

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650406

研究課題名(和文) 脳・神経における遊離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 free branched-chain amino acids in nerve and brain

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：分岐鎖アミノ酸(BCAA)代謝は、分岐鎖-ケト酸脱水素酵素キナーゼ(BDK)により抑制されている。本研究では、BDK遺伝子のコンディショナル・ノックアウト(KO)マウスを作製した。BDK-KOマウスでは、BCAA分解を亢進し慢性的にBCAA不足となる。本研究では、まずコンディショナルKOマウスを作製するためのBDK-floxedマウスを作製し、次いで全身組織のBDK-KOマウス、筋特異的BDK-KOマウスを作製し、最終的に神経特異的BDK-KOマウス作製の計画である。現在、これらのマウスの特徴が明らかになりつつある。

研究成果の概要(英文)：Branched-chain amino acid metabolism is suppressed by branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase kinase (BDK). In the present study, we have prepared conditional BDK-knockout (KO) mice to clarify the physiological functions of BCAAs. We first produced BDK-floxed mice for preparation of conditional BDK-KO mice. Using the mice, we prepared global (whole body) BDK-KO mice, and then muscle-specific BDK-KO mice, and now preparation of nerve-specific BDK-KO mice is ongoing. The conditional BDK-KO mice have a tissue-specific deficiency of BCAAs. Specific features of these mice are becoming to be clarified.

研究分野：複合領域

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 分岐鎖-ケト酸脱水素酵素キナーゼ コンディショナルノックアウト マウス 筋神経

1. 研究開始当初の背景

(1) 分岐鎖アミノ酸(BCAA)による代謝調節

必須アミノ酸である BCAA (ロイシン、イソロイシン、バリン) は、タンパク質を構成する成分としてだけでなく、タンパク質の合成促進と分解抑制に働く調節因子である。BCAA の中でも特にロイシンは、ラパマイシン標的因子 (mTOR) の活性化を通して mRNA 翻訳を促進し、タンパク質合成を高めることが明らかにされている (Proud, Biochem J 403:217-234 (2007))。

BCAA は、タンパク質代謝だけでなくグルコース代謝にも作用することが明らかにされつつある。研究代表者らは、2型糖尿病ラットに 5%BCAA を含む食餌を長期に摂取させると、耐糖能が一部改善すること (Biochem Biophys Res Commun 373: 94-98 (2008))、また高脂血症薬であるクロフィブレート (図 1 中の BDK の阻害剤) 投与により BCAA 分解を促進して血中 BCAA 濃度を低下したラットでは耐糖能が低下することを発見した (J Parenter Enteral Nutr, 36:337-343 (2012))。よって、BCAA はグルコース代謝の調節因子としても作用することは明らかであるが、そのメカニズム、ER ストレスに対する作用、及び運動との相乗作用については情報がない。最近の研究において、BCAA は中高齢マウスの筋ミトコンドリア生合成を促進することが明らかにされたので (D'Antona et al, Cell Metab 12: 362-372 (2010))、筋肉のエネルギー代謝を活性化する作用を持つと考えられる。この BCAA 作用と代謝調節作用の関係は興味深いがこのところ情報がない。

(2) BCAA 代謝 (分解) の調節

上記のようにタンパク質代謝と糖代謝に強く影響する BCAA の代謝調節機構を解明することは重要である。BCAA 代謝系を調節する酵素はその第 2 ステップに存在する分岐鎖  $\alpha$ -ケト酸脱水素酵素 (BCKDH) 複合体であ

る (図 1)。この BCKDH 複合体の活性は、酵素のリン酸化・脱リン酸化により調節される。そのリン酸化 (不活性化) を触媒する酵素が BCKDH キナーゼ (BDK) であり、脱リン酸化 (活性化) する酵素が BCKDH ホスファターゼ (BDP) である。研究代表者は、これまでの BCAA 代謝系の研究において、BCKDH 複合体の精製、BDK の精製と遺伝子クローニングに成功し (Arch Biochem Biophys 283: 293-299 (1990); J Biol Chem 267:13127- 13130 (1992))、BCKDH 複合体の活性調節には BDK が重要な役割を演じていることを明らかにしてきた (J Nutr 136:250S- 253S (2006))。

