

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14924

研究課題名(和文)心機能維持におけるアミノ酸栄養の重要性

研究課題名(英文)Importance of amino acid nutrition for maintaining heart function

研究代表者

北浦 靖之(Kitaura, Yasuyuki)

名古屋大学・生命農学研究科・講師

研究者番号：90442954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：分岐鎖アミノ酸(BCAA: Branched chain amino acid)の分解を心筋・骨格筋で特異的に促進させ、BCAAが低下したマウス(BDK-mKOマウス)を用いて、BCAA低下による心肥大誘導メカニズムの解明を目的とした。その結果、若年期のBDK-mKOマウスではControlマウスとの間で心臓重量に変化は認められなかったが、BCAA低下が長期的に続くと、特に高脂肪食により、心臓重量、心肥大マーカー遺伝子の増加が顕著に引き起こされ、BCAA投与により、これらの増加が抑制された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the importance of BCAA (Branched chain amino acid) for maintaining heart function using the mice in which BCAAs are decreased by enhanced degradation of BCAA specifically in heart and skeletal muscle (BDK-mKO mice). There was no significant difference in heart weight between control and BDK-mKO mice at young age, however, the middle-aged BDK-mKO mice, especially in the case of feeding high-fat diet, showed significantly increased heart weight and cardiac hypertrophy-related genes which were decreased by BCAA administration.

研究分野：栄養生化学

キーワード：アミノ酸 心臓

1. 研究開始当初の背景

必須アミノ酸であるロイシン、イソロイシン、バリンは、分子内に分岐構造をもつことから、BCAA (Branched-chain amino acid) と称され、ヒトの筋タンパク質、食物タンパク質中に多く含まれている。BCAA は体内で遊離アミノ酸としても存在し、その濃度が上昇するとタンパク質の合成を促進する生理作用を持つ。また、BCAA は運動時に筋肉で分解されエネルギー源となり、イソロイシン、バリンは絶食時に糖原性アミノ酸として肝臓で利用される。BCAA の分解は図 1 に示す反応によりアセチル CoA、スクシニル CoA などに分解され、TCA サイクルに供給される。このうち、第 1、第 2 ステップは 3 つの BCAA に共通であり、第 1 ステップで BCAA アミノ基転移酵素 (BCAT: BCAA aminotransferase) により、分岐鎖 α -ケト酸 (BCKA: Branched-chain α -keto acid) となる。BCAA 代謝の第 2 ステップでの BCKDH (BCKA dehydrogenase) により、BCKA から分岐鎖アシル CoA (BCA-CoA: Branched-chain acyl-CoA) が生成され、その後はそれぞれ別々の経路で代謝されてアセチル CoA またはスクシニル CoA となる。さらに、BCKDH の活性は、リン酸化・脱リン酸化により調節され、BCKDH をリン酸化 (不活性化) する酵素が BCKDH キナーゼ (BDK) である (*J Nutr.* (2006) 136: 250S-253S)。

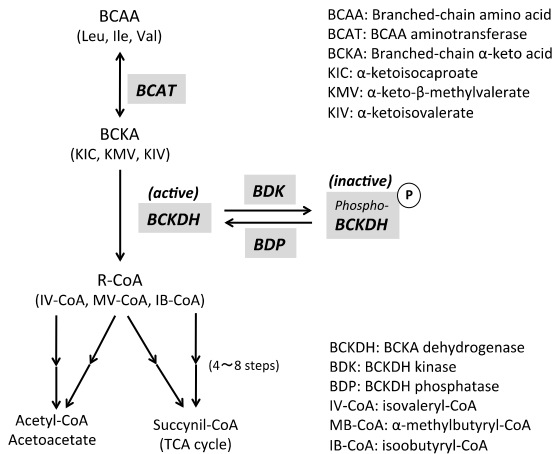


図 1 . BCAA 分解機構の略図

この BDK を欠損させたマウス (BDK-KO マウス) では、BCAA の分解が亢進し、BCAA 濃度が低下し、脳神経系に異常が見られる (*Biochem. J.* (2006) 400: 153-162)。本研究では Cre-loxP システムを用いて、心筋・骨格筋特異的に BDK 欠損マウス (BDK-mKO マウス) の作製に成功し、心筋、骨格筋での BCAA 不足による生理現象について解析を行っている (図 2)。このマウスを長期間 (70 週間) 飼育したところ、BCAA 濃度が正常な Control マウスに比べて、生存率の低下が見られるこ

と、生存した BDK-mKO マウスの組織重量を測定すると、骨格筋の重量に大きな差は見られなかったが、心臓の重量が BDK-mKO マウスで有意に増加している予備のデータが得られた。このことから、心筋での慢性的な BCAA 低下が心肥大を引き起こし、生存率を低下させる可能性が考えられるが、なぜ、BDK-mKO マウスで心肥大が引き起こされるかは全く不明である。

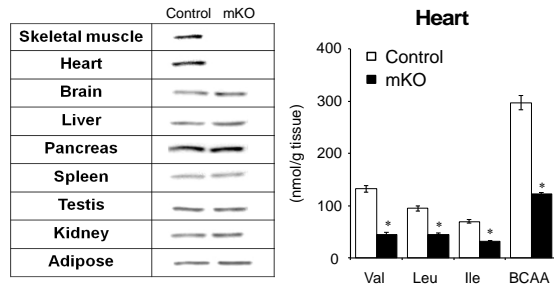


図 2 . BDK-mKO マウスの各組織における BDK の発現 (左) と心臓の BCAA 濃度 (右)

心肥大は心不全の前段階としてばかりでなく、多くの心疾患の危険因子となる。実験的にマウスに心肥大を引き起こすと、炎症細胞浸潤、間質の線維化などの組織学的な変化 (リモデリング) が起き、最終的には心機能が低下し心不全となる。アミノ酸と心疾患に関しては、アミノ酸投与により慢性の心不全患者における炎症マーカーが低下すること、BCAA 含量を増加した食餌で慢性の心疾患の高齢者の運動能力を改善すること、心血管疾患で BCAA が増加すること、また、ゼブラフィッシュの発生過程で BCAA を増加させると心臓の発生に異常がみられることなどが報告されているが、哺乳類の心疾患、特に心肥大に対する BCAA の直接的な効果についてのエビデンスはこれまで得られていない (*Cardiovasc. Res.* (2011) 90, 220-223)。

2. 研究の目的

本研究では、BDK-mKO マウスを短期間もしくは長期間飼育し、心臓における継時的変化を明らかにし、BCAA 低下による心肥大誘導メカニズムの解明を目的とする。また、これらの変化が BCAA を投与した際に抑えられるかについても明らかにする。本研究により、このマウスが新たな心肥大のモデル動物として利用できるとともに、BCAA 不足と心肥大の関連について明らかにすることで、心肥大予防のためのアミノ酸栄養について有益な情報を提供できると期待される。BCAA による心機能維持の解明はアミノ酸栄養領域では新しい試みであるとともに、心肥大予防に寄与しようとする健康寿命の促進に貢献できる。

3. 研究の方法

BCAA の心筋・骨格筋における生理機能を検討するために、Cre-loxP システムを用いて BDK を心筋・骨格筋特異的に欠損させ、BCAA 濃度を低下させたマウス(BDK^{flax/flax}, creatine kinase-Cre Tg マウス: BDK-mKO) を使用し、心筋・骨格筋中 BCAA 濃度が正常な Control マウスとして、BDK^{flax/flax} マウスを使用した。離乳後(約 5 週齢)の BDK-mKO および Control マウスに、それぞれ通常食 (RD: Regular Diet, Protein 20 kcal%, Carbohydrate 70 kcal%, Fat 10 kcal%: D12450J (Research Diets Inc.)) を与える群 (RD 群)、低タンパク質食 (LPD: Low Protein Diet, Protein 8 kcal%, Carbohydrate 82 kcal%, Fat 10 kcal%: D12450J (Research Diets Inc.)) を与える群 (LPD 群)、高脂肪食 (HFD: High Fat Diet, Protein 20 kcal%, Carbohydrate 20 kcal%, Fat 60 kcal%: D12492 D12450J (Research Diets Inc.)) を与える群 (HFD 群) を設けた。また、2 週間の運動トレーニング (1 週目: 勾配 10%、15 m/分 x 60 分/日 x 5 日/週、2 週目: 勾配 10%、18 m/分 x 60 分/日 x 5 日/週) を負荷させた群、さらに、BCAA 不足を補うため、3% BCAA (Leu:Ile:Val=2:1:1) を含む飲料水を自由摂取させる群 (+BCAA 群) を設けた。また、トレーニング群においては、トレーニング前後での走運動テスト (勾配 10%、速度 15 m/分から開始、4 分毎に 1 m/分ずつ速度を上げ、マウスが疲労困憊になるまでの走行距離を測定) を行った。

以上の条件で、約 3 ヶ月齢まで飼育した若年期のマウス、および約 12 ヶ月齢まで長期飼育した中高齢期のマウス、トレーニング群においては、走運動 (勾配 10%、速度 15 m/分から開始、4 分毎に 1 m/分ずつ速度を上げ 32 分間) 負荷したマウスについて、以下の解析を行った。各組織重量を測定し、採取した血液成分 (グルコース、インスリン、トリグリセリド、遊離脂肪酸など) の濃度をそれぞれ測定キットにより測定した。また、血中および各組織中のアミノ酸濃度を自動アミノ酸分析機により測定した。グリコゲンフェノール-硫酸法を用いて測定した。心筋、骨格筋から可溶性と筋線維タンパク質を調製し、それぞれ組織重量あたりの濃度を定量した。BCAA が作用する mTORC1 タンパク質合成系、オートファジー分解系などの総タンパク質量とそれぞれの活性調節部位のリン酸化タンパク質、分解タンパク質量を Western blotting により解析した。ユビキチン・プロテアソーム分解系遺伝子、心肥大、繊維化、炎症に関連するマーカー遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で調べた。

4. 研究成果

通常食 (RD 群)、低タンパク質食 (LPD 群)、高脂肪食 (HFD 群)、すべての食餌群において、若年期の Control マウスと BDK-mKO マ

ウスとの間で体重、心臓、骨格筋をはじめ各組織重量、血中成分において有意な差は認められなかった。骨格筋のタンパク質量について、可溶性タンパク質、筋原線維タンパク質に分離し、それぞれのタンパク質濃度を測定したところ、HFD 群では変化は認められなかったが、LPD 群では、Control マウスに比べ BDK-mKO において有意に低下した。さらに mTORC1 タンパク質合成系について、mTORC1 の基質である S6K1, 4E-BP1 のリン酸化を Western blotting により定量したところ、LPD 群で同様に BDK-mKO において有意に低下した (図 3)。これらの変化は BCAA 水摂取により、有意差が見られなくなったことから、BCAA の低下は筋原線維タンパク質の低下を引き起こすことが明らかとなった。

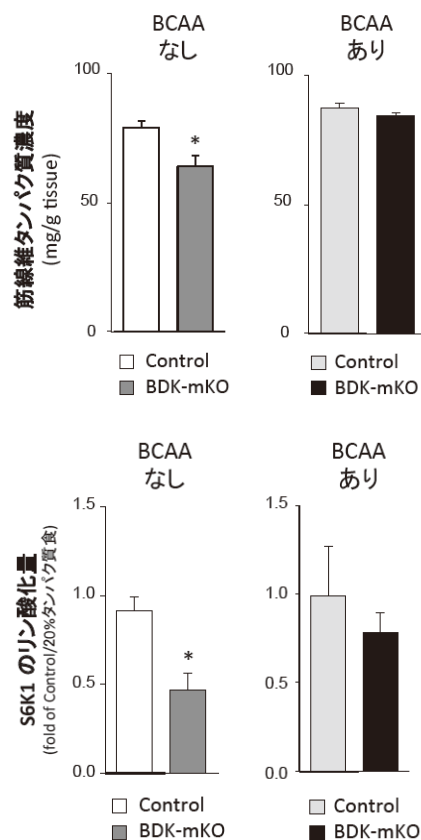


図 3 . BDK-mKO マウスの LPD 摂取後の筋原線維タンパク質濃度 (上) と S6K1 のリン酸化量 (下)

若年期の RD 群で 2 週間の走運動トレーニングを負荷させたところ、Control マウスと BDK-mKO マウスとの間で体重および心臓、骨格筋をはじめ各組織重量、血中成分において有意な差は認められなかった。走運動トレーニングの前後に走運動能力テストを行ったところ、トレーニング前では Control マウスと BDK-mKO マウスとの間で走行距離に有意な差は認められなかった。トレーニング後の走行距離はトレーニング前に比べて増加

したが、Control マウスに比べ BDK-mKO の走行距離が有意に低下し、骨格筋中のグリコーゲン量も有意に低下した。このマウスに BCAA 水を摂取させ、走運動トレーニングを负荷させると、Control マウスに比べてトレーニング後の走行距離が BDK-mKO で有意に上昇し、骨格筋中のグリコーゲン量も Control マウスと同程度となった(図4)。このことから、BCAA の低下は走運動トレーニング効果を低減させることが明らかとなった。

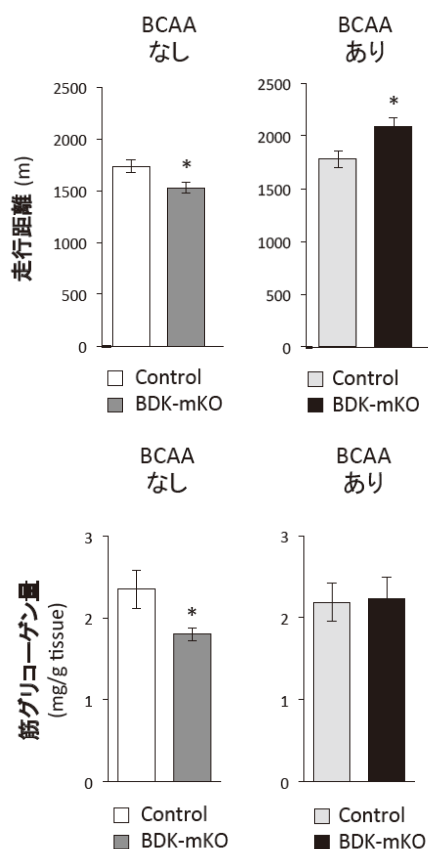


図4 . BDK-mKO マウスの走運動トレーニング後の走行距離(上)と筋グリコーゲン量(下)

約 12 ヶ月齢まで長期飼育した中高齢期のマウスでは、通常食 (RD 群) 低タンパク質食 (LPD 群) 高脂肪食 (HFD 群) すべての食餌群で Control マウスに比べて BDK-mKO マウスの心臓重量が有意に増加し、特に HFD 群で心肥大が顕著に見られた。また、HFD 群のマウスに 3 %BCAA を含む飲料水を与えて飼育したところ、Control マウスと BDK-mKO マウスとの間で心臓重量に有意な差が見られなかった(図5)。さらに、Control マウスに比べて、心臓における心肥大関連遺伝子、炎症関連遺伝子の発現が BDK-mKO マウスで有意に増加し、BCAA 水摂取により差が見られなくなった。

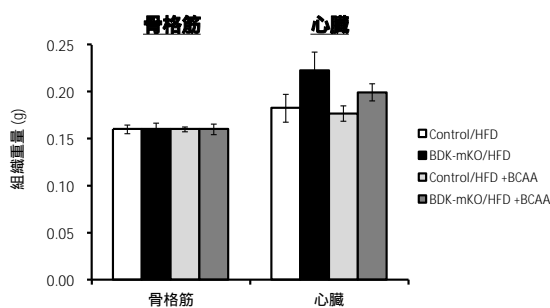


図5 . 高脂肪食(HFD)での長期飼育による BDK-mKO マウスの骨格筋および心臓重量

以上の結果から、若年期の LPD 群で BDK-mKO マウスの骨格筋の筋原線維タンパク質濃度、mTORC1 経路の活性が低下したが、BCAA 摂取により回復した。また、走運動トレーニング負荷後の運動能力が BDK-mKO マウスで低下し、BCAA 摂取により増加したことが示されたが、心臓重量に変化は認められなかったことから、運動トレーニング負荷による心機能の維持に BCAA 濃度の維持が重要である可能性が示唆された。さらに、BCAA 低下が長期的に続くと心肥大、特に高脂肪食による心肥大が顕著に引き起こされることが考えられ、BCAA 投与により心肥大が抑制される可能性が示唆された。心臓特異的にオートファジーを不活性化させたマウスでも心肥大が認められたことから、心臓でのアミノ酸、特に BCAA の低下は心肥大を引き起こすことが考えられ、BCAA 投与により心肥大が改善される可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Xu M, Kitaura Y, Shindo D, Shimomura Y. Branched-chain amino acid (BCAA) supplementation enhances adaptability to exercise training of mice with a muscle-specific defect in the control of BCAA catabolism. *Biosci Biotechnol Biochem.* (2018) in press. (査読有)

2. Xu M, Kitaura Y, Ishikawa T, Kadota Y, Terai C, Shindo D, Morioka T, Ota M, Morishita Y, Ishihara K, Shimomura Y. Endurance performance and energy metabolism during exercise in mice with a muscle-specific defect in the control of branched-chain amino acid catabolism. *PLoS One.* (2017) 12(7) e0180989. (査読有)

3. Ishikawa T, Kitaura Y, Kadota Y, Morishita Y, Ota M, Yamanaka F, Xu M, Ikawa M, Inoue N,

Kawano F, Nakai N, Murakami T, Miura S, Hatazawa Y, Kamei Y, Shimomura Y. Muscle-specific deletion of BDK amplifies loss of myofibrillar protein during protein undernutrition. *Sci Rep*. (2017) 7, 39825. (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 山田 靖子, 山中 郁弥, 佐野 仁志, 北浦 靖之, 下村 吉治
骨格筋タンパク質合成に対する筋特異的 BCAA 代謝亢進と低タンパク質食摂取の影響
第 72 回日本栄養・食糧学会大会、岡山県立大学 (岡山県総社市) 2018 年 5 月

2. Kitaura Y

Exploring BCAA function using gene-engineered mice.
IUNS2017/21stICN, Sheraton Buenos Aires Hotel & Convention Center, Buenos Aires, Argentina. 2017 年 10 月

3. 北浦 靖之

遺伝子改変マウスを用いた分岐鎖アミノ酸の生理機能の解明
日本アミノ酸学会第 11 回学術大会、京都府立大学稲盛記念会館 (京都市) 2017 年 9 月

4. 山中 郁弥, 石川 卓弥, 森下 由佳子, 山田 靖子, 北浦 靖之, 下村 吉治
恒常的な筋特異的 BCAA 分解亢進による筋タンパク質代謝の変化
第 71 回日本栄養・食糧学会大会、沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市) 2017 年 5 月

5. 北浦 靖之, Xu Minjun, 寺井 智勇, 新土 大地, 下村 吉治
恒常的 BCAA 分解亢進は運動トレーニング効果にどのように影響するか
日本農芸化学会 2017 年度大会、京都女子大学 (京都市) 2017 年 3 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北浦 靖之 (KITAURA, Yasuyuki)
名古屋大学大学院生命農学研究科・講師
研究者番号 : 90442954

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

下村 吉治 (SHIMOMURA, Yoshiharu)
名古屋大学大学院生命農学研究科・教授
研究者番号 :

(4) 研究協力者

()