

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650152

研究課題名（和文）

筋肉における分岐鎖アミノ酸の生理機能の解明

研究課題名（英文）

PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS OF BRANCHED-CHAIN AMINO ACIDS IN MUSCLES

研究代表者

下村 吉治 (SHIMOMURA YOSHIHARU)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：30162738

研究成果の概要（和文）：本研究では、分岐鎖アミノ酸（BCAA）分解の律速酵素である分岐鎖 $\alpha$ -ケト酸脱水素酵素（BCKDH）複合体の特異的キナーゼ（BCKDHキナーゼ：BDK）の遺伝子を筋肉特異的に欠損（KO）させて、筋肉でBCAA分解を促進することにより遊離BCAAが不足したマウスを作製することを目的とした。筋BDK-KOマウスの作製は、Cre-loxPシステムを用いて筋肉特異的に標的タンパク質を欠損させる方法を用いた。すなわち、マウスBDKのエクソン9～12をloxPで挟み込んだターゲティングベクターをES細胞へ導入しキメラマウスを作製した。1回目のES細胞ではベクターDNAの生殖系列移行ができなかったため、別のES細胞へのベクターDNAの導入を行い、キメラマウスを作成した。現在、このキメラマウスを用いてfloxed BDK遺伝子マウスの作製が進行中である。

研究成果の概要（英文）：Branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase (BCKDH) complex is a rate-limiting enzyme of the branched-chain amino acid (BCAA) catabolism and is regulated by the specific kinase (BCKDH kinase: BDK). In the present study, we aimed to generate muscle-specific BDK deficient mice, which may result in muscle-specific BCAA deficiency due to the acceleration of BCAA catabolism. We used the Cre-loxP system to generate the conditional BDK-knockout (KO) mice; recombinant ES cells containing a conditional allele of the mouse BDK gene that was engineered by flanking exons 9-12 with loxP sites. Thus, exons 9-12 are deleted by the expression of Cre recombinase. In the first trial, we obtained chimeric mice without the floxed BDK gene in the germ line. In the second trial, we again obtained the chimeric mice, which is used to produce heterozygous BDK-gene-floxed offsprings.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	2,900,000	420,000	3,320,000

研究分野：栄養生化学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学、スポーツ科学

キーワード：分岐鎖アミノ酸（BCAA）、分岐鎖 $\alpha$ -ケト酸脱水素酵素（BCKDH）、BCKDHキナーゼ、筋肉、コンディショナルBDK-KOマウス、BCAA不足、キメラマウス

## 1. 研究開始当初の背景

ロイシン、イソロイシン、バリンは、その側鎖の構造中に分岐構造を持つため総称し

て分岐鎖アミノ酸（branched-chain amino acids: BCAA）と呼ばれる。BCAAは全て必須アミノ酸であるため、ヒトは食物としてそ

れらを摂取しなければならぬ。タンパク質中のその含量は高く、筋肉タンパク質の必須アミノ酸の約35%、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。したがって、通常の栄養状態ではBCAA不足は発生しない。近年の研究において、遊離BCAAはタンパク質の合成材料としてだけでなく、筋タンパク質合成の促進(Proud (2007) Biochem. J. 403:217-234)、骨格筋へのグルコース取り込み促進(Kadota, et al. (2012) JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr. 36:337-343)、運動による遅発性筋肉痛の抑制(Shimomura, et al., (2010) Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab. 20: 236-244)、筋ミトコンドリアのエネルギー合成活性の上昇(D'Antona, et al., (2010) Cell Metabol. 12:362-372)など、筋肉に対する多くのBCAA作用が明らかにされてきた。すなわち、食物として摂取するBCAAは筋肉の維持・発達及びエネルギー代謝に対して重要な役割を果たす可能性が指摘されている。BCAAのこれらの生理機能を明確にするためには、遊離BCAAを欠乏させた動物を作製して解析に用いることが最も有効な手段と考えられる。

