

平成21年 5月29日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580133
 研究課題名（和文）血糖値低下を誘導するイソロイシンの糖代謝調節シグナル分子としての機能の解析
 研究課題名（英文）Analysis of the function of isoleucine, a blood glucose-lowering amino acid, as the signal molecule that regulates glucose metabolism
 研究代表者
 吉澤 史昭（YOSHIZAWA FUMIAKI）
 宇都宮大学・農学部・教授
 研究者番号：10269243

研究成果の概要：アミノ酸のひとつであるイソロイシン(Ile)は、血糖値を低下させる機能を有する。この機能に注目して、Ileの糖代謝調節機能の全貌を把握することを目指して研究を行った。その結果、Ileが骨格筋への糖の取り込みを刺激するとともに、全身での糖の酸化的利用を促進する機能を有することが明らかとなった。さらにIleは、肝臓での糖新生を抑制する機能を有しており、これらの機能によってIleは血糖値を低下させることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,800,000	540,000	2,340,000
20年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：栄養化学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：イソロイシン、血糖値、糖代謝、糖新生、糖尿病、肝臓、ラット

1. 研究開始当初の背景

アミノ酸はタンパク質の構成成分であり、タンパク質は体組織の主たる成分であると同時に酵素やホルモン、抗体その他さまざまな形で生体機能に重要な役割を有している。さらにアミノ酸はタンパク質の構成成分としてだけでなく、細胞内や血漿などに遊離した形で存在し、生体内でさまざまな役割を担っている。最近、アミノ酸のなかでも特に分岐鎖アミノ酸（ロイシン、イソロイシン、バリン）が、その古典的な栄養素としての機能ではなく、より新しい有効性の面から注目されている。

研究代表者らは、過去10年間の研究で、分岐鎖アミノ酸のロイシンが骨格筋のタンパク質合成を刺激しタンパク質分解を抑制する機能を有することを明らかにした。また、この研究の過程で分岐鎖アミノ酸のなかでもロイシンとイソロイシンが血糖値低下作用を有することを発見した。平成17-18年度科学研究費補助金（基盤研究C）「分岐鎖アミノ酸の血糖値低下作用の機構解析とその糖尿病治療への寄与」の助成を得て、ロイシンとイソロイシンが血糖値を低下させる機構の解明を目指して解析を行った結果、これらのアミノ酸は骨格筋への血中グルコースの取り込みを促進する作用を有しており、こ

の作用が血糖値の低下をもたらす一因になっていることを明らかにした。さらに、血糖値を低下させる作用はロイシンよりもイソロイシンの方が強く、イソロイシンはグリコーゲン合成を刺激しないことから、イソロイシンの作用によって骨格筋へ取り込まれたグルコースはエネルギー源として利用されていることが示唆された。

以上のように分岐鎖アミノ酸は、タンパク質代謝を調節する作用を有するだけでなく糖代謝を調節する作用も併せ持っていることが次第に明らかになってきた。分岐鎖アミノ酸の糖代謝調節作用はこれまでに明らかにされていなかった分岐鎖アミノ酸の新機能であり、この機能についての研究は研究代表者らの研究が先行しているが、現在のところ骨格筋での解析データがあるのみで、他の抹消組織や糖代謝において重要な役割を果たしている肝臓での解析は行われていない。Macro-nutrient (体にエネルギーを与え、体の構造部分の基になる栄養素) であるアミノ酸が持つ作用の全貌を把握するためには、その作用を複数の組織で解析し比較することが必須である。

2. 研究の目的

本研究は、分岐鎖アミノ酸のなかでも特にイソロイシンに注目して、イソロイシンの糖代謝調節機能の全貌を把握することを目指し、以下のことを明らかにすることを目的とした。

(1)イソロイシンが組織へのグルコース取り込みに与える影響を調べる

これまでの研究で、イソロイシンは骨格筋への血中グルコースの取り込みを促進する作用を有することを明らかにした。骨格筋は体の中で約 40% を占める最大の組織であることから、骨格筋への血中グルコースの取り込み促進が血糖値の低下に大きく影響することは明らかであるが、イソロイシンが血糖値を低下させるメカニズムの全貌を解明するには、イソロイシンの骨格筋以外の組織への血中グルコースの取り込み能を評価する必要がある。そこで糖代謝において重要な役割を担っている組織である①脂肪組織 (脂質代謝や糖代謝の接点となって生体全体のエネルギーバランスの要となっている) ②肝臓 (生体の血糖値の調節において重要な役割を果たしている) への血中グルコースの取り込みに対してイソロイシンがどのような影響を及ぼすのかを明らかにする。

(2)イソロイシンが全身糖酸化量に与える影響を調べる

イソロイシンはグルコースの骨格筋への取り込みを促進するにもかかわらず、取り込まれたグルコースはグリコーゲンとして貯蔵されるのではないこと、また、イソロイシン投与によって筋肉中のエネルギー状態が改善されることなどから、イソロイシンは糖の酸化を促進する機能を有することが示唆された。そこでイソロイシン投与が全身の糖酸化能に与える影響を調べる。

(3)イソロイシンが肝臓からのグルコースの放出に与える影響を調べる

血糖値は、組織へのグルコースの取り込みと組織からのグルコースの放出のバランスによって巧みに制御されている。生体はグルコースをグリコーゲンの形で肝臓に貯えており、絶食時にはグリコーゲンがグルコースに分解されて血中に放出されるが、貯蔵量には限界があるため高等動物は糖以外の物質からグルコースを合成して血液中に放出する (糖新生)。糖新生活性を示す組織は肝臓と腎臓であるが、血糖の恒常性に大きく寄与しているのは肝臓である。肝臓は糖新生活性のみでなく、グリコーゲンの貯蔵能が高いからである。したがって、イソロイシンによって誘導される血糖値低下に肝臓からのグルコースの放出の減少が大きく関わっている可能性がある。そこで、イソロイシンが肝臓からのグルコースの放出に与える影響を明らかにする。

(4)糖尿病モデルラットを用いてイソロイシンの食後高血糖抑制作用を解析する

近年、複数の長期にわたる臨床試験の結果がまとめられ、糖尿病の発症早期からできるだけ正常に近い血糖コントロールを維持すれば、合併症のリスクを軽減しうることが明確に示された。そこで、イソロイシンの血糖値低下作用に注目して、イソロイシンを経口摂取して食中・食後の血中イソロイシン濃度を高く維持することで、糖尿病時の食後高血糖の抑制が可能であるかを調べて、イソロイシンの糖尿病治療への貢献の可能性を調べる。

3. 研究の方法

(1)イソロイシンが組織へのグルコース取り込みに与える影響の解析

16 時間絶食させた 7 週齢の Wistar 系雄ラットに、水に溶解したロイシン (Leu)、あるいはイソロイシン (Ile) を 0.45 g/kg b.w. 経口投与し、正確に 20 分後に 2-[1,2-³H]-deoxyglucose (2-[³H]DG) を 30 μ

Ci/kg b.w. 静脈から投与した。また、生理食塩水を経口投与したラットを対照群とした。2-[³H]DG を投与して 40 分後 (Leu, Ile、あるいは生理食塩水を投与してから 60 分後) に、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で腓腹筋、睾丸周辺脂肪組織、肝臓を摘出した。各組織中の 2-[1,2-³H]-DG-phosphate (2-[³H]DGP) 量を測定して、組織中の 2-[³H]DGP 蓄積量と 2-[³H]DG 投与後の血漿中 2-[³H]DG レベルの積分値と平均血糖値を用いて各組織への糖の取り込み量を算出した。

(2) イソロイシンが全身糖酸化量に与える影響の解析

16 時間絶食させた 7 週齢の Wistar 系雄ラットに Ile を 0.45 g/kg b.w. 経口投与し、[U-¹⁴C]-glucose を 30 μ Ci/kg b.w. 静脈内投与した後、直ぐに呼気ガスを集めることのできるアクリル製の代謝ケージにラットを移した。ケージから 8 L/min の流速で空気を取り出し、CO₂ を集める前に空気中の水蒸気を除いた。30 分間に排出される呼気中の CO₂ を、30 分毎に 30 分後、60 分後、90 分後に集めて、集めたガスから CO₂ をトラップするために、ガスをゆっくりとエタノールアミン溶液 20 mL に通した。そして、エタノールアミン溶液中の ¹⁴C の比放射能を測定して、投与した総放射能に対する割合を求めた。

(3) イソロイシンが肝臓からのグルコースの放出に与える影響の解析

① G6Pase と PEPCK の mRNA 量の測定

肝臓における糖新生の律速酵素である glucose-6-phosphatase (G6Pase) と phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) の mRNA 量を、常法に従ってリアルタイム定量 PCR を用いて測定した。プライマーとプローブセットのシークエンスは以下の通りである。

G6Pase :

(forward) 5-GACCTCAGGAACGCCTTCTATG-3
(reverse) 5-AGGAGATTGATGCCACAGTCT-3
(probe) 5-FAM-CCTCTTTCCCATCTGGTTCCA
CATTCA-TAMRA-3

PEPCK:

(forward) 5-CCCAGGAGTCACCATCACTTC-3
(reverse) 5-GGTGCAGAATCGCGAGTTG-3
(probe) 5-FAM-CACGGTTCCTCATCTGTGGT
CTCCA-TAMRA-3 (probe)

② G6Pase の活性測定

G6Pase の活性は、基質としてグルコース

-6-リン酸を用いて、グルコース-6-リン酸からのリン酸の遊離能によって評価した。肝臓を 0.25 M sucrose-HEPES buffer (pH 7.4) 中でホモジナイズし、3,000g で遠心分離した。遠心上清 100 μ l に 0.5 % Sodium choleate 溶液 10 μ l を加え、氷上に 30 分間放置した。その後、0.25 M sucrose-HEPES buffer (pH 7.4) を 290 μ l 加えた。この溶液 60 μ l に reaction buffer (0.5 M Tris buffer (pH 6.5): 25 μ l, 100 mg/ml BSA: 20 μ l, 0.1 M glucose-6-phosphate: 40 μ l, 蒸留水: 55 μ l) を加えて、37°C で 0 分間、あるいは 20 分間インキュベートした。3.5% トリクロロ酢酸を 600 μ l 加えて反応を停止させて、4°C、3,000g で 10 分間遠心分離した。その上清 300 μ l にリン酸試薬 (ammonium molybdate tetrahydrate を 5 %、Ion (II) sulfate heptahydrate を 1% 含む 4 N HCl 溶液) 300 μ l を加えて室温で 10 分間反応させ、650 nm の吸光度を測定することで上清に含まれる遊離リン酸量を求めた。そして、0 分間インキュベーションしたサンプルと 20 分間インキュベーションしたサンプルに含まれる遊離リン酸量の差から、G6Pase の活性を求めた。

(4) 糖尿病モデルラットを用いたイソロイシンの食後高血糖抑制作用の解析

(実験 1)

3 時間の時間制限給餌に馴致した 5 週齢の Wistar 系雄ラットに、3 時間の給餌開始直前に Ile (135mg/100g 体重)、あるいは生理食塩水を経口投与した。Ile を投与したラットには給餌開始と同時に水、1% Ile 溶液、2% Ile 溶液、3% Ile 溶液を飲料として与え、その後 5 時間自由摂取させた (順に 0% 群、1% 群、2% 群、3% 群)。生理食塩水を経口投与したラットには給餌開始と同時に水を飲料として与え、その後 5 時間自由摂取させた (Sal 群)。実験開始日から 9 日目まで 1 日おきに計 5 日間、経口投与直前、投与 1、3、5 時間後に尾静脈から採血し、ラットごとに同じ時間にサンプリングした血液を 5 日分プールして、血糖値をグルコースオキシダーゼ法で、血中インスリン濃度をエンザイムイムノアッセイ法で、血中アミノ酸濃度をアミノ酸アナライザーを用いて測定した。

(実験 2)

