

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18696

研究課題名(和文)慢性炎症抑制因子としての分岐鎖アミノ酸の新たな可能性

研究課題名(英文)Study for novel function of branched-chain amino acids

研究代表者

門田 吉弘 (Kadota, Yoshihiro)

名古屋大学・生命農学研究科・研究員

研究者番号：10724776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：分岐鎖アミノ酸(BCAA)の分解を抑制する酵素である分岐鎖-ケト酸脱水素酵素キナーゼ(BDK)を脂肪組織特異的に欠損させたマウス(BDK-aKOマウス)を作製した。BDK-aKOマウスの血漿及び脂肪組織におけるBCAA濃度は、コントロールマウスと比較して低値を示すことが明らかとなった。また、BDK-aKOマウスを24時間寒冷暴露した結果、コントロールマウスと比較して、褐色脂肪組織におけるPGC-1の発現が増加することが明らかとなった。これらの結果から、脂肪組織におけるBCAAの分解促進によって、褐色脂肪組織におけるエネルギー代謝が亢進される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The catabolism of branched-chain amino acids (BCAA) is regulated by the mitochondrial branched-chain -keto acid dehydrogenase kinase (BDK). In this study, we generated adipose tissue-specific BDK deficient mice (BDK-aKO mice) and investigated its characteristics. BCAAs were lower in white adipose tissues and brown adipose tissue as well as in plasma of BDK-aKO mice compared to control mice. Moreover we revealed that cold exposure-induced mRNA expression of PGC-1 in brown adipose tissue was increased in BDK-aKO mice. These results suggested that BCAA catabolism in adipose tissues affected BCAA levels in whole body and energy consumption in brown adipose tissue.

研究分野：栄養生化学

キーワード：分岐鎖アミノ酸 分岐鎖アミノ酸分解系 脂肪組織 コンディショナルノックアウトマウス

### 1. 研究開始当初の背景

分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 分解系は、そのほとんどがミトコンