

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560366

研究課題名(和文) 運動トレーニング効果を発揮するためのアミノ酸栄養

研究課題名(英文) Amino acid nutrition for promoting the efficacy of exercise training

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：筋特異的に分岐鎖アミノ酸(BCAA)分解を亢進する筋特異的分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素キナーゼ(BDK)欠損(BDK-mKO)マウスを作製し、運動トレーニング適応現象におけるBCAAの生理機能を検討した。その結果、トレーニングによる持久力の上昇が、コントロールマウスに比べてBDK-mKOマウスで抑制されることが判明した。この原因として筋グリコーゲン量の減少、ミトコンドリア酵素活性の低下、BCAA代謝産物のカルニチン誘導体化、解糖系の抑制の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We produced muscle-specific branched-chain α -ketoacid dehydrogenase kinase (BDK)-deficient mice, in which the catabolism of branched-chain amino acids (BCAAs) were promoted in a muscle-specific manner. The mice showed decreased adaptability to exercise training compared to control mice. It was suggested that decreased muscle glycogen content, low activities of mitochondrial enzymes, derivatization of BCAA catabolites, and suppression of glycolysis were involved in the mechanisms.

研究分野：複合領域

キーワード：分岐鎖アミノ酸 分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素キナーゼ 運動トレーニング 持久力 マウス コンディショナルロックアウト 筋肉

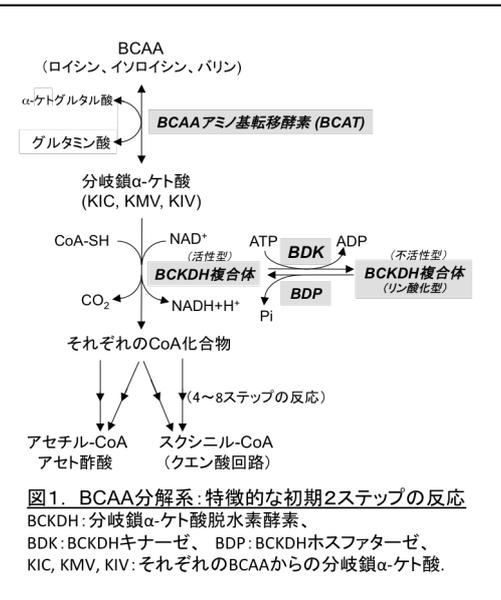
1. 研究開始当初の背景

運動(特に持久運動)により生体内のほぼ全ての代謝が亢進するが、そのトレーニング効果として(1)筋ミトコンドリア数の増加とその呼吸活性の上昇、(2)グルコース及びグリコーゲン代謝の促進、及び(3)脂肪酸代謝の促進がよく知られている。さらに、体タンパク質構成成分であるアミノ酸の代謝も運動により促進され、アミノ酸はタンパク質合成に多く利用されるのみならずエネルギー代謝にも関与することが明らかにされている(Rennie. *Handbook of Physiology: Section 12*, pp995-1035, 1996)。運動のためのアミノ酸栄養としては、筋タンパク質合成のための必須アミノ酸に関心が集まっているが、その中でも以下の理由で分岐鎖アミノ酸(Branched-Chain Amino Acids (BCAA): ロイシン、イソロイシン、バリン) に対する関心が高い。(1)BCAA 以外の必須アミノ酸は肝臓で分解(代謝)されるのに対して、BCAA はその代謝の第一ステップの酵素 (BCAT、図1) が肝臓にはほとんど発現しておらず、筋肉において高発現しているため、筋肉を中心に代謝されると考えられている(*Am J Clin Nutr.* 1998;68:72-81)。(2)BCAA は、筋タンパク質を構成する必須アミノ酸の約 35%を占め、食事タンパク質の必須アミノ酸の約 50%もの多くを占めている。(3)BCAA の1つのロイシンは、mTOR プロテインキナーゼを活性化して、筋タンパク質合成を強く促進する(Proud. *Biochem J.* 2007;403:217-34)。(4)BCAA サプリメントは、運動中の筋タンパク質分解を抑制する(MacLean et al. *Am J Physiol.* 1994; 267:E1010-22)。(5)BCAA 代謝系はミトコンドリアに存在し、運動によるエネルギー代謝の亢進に伴いその分解が著しく亢進する(*J Nutr.* 2003;136:529S-32S)。(6)中高齢マウスへの高BCAA 含有飲料水の長期投与は、筋ミトコンドリア量を増加し、運動持久力を上昇する(D'Antona et al. *Cell Metab.* 2010;12:362-72)。(7)運動による筋損傷と遅発性筋肉痛は、運動時のBCAA 摂取により緩和される (*Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2010;20:236-44)。(8)BCAA は運動による中枢性疲労を軽減する(Blomstrand et al. *Amino Acids.* 2001;20: 25-34)。以上のように、BCAA は運動との関係で種々の生理作用を示すことが明らかである。

さらに、一般的に運動トレーニングは骨格筋のグルコース・トランスポーターIV (GLUT-IV)を増加して、筋でのグルコース代謝を促進するが、研究代表者らの所見では、高(5%)BCAA 食を与えて4週間トレーニングしたラットでは、

骨格筋でのその現象が認められなかった(*J Nutr Sci Vitaminol.* 2000;46:71-7)。また、血清インスリン濃度が低下する傾向にあった。すなわち、高 BCAA 食はインスリン感受性を高めてグルコース代謝を促進することにより、筋 GLUT-IVを増加するトレーニング効果を打ち消した可能性が考えられるが、その生理的意義と機構は不明である。

体内における遊離 BCAA 濃度は、血液と骨格筋共に 400~600 μ M 程度の低濃度に維持されているが、この濃度が変動することにより BCAA の生理作用が発揮されると考えられる。体内の遊離 BCAA の機能を検討する場合に、食事制限等により体内の遊離 BCAA 濃度を低下する方法が考えられるが、体タンパク質に多量の BCAA が含まれ、必要な場合にはタンパク質分解により動員されるため、長期的に安定して低 BCAA 血症にすることは困難である。



2. 研究の目的

上記のように、運動およびトレーニング効果の発揮において体内の遊離 BCAA が種々の生理機能を果たしていることは間違いないが、そのメカニズムはほとんど不明である。そこで、本研究では、筋肉特異的に BCAA 分解を亢進して安定して且つ長期的に筋肉の BCAA を不足状態にする遺伝子改変マウスを作製した。実際には、BDK 遺伝子(BDK)をノックアウト (KO) して(図1)、筋肉特異的(コンディショナル)BDK 欠損マウス(BDK-mKO マウス)を作製した。本研究では、このマウスの運動能力と運動中の代謝状態を解析し、運動能力と運動トレーニング適応現象に如何に BCAA が関与しているかを検討した。

3. 研究の方法

(1) BDK-mKO マウスの作製: BDK-mKO マ

ウスの作製には Cre-loxP システムを用いた (Bruning et al. *Mol Cell*. 1998;2:559-69)。この手法では、BDK のエクソン 9~12 を loxP で挟みこんだターゲティングベクターを C57BL/6N 系統由来の ES 細胞へトランスフェクションしそれを ICR マウス胚に注入することによりキメラマウスを得た。これを、C57BL/6 系統マウスと交配して繁殖し BDK^{flox/flox} マウス (コントロールマウス) を得た。このマウスを筋肉特異的に発現するクレアチニンキナーゼのプロモーターを持った Cre 遺伝子を導入したクレアチンキナーゼ (CK)-Cre トランスジェニックマウスと交配し、BDK^{flox/flox}; Cre⁺ マウス (BDK-mKO マウス) を作製した。

(2) マウスの運動持久力測定と運動トレーニング: 8 週齢の雄性 BDK-mKO マウスとコントロールマウスを 12 週齢時まで個別のケージで予備飼育した。食餌、水ともに自由摂取とし、飼育室は室温が 23±2°C、12 時間の明暗サイクル (明期 8:00-20:00、暗期 20:00-8:00) とした。食餌は D12450B (Research Diets Inc, USA) を用いた。

12 週齢時に 10% 登勾配のトレッドミル (Natsume, Tokyo) を用いてトレーニング前の運動持久力 (以下参照) を測定した。その後 2 日間安静にして、速度 15 m/分、60 分/日、で 5 日間連続のトレーニングを負荷した。その後 2 日間安静にして速度 18 m/分、60 分/日で 5 日間連続のトレーニングを負荷した。トレーニング負荷最終日から 2 日間安静にしたのち再度運動持久力の測定を行った。

運動持久力測定は、トレッドミル (10% 登勾配) を用いて行った。速度 15 m/分でスタートし、4 分ごとに 1 m/分ずつ速度を上げ、疲労困憊までの走行距離で評価した。

(3) マウスの運動トレーニングとメタボローム解析: 8 週齢の雄性 BDK-mKO マウスとコントロールマウスを 12 週齢時まで上記と同様に飼育およびトレーニング負荷を行なった。トレーニング負荷最終日から 2 日間安静にした後、朝 8:00 からエサを抜き、8 時間絶食させ、マウスを急性運動の有無で群分けし、急性運動群には運動持久力測定と同様の走らせ方で 32 分間の急性運動を負荷した。その直後に頸部脱臼により屠殺し解剖した。急性運動を負荷しないマウスもほぼ同時刻に同様に屠殺した。屠殺後速やかに骨格筋を採取した。採取した組織は液体窒素温度でフリーズクランプし、重量を測定後 -80°C で保存した。この骨格筋を用いて、代謝物質の網羅的解析 (メタボローム解析) を実施し

た。

後肢筋 (腓腹筋+足底筋+ヒラメ筋) の筋グリコーゲン量をフェノール硫酸法を用いて測定した。ヒラメ筋のクエン酸合成酵素とシトクロム c オキシダーゼの活性を分光学的方法により測定した。

4. 研究成果

(1) ラット持久力: トレーニング期間を通してコントロールマウスと BDK-mKO マウスの間で、体重と摂食量について有意な差は見られなかった。トレーニング前およびトレーニング後の運動持久力を図 2, 3 に示した。トレーニング前の運動持久力には、コントロールマウスと BDK-mKO マウスの間に有意な差は見られなかった。一方、トレーニングを負荷したことによりコントロールマウス、BDK-mKO マウスともに運動持久力は 2 倍以上に増加したが、トレーニング後の運動持久力は、コントロールマウスに比べて、BDK-mKO マウスで有意に低かった。

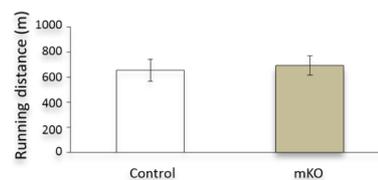


図 2. トレーニング前の運動持久力

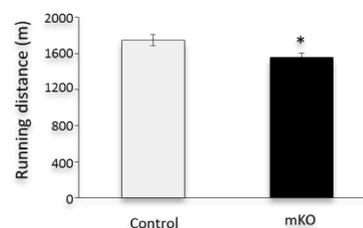


図 3. トレーニング後の運動持久力
値は means ± SE (各群 n=7)。mKO: BDK-mKO。*P<0.05.

(2) 骨格筋のメタボローム:

① BCAA 代謝系 (図 4): 骨格筋の BCAA 濃度は BDK-mKO マウスで有意な低値であった。BCAA から生じる α-ケト酸である KIC と KMV 濃度は全ての BDK-mKO マウスで測定限界を下回ったが、コントロールマウスでは急性運動の負荷により減少する傾向にあった。BCAA 代謝産物の分岐鎖アシル-CoA から生じるカルニチン誘導体のイソブチリルカルニチンとイソバレリルカルニチン濃度は、運動を負荷しないコントロールマウスに比べて BDK-mKO マウスで有意に高い値を示した。これらは、急性運動を負荷することで両群とも上昇する傾向にあったが、コントロールマウスの

上昇度が高かった。アセチル-CoA 濃度は急性運動を負荷しないコントロールマウスに比べて、BDK-mKO マウスで有意な低値を示した。その濃度は急性運動によりコントロールマウスでは低下傾向に、BDK-mKO マウスでは増加傾向にあった。

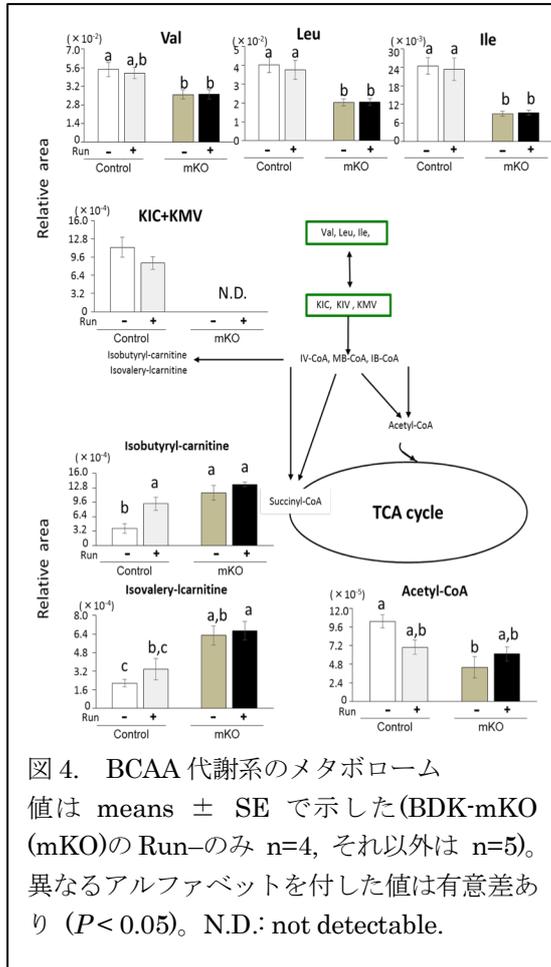


図 4. BCAA 代謝系のメタボローム
値は means ± SE で示した(BDK-mKO (mKO)の Run-のみ n=4, それ以外は n=5)。異なるアルファベットを付した値は有意差あり ($P < 0.05$)。N.D.: not detectable.

②解糖系 (図 5) : 解糖系のグルコース 1-リン酸およびグリセルアルデヒド 3-リン酸濃度では、BDK-mKO の影響は見られなかった。フルクトース 1,6-ビスリン酸、ジヒドロキシアセトンリン酸、およびホスホエノールピルビン酸濃度では、BDK-mKO マウスで減少する傾向が見られ、2-ホスホグリセリン酸濃度では運動を負荷しない BDK-mKO マウスが有意に低い値を示し、運動負荷後、コントロールマウスは減少傾向に、BDK-mKO マウスは増加傾向にあった。

③筋グリコーゲン量 (図 6) : 骨格筋 (足底筋、腓腹筋、ヒラメ筋) のグリコーゲン量は、急性運動を負荷しないコントロールマウスに比べて、BDK-mKO マウスで、有意に低かった。急性運動を負荷することにより両群とも減少傾向にあったが、急性運動後の BDK-mKO マウスではコントロールマウスよりも低い傾向を示した。

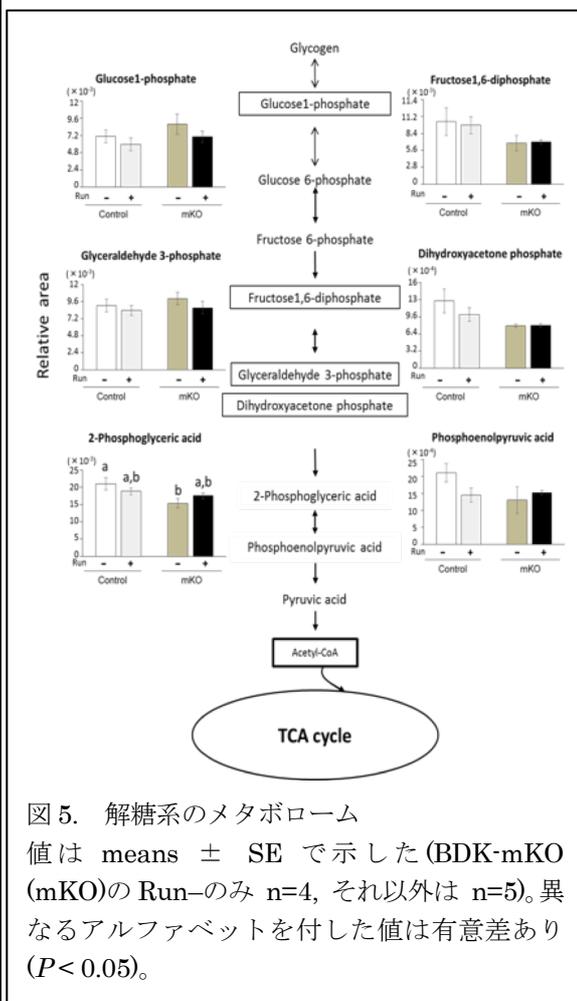


図 5. 解糖系のメタボローム
値は means ± SE で示した (BDK-mKO (mKO)の Run-のみ n=4, それ以外は n=5)。異なるアルファベットを付した値は有意差あり ($P < 0.05$)。

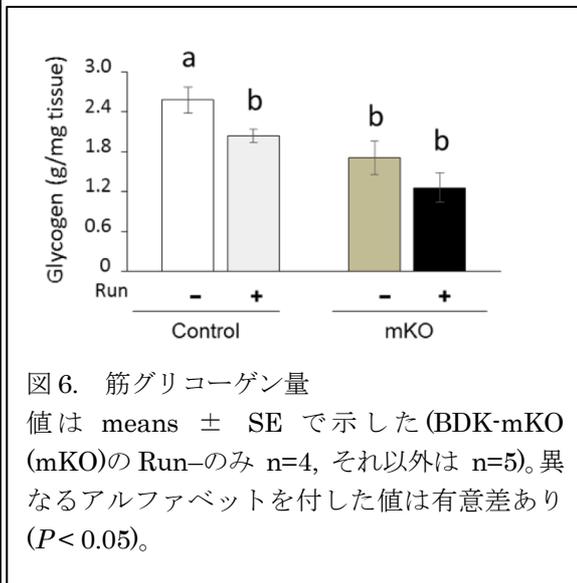


図 6. 筋グリコーゲン量
値は means ± SE で示した (BDK-mKO (mKO)の Run-のみ n=4, それ以外は n=5)。異なるアルファベットを付した値は有意差あり ($P < 0.05$)。

④ミトコンドリア酵素活性 (図 7) : ヒラメ筋のクエン酸合成酵素活性では、いずれの群においても有意差は見られなかったが、急性運動を負荷しない BDK-mKO マウスでコントロールマウスより低値を示した。また急性運動を負荷することで両群とも上昇したが、依然 BDK-mKO マウスの酵素活性がコントロールマウスよりも低値を示した。

ヒラメ筋のシトクロム c オキシダーゼ活性

は、急性運動を負荷しない BDK-mKO マウスでコントロールマウスよりも低い傾向にあった。急性運動を負荷することにより両群マウスとも上昇傾向を示したが、有意な変化ではなかった。また急性運動後の BDK-mKO マウスではコントロールマウスに比べ低い傾向にあった。

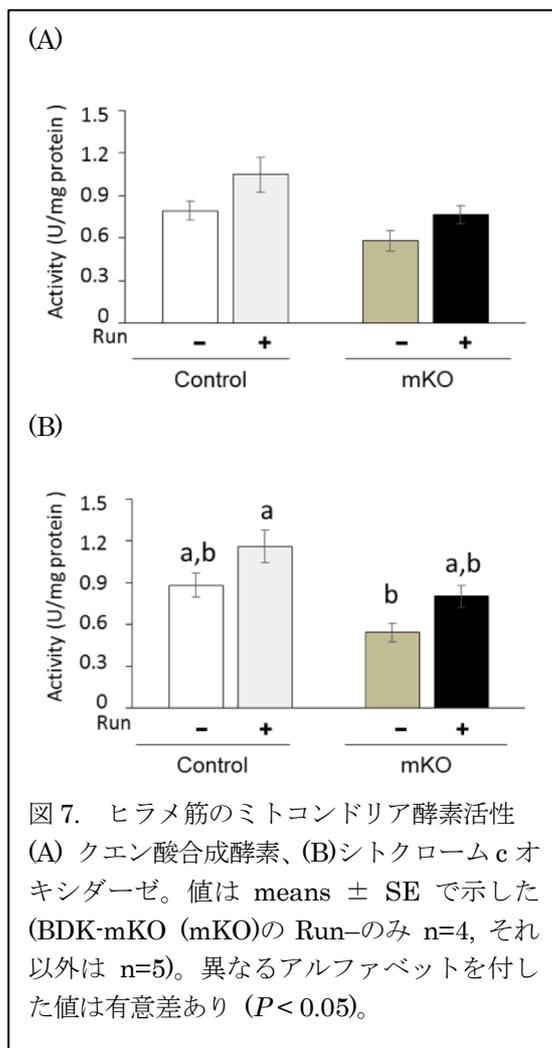


図7. ヒラメ筋のミトコンドリア酵素活性 (A) クエン酸合成酵素、(B)シトクロームc オキシダーゼ。値は means ± SE で示した (BDK-mKO (mKO)の Run-のみ n=4, それ以外は n=5)。異なるアルファベットを付した値は有意差あり (P < 0.05)。

以上の結果より、トレーニングによる運動持久力の上昇が、コントロールマウスに比べて、BDK-mKO マウスで抑制されることが判明した。この原因として、筋グリコーゲン量の減少、ミトコンドリア酵素活性の低下によるエネルギー産生能の低下、BCAA 代謝産物のカルニチン誘導体化、解糖系の一部抑制などが関与す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 1 件)

- (1) 下村吉治、北浦靖之、分岐鎖アミノ酸 (BCAA) の新規生理機能～バイオテクノロジー研究による証明～ (査読なし) ILSI Japan、122、2015 年、16-22.

[学会発表] (計 4 件)

- (1) Yoshiharu Shimomura, Yasuyuki Kitaura, Yoshihiro Kadota. Novel physiological functions of branched-chain amino acids. (Symposium), 12th Asian Congress of Nutrition, 2015 年 5 月、横浜
- (2) Minjun Xu, Yasuyuki Kitaura, Takuya Ishikawa, Yoshihiro Kadota, Takashi Morioka, Miki Ota, Morishita Yukako, Yoshiharu Shimomura. Effects of enhanced BCAA catabolism induced by branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase (BCKDH) kinase deficiency on adaptation to exercise training in mice. 12th Asian Congress of Nutrition, 2015 年 5 月、横浜
- (3) 下村吉治、北浦靖之、筋の運動適応における分岐鎖アミノ酸の生理機能、第 70 回日本体力医学会大会、2015 年 9 月、和歌山
- (4) 寺井智勇、徐旻珺、新土大地、門田吉弘、北浦靖之、下村吉治、運動トレーニングの適応における分岐鎖アミノ酸 (BCAA) の重要性、日本アミノ酸学会 第 9 回学術大会、2015 年 10 月、滋賀

[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]

ホームページ:

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~nutr/shimomura/index.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

(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