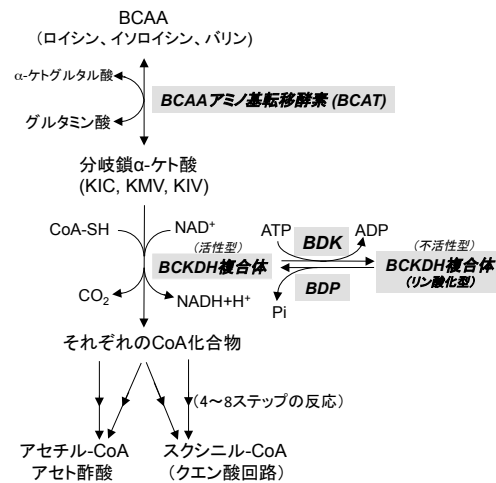


図1. 分岐鎖アミノ酸(BCAA)分解系

BCKDH: 分岐鎖 $\alpha$ -ケト酸脱水素酵素、  
BDK: BCKDHキナーゼ、BDP: BCKDHホスファターゼ、  
KIC, KMV, KIV: それぞれのBCAAの分岐鎖 $\alpha$ -ケト酸。

2. 研究の目的

特定の遺伝子を欠損させるノックアウト (KO)マウスを用いた研究は、他の多くの研究で示されているように大きな成果を挙げる可能性が高い。BCAA 代謝系についても、全身組織で BDK を欠損したマウスが作製され、血中および組織中の BCAA 濃度が低下する影響が調べられた (Joshi et al. Biochem J 400: 153-162 (2006))。その結果、そのマウスでは成長不良、脳機能の異常 (尾懸垂したときの後肢の抱え込み動作)、成長後のてんかん発作の発生が認められた。脳機能の異常と

てんかん発作は、脳の BCAA 濃度が正常動物と比べて約 1/3 に低下したことにより発生すると考えられるが、脳以外の全身組織の BCAA 濃度低下がそれにどの程度関与しているかは不明である。

そこで、研究代表者は、BCAA の各組織の生理機能解明のために、組織特異的 BDK-KO マウス (コンディショナル BDK-KO マウス) の作製を目標にした。

### 3. 研究の方法

コンディショナル BDK-KO マウスの作製には、ゲノム中の標的遺伝子の一部を loxP 配列ではさみ、組み替え酵素である Cre を組織特異的に発現することによりその遺伝子でコードされている酵素を欠損させる方法 (Bruning et al. Mol Cell 2:559-569 (1998)) を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) BDK-floxed マウスの作製

本研究では、図 2 に示すように、BDK のエクソン 9-12 を loxP で挟み込んだ BDK (Bckdk) ターゲティングベクターを用いて BDK-floxed マウスの作製を試みたところ、ベクターを挿入したキメラマウスの仔マウスに BDK ターゲティングベクターが検出されたので、目的とする BDK-floxed マウスの作製に成功した。よって、コンディショナル BDK-KO マウス作製のための基となるマウスを得ることができた。

#### (2) 全身組織 BDK-KO マウスの作製

脳・神経特異的 BDK-KO マウスを作製する前に、そのコントロールにもなる全身組織 BDK-KO マウスを BDK (Bckdk)-floxed(Neo+)ヘテロマウスを交配することにより作製した。Flippase 処理前の BDK-floxed(Neo+)マウスは、全身の細胞に BCKDK エクソンの 8 と 9 の間にスプライシ

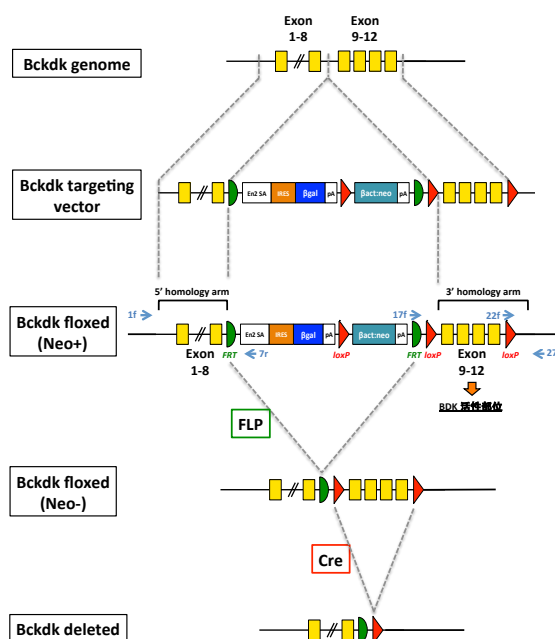


図 2. Cre-loxP システムによる BDK 遺伝子 (BCKDK) の欠失

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);  $\beta$ gal,  $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -galactosidase); Bact:neo,  $\beta$ -アクト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。