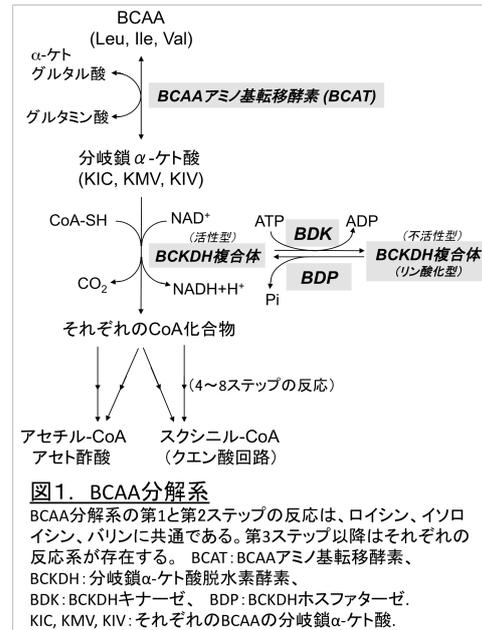
BCAA分解系(代謝系)は、ほぼ全てミトコンドリアに存在し、最初の2つのステップは3つのBCAAに共通であり、この分解系の大きな特徴を示す反応である(図1)。第一ステップは、BCAAアミノ基転移酵素(BCAT)によるBCAAの可逆的なアミノ基転移反応である。第二ステップは、分岐鎖 $\alpha$ -ケト酸脱水素酵素複合体(branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase: BCKDH)複合体による分岐鎖 $\alpha$ -ケト酸の不可逆的な酸化脱炭酸反応である。さらに、BCKDH複合体は特異的キナーゼ(BCKDH kinase: BDK)による酵素タンパク質のリン酸化により活性調節(不活性化)されることが明らかにされている。これらの事実より、第二ステップの酵素活性調節機構がBCAA代謝を主に調節するとされており、特にBDKによるBCKDH複合体の活性調節が重要であることが明らかにされている。

## 2. 研究の目的

本研究ではBDKの遺伝子を筋肉特異的に欠損させて、BCKDH複合体を活性化することによりBCAA分解を促進し、筋肉の遊離BCAAが不足したマウス(コンディショナル筋BDK-KOマウス)を作製し、その特徴を解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法(図2)

筋肉(骨格筋、心筋)特異的に標的タンパク質を欠損させるため、Cre-loxPシステムを用いたコンディショナルKOマウスを作製する方法(Bruning et al. Mol. Cell 2:



559-569, 1998)を用いた。このシステムでは、まず、目的遺伝子のエクソンの一部をloxPではさんだゲノムDNAを含むターゲティングベクターを調製する。このベクターを胚性幹細胞(ES細胞)に導入し、薬剤耐性を利用した細胞の選択、およびポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことにより、正しく相同組換えが起こったもの、つまり目的の遺伝子領域をloxPで挟み込んだものと入れ替わったES細胞クローンを選別する。このES細胞をマウス初期胚に注入し、仮親の子宮に移植することにより組換えES細胞由来の細胞が全身でランダムに存在するマウス(キメラマウス)を作製する。同時に、筋肉特異的に発現するクレアチンキナーゼ(CK)のプロモーターを持ったCreリコンビナーゼ遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(CK-Creマウス)を作製する。両種のマウスを交配することにより、筋肉で発現したCreリコンビナーゼによりloxPで挟み込まれたエクソン部分を欠失させ、筋肉においてのみ標的タンパク質が欠損するマウスを誕生させることができる。

本研究では、マウスBDK遺伝子Bckdkのエクソン9~12(BDK活性部位をコードするエクソン)をloxPではさんだゲノムDNA、その中に薬剤耐性を利用した細胞選択のためのネオマイシン耐性遺伝子(Neo)、および発現解析のための $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子( $\beta$ Gal)を酵母の組換え酵素フリッパーゼ(FLP)の認識配列であるFLP認識ターゲット(FRT)ではさんだDNA配列を挿入したターゲティングベク