ストレプトゾトシン (STZ) (75mg/kg 体重) を投与して 1 型糖尿病を誘発させた 5 週齢の Wistar 系雄ラットを、実験 1 の 3% 群、あるいは Sal 群と同じ処理をした 2 群に分けた。STZ 投与の翌日から 10 日目まで 1 日おきに、実験 1 と同様に血糖値・血中インスリン濃度・血中アミノ酸濃度を測定した。また、12

日目に麻酔下で全血採血して、血中ヘモグロビン A1c(HbA1c)をラテックス凝集比濁法で、1,5-アンヒドログルシトール(1,5-AG)を酵素法で測定した。

4. 研究成果

(1)イソロイシンが組織へのグルコース取り込みに与える影響

生体において血糖値が下がるときには、インスリン依存的・非依存的に関わらず肝臓や末梢組織である筋肉、脂肪組織への糖の取り込み量が増加している可能性が高い。そこで我々は、イソロイシンが肝臓や末梢組織（骨格筋・脂肪組織）への糖の取り込みに与える影響についてラットを用いて調べた。一晚絶食にしたラットに、イソロイシンを血漿グルコース濃度低下作用の最大有効量 (0.45g/kg bw) 投与し、1時間後に肝臓、骨格筋、脂肪組織を摘出して、各組織へのグルコースの取り込み量を調べた。その結果、イソロイシンの投与で血漿グルコース濃度はコントロール群に比べて有意に 20%低下し (図 1)、グルコースの取り込み量は骨格筋においてのみイソロイシン投与によって有意に 71%高い値を示した (図 3~5)。また、血中インスリン濃度はイソロイシン投与群とコントロール群間で有意な差はなかった (図 2)。一方、ロイシン投与群では他の群に比べて血中インスリン濃度は高い値を示したが (図 2)、各末梢組織へのグルコースの取り込み量に有意な変化は見られなかった (図 3~5)。これらのことから、イソロイシンによるグルコース取り込み亢進は主に骨格筋で行われていることが示された。

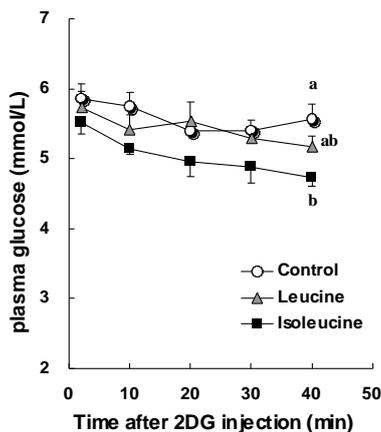


図 1. ロイシンおよびイソロイシンが血漿グルコースレベルに与える影響
結果は平均値±標準誤差で表示。異なるアルファベット間で有意差あり (Tukey-Kramer test: $p < 0.05$)。

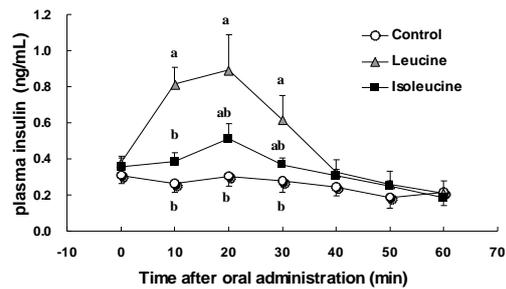


図 2. ロイシンおよびイソロイシンが血漿インスリンレベルに与える影響
結果は平均値±標準誤差で表示。異なるアルファベット間で有意差あり (Tukey-Kramer test: $p < 0.05$)。

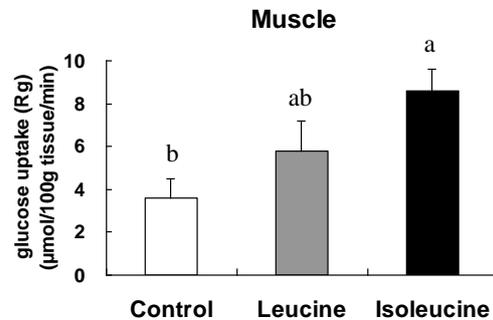


図 3. ロイシンおよびイソロイシンが骨格筋への糖の取り込みに与える影響
結果は平均値±標準誤差で表示。異なるアルファベット間で有意差あり (Tukey-Kramer test: $p < 0.05$)。

