

脂肪細胞分化に伴う脂肪蓄積に対するアミノ酸の効果

Effects of amino acids on lipid accumulation in differentiated adipocytes

田中千尋* 鎌田由香* 矢内信昭*
Chihiro TANAKA Yuka KAMADA Nobuaki YANAI

Adipose tissue plays important roles in lipid homeostasis, though less is known about the regulation of amino acid metabolism in adipocytes. We administered 11 kinds of amino acids to differentiating adipocytes to quantify the contributions of amino acids to lipid accumulation in differentiated adipocytes from mouse bone marrow mesenchymal progenitor cell line. Among those amino acids, 8 amino acids including branched-chain amino acids (BCAAs) enhanced lipid accumulation in adipocytes, and arginine, asparagine, and cysteine administration did not affect lipid accumulation. All the amino acids tested did not suppress the lipid accumulation in adipocytes. The highest lipid accumulation was observed in leucine (one of BCAAs) administration, suggesting leucine has an effect different from isoleucine and valine (other BCAAs) addition. When asparagine is easily synthesis from aspartic acid in cells, only aspartic acid enhanced the lipid accumulation. Arginine is a popular supplement as it is touted to increase nitric oxide activity in the body, and arginine administration did not affect the lipid accumulation in adipocytes. When taking a large amount arginine as a supplement, there is no worry of the lipid accumulation in adipocytes.

Keywords: adipocyte, mesenchymal progenitor, amino acid
脂肪細胞, 中胚葉性前駆細胞, アミノ酸

1. 緒言

脂肪組織は、グルコースからの脂質合成を担い、グルコースと脂質の恒常性を維持し、余分なエネルギーを中性脂肪の形で保存する組織である。脂肪細胞は、脂肪組織の主な構成成分で、ホルモンやサイトカインを介して、脂質の合成と放出が調整されている。また、脂肪細胞が分泌するアディポカインは、肝での脂質代謝、食欲、炎症やインスリン抵抗性に影響を与えている¹⁾。脂肪細胞での脂質代謝において、タンパク質の積極的摂取やアミノ酸の摂取が、肥満の発症を抑制、すなわち脂肪細胞への脂肪蓄積を抑制すると考えられているが、脂肪細胞に直接作用して機能していることが明らかとなっているわけではない。

従来、分岐鎖アミノ酸であるバリン、ロイシン、イソロイシンは、骨格筋の増殖と維持に効果的であるといわれているが、近年、分岐鎖アミノ酸と肥満の関係が注目され、分岐鎖アミノ酸代謝と脂肪細胞の分化過程での遺伝子発現制御の研究も進んでいる^{2,3)}。分岐鎖アミノ酸は、多くの組織で重要なケト原性アミノ酸で⁴⁾、血中のこれらのアミノ酸は、代謝の過程で、血中濃度依存的にインスリン抵抗性を増大させるという結果も示されている⁵⁾。ただ、これらのアミノ酸の脂肪細胞に対しての効果をもたらす機序の詳細については明らかとなっていない。いくつかの報告に

よって、分岐鎖アミノ酸が濃度依存的に TCA 回路を活性化させたり、3T3-L1 脂肪前駆細胞の脂肪細胞分化を促進させたり、脂肪酸代謝酵素の転写を促進させることが知られている^{6,7)}。脂肪細胞に分化した 3T3-L1 細胞では、ミトコンドリアのアセチル CoA の 1/3 が分岐鎖アミノ酸由来であると考えられている⁸⁾。このように、脂肪細胞では分岐鎖アミノ酸代謝が脂肪細胞機能に大きく関わっている。

