

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20300216

研究課題名(和文)

筋肉のタンパク質とエネルギー代謝の調節機構に対するアミノ酸投与と運動の効果

研究課題名(英文) Effects of amino acid administration and exercise on the regulation of the muscle protein and energy metabolism.

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)：

健康の維持増進に栄養と運動による代謝調節の必要性は極めて高く、それらに関する正確な科学的情報とメカニズムの解明が求められている。本研究では、分岐鎖アミノ酸(BCAA)投与と運動が健康の維持増進に及ぼす効果のメカニズムを明らかにするために、(1) BCAA代謝調節機構の解明、(2) 廃用性筋萎縮に対するBCAA投与効果の解明、および(3) グルコース代謝に対するBCAA機能の解明を目的とした。得られた研究成果として、BCAA代謝調節因子として分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素キナーゼの未知の調節因子がラット肝臓ミトコンドリアに存在する可能性が示唆された。廃用性筋萎縮に対するBCAA投与の効果として、5% BCAA食摂取は、廃用性筋萎縮による筋重量の低下およびユビキチン-プロテアソーム系成分量に対して影響しなかったが、それらに対抗する細胞内シグナル成分の減少を抑制することが示唆された。さらに、グルコース代謝に対するBCAAの機能として、耐糖能を正常に維持するためには血中のBCAA濃度が重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

The metabolic control by nutrition and exercise may play important roles in the health promotion, and its correct information in regard to the responsible mechanisms for the effects are required. In the present studies, we addressed to clarify effects of branched-chain amino acid (BCAA) administration and exercise on the health promotion and the responsible mechanisms for the effects: the detailed aims were to clarify (1) the regulatory mechanism responsible for the BCAA metabolism, (2) the effects of BCAA administration on the disuse-induced muscle atrophy, and (3) the function of BCAA on the glucose metabolism. We found the evidence that suggests the existence of an unknown factor which may regulate the BCAA catabolism through inactivation of the branched-chain α -keto acid dehydrogenase kinase in rat liver mitochondria. In the study for the disuse-induced muscle atrophy, we found that the feeding of 5% BCAA diet attenuated disuse-induced decreases in the factors that promote cell growth and protein synthesis, although it did not affect the muscle atrophy itself and amounts of the components in the ubiquitin-proteasome system. Furthermore, we found that the plasma BCAA concentrations may play an important role in the normal glucose tolerance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

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 α -ケト酸脱水素酵素 (BCKDH)、
BCKDH キナーゼ、廃用性筋萎縮、ラット

1. 研究開始当初の背景

ヒトの健康は、体内の代謝調節により大きく影響されることが明らかにされつつある。現代のメタボリック・シンドロームに代表されるように、代謝状態の悪化はインスリン抵抗性を共通の症状とする肥満や糖尿病などの生活習慣病をもたらす。一方、代謝を正常に維持すればそれらの疾病予防に貢献することはもはや疑う余地はない。したがって、栄養と運動による代謝調節の必要性は極めて高く、それらに関する正確な科学的情報とメカニズムの解明が求められている。

タンパク質・アミノ酸は、体組織を構成する重要な栄養素としてばかりでなく、生体内代謝に強い影響をもつ栄養因子であることが明らかにされつつある。タンパク質構成に必要なアミノ酸は 20 種類存在するが、それらの中でも骨格筋のタンパク質代謝およびエネルギー代謝に大きな影響を及ぼすアミノ酸として分岐鎖アミノ酸 (Branched-Chain Amino Acid: BCAA) が注目されている。BCAA は、ロイシン、イソロイシン、バリンの 3 つのアミノ酸であり、いずれも体内では合成されない必須アミノ酸である。これらの 3 つのアミノ酸の中でも特に生理作用が強いのがロイシンであり、筋タンパク質の合成促進と分解抑制の作用を持つことが知られている。すなわち、ロイシンはタンパク質構成成分としての役割ばかりでなく、タンパク質代謝を調節する栄養因子としての役割も持っている。

ヒトは、主にタンパク質として 1 日に 10 g 以上の BCAA (その約 50% がロイシン) を摂取する。摂取された BCAA はタンパク質合成に利用されるが、過剰なアミノ酸は速やかに分解される。よって、体内の遊離 BCAA 量はかなり少なく、全身でもわずかに数 g のレベルである。組織の遊離 BCAA 量 (濃度) がタンパク質代謝に強い影響を及ぼすので、食事により BCAA (タンパク質) を摂取すると筋タンパク質合成は促進されることが知られている。一方、遊離 BCAA を摂取した場合には、タンパク質摂取に比べてその血中濃度上昇はかなり急峻であり、約 30 分でピークに達する。また、そのピーク値も摂取量に応じて高くなることが分かっている。これまでの研究において、血中ロイシン濃度の上昇は、筋細胞の mTOR (哺乳動物のラバマイシン標的因子であるプロテイン・キナーゼ) を活性化し、メッセンジャーRNA(mRNA)の翻訳を促進してタンパク質合成を強く促進するこ

とが証明された。筋タンパク質の合成・分解 (代謝) は、かなりのエネルギーを必要とするため、エネルギー代謝と密接な関係にある。すなわち、タンパク質代謝とエネルギー代謝は相互作用しており、それらの調節の中心的役割を担う細胞内因子が明らかにされつつある。

以上のように、BCAA (特にロイシン) はタンパク質代謝を調節するので、BCAA の代謝調節がタンパク質代謝に大きく影響する。実際に、BCAA 分解の異常亢進マウスでは、筋障害、発育不全および脳の障害が起こる。さらに、このマウスでは耐糖能が低下する。一方、BCAA を分解できない BCAA 過剰マウスでは、タンパク質合成と分解の両者が促進されるのでエネルギー代謝が亢進して肥満しないこと、および耐糖能が非常に高いことが認められた。よって、BCAA 代謝はエネルギー代謝 (特にグルコース代謝) と密接に関係することは明らかである。

BCAA 代謝 (分解) 系は、全てミトコンドリア内に存在するが、それを調節する酵素は分解系の第 2 ステップに存在する分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素(BCKDH)複合体である。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が、そのリン酸化 (不活性化) を触媒する酵素が BCKDH キナーゼである。申請者はこれまでに BCKDH 複合体の精製、BCKDH キナーゼの精製と遺伝子クローニングに成功し、さらに、そのキナーゼには BCKDH 複合体に結合して存在する結合型と結合していない遊離型が存在し、結合型のみが活性をもつことを報告した。また、*in vivo* においても、このキナーゼが BCKDH 複合体 (BCAA 代謝) の第 1 の調節因子であることも報告した。

2. 研究の目的

上述のように、筋肉のアミノ酸・タンパク質代謝とエネルギー代謝は密接な関係にあり、その大まかな外観と重要な調節因子が明らかにされてきた。しかし、BCAA 代謝の調節機構、ユビキチン-プロテアソーム系タンパク質分解酵素の成分である atrogenes を介したタンパク質分解 (筋萎縮) に対するロイシンの作用、およびこれらのロイシン作用と運動作用の相乗効果などについては依然として不明な点が多く、これらを解明する必要がある。そこで、以下の項目を本研究の目的とした。

(1) BCAA 代謝調節機構の解明： BCKDH

キナーゼの遊離型を精製し、その特徴を解析することにより結合型（活性型）との違いを明らかにし、さらに BCKDH 複合体への結合のメカニズムを明らかにする。

(2) 廃用性筋萎縮に対する BCAA 投与効果の解明：ラットの後肢を懸垂し、後肢筋に負荷をかけないことにより筋萎縮を誘発するモデルを用いる。このモデルを用いて廃用性筋萎縮に対する BCAA 投与の効果を検討する。その中で、BCAA 代謝活性の分析と共に、*atrogenes* の発現およびタンパク質合成における mRNA 翻訳開始因子の活性を分析する。これらの検討により、BCAA 作用のメカニズムを明らかにする。

(3) グルコース代謝に対する BCAA 機能の解明：インスリン感受性を高めグルコース代謝を改善することはエネルギー代謝の改善に重要である。グルコース代謝に対する BCAA 投与の効果を検討し、その BCAA 効果と BCAA 代謝との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) BCAA 代謝調節機構の解明

①すでに報告したラット肝臓からの BCKDH 複合体の精製法(Shimomura, et al. (1987) *Anal. Biochem.* 163:74-78)における、ポリエチレングリコール (PEG) 沈降法、およびフェニルセファロースとヒドロキシアパタイトのカラムクロマトグラフィーの改善を検討した。

②ラット肝臓より遊離型の活性を示さない BCKDH キナーゼの精製を、PEG 沈降法とフェニルセファロースカラムクロマトグラフィーを用いて試みた。

(2) 廃用性筋萎縮に対する BCAA 投与効果の解明

6 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットを 6 日間の後肢懸垂群と対照群に分け、更に両群を、AIN-93G 食（コントロール食）もしくは AIN-93G+5% BCAA 食(BCAA 食)を摂取させる群に分けた。後肢懸垂には独自に開発したケージを用いた。実験最終日に、全てのラットから抗重力筋であるヒラメ筋を採取した。

(3) グルコース代謝に対する BCAA 機能の解明

①実験動物として Sprague-Dawley 系の雄性ラット(8 週齢)を用い、実験日にラットをコントロール/生理食塩水(Con/生食)群、コントロール/BCAA (Con/BC)群、クロフィブレート/生理食塩水 (Clo/生食)群、クロフィブレート/BCAA (Clo/BC)群の 4 群に分けた。5 時間の絶食の後、2つのクロフィブレート群には 0.2 g/kg 体重のクロフィブレートを経口投与し、他のコントロール群には 0.5%メチルセルロースを同量投与した。その経口投与から 1 時間後、2つの BCAA 群には 0.45 g/kg 体重の

BCAA (Leu:Val:Ile=2:1:1)を経口投与し、その他の生食群には同量の生理食塩水を投与した。この 2 回目の経口投与の 2 時間後に腹腔内糖負荷試験(IPGTT)を行った。すなわち、腹腔内に 2 g/kg 体重のグルコース(25%溶液)を投与し、負荷直前と負荷後 30、60、90、120 分後に尾静脈より血液を採取し、血糖値の経時的変化を調べた。また、採取した血液の血漿 BCAA 濃度も測定した。

②実験動物として Sprague-Dawley 系の雄性ラットを用い、8 週齢時に食餌を 10%カロリー脂肪の低脂肪食を与える群と 60%カロリー脂肪の高脂肪食を与える群に分け、12 週間飼育した。インスリン抵抗性の有無を確認するために、飼育 11 週目に IPGTT を行い、血糖値の経時的変化を①実験と同様に調べた。この 4 日後に再度 IPGTT を実施したが、グルコース投与の約 1 時間前に 0.45 g/kg 体重のロイシン(4.5%溶液)を経口投与して耐糖能に対するロイシンの効果を検討した。飼育最終日にラットを屠殺して肝臓を採取した。

4. 研究成果

(1) BCAA 代謝調節機構の解明

①ラット肝臓からの BCKDH 複合体の精製法を改善し、安定してその酵素の精製を可能にした。主な改善点としては、(i)最初のポリエチレングリコール分画において、0.5 M KCl をラット肝臓からの酵素抽出液に添加することによりその分画の精度を高めたこと、(ii)フェニルセファロースゲルクロマトグラフィーにおいて、ゲルの洗浄時にゲルを攪拌して洗浄効率を高めたこと、および(iii)ヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーにおけるカラムの洗浄と BCKDH 複合体の溶出に必要なリン酸カリウム濃度を最適化したことが挙げられる。最終的に得られた BCKDH 複合体は、比活性 6.6 U/mg protein、回収率は約 30%であった。

②BCKDH 複合体を不活性化する BCKDH キナーゼの酵素学的解析において、ミトコンドリア中に含まれるタンパク質性因子によって BCKDH キナーゼが Mn^{2+} または Ca^{2+} 存在下で阻害される結果を得た。一方、フェニルセファロースゲルクロマトグラフィーにより部分精製した酵素標品にはそのキナーゼ活性阻害作用は認められなかった。すなわち、ラット肝臓のミトコンドリア抽出液には、BCKDH キナーゼ活性を阻害するこれまでに報告されていない BCKDH キナーゼ不活性化因子が存在することが示唆され、この不活性化因子は、フェニルセファロースゲルには結合しないことが明らかにされた。

(2) 廃用性筋萎縮に対する BCAA 投与効果の解明

ラットをコントロール食である AIN-93G 食もしくは 5%BCAA を添加した BCAA 食で

飼育し、これらの群の一部のラットに6日間の後肢懸垂による廃用性筋萎縮を誘発した。この間に摂取させた餌に関係なく、後肢懸垂ラットのヒラメ筋は著しく萎縮し、対照ラットに比べて～55%の重量であった。すなわち、ヒラメ筋重量に対して、BCAA 食摂取の効果は認められなかった。一方、ヒラメ筋の総タンパク質量および総 RNA 量は、後肢懸垂によって有意に低下したが、後肢懸垂群ラットではコントロール食群に比べて BCAA 食群で有意に高値であった。これらの結果より、BCAA 食摂取は、筋不活動によるヒラメ筋重量の低下を抑制しなかったが、筋総タンパク質量および総 RNA 量の低下を軽減したため、筋不活動による筋タンパク質合成能力の低下を抑制する可能性が示唆された。それらと対応して、筋萎縮に伴うタンパク質合成抑制因子 (eIF4E-BP1) の増加および細胞増殖/タンパク質合成促進因子 (cyclin D1, mTOR, ERK1) の減少は BCAA 食摂取により抑制された。しかし、筋萎縮と対応した atrogenes の発現増加に対して BCAA 食摂取の効果は認められなかった。すなわち、BCAA 食摂取は、廃用性筋萎縮自体およびユビキチン-プロテアソーム系成分量に対して影響しなかったが、それに対抗する細胞内シグナル成分の減少を抑制することが認められた。

(3) グルコース代謝に対する BCAA 機能の解明

① BCAA またはクロフィブレート投与 (Con/BC 群、Clo/生食群、Clo/BC 群) により、ラット肝 BCKDH 複合体活性は有意に活性化されたが、その活性化はクロフィブレート投与 (Clo/生食群、Clo/BC 群) においてより顕著であった。血漿 BCAA 濃度では、Clo/生食群でのみ有意な低下が認められた (図1の説明参照)。また、IPGTT の結果では、グルコース負荷 30 分後の Clo/生食群の血糖値は、クロフィブレートを投与していない Con/生食群と Con/BC 群よりも有意に高かった (図1)。また、Clo/BC 群の血糖値は Clo/生食群の血糖値よりも有意に低く、Con/生食群、Con/BC 群と同様なパターンを示した。これらの結果より、血漿 BCAA 濃度が低下することにより耐糖能が低下し、BCAA を投与して血漿 BCAA 濃度を正常に回復することで耐糖能が改善されることが示された。

② ラットに高脂肪食を 11 週間摂取させることにより、耐糖能が低下した。一方、同様の耐糖能試験の約 1 時間前にロイシンを経口投与すると、高脂肪食により低下した耐糖能が改善する傾向にあった。すなわち、ロイシン投与は高脂肪食により誘発されるインスリン抵抗性を改善することが示唆された。実験最終日に採取したラット肝臓の BCKDH 複合体活性は、低脂肪食群に比べて、高脂肪食群で高値を示した。高脂肪食群のラットでは、

インスリン抵抗性が増大したにもかかわらず BCKDH 複合体活性が高い傾向にあった現象は、これまでに報告された 2 型糖尿病ラットの酵素活性とは逆の傾向にあった。BCAA 代謝に対する高脂肪食摂取と 2 型糖尿病の影響の差異については、今後さらに検討が必要である。

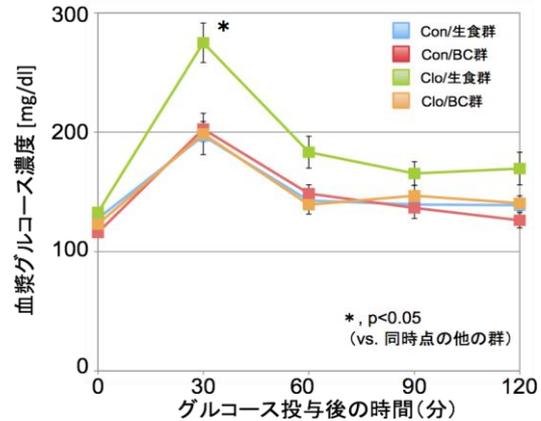


図1 腹腔内糖負荷試験 (IPGTT) における血漿グルコース濃度の変化

グルコース投与後 30 分の時点の血漿 BCAA 濃度は、Con/生食群 $403 \pm 19 \mu\text{M}$ 、Con/BC 群 $841 \pm 50 \mu\text{M}$ 、Clo/生食群 $228 \pm 17 \mu\text{M}$ 、Clo/BC 群 $537 \pm 21 \mu\text{M}$ であった。グルコース投与後 30 分の時点の血漿 BCAA 濃度の低下により血漿グルコース濃度が他の群よりも有意に増加した。

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 10 件)

- ① Kadota, Y., Kazama, S., Bajotto, G., Kitaura, Y., and Shimomura, Y. (2011) Clofibrate-induced reduction of plasma branched-chain amino acid concentrations impairs glucose tolerance in rats. *J. Parenter. Enteral Nutr.* In press, 審査有
- ② Bajotto, G., Sato, Y., Kitaura, Y., and Shimomura, Y. (2011) Effect of branched-chain amino acid supplementation during unloading on regulatory components of protein synthesis in atrophied soleus muscles. *Eur. J. Appl. Physiol.* In press, 審査有
- ③ Shimomura, Y., Inaguma, A., Watanabe, S., Yamamoto, Y., Muramatsu, Y., Bajotto, G., Sato, J., Shimomura, N., Kobayashi, H., and

- Mawatari, K. (2010) Branched-chain amino acid supplementation before squat exercise and delayed-onset muscle soreness. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 20: 236-244, 審査有
- ④ Bajotto, G., Murakami, T., Nagasaki, M., Sato, Y., and Shimomura, Y. (2009) Decreased enzyme activity and contents of hepatic branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex subunits in a rat model for type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 58: 1489-1495, 審査有
- ⑤ Shimomura, Y., Kobayashi, H., Mawatari, K., Akita, K., Inaguma, A., Watanabe, S., Bajotto, G., and Sato, J. (2009) Effects of squat exercise and branched-chain amino acid supplementation on plasma free amino acid concentrations in young women. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 55: 288-291, 審査有
- ⑥ Akita, K., Fujimura, Y., Bajotto, G., and Shimomura, Y. (2009) Inhibition of branched-chain α -ketoacid dehydrogenase kinase by thiamine pyrophosphate at different potassium ionic levels. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 1189-1191, 審査有
- ⑦ Fujimura, Y., Muramatsu, Y., Akita, K., Bajotto, G., and Shimomura, Y. (2009) Modified method for purifying rat liver branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 766-768, 審査有
- ⑧ 下村吉治, (2009) 分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 代謝の調節機構, *化学と生物*, 47: 480-485, 審査無
- ⑨ Asai, Y., Bajotto, G., Yoshizato, H., Hamada, K., Higuchi, T., and Shimomura, Y. (2008) The effects of endotoxin on plasma free amino acid concentrations in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 54: 460-466, 審査有
- ⑩ Kuzuya, T., Katano, Y., Nakano, I., Hirooka, Y., Itoh, A., Ishigami, M., Hayashi, K., Honda, T., Goto, H., Fujita, Y., Shikano, R., Muramatsu, Y., Bajotto, G., Tamura, T., Tamura, N., and Shimomura, Y. (2008) Regulation of branched-chain amino acid catabolism in rat models for spontaneous type 2 diabetes mellitus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373: 94-98, 審査有
- [学会発表] (計 13 件)
- ① 風間駿輔, 分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 代謝の調節: Branched-chain α -keto acid dehydrogenase (BCKDH) kinase の不活性化因子, 日本アミノ酸学会第 4 回学術集会, 2010年9月17日, ホテルサンシャイン鬼怒川 (日光市)
- ② Gustavo Bajotto, ラット後肢懸垂による筋萎縮時のタンパク質合成調節因子に対する分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 添加食摂取の影響, 第65回日本体力医学会大会, 2010年9月16日, 千葉商科大学 (市川市)
- ③ 門田吉弘, 低血漿分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 濃度による耐糖能の低下, 日本外科代謝栄養学会第 47 回学術集会, 2010年9月16日, 横浜産貿ホール (横浜市)
- ④ Bolin Qin, Very low density lipoprotein-apob100 overproduction is associated with the systemic and hepatic inflammation in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat, an animal model of type 2 diabetes. American Diabetes Association 70th Scientific Session, 2010年6月27日, Orlando, Florida, USA
- ⑤ 風間駿輔, Branched-chain α -keto acid dehydrogenase (BCKDH) kinase の活性測定, 第 64 回日本栄養・食糧学会大会, 2010年5月23日, アスティー徳島 (徳島市)
- ⑥ 土居崎正雄, 2型糖尿病モデルラット (ZDFラット) における分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 代謝, 第 64 回日本栄養・食糧学会大会, 2010年5月22日, アスティー徳島 (徳島市)
- ⑦ 門田吉弘, BCAA代謝に対する高脂肪食摂取の影響, 第 64 回日本栄養・食糧学会大会, 2010年5月22日, アスティー徳島 (徳島市)
- ⑧ Masao Doisaki, Regulation of hepatic branched-chain α -keto acid dehydrogenase kinase in a rat model for type 2 diabetes mellitus at different stages of the disease. *Experimental Biology 2010*, 2010年4月27日, Anaheim, California, USA
- ⑨ Yoshihiro Kadota, The concentrations of plasma branched-chain amino acids affect glucose tolerance in rats. *Experimental Biology 2010*, 2010年4月26日, Anaheim, California, USA
- ⑩ Yoshihiro Kadota, Lowered plasma branched-chain amino acid concentrations impairs glucose tolerance in rats. 19th International Congress of Nutrition, 2009年10月8日, タイ、バンコク
- ⑪ 門田吉弘, 耐糖能に対する血漿 BCAA 濃度低下の影響, 日本アミノ酸学会第 3 回学術集会, 2009年9月30日, 京都府立大学大学院 (京都市)
- ⑫ 下村吉治, 分岐鎖アミノ酸 (BCAA) の代謝調節と生理機能, 日本栄養・食糧学会第 63 回大会, 2009年5月22日, 長崎ブリックホール (長崎市)
- ⑬ Yoshiharu Shimomura, Branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex (BCKDC): purification from rat liver and inhibition by thiamin pyrophosphate (TPP), *Experimental Biology 2009*, 2009年4月20日,

New Orleans, FL, USA

〔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

<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

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：