グルコースは細胞外に位置して、TGR5の細胞外ドメインに位置する結合に必須な2か所のアミノ酸残基とノミリンの結合を邪魔する可能性が高い。以上の理由で、配糖体はアゴニスト活性が低いと理解することができる（*Fig.3*）。

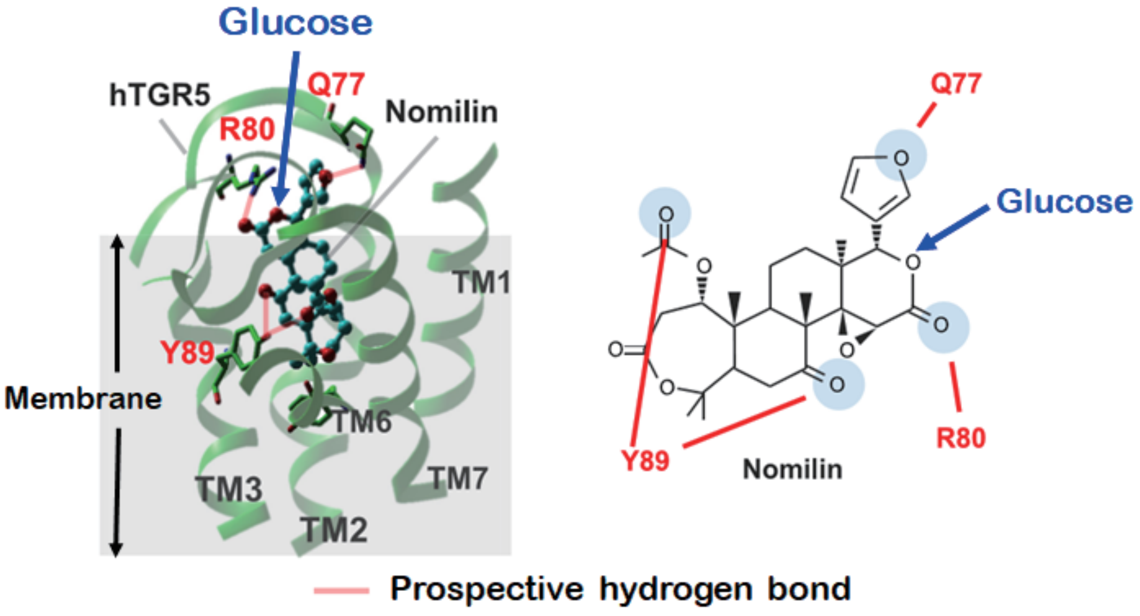

Fig.3. **The binding pattern between nomilin and TGR5: A diagram.**

The Nomilin tip enters the transmembrane region and the other end, located extracellularly, binds to TGR5. Once the glycosides added glucose to portions with arrows, the binding of TGR5 to Q77 (Gln 77) and R80 (Arg 80) is predicted to be interrupted.

おわりに

21世紀半ばに到来する超高齢社会において、食品の力で骨格筋機能を維持する試みは今後益々重要になると考えられる。今後40年の日本の人口動態の変化予想によると、65歳以上の高齢者人口は3500～3900万人と人口減少社会の中ではほとんど変化しない。今後数十年に渡り、信頼に値する健康寿命延伸効果を有した食品の開発が多くの国民から期待されることが予想される。食品の持つ潜在能力を活用し、骨格筋機能維持を図り、健康寿命延伸が達成できることを願っている。

謝辞

本研究は、文部科学省科研費（#JP15H05781、#JP16K18699）並びに総合科学技術・イノベーション会議のSIP（戦略的イノベーション創造プログラム 研究課題番号14533567）「次世代農林水 産業創造技術」（農研機構生研センター委託研究）より支援を受け実施された。

利益相反申告

本研究に関して該当事項はない。

参考文献

1) Sasaki T, Kuboyama A, Mita M, et al. The exercise-inducible bile acid receptor Tgr5 improves skeletal muscle function in mice. *J Biol Chem*. 2018; 293: 10322-10332.
2) Ono E, Inoue J, Hashidume T, et al. Anti-obesity and anti-hyperglycemic effects of the dietary citrus limonoid nomilin in mice fed a high-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 410: 677-681.
3) Smith GI, Atherton P, Reeds DN, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids augment the muscle protein anabolic response to hyperinsulinaemia-hyperaminoacidaemia in healthy young and middle-aged men and women. *Clin Sci*. 2011; 121: 267-278.
4) Ahmad TR, Haeusler RA. Bile acids in glucose metabolism and insulin signalling – mechanisms and research needs. *Nat Rev Endocrinol*. 2019; 15: 701-712.
5) Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, et al. Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 298: 714-719.
6) Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, et al. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem*. 2003; 278: 9435-9440.
7) Thomas C, Gioiello A, Noriega L, et al. TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab*. 2009; 10: 167-177.
8) Watanabe M, Houten SM, Mataki C, et al: Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*. 2006; 439(7075): 484-489.
9) Berdeaux R, Stewart R. cAMP signaling in skeletal muscle adaptation: Hypertrophy, metabolism, and regeneration. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012; 303: E1-17.
10) Lynch GS, Ryall JG. Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: Implications for muscle wasting and disease. *Physiol Rev*. 2008; 88: 729-767.
11) Wu J, Ruas JL, Estall JL, et al. The unfolded protein response mediates adaptation to exercise in skeletal muscle through a PGC-1α/ATF6α complex. *Cell Metab*. 2011; 13: 160-169.
12) Suzuki T, Aoyama J, Hashimoto M, et al. Correlation between postprandial bile acids and body fat mass in healthy normal-weight subjects. *Clin Biochem*. 2014; 47: 1128-1131.
13) Tian Q, Miller EG, Ahmad, H, et al. Differential inhibition of human cancer cell proliferation by citrus limonoids. *Nutr Cancer*. 2001; 40: 180-184.
14) Abdelgaleil SAM, Hashinaga F, Nakatani M. Antifungal activity of limonoids from *Khaya ivorensis*. *Pest Manag Sci*. 2005; 61: 186-190.
15) Battinelli L, Mengoni F, Lichtner M, et al. Effect of limonin and nomilin on HIV-1 replication on infected human mononuclear cells. *Planta Med*. 2003; 69: 910-913.
16) Sato R. Nobilin as an anti-obesity and anti-hyperglycemic agent. *Vitam Horm*. 2013; 91: 425-439.
17) Horiba T, Katsukawa M, Mita M, et al. Dietary obacunone supplementation stimulates muscle hypertrophy, and suppresses hyperglycemia and obesity through the TGR5 and PPARγ pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 463: 846-852.
18) Sasaki T, Mita M, Ikari N, et al. Identification of key amino acid residues in the hTGR5-nomilin interaction and construction of its binding model. *PLoS ONE*. 2017; 12: e0179226.