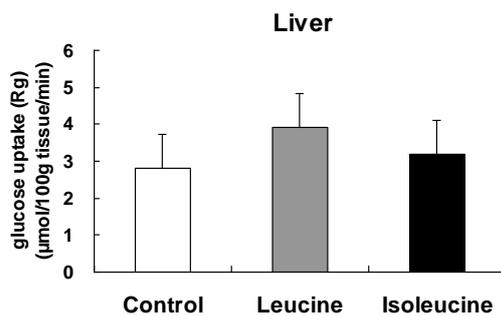


図 4. ロイシンおよびイソロイシンが肝臓への糖の取り込みに与える影響

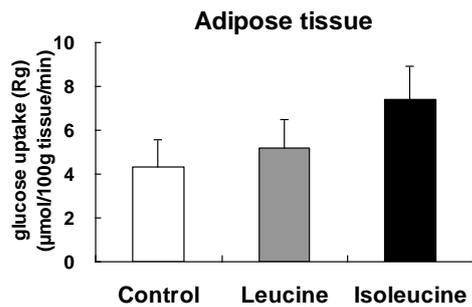


図5. ロイシンおよびイソロイシンが脂肪組織への糖の取り込みに与える影響

(2)イソロイシンが全身糖酸化量に与える影響

ラットにイソロイシンを経口投与するのとほぼ同時に ^{14}C で標識したグルコースを静脈から投与し、30分毎にラットの呼気中に排泄される ^{14}C 標識された CO_2 の量を測定することでグルコースの利用率を評価した。その結果、イソロイシン経口投与後60分から90分の間において、呼気中 $^{14}\text{CO}_2$ 排泄量が増加した (図6)。このことからイソロイシン投与によりグルコース利用が亢進していること、すなわち、取り込まれたグルコースの酸化が亢進していることが示された。

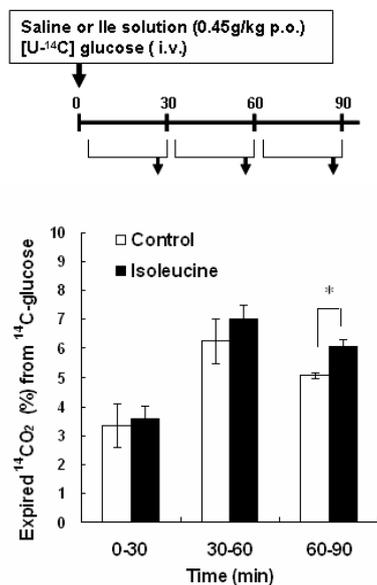


図6. イソロイシンが[U- ^{14}C]-glucose から呼気排出 $^{14}\text{CO}_2$ への変換に与える影響
結果は平均値±標準誤差で表示。* $p < 0.05$ (Student t-test)。

(3)イソロイシンが肝臓からのグルコースの放出に与える影響

絶食状態の肝臓では、アラニンなどの糖新生基質よりピルビン酸などを経てグルコースが生成される。そのピルビン酸からグルコース生成への反応には4種の糖新生律速酵素が関与することが知られているが、その中でも phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)は糖新生能やその活性と mRNA 量に相関があることが分かっている。そこで我々は、イソロイシン投与ラットの肝臓やラット単離肝細胞を用いて、イソロイシンが肝臓での糖新生や糖新生律速酵素に与える影響について調べた。

ロイシン、あるいはイソロイシンを経口投与したラットの肝臓を調べたところ、イソロイシンを投与したラットの肝臓においてのみ PEPCK の mRNA 量および別の糖新生律速酵素である glucose-6-phosphatase (G6Pase)の mRNA 量 (図7) と活性 (図8) がコントロール群に比べて有意に低下していた。したがって、イソロイシン投与によって肝臓では糖新生が抑制されていると考えられる。

