

Mini Review

骨格筋におけるアミノ酸代謝調節の分子機序

¹味の素株式会社, ²京都府立大学大学院生命環境科学研究科分子栄養学研究室畑澤 幸乃^{1,2}

Molecular mechanism of skeletal muscle amino acid metabolism

Yukino Hatazawa^{1,2}¹Ajinomoto Co., Inc., ²Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University

1. はじめに

骨格筋はヒトの体重の約40%を占める人体で最も大きな組織であり、タンパク質（アミノ酸）の形でエネルギー貯蔵を行っている。骨格筋は環境の変化に順応する可塑性があり、適切な運動トレーニングと十分な栄養により肥大する。一方、寝たきりや加齢などによって、骨格筋の萎縮が生じる。その結果、エネルギー消費減少（肥満）や、糖取り込み能の低下・血糖値上昇（糖尿病）そして生活の質（QOL）の低下へと向かう。超高齢社会を迎えた我が国において、筋萎縮の抑制は健康寿命の延長の観点から重要である。生活習慣病の予防やQOLの維持に大きな役割を果たす骨格筋代謝の分子機序を理解することは、国民の健康の維持・増進を目指した筋機能不全の予防法の開発のために重要である。

アミノ酸は分子内にアミノ基（-NH₂）とカルボキシル基（-COOH）を有する化合物である。タンパク質を構成するとともに、様々な生理活性物質を作り出す原料となっている。アミノ酸の持つ基本的な性質として、他の食品と同様、一次機能（栄養機能）、二次機能（感覚機能）、三次機能（生体調節機能）が挙げられる。安全性の高い化合物であることから、食品以外の利用も進んでいる。すなわち、(1) 一次機能（栄養機能）：良質のタンパク質を十分に摂取していれば、必須アミノ酸（人体で生合成されないアミノ酸）が不足することはない。しかし、アミノ酸バランスのよくないタンパク質ばかりを摂取すると必須アミノ酸が不足する場合がある。植物性タンパク質の中には、動物の成長に必要なアミノ酸（リジン等）が不足しているものもあり、栄養強化の目的でヒトおよび動物飼料に用いられる。また、食事としてタンパク質を摂取できない場合にはアミノ酸製剤として病態別の栄養管理に用いられる。(2) 二次機能（感覚機能）：アミノ酸は甘味、塩味、酸味、苦味、旨味の基本5味のうちいくつかの呈味を有している。また、アミノ酸はフレーバー（香り）として加工食品に利用され

ている。(3) 三次機能（生体調節機能）：アミノ酸の生体調節機能に関しては、ロイシンの筋タンパク質の同化作用、アルギニンによる血管拡張効果や免疫増強作用、またγアミノ酪酸（GABA）には血圧調節作用等が知られる。また、その他として、血液中の各種アミノ酸濃度を測定し、統計的に疾病（がん等）のリスクを評価しうる医療診断法も実用化されている。本稿では、骨格筋におけるアミノ酸代謝調節の分子機序に関する研究について、われわれのデータを中心に紹介する。

2. 転写調節因子 PGC1 α と骨格筋アミノ酸代謝2-1 PGC1 α による分岐鎖アミノ酸代謝制御

分岐鎖アミノ酸（branched-chain amino acids; BCAA）であるロイシン、イソロイシン、バリンは骨格筋のタンパク質を構成する必須アミノ酸の約35%を占めており、ヒトは大量のBCAAを体内に貯蔵している。ほとんどのアミノ酸の代謝は主に肝臓で行われるが、BCAAの代謝は骨格筋で活発に行われ、エネルギー源として利用される¹⁾。これはBCAAの最初の異化反応を触媒する酵素であるBCAAアミノ基転移酵素（BCAA aminotransferase; BCAT）が肝臓ではほとんど発現しておらず、骨格筋で多いためである²⁾。BCAAは異化反応の1つ目のステップにおいて、BCATによる可逆的なアミノ基転移反応により分岐鎖 α ケト酸となる。この分岐鎖 α ケト酸は、分岐鎖 α ケト酸脱水素酵素（branched-chain α -keto acid dehydrogenase; BCKDH）による酸化的脱炭酸反応を起こしCoA化合物となる。それらの最初の2つの反応を触媒する酵素は3つのBCAA（Leu, Ile, Val）に共通している。2つ目のステップの酵素であるBCKDHは非可逆的な反応を触媒するため、BCAAの異化経路における最も重要な調節酵素であると考えられている。さらに、BCKDHの活性は分岐鎖 α ケト酸脱水素酵素キナーゼ（branched-chain α -keto acid dehydrogenase kinase; BCKDK）というキナーゼ

によって調節され、BCKDH はBCKDK によりリン酸化されることでその活性が低下する³⁾。

PPAR γ coactivator 1 α (PGC1 α) は様々な核内受容体の転写共役因子 (転写調節因子) であり、脂肪酸酸化などの遺伝子発現を活性化する⁴⁾。また、PGC1 α は骨格筋の性質を決定するミトコンドリアの生合成や筋線維タイプ (赤筋・白筋) の制御に重要である⁵⁻⁷⁾ (図1A)。PGC1 α は骨格筋などにおいて持続的な運動によって発現が増加することが知られており⁸⁾、骨格筋でPGC1 α を過剰発現したマウス (PGC1 α -Tg) では、ミトコンドリアが多く有酸素運動能力に優れた赤筋化が認められ、持久的運動能力が向上する⁷⁾。つまり、骨格筋におけるPGC1 α は運動のマスターレギュレーターであると言える。

われわれは、PGC1 α の発現増加によって生じる表現型を説明する遺伝子発現変化を調べるためにPGC1 α -Tgマウスの骨格筋において網羅的な遺伝子発現変化の解析を行った。その結果、PGC1 α -Tgマウスの骨格筋にお

いてPGC1 α によって活性化することが既に知られている脂肪酸代謝などのほか、これまでにPGC1 α との関連が知られていなかったBCAA代謝経路が亢進していることが明らかとなった^{9,10)}。すなわち、BCAA代謝酵素であるBCATやBCKDHの発現増加が認められた。つづいて、PGC1 α -Tgマウスの骨格筋においてBCAA代謝酵素の発現が増加していることをReal time PCR法及びウエスタンブロット法を用いて確認した。さらにPGC1 α をレトロウイルスで過剰発現させたC2C12筋芽細胞を用いて、BCAA代謝酵素の遺伝子発現増加を確認した。また、これらの結果と一致してPGC1 α -Tgマウスの骨格筋及びPGC1 α 過剰発現C2C12筋芽細胞においてBCAA含有量が減少していた。これらの結果から、骨格筋におけるPGC1 α はBCAA代謝に貢献し、運動により生じるPGC1 α の発現増加はBCAA代謝に関与している可能性が示唆された。また一方で、骨格筋でPGC1 α を特異的に欠損したマウスにおいてBCAA代謝酵素の遺伝子発現が低下していることも見出した¹¹⁾。

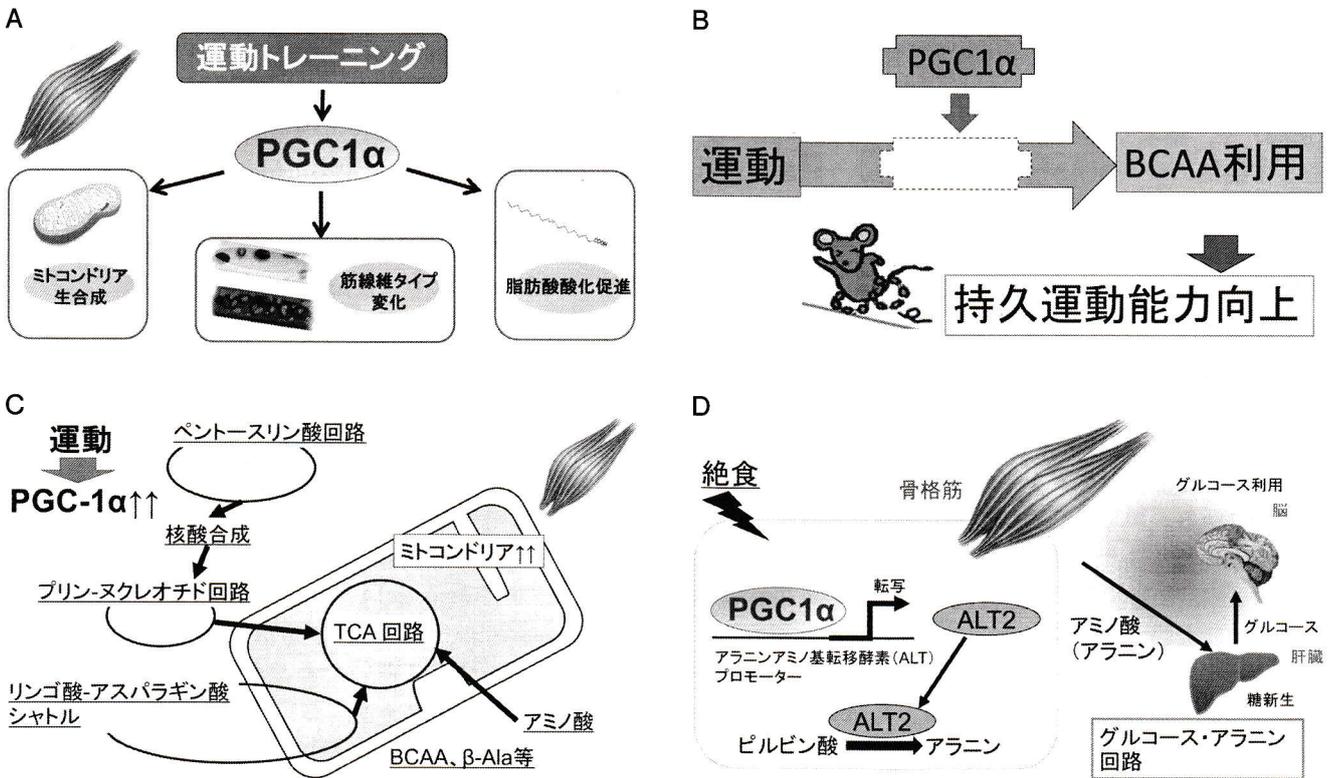


図1. PGC1 α による運動時の骨格筋への影響

- A) PGC1 α は運動時の骨格筋で発現量が増加する。骨格筋でのPGC1 α の発現増加により、ミトコンドリア生合成の増加、筋線維タイプの変化 (白筋から赤筋へ)、脂肪酸酸化の促進など、持久的な運動に適した骨格筋へと変化する。
- B) 運動時、BCAA は骨格筋における重要なエネルギー源であり、運動のサプリメントとしての需要が高まっている。しかし、運動時、BCAA がどのようなメカニズムでエネルギー源として利用されるか詳細は不明であった。網羅的解析により、運動時、骨格筋においてPGC1 α を介してBCAA利用が促進されることが明らかとなった。
- C) PGC1 α がアミノ酸を含む様々な基質を利用してTCA回路を活性化し、運動時のエネルギー源としている可能性が示唆された。
- D) 絶食時骨格筋において、PGC1 α はアラニン合成酵素 (アラニンアミノ基転移酵素) の発現を増加させ、アラニン合成を促進する。アラニンは肝臓で糖新生の基質として利用されることが知られており、PGC1 α は肝臓だけでなく、骨格筋においても飢餓適応の役割を担っているかもしれない。

BCAAは運動時の骨格筋の重要なエネルギー源であるが、これまでBCAAが運動時にどのようなメカニズムでエネルギー源として利用されるかの詳細は不明であった。上述の結果から、運動時の骨格筋においてPGC1 α を介してBCAA利用が促進されることが示唆された⁹⁻¹⁰⁾(図1B)。

2-2 運動時の骨格筋でのPGC1 α を介したアミノ酸代謝の役割

われわれは、メタボローム解析により、PGC1 α -Tgマウスの骨格筋中の低分子代謝物の変動を網羅的に解析した。その結果、TCA回路の代謝産物の量の増加が観察された。そして、TCA回路の基質となりうるBCAAや β -アラニンを含むアミノ酸の量が顕著に減少していた。さらに運動時に活性化することが知られているプリンヌクレオチド回路とアスパラギン酸-リンゴ酸シャトルの代謝産物の量が増加した⁹⁾。これらの結果から、PGC1 α がアミノ酸を含む様々な基質を利用してTCA回路を活性化し、運動時のエネルギー源としている可能性が示唆された(図1C)。

2-3 運動時に骨格筋から分泌されるアミノ酸関連分子

運動トレーニングは筋タンパク質合成を促進し、筋肥大を誘導する。また、有酸素運動は骨格筋においてミトコンドリア生合成を促進させる他、赤筋化、脂肪酸酸化、血管新生を促進させ、エネルギー代謝を活性化させて筋機能を高める事が知られている。一方、運動は骨格筋のみならず、全身健康に良い効果を示すことが知られている。例えば、運動によりストレス解消、糖取り込み、脂肪燃焼などが起こる。これらの効果に関して、骨格筋から分泌される生理活性物質(マイオカイン)の関与が示唆されている¹²⁾。

メタボローム解析においてPGC1 α -Tgマウスの骨格筋ではアミノ酸代謝産物である β アミノイソ酪酸(β -aminoisobutyric acid; BAIBA)や γ アミノ酪酸(γ -aminobutyric acid; GABA)の量が顕著に増加していた⁹⁾。運動時の骨格筋においてBAIBAが分泌され、白色脂肪組織を褐色化してエネルギー消費を増加させるという報告がなされている¹²⁾。また、GABAの摂取は高血圧の改善に有効であることが知られる。適度な運動は高血圧を改善するが、運動時に発現が増加するPGC1 α によるGABAの産生はその作用機序を担っているかもしれない。BAIBA、GABAなどは運動時の骨格筋から分泌され、他臓器に影響を及ぼす新たな生理活性物質(マイオカイン)である可能性がある。すなわち、運動による生活習慣病改善などの臓器間相互作用の効果を説明する新たな機序であるかもしれない。

2-4 PGC1 α とアラニン代謝

骨格筋はタンパク質(アミノ酸)の形でエネルギー貯蔵を行っており、異化の条件下において分解される。PGC1 α は様々な刺激により骨格筋や肝臓などの多様な組織において応答する。骨格筋においてPGC1 α は運動により発現増加する一方、肝臓においては絶食時に発現増加して糖新生を促進させることが知られている。絶食時の血糖値維持は、肝臓だけでなく骨格筋も重要な役割を担っている。絶食時骨格筋において、アラニンアミノ基転移酵素(Alanine transaminase; ALT)によりアラニンが合成され、このアラニンは肝臓で糖新生の基質として利用されることが知られている。

われわれは絶食時、骨格筋においてもPGC1 α の発現が増加し、同様にアラニン合成酵素であるALTが増加することを観察した。そこで、骨格筋においてもPGC1 α が飢餓適応に役割を担っており、PGC1 α がALTの発現増加を介してアラニン合成を促進しているかどうかIn vitroの筋細胞を用いて調べた。その結果、PGC1 α 過剰発現C2C12筋芽細胞において、ALTの発現が有意に増加していた。さらに、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、PGC1 α 容量依存的にALTプロモーターの活性が増加することを観察した。一致して、PGC1 α 過剰発現C2C12筋芽細胞においてアラニン量が増加し、さらに培地中のアラニン量も増加していた¹³⁾。

これらの結果は骨格筋においてPGC1 α により合成されたアラニンが骨格筋から分泌されて肝臓のような多臓器で利用される可能性を示唆している(図1D)。絶食時、骨格筋においてPGC1 α はアラニンを合成し、肝臓における糖新生の基質を供給するかもしれない¹³⁾。

3. 転写調節因子FOXO1と骨格筋アミノ酸代謝

Forkhead box O1 (FOXO1)はフォークヘッド型の転写調節因子である。われわれは、数年来、個体レベルでFOXO1の骨格筋代謝調節機構を検討してきた。すなわち、エネルギー欠乏により骨格筋におけるFOXO1の遺伝子発現が増加することを踏まえ、FOXO1を骨格筋特異的に過剰発現する遺伝子改変マウス(FOXO1-Tg)を作製し、FOXO1が筋萎縮を引き起こすことを示した(図2A)¹⁴⁾。FOXO1の発現増加は筋萎縮に共通して認められ、筋萎縮の原因となっていることが示唆される。FOXO1およびFOXO3aはユビキチン・プロテアソーム系によるタンパク質分解、オートファジーの亢進など様々な機序により筋萎縮を引き起こすことが明らかになっている¹⁴⁾。

一方、タンパク質・アミノ酸の分解に伴いアミノ基(-NH₂)からアンモニアが生じる。このアンモニアは細胞に有害であるが骨格筋にはアンモニアを解毒する系は存在しない。そこで、骨格筋においてグルタミン合成酵素によって生成されたグルタミン(アンモニアに由来す

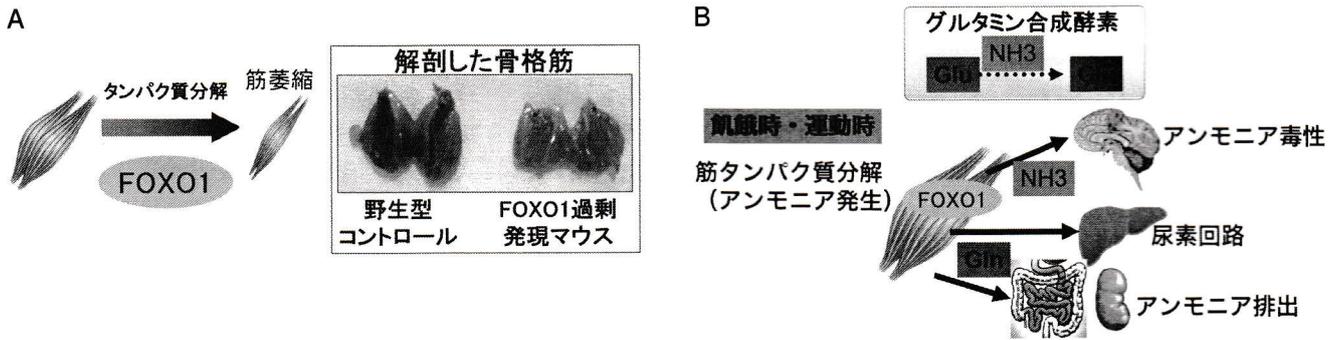


図2. FOXO1は骨格筋萎縮を引き起こす

- A) FOXO1は飢餓やギプス固定、糖尿病、がんなどで骨格筋において発現誘導され筋萎縮を引き起こす。骨格筋特異的にFOXO1を過剰発現した遺伝子改変マウスでは顕著な筋萎縮が生じ、タンパク質分解などの遺伝子の発現が亢進した。
 B) 骨格筋において筋タンパク質分解によりアンモニアが発生するが、グルタミンに固定することで肝臓に運ばれて代謝することができる。骨格筋においてFOXO1によりグルタミン合成酵素が増加した。FOXO1によるグルタミン合成促進は、アミノ酸分解時に生成されるアンモニアの消去にも役割を果たす可能性がある。

るアミノ基がグルタミン酸に付加された)は、肝臓などに運搬されアンモニアの解毒に利用されると考えられる(図2B)。

われわれは、FOXO1-TgマウスおよびFOXO1を骨格筋特異的に欠損させたマウス(FOXO1-KO)を使用し、それぞれの野生型同腹仔の骨格筋と比較して、タンパク質・アミノ酸代謝に関する遺伝子発現を測定した。その結果、FOXO1マウスにおいてグルタミン合成酵素の発現が増加し、FOXO-KOマウスにおいて絶食により誘導されるFOXO1の発現が抑制されることが明らかとなった¹⁵⁾。つづいて、FOXO-KOマウスの骨格筋において絶食により誘導されるグルタミン合成酵素のタンパク質発現が抑制されていることをウエスタンブロット法を用いて確認した。さらに、C2C12筋芽細胞を用いたルシフェラーゼアッセイ及びChIPアッセイによりFOXO1はグルタミン合成酵素遺伝子を発現制御することが明らかとなった。FOXO1によるグルタミン合成促進は、アミノ酸分解時に生成されるアンモニアの消去にも役割を果たす可能性がある¹⁵⁾。

4. アミノ酸摂取と筋機能の改善

食物タンパク質中にはBCAAが多量に含まれている(食物タンパク質の必須アミノ酸の約50%、総アミノ酸の約20%を占める)¹⁾。このうち、特にロイシンはタンパク質合成の促進作用が知られており、栄養シグナル分子としての作用機序が明らかとなりつつある¹⁶⁾。ロイシンによるタンパク質合成の促進は、遺伝情報がmRNAからタンパク質に翻訳される段階の活性化がその一因である。翻訳開始因子(eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E))を含む複合体は、翻訳開始に重要である。アミノ酸欠乏時や飢餓時等では4E結合タンパク質(4EBP)はeIF4Eに結合し、翻訳開始複合体の形成が低下し翻訳開始が起りにくくなる。ロイシンはキナーゼである

mechanistic target of rapamycin 複合体1 (mTORC1)を活性化し、4EBPをリン酸化し、その結果4EBPはeIF4Eから解離し、翻訳開始・タンパク質合成が進むことがわかっている。実際、われわれの実験においてもマウスへのロイシンの経口投与によって骨格筋で4EBPのリン酸化が顕著に進むことを観察している¹⁷⁾。

ロイシン・BCAAがタンパク質合成を進めることから、これらが筋萎縮の予防に寄与することが予想される。中高齢マウスにBCAAを多く含むエサを与えると、骨格筋でmTORC1の活性化および一酸化窒素(NO)合成酵素(eNOS)の発現の増加とNOの産生、PGC1 α の発現の増加とともに筋萎縮が抑制されると報告されている¹⁸⁾。また、ヒト高齢者がロイシンを多く含むサプリメントを摂取することで筋量・筋力・歩行速度が改善することが示されている¹⁹⁾。このように、高齢者の筋萎縮(サルコペニア)の予防・改善にはBCAAの作用が期待される。

アルギニンおよび γ アミノ酪酸(GABA)から産生されるNOは血管に作用し血流の改善をすることが知られる。PGC1 α -Tgマウスの骨格筋ではeNOSの発現量の増加とともに、骨格筋での血管の量が増加している⁷⁾。これは運動時に骨格筋に栄養素や酸素を運搬するのに適した状態であるといえる。アルギニンは経口摂取する際に腸管で多く分解を受けるために、アルギニンの前駆体のシトルリンを摂取する方が血中のアルギニン量が増加することが報告されている²⁰⁾。このため、シトルリン摂取によるNOの増加によって骨格筋の血流改善が可能かもしれない。

5. おわりに

本稿では、骨格筋におけるアミノ酸代謝に関して、転写調節因子PGC1 α やFOXO1に関する知見を紹介した。アミノ酸はタンパク質を構成するとともに、様々な生理

活性物質を作り出す原料となっている。人体で最大の組織である骨格筋はアミノ酸の貯蔵庫としても重要であろう。骨格筋機能の維持は超高齢社会の健康寿命を伸ばすために重要であるが、筋機能不全の予防・改善法の確立のためにも、骨格筋のアミノ酸代謝と筋機能や他臓器への影響などのさらなる解析が期待される。

6. 謝辞

本研究内容は、京都府立大学 生命環境科学研究科 分子栄養学研究室で実施した。指導教員の亀井康富教授（京都府立大学）に深く感謝の意を表します。また、PGC1 α 過剰発現マウスを供与いただいた三浦進司教授（静岡県立大学）に感謝します。

7. 引用文献

- 1) Harper AE, Miller RH, Block KP (1984) Branched-chain amino acid metabolism. *Annu Rev Nutr*, **4** : 409-454.
- 2) Shimomura Y, Murakami T, Nakai N, Nagasaki M, Harris RA (2004) Exercise promotes BCAA catabolism: effects of BCAA supplementation on skeletal muscle during exercise. *J Nutr*, **134** : 1583s-1587s.
- 3) Shimomura Y, Obayashi M, Murakami T, Harris RA (2001) Regulation of branched-chain amino acid catabolism: nutritional and hormonal regulation of activity and expression of the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **4** : 419-423.
- 4) Kamei Y, Ohizumi H, Fujitani Y, Nemoto T, Tanaka T, Takahashi N, Kawada T, Miyoshi M, Ezaki O, Kakizuka A (2003) PPAR γ coactivator 1 β /ERR ligand 1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100** : 12378-12383.
- 5) Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegelman BM (2002) Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*, **418** : 797-801.
- 6) Miura S, Kai Y, Ono M, Ezaki O (2003) Overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α down-regulates GLUT4 mRNA in skeletal muscles. *J Biol Chem*, **278** : 31385-31390.
- 7) Tadaishi M, Miura S, Kai Y, Kano Y, Oishi Y, Ezaki O (2011) Skeletal muscle-specific expression of PGC-1 α -b, an exercise-responsive isoform, increases exercise capacity and peak oxygen uptake. *PLoS One*, **6** : e28290.
- 8) Tadaishi M, Miura S, Kai Y, Kawasaki E, Koshinaka K, Kawanaka K, Nagata J, Oishi Y, Ezaki O (2011) Effect of exercise intensity and AICAR on isoform-specific expressions of murine skeletal muscle PGC-1 α mRNA: a role of β_2 -adrenergic receptor activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **300** : E341-349.
- 9) Hatazawa Y, Senoo N, Tadaishi M, Ogawa Y, Ezaki O, Kamei Y, Miura S (2015) Metabolomic Analysis of the Skeletal Muscle of Mice Overexpressing PGC-1 α . *PLoS One*, **10** : e0129084.
- 10) Hatazawa Y, Tadaishi M, Nagaike Y, Morita A, Ogawa Y, Ezaki O, Takai-Igarashi T, Kitaura Y, Shimomura Y, Kamei Y, Miura S (2014) PGC-1 α -mediated branched-chain amino acid metabolism in the skeletal muscle. *PLoS One*, **9** : e91006.
- 11) Hatazawa Y, Minami K, Yoshimura R, Onishi T, Manio MC, Inoue K, Sawada N, Suzuki O, Miura S, Kamei Y (2016) Deletion of the transcriptional coactivator PGC1 α in skeletal muscles is associated with reduced expression of genes related to oxidative muscle function. *Biochem Biophys Res Commun*, **481** : 251-258.
- 12) Roberts LD, Boström P, O'Sullivan JF, Schinzel RT, Lewis GD, Dejam A, Lee YK, Palma MJ, Calhoun S, Georgiadi A, Chen MH, Ramachandran VS, Larson MG, Bouchard C, Rankinen T, Souza AL, Clish CB, Wang TJ, Estall JL, Soukas AA, Cowan CA, Spiegelman BM, Gerszten RE (2014) β -Aminoisobutyric acid induces browning of white fat and hepatic β -oxidation and is inversely correlated with cardiometabolic risk factors. *Cell Metab*, **19** : 96-108.
- 13) Hatazawa Y, Qian K, Gong DW, Kamei Y (2018) PGC-1 α regulates alanine metabolism in muscle cells. *PLoS One*, **13** : e0190904.
- 14) Kamei Y, Miura S, Suzuki M, Kai Y, Mizukami J, Taniguchi T, Mochida K, Hata T, Matsuda J, Aburatani H, Nishino I, Ezaki O (2004) Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *J Biol Chem*, **279** : 41114-41123.
- 15) Kamei Y, Hattori M, Hatazawa Y, Kasahara T, Kanou M, Kanai S, Yuan X, Suganami T, Lamers WH, Kitamura T, Ogawa Y (2014) FOXO1 activates glutamine synthetase gene in mouse skeletal muscles

- through a region downstream of 3'-UTR: possible contribution to ammonia detoxification. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **307** : E485-493.
- 16) Moro T, Ebert SM, Adams CM, Rasmussen BB (2016) Amino Acid Sensing in Skeletal Muscle. *Trends Endocrinol Metab*, **27** : 796-806.
- 17) Yoshimura R, Minami K, Matsuda J, Sawada N, Miura S, Kamei Y (2016) Phosphorylation of 4EBP by oral leucine administration was suppressed in the skeletal muscle of PGC-1 α knockout mice. *Biosci Biotechnol Biochem*, **80** : 288-290.
- 18) D'Antona G, Ragni M, Cardile A, Tedesco L, Dossena M, Bruttini F, Caliaro F, Corsetti G, Bottinelli R, Carruba MO, Valerio A, Nisoli E (2010) Branched-chain amino acid supplementation promotes survival and supports cardiac and skeletal muscle mitochondrial biogenesis in middle-aged mice. *Cell Metab*, **12** : 362-372.
- 19) Kim HK, Suzuki T, Saito K, Yoshida H, Kobayashi H, Kato H, Katayama M (2012) Effects of exercise and amino acid supplementation on body composition and physical function in community-dwelling elderly Japanese sarcopenic women: a randomized controlled trial. *J Am Geriatr Soc*, **60** : 16-23.
- 20) Schwedhelm E, Maas R, Freese R, Jung D, Lukacs Z, Jambrecina A, Spickler W, Schulze F, Böger RH (2008) Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism. *Br J Clin Pharmacol*, **65** : 51-59.