ングアクセプターサイト (En2SA) 等を含むため、その交配により全身組織 BDK-KO マウスの作製が可能である。全身で BDK を欠損したマウスは、血中の BCAA 濃度が正常マウスの約 1/2 に低下し、離乳直後に尾懸垂すると後肢を抱え込む動作を示した (図 3)。本研究では、以前に報告された全身組織 BDK-KO マウス (Joshi et al. Biochem J 400:153-162 (2006)) とは異なる手法により作製されたが、両マウスは同じ表現型を示したため、BCAA 濃度の著しい低下により脳機能に異常をきたすことが確認された。

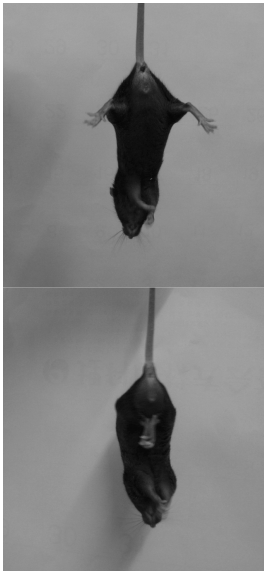


図 3. 正常マウス（上段）と全身組織 BDK-KO マウス（下段）

### (3) コンディショナル BDK-KO マウスの作製

身体の占める割合が最も大きな組織は筋肉であり、BCAA 代謝の中心的組織と考えられているため、コンディショナル BDK-KO マウスとして筋特異的 BDK-KO マウスの作製を試みた。このマウスの作製には、BDK-floxed マウスと、クレアチンキナーゼ (CK) のプロモーターにより Cre を発現する CK-Cre トランスジェニックマウスを交配させた。得られたマウスの主な組織の BDK を Western blotting により検出したところ、筋特異的 BDK-KO (mBDK-KO) マウスでは骨格筋と心筋で BDK がほとんど欠失していた (図 4)。よって、mBDK-KO マウスの作製に成功した。

上述のように BDK-floxed マウスを用いることにより、組織特異的 (コンディショナル) BDK-KO マウスの作製が可能であることが明らかとなった。今後、この BDK-floxed マウスと神経幹細胞に特有の中間径フィラメント (細胞骨格) タンパク質である nestin のプロモーターにより Cre を発現する nestin-Cre トランスジェニックマウスを交

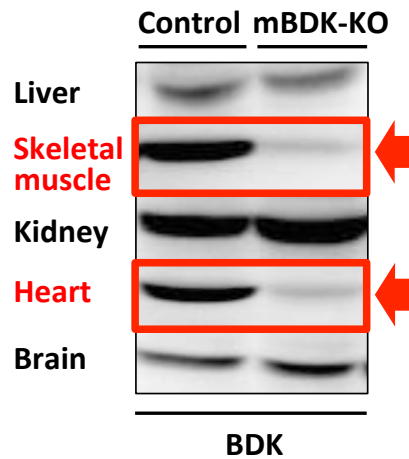


図 4. mBDK-KO マウス組織における BDK の検出

配することにより脳・神経特異的 BDK-KO マウスの作製が可能と考えられるので、そのマウスを作製予定である。

### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

- ① Ishikawa, T., Kitaura, Y., Itami, Y., Kadota, Y., Kato, R., Inukai, A., and Shimomura, Y. Characterization of muscle-specific branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase kinase (BDK)-deficient mice. *Experimental Biology* 2014, 2014 年 4 月 28 日, San Diego, USA.
- ② 北浦靖之、石川卓弥、伊丹雄也、加藤里奈、犬飼彩美、門田吉弘、下村吉治、筋特異的分岐鎖アミノ酸代謝亢進マウスの解析、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 29 日、川崎市。

### 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

#### (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

(3) 研究協力者

門田 吉弘 (KADOTA YOSHIHIRO)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・特別研究員

研究者番号：10724776