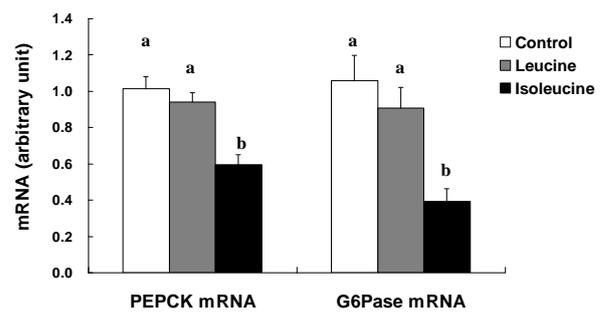


図7. ロイシンおよびイソロイシンが PEPCK mRNA および G6Pase mRNA 発現に与える影響

結果は平均値±標準誤差で表示。異なるアルファベット間で有意差あり。

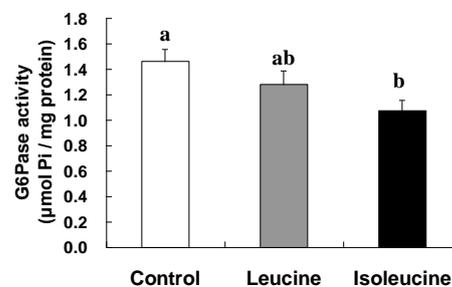


図8. ロイシンおよびイソロイシンが G6Pase 活性に与える影響

結果は平均値±標準誤差で表示。異なるアルファベット間で有意差あり。

また、単離肝細胞を用いた実験で、培地にイソロイシン、あるいはロイシンを 3 mM 添加すると、イソロイシンを添加した場合にアラニンを基質としたグルコース産生量が有意に減少した (図 9)。一方、ロイシンを添加した場合はコントロール群との間に有意な差は認められなかった (図 9)。インスリン非存在下の *in vitro* 系においてイソロイシンによるグルコース産生低下が認められたことから、イソロイシンを投与したラットにおける糖新生抑制作用はインスリン非依存的作用であることが示唆された。

これらのことから、ラットへのイソロイシン経口投与は、骨格筋への糖取り込み量と全身の糖の酸化的利用能を亢進し、かつ肝臓においては糖新生を抑制し、これらの作用が血糖値の低下に寄与していることが示唆された。

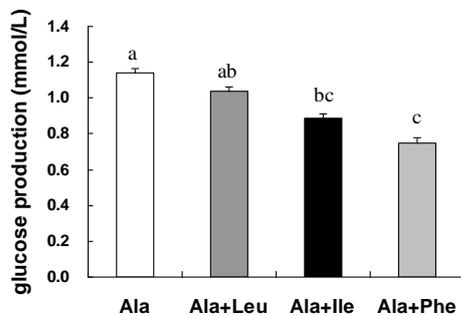


図 9. ラット単離肝細胞において、ロイシンおよびイソロイシンがアラニンからのグルコース産生に与える影響
結果は平均値±標準誤差で表示。異なるアルファベット間で有意差あり (Tukey-Kramer test: $p < 0.05$)。

(4)糖尿病モデルラットを用いたイソロイシンの食後高血糖抑制作用の解析

(実験 1)

Ile 溶液を飲料として与えることで、食後の血糖値上昇が抑制され、その効果は 3%群で最も顕著であった (図 10)。3%Ile 溶液を投与しても体重増加の阻害、摂食量の減少が見られなかったことから (データ示さず)、Ile 投与によるアミノ酸インバランスは起こっていないと考えられる。

(実験 2)

正常ラットと同様に糖尿病ラットでも、給餌開始直前に Ile を経口投与し、給餌開始と同時に 3%Ile 溶液を飲料として与えることで食後血糖値上昇の抑制が見られた (図 11)。また、過去数日間の血糖コントロール状態を反映する 1,5-AG は群間に差はなく (データ示