今回、脂肪細胞のモデルとして、マウス骨髄由来前駆細胞が脂肪細胞へと分化して細胞内に脂肪滴を蓄積する系を用いて、培養細胞に対するアミノ酸添加が脂肪滴形成にどのような作用があるかを検討することとした。効果を観るアミノ酸として、分岐鎖アミノ酸 (バリン、ロイシン、イソロイシン)、分岐鎖アミノ酸に次いでエネルギー源として用いられているアスパラギン酸と容易にアスパラギン酸へ変換が可能なアスパラギン、脂肪組織の量を減少させる事が報告されているシトルリン⁹⁾、アルギニン¹⁰⁾、シトルリンとともにオルニチン回路を構成するアミノ酸であるオルニチン、脂肪細胞分化を促進するシステイン¹¹⁾、脂肪組織での代謝抑制効果のあるメチオニン¹²⁾、脂肪細胞に作用するという報告がほとんどないトリプトファン (インスリン依存的なグルコースの取り込みを促進しない¹³⁾) の11種類とし、それらのアミノ酸が、脂肪細胞への脂肪

*宮城学院女子大学大学院健康栄養学研究所

蓄積に対する影響を調べることとした。

通常臨床的に用いられているアミノ酸の投与量は、1日あたり1g程度なので、体重が60kgの場合、アミノ酸の分子量にもよるが、そのままの量が血流に入ったと仮定すれば数mMになることが予想されることから、今回の実験では、培地に含まれるアミノ酸とは別に添加するアミノ酸濃度を2mMと設定した。

2. 材料と方法

1) 培養細胞

脂肪細胞分化を観察する系として、骨髄由来マウス前脂肪細胞株 TBR311を用いた。TBR311細胞は、温度感受性SV40のT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの骨髄から樹立された細胞株で、33°CではT抗原が活性化して細胞を増殖させ、37°Cの培養によってT抗原が不活化され、増殖が遅くなり、細胞の分化が促進される中胚葉性前駆細胞である^{14,15)}。継代培養は、10%牛胎児血清(FBS: fetal bovine serum)を添加したF12/DMEM (Invitrogen)を用い、10cmプラスチック培養皿(住友ベークライト)で、33°Cの5%炭酸ガスインキュベータ内で行った。培地は、1週間に2回交換した。細胞の継代は、細胞が培養面に飽和した状態で、トリプシン溶液(20μg/mL牛臍臓由来トリプシン(シグマ)、0.02%EDTA、リン酸緩衝塩類溶液(PBS: Dulbecco's phosphate buffered saline))処理により細胞を培養皿から剥がした後、培地に細胞を分散し、5倍の培養面積へと継代した。

2) 脂肪細胞分化

TBR311の脂肪細胞への分化は、6穴プラスチック培養皿(バクtonディッキンソン)を用い、飽和状態(1.3×10⁵細胞/ウェル程度)となった培養に対して、リポタンパク質が多い馬血清(HS: horse serum)を20%、脂肪細胞分化を誘導する0.1μMデキサメタゾン(合成グルココルチコイド)、グルコースの取り込みと脂肪酸合成を促進するための10μg/mLインスリン(シグマ)を添加したF12/DMEM培地で、37°Cの5%炭酸ガスインキュベータ内で脂肪細胞へと分化させた。培地交換は3日毎に行った。

3) アミノ酸添加

脂肪細胞分化に際して添加したアミノ酸(和光純薬)は、アスパラギン、アスパラギン酸、アルギニン、イソロイシン、オルニチン、シトルリン、システイン、トリプトファン、メチオニン、バリン、ロイシンで、1M水酸化ナトリウム溶液を用い、それぞれ1M溶液を作成した。アミノ酸添加に際しては、コントロール培養には1/500容の1M水酸化ナトリウム溶液、アミノ酸液は1/500容を添加し、最終濃度を2mMとした。

4) 脂肪染色

1週間の脂肪細胞分化誘導培養後、細胞内に形成された脂肪滴を0.18%オイルレッド(OilRed-O)溶液で染色した。イソプロパノールで可溶化した0.3%オイルレッド溶液6に対して4容の純水を加えて染色液とした。細胞を20%中性ホルマリン溶液(和光純薬)で10分間固定した後、PBSでリンスし、60%イソプロパノールで置換した後、染色液で10分間染色した。定量に際しては、60%イソプロパノールで脱色した後、PBSで2回リンスして風乾した。乾燥後、イソプロパノールで色素を抽出し、島津製作所UVmini-1240を用い、520nmの波長で吸光度を測定した。

3. 結果と考察

マウス骨髄由来の中胚葉性前駆細胞株であるTBR311細胞は、1μMデキサメタゾンを添加し、リポタンパク質の多い馬血清を20%加えた培地で、37°C、6日ほどの培養で、細胞内に脂肪的を蓄積して脂肪細胞へと分化した(図1)。細胞内に蓄積した脂肪滴は、オイルレッドでよく染まるため、オイルレッド染色後に色素を抽出して吸光度を測定することで、細胞内に蓄積した脂肪の概量を求めることができる。

TBR311細胞の脂肪細胞への分化過程における脂肪蓄積に対する各種アミノ酸の効果を調べるために、アスパラギン、アスパラギン酸、アルギニン、イソロイシン、オルニチン、システイン、シトルリン、トリプトファン、バリン、メチオニン、ロイシンの11種類のアミノ酸の効果を

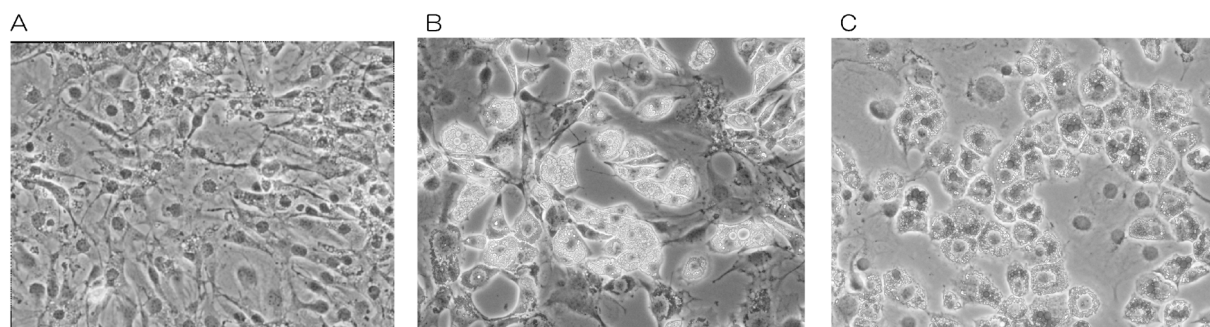


図1: TBR311細胞の脂肪細胞分化

A: 維持培養で飽和状態となったTBR311細胞。B: 分化誘導6日目には細胞内に脂肪滴が観察できる。C: 分化誘導6日目に脂肪滴をオイルレッド染色した。

検討した。添加するアミノ酸の濃度は、経口摂取可能な量 (体重60 Kgの個体に対して1g程度) を想定し、すべてが吸収され血中濃度に反映することを仮定して、2 mMとした。アミノ酸の添加は、脂肪細胞分化誘導培養期間を通して行い、分化誘導培養3日目に行った培地交換時にもアミノ酸を添加した。アミノ酸の効果が脂肪細胞分化誘導にあるのか、分化後の脂肪蓄積にあるのかを判別することはできないが、すべてのアミノ酸添加において脂肪滴の蓄積が見られたことから、今回添加したアミノ酸が分化誘導の過程に作用したとは考えにくい。

脂肪細胞分化誘導培養6日目に細胞を固定し、オイルレッドで染色された脂肪をイソプロパノールで可溶化して吸光度を測定し、蓄積した脂肪量とした (表1)。脂肪細胞分化の実験系は、分化して脂肪滴を蓄積した細胞の培養基質に対する接着性が弱くなること、固定・染色の過程で細胞が培養基質から剥がれやすくなること、さらにオイルレッドのプラスチックに対する親和性による染色ムラなどから誤差の多い実験系となっているため、6回の独立した実験を行い、その平均的な値に最も近い値を持つ1回の

表1: TBR311細胞の脂肪蓄積量

添加アミノ酸 2mM	オイルレッドO吸光度 A ₅₂₀ ±SD	平均変動率* %
control	0.050±0.003	16
脂肪細胞分化	0.309±0.037	100
アスパラギン	0.311±0.013	101
アスパラギン酸	0.380±0.022	123
アルギニン	0.319±0.041	103
イソロイシン	0.381±0.028	123
オルニチン	0.418±0.030	135
システイン	0.314±0.035	102
シトルリン	0.396±0.016	128
トリプトファン	0.428±0.041	139
バリン	0.367±0.036	119
メチオニン	0.392±0.024	127
ロイシン	0.474±0.043	153

脂肪細胞分化誘導後、オイルレッド染色を行い、イソプロパノールでオイルレッドを抽出し、520nmの吸光度を測定した。値は、3ウェルあたりの平均値±標準偏差。*: 脂肪細胞分化誘導した場合の吸光度平均値を100%としたとき、吸光度平均値の割合。

実験の3ウェルあたりの平均値を結果とした。脂肪滴蓄積を阻害するアミノ酸は見当たらず、すべてのアミノ酸で陽性コントロールを上回っていた。最も脂肪蓄積量が増加したのはロイシン添加で、およそ1.5倍量の脂肪蓄積であった。分岐鎖アミノ酸では、バリン、イソロイシン添加ともに1.2倍量の脂肪蓄積があった。従来の報告に見られる分岐鎖アミノ酸の脂肪細胞への効果¹⁶⁾ とほぼ同様の結果が得られた。アミノ酸添加によって脂肪蓄積が増加したアミノ酸は、11種類の内8種類で、脂肪蓄積に対して効果のなかったアミノ酸はアスパラギン、アルギニン、システインの3種であった。以下にアミノ酸毎の脂肪蓄積効果について考察する。

分岐鎖アミノ酸

分岐鎖アミノ酸3種類は、摂取したタンパク質のアミノ酸組成のおよそ20%を占め、主に肝臓で代謝される残りの (タンパク合成に使われる) 17種のアミノ酸と異なり、筋肉組織や脂肪組織で代謝される。分岐鎖アミノ酸は、主に筋組織で代謝されると思われていたが¹⁷⁾、分岐鎖アミノ酸の組織重量あたりの代謝は、筋組織よりも脂肪組織の方が高く、脂肪組織では分岐鎖アミノ酸濃度に依存して代謝量変動することが明らかとなった¹⁸⁾。また、分岐鎖アミノ酸の代謝酵素である分岐鎖アミノ酸トランスアミナーゼ (branched-chain amino acid transaminase 2: BCAT2) や分岐鎖αケト酸デヒドロゲナーゼ (branched-chain alpha keto acid dehydrogenase: BCKD) などの分岐鎖アミノ酸代謝酵素が脂肪細胞にロイシンを添加することで転写が増加することが示されている¹⁹⁾。また、筋組織ではこれらの代謝酵素の変動が見られないことから、分岐鎖アミノ酸の血中濃度は、脂肪組織の代謝に依存して、脂肪組織が調節していると考えられるに至っている¹⁸⁾。

分岐鎖アミノ酸は、動物に摂取させる際には、ほとんどの場合BCAA (branched-chain amino acid) として一括して扱われて研究されてきたが、今回の結果から、脂肪細胞内への脂肪蓄積に関しては、バリン、イソロイシンに比較して、ロイシン添加の場合に蓄積量が高くなることが分かった。ロイシンは、細胞に取り込まれた後、小胞体にあるロイシンセンサーである Sestrin²⁰⁾ に結合して活性化すると、栄養環境感知システムとしての mTOR を活性化させ、代謝や細胞分裂を促進させている²¹⁾。今回の分岐鎖アミノ酸添加による脂肪蓄積の結果を見ると、バリンとイソロイシンはほぼ同じような脂肪蓄積量を示したが、ロイシンはその25%程度多い脂肪蓄積量を示した。さらに、ロイシンを添加した場合の脂肪蓄積量は、容量依存的に増加したことから (表2)、分岐鎖アミノ酸の中でもロイシンは、単に代謝の基質として使われているだけではなく、シグナルとして機能しているものと考えられる。分岐鎖アミノ酸の脂肪蓄積に対する効果は、バリン、ロイシン、イソロイシンすべての場合で期待できるが、ロイシンが最も効果が高い。

表 2：添加アミノ酸容量依存的 TBR311細胞の脂肪蓄積量

添加アミノ酸	オイルレッド O 吸光度 A ₅₂₀ ±SD	平均変動率 * %
control	0.051±0.007	12
脂肪細胞分化	0.424±0.011	100
アルギニン0.5mM	0.424±0.031	100
アルギニン1.0mM	0.430±0.029	101
アルギニン2.0mM	0.441±0.044	104
ロイシン0.5mM	0.491±0.006	116
ロイシン1.0mM	0.500±0.022	118
ロイシン2.0mM	0.520±0.031	123

脂肪細胞分化誘導後、オイルレッド染色を行い、イソプロパノールでオイルレッドを抽出し、520nmの吸光度を測定した。値は、3ウェルあたりの平均値±標準偏差。controlは、分化誘導を行わない場合。*：脂肪細胞分化誘導した場合の吸光度平均値を100%としたとき、吸光度平均値の割合。

アルギニン、オルニチン、シトルリン)

mTORを活性化させ、代謝や細胞分裂を活性化させている事が知られているもうひとつのアミノ酸がアルギニンである²¹⁾。アルギニンは、細胞内のセンサーであるCASTOR122)に結合して活性化すると、栄養環境感知システムとしてのmTORを活性化させ、代謝や細胞分裂を活性化させている²¹⁾。今回、脂肪細胞へのアルギニン添加による脂肪蓄積量は、アミノ酸添加のない陽性コントロールの場合とほぼ同じ量で、アルギニンの濃度を変化させた場合でも濃度依存的な効果は見られなかった(表2)。mTORを活性化させる点では、ロイシンでもアルギニンでも可能であるが、両アミノ酸受容体以降のmTORに至る過程が異なるので、脂肪細胞ではアルギニン受容体が発現していないことやmTORまでの経路に関わるタンパク質の発現のないことが予想され、脂肪細胞でのCASTOR1の発現量を調べるなどのさらなる検証が必要である。アルギニンが脂肪組織を減少させるという報告²³⁾があるが、個体の脂肪組織を用いた観察で、直接脂肪細胞での作用を見ているわけではない。今回、脂肪細胞分化において、アルギニンによる脂肪蓄積の増加が見られなかったことから、動物実験系でのアルギニン摂取の効果が脂肪細胞のアルギニン受容体を直接介した作用ではなく、二次的な作用ではないかと思われる。

アルギニンは、細胞内の尿素回路の構成アミノ酸であり、アルギニン添加と尿素回路の構成要素であるオルニチ

ンとシトルリンの添加が脂肪蓄積に対する効果を検討したが、前述の通り、アルギニンによる脂肪蓄積促進効果は見られなかったが、オルニチンとシトルリンの添加は、同程度に脂肪蓄積促進効果を観ることができた。オルニチン回路を構成するアミノ酸の中で、なぜオルニチンとシトルリンが脂肪蓄積に効果があってアルギニンにはないのかについては、興味深い結果であり、さらなる詳細な解析が必要である。今回用いたTBR311細胞の脂肪細胞分化は、白色脂肪細胞の表現系を持ったものであるが、褐色脂肪細胞の場合には、アルギニンが分化と増殖を促進することが最近報告されている²⁴⁾。

アスパラギン、アスパラギン酸)

分岐鎖アミノ酸に次いでエネルギー源として用いられているアスパラギン、アスパラギン酸を添加した場合には、脂肪蓄積量が、アスパラギン酸の場合には1.2倍であったが、アスパラギンではほとんど促進作用が無かった。アスパラギンは、アスパラギン合成酵素により容易にアスパラギン酸から合成されることが古くから知られており、アスパラギン酸の添加はアスパラギン添加と同様であろうと予想していたが、予想に反し、両アミノ酸間で差のある理由については、今後の検討が必要である。

トリプトファン、メチオニン、システイン)

ロイシンに次いで脂肪蓄積量が多かったのが、トリプトファン添加(約1.4倍)、メチオニン添加(約1.3倍)の場合であった。メチオニンに関しては、抑制効果を期待して検討したが、脂肪蓄積を促進するという結果を得たので、この効果の理由についてはさらなる検討が必要である。トリプトファンは、ヒトが摂取する場合には、比較的低濃度で、セロトニンやナイアシンの前駆物質として用いられており、今回のような高濃度での検討は、従来、実施されてこなかった。もしも、今回用いた高濃度の摂取が生理的な副作用を生じないのであれば、脂肪蓄積促進効果を期待しての使用が可能かもしれない。

脂肪細胞分化の標準的実験系として使われている3T3-L1細胞では、システインの添加により脂肪細胞分化が促進されることが報告されているが¹¹⁾、今回の結果、システインの添加は、脂肪蓄積には効果が無かった。

今回の11種類のアミノ酸による脂肪蓄積促進効果の結果から、脂肪蓄積促進を期待して経口摂取するとした場合は、分岐鎖アミノ酸、特にロイシンが効果的であろうと考えられる。アスパラギン、アスパラギン酸を利用する際には、アスパラギンを用いた方が脂肪蓄積に影響が無いといえる。一酸化窒素(NO)の産生を期待して使われるアルギニンは、脂肪蓄積の増加は考慮せずに使用できると思われる。

4. 要約

脂肪組織は、脂質代謝を担う重要な組織であるが、脂肪細胞の脂質代謝に対するアミノ酸の役割は、部分的にしか

理解されていない。今回、マウス骨髄由来中胚葉性前駆細胞から脂肪細胞へ分化誘導する過程で、アミノ酸の添加が細胞内の脂肪蓄積に与える影響を検討した。添加した11種類のアミノ酸の内、脂肪蓄積を促進したものが8種類、促進効果の無かったものが3種類で、脂肪蓄積を抑制したアミノ酸は無かった。分岐鎖アミノ酸の中で、ロイシンが最も脂肪蓄積作用が高く、イソロイシンやバリンとは異なる経路で作用していると考えられた。アスパラギンは、細胞内で容易にアスパラギン酸から転換されるにもかかわらず、アスパラギン酸添加の場合のみが脂肪蓄積を促進した。一酸化窒素の供給を期待して用いられているアルギニンは、脂肪蓄積に対しては効果の無いことが分かった。

5. 謝辞

本研究は、2016、2017年度宮城学院女子大学研究助成金により進められた。

6. 引用文献

- 1) Glass CK, Olefsky JM. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell metabolism*, 15, 635–645 (2012)
- 2) Kisty A, et al. Effects of leucine supplementation and serum withdrawal on branched-chain amino acid pathway gene and protein expression in mouse adipocytes. *PLoS One*, 9, e102615 (2014)
- 3) Lackey DE, et al. Regulation of adipose branched-chain amino acid catabolism enzyme expression and cross-adipose amino acid flux in human obesity. *American Journal of Physiology*, 304, E1175–E1187 (2013)
- 4) Rosenthal J, Angel A, Farkas J. Metabolic fate of leucine: a significant sterol precursor in adipose tissue and muscle. *American Journal of Physiology*, 226, 411–418 (1974)
- 5) Newgard C, et al. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell metabolism*, 9, 311–326 (2009)
- 6) Si Y, Yoon J, Lee K. Flux profile and modularity analysis of time-dependent metabolic changes of de novo adipocyte formation. *American Journal of Physiology*, 292, E1637–1646 (2007)
- 7) Lackey D, et al. Regulation of adipose branched-chain amino acid catabolism enzyme expression and cross-adipose amino acid flux in human obesity. *American Journal of Physiology*, E1175–1187 (2013)
- 8) Courtney R, et al. Branched chain amino acid catabolism fuels adipocyte differentiation and lipogenesis. *Nat. Chem. Biol.* 12, 15–21 (2016)
- 9) Joffin N, et al. Citrulline induces fatty acid release selectively in visceral adipose tissue from old rats. *Molecular Nutrition*, 58, 1765–1775 (2014)
- 10) Jobge W, et al. Dietary L-arginine supplementation reduces white fat gain and enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats. *J. Nutr.* 139, 230–237 (2009)
- 11) Ueki I, Stipanuk MH. 3T3-L1 adipocytes and rat adipose tissue have a high capacity for taurine synthesis by the cysteine dioxygenase/cysteinesulfinatase decarboxylase and cysteamine dioxygenase pathways. *J. Nutr.* 139, 207–214 (2009)
- 12) Castellano R, et al. A methionine deficient diet enhances adipose tissue lipid metabolism and alters anti-oxidant pathways in young growing pigs. *PLoS One*, 10(7): e0130514. (2015)
- 13) Inubushi T, et al. L-tryptophan suppresses rise in blood glucose and preserves insulin secretion in type-2 diabetes mellitus rats. *J. Nutr. Sci.* 58, 415–422 (2012)
- 14) Kameoka J, Yanai N, Obinata M. Bone marrow stromal cells selectively stimulate the rapid expansion of lineage-restricted myeloid progenitors. *J Cell. Physiol.* 164, 55–64 (1995)
- 15) Okuyama R, Yanai N, Obinata M. Differentiation capacity toward mesenchymal cell lineages of bone marrow stromal cells established from temperature-sensitive SV40T-antigen gene transgenic mouse. *Exp. Cell Res.* 218, 424–429 (1995)
- 16) Courtney R, et al. Branched chain amino acid catabolism fuels adipocyte differentiation and lipogenesis. *Nat. Chem. Biol.* 12, 15–21 (2016)
- 17) Rosenthal J, Angel A, Farkas J. Metabolic fate of leucine: a significant sterol precursor in adipose tissue and muscle. *American Journal of Physiology*, 226, 411–418 (1974)
- 18) Harman MA, et al. Adipose tissue branched chain amino Acid (BCAA) metabolism modulates circulating BCAA levels. *JBC*, 285, 11348–11356 (2010)
- 19) Kisty A, et al. Effects of leucine supplementation and serum withdrawal on branched-chain amino acid pathway gene and protein expression in mouse adipocytes. *PLoS One*, 9, e102615 (2014)
- 20) Wolfson RL, et al. Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway. *Science*, 351, 43–48 (2016)
- 21) Efeyan A, Comb WC, Sabatini DM. Nutrient sensing mechanisms and pathways. *Nature*, 517, 302–310 (2015)
- 22) Saxton RA, et al. Mechanism of arginine sensing by

- CASTOR1 upstream of mTORC1. *Nature*, 536, 229–233 (2016)
- 23) Tan B, et al. Regulatory roles for L-arginine in reducing white adipose tissue. *Front. Biosci.* 1, 2237–2246 (2012)
- 24) Ma X, et al. L-Arginine promotes protein synthesis and cell growth in brown adipocyte precursor cells via the mTOR signal pathway. *Amino Acids*, 49, 957–964 (2017)