ターを調製した。このベクターを C57BL/6N 系統のマウス由来の ES 細胞にトランスフェクションし、薬剤選択後、得られたコロニーよりゲノム DNA を抽出し、PCR により正しく相同組換えを起こした ES 細胞クローンを選別した。この組換え ES 細胞を ICR 系統マウス由来の 4 細胞期胚にインジェクションし、キメラマウスを作製した。これ以降の操作は、現在進行中であるが、その方法を記載する。

このキメラマウスと C57BL/6N 系統のマウスと交配させ、得られた仔マウスのゲノム DNA を PCR による相同組換えの有無を確認することにより、*Bckdk* の対立遺伝子の片方が *loxP* により挟み込まれた組換えマウス (*Bckdk*-floxed ヘテロマウス) を作製する。この段階では、*Bckdk* ゲノム DNA 領域に、ES 細胞を単離するための薬剤耐性遺伝子 (*Neo+*) が存在しているため、この薬剤耐性遺伝子を取り除く必要がある。これを取り除くため、*Neo+* の *Bckdk* ヘテロマウスと全組織で FLP を発現するトランスジェニックマウスを交配させることにより、薬剤耐性遺伝子を取り除くことができる。これらマウスの交配により得られた仔マウスのゲノム DNA を PCR により薬剤耐性遺伝子の有無を確認することにより、*Neo-* の *Bckdk*-floxed ヘテロマウスを作製する。このマウスを CK-Cre マウスと交配し、*Cre+* 及び *Cre-* の *Bckdk*-floxed ヘテロマウスを作製し、これらを交配させ、*Cre+* の *Bckdk*-floxed ホモマウス、すなわち筋肉特異的 BDK 欠損マウスを作製する。

#### 4. 研究成果

現在、欧米で約 2 万個すべての遺伝子について、ノックアウトマウスを作成するプロジェクトが進行中であり、さらにコンディショナル KO マウスを作製するための全遺伝子を *loxP* で挟み込んだターゲティングベクターおよびその組換え ES 細胞についても作製されつつある。そこで、これらプロジェクトの進行状況をデータベースにて検索したところ、EUCOMM (European Conditional Mouse Mutagenesis Program) において、マウス BDK 遺伝子である *Bckdk* のエクソン 9~12 (BDK 活性部位をコードするエクソン) を *loxP* で挟み込んだ組換え ES 細胞がすでに作製済であることを見いだした。EUCOMM よりこの ES 細胞 3 クローンを入手し、ゲノム DNA を抽出した後、*Bckdk* 遺伝子領域について特異的プライマーを用いて確認したところ、予想どおりの PCR 産物が検出され、*Bckdk* 遺伝子領域での相同組換えが確認できた。大阪大学微生物病研究所の NPO 法人発生工学研究会に委託して、これら ES

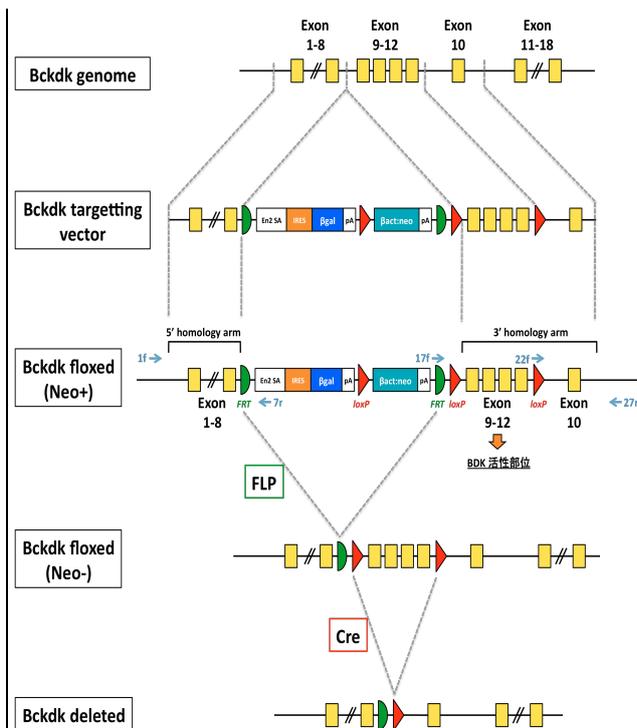


図2. *Bckdk* コンディショナルKOマウスの作成

En2SA: スプライシングアクセプターサイト (Splicing Acceptor site)  
 IRES: リボソーム内部進入部位 (Internal Ribosomal Entry Site)  
 βgal: β-ガラクトシダーゼ (β-galactosidase) 耐性遺伝子  
 Bact:neo: β-アクチンプロモーターの下流にネオマイシン (Neomycin) 耐性遺伝子  
 pA: poly A 配列  
 矢印はPCRに用いたプライマーとそれらの番号を示す。

細胞 3 クローンをマウス胚 4 細胞期にインジェクションし、キメラマウス 20 匹が得られた。

これらキメラマウスを C57BL/6N 系統マウス 50 匹と交配し、約 500 匹の仔マウスが得られた。それらのマウスからゲノム DNA を抽出し、*Bckdk* の遺伝子領域での相同組み換えを PCR により確認したが、予想される塩基配列の PCR 産物が検出されなかった。すなわち、ES 細胞が生殖細胞系列へ分化できなかつたと判断される。したがって、再度同様の過程を繰り返すこととした。

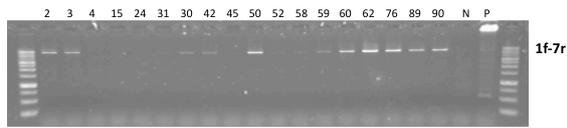
EUCOMM より *Bckdk* のターゲティングベクターを入手し、このベクターを PCR により確認した後、NPO 法人発生工学研究会に委託して ES 細胞へのトランスフェクション、薬剤耐性クローンの単離を行い、96 個のクローン ES 細胞が得られた。これらの細胞からゲノム DNA を抽出し、PCR により相同組換えが確認された ES 細胞 12 クローンを得ることができた (図 3)。このうち 5 クローンの核型解析を行い、80% 以上で正常な核型が確認された 4 クローンをインジェクションに使用した。上記と同

様にインジェクションを行った結果、13匹のキメラマウスが得られ(図4)、現在C57BL/6系統マウスと交配中である。

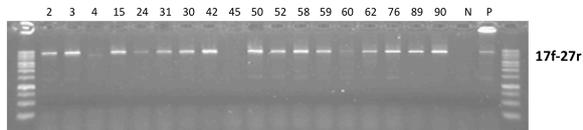
(2) 研究分担者

北浦 靖之 (KITAURA YASUYUKI)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教  
研究者番号：90442954

(A) 5' arm PCR (Primer set: 1f-7r)



(B) 3' arm PCR\_1 (Primer set: 17f-27r)



(C) 3' arm PCR\_2 (Primer set: 22f-27r)

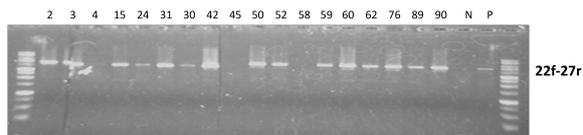


図3. PCRによる相同組換えの確認

各レーンの数字はES細胞のクローン番号、図の右側の数字は各プライマー番号(図2参照)を示す。

N: ネガティブコントロール

P: ポジティブコントロール



図4. Bckdk キメラマウス

5. 遺伝子改変マウスの作製途中であり発表論文はない。

[その他]

ホームページ等

[http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~nutr/shimomura/yan\\_jiugurupuTop.html](http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~nutr/shimomura/yan_jiugurupuTop.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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：30162738