さず)、過去 1~2 カ月間の血糖コントロール状態を反映する HbA1c は Ile 投与群で低下した (図 12)。

以上から、食中・食後の Ile の経口摂取は糖尿病時の食後高血糖の抑制に有効であり、糖尿病合併症のリスク軽減に効果的である可能性が示唆された。

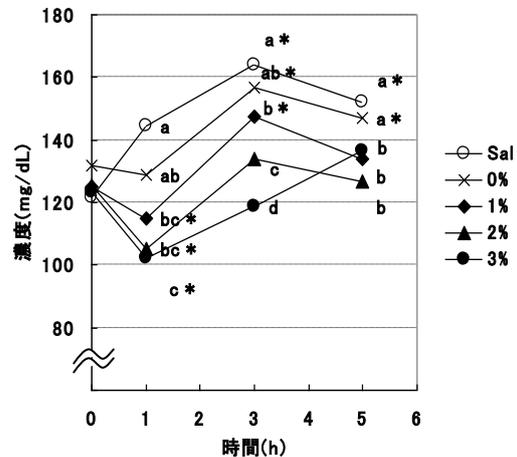


図 10. イソロイシン経口投与後の血糖値の変化
結果は平均値で表示。同時刻において、異なるアルファベット間で有意差あり (Tukey-Kramer test: $p < 0.05$)。*: 基礎値 (0h) と比較して有意差あり (Student t-test: $p < 0.05$)。

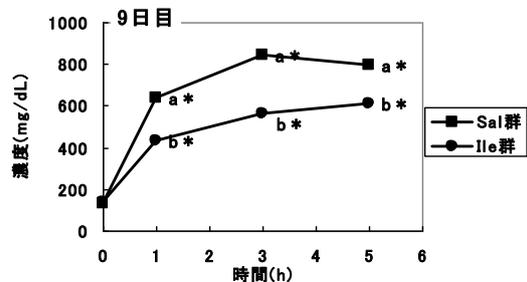


図 11. 採血開始後 9 日目におけるイソロイシン経口投与後の血糖値の変化
結果は平均値で表示。同時刻において、異なるアルファベット間で有意差あり (Tukey-Kramer test: $p < 0.05$)。*: 基礎値 (0h) と比較して有意差あり (Student t-test: $p < 0.05$)。

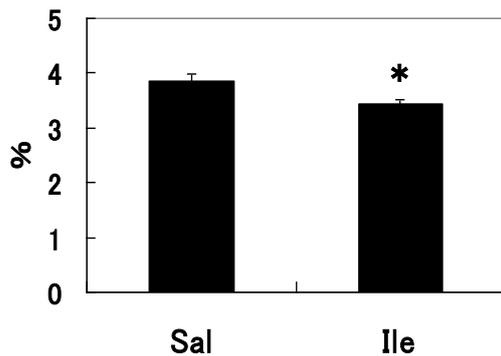


図 12. イソロイシン投与による血中 HbA1c 値の変化
結果は平均値±標準誤差で表示。* $p < 0.05$ (Student t-test)

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 吉澤史昭、スポーツとアミノ酸、**Functional Food**、2、240-248、2008 (審査無し)
- ② 土居雅子、山岡一平、中山満雄、菅原邦生、吉澤史昭、アミノ酸による血糖値低下作用-イソロイシンのグルコース代謝へ及ぼす影響について-、栄養生理研究会報、52、27-36、2008 (審査有り)
- ③ 吉澤史昭、分岐鎖アミノ酸によるタンパク質代謝調節と糖代謝調節、アミノ酸研究、1、9-17、2007 (査読無し)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 吉澤史昭、関山絵梨、高平奈央、菅原邦生、糖尿病モデルラットを用いたイソロイシンの食後高血糖抑制作用の解析、第 63 回日本栄養・食糧学会大会、2009 年 5 月 21 日、長崎
- ② 吉澤史昭、分岐鎖アミノ酸の生理機能の共通性と特異性、日本農芸化学会 2009 年度 (平成 21 年度) 大会、2009 年 3 月 28 日、福岡
- ③ 吉澤史昭、分岐鎖アミノ酸によるタンパク質代謝調節と糖代謝調節、日本アミノ酸学会 第 1 回夏期シンポジウム、2007 年 8 月 26 日、岐阜長良川温泉

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉澤史昭 (YOSHIZAWA FUMIAKI)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：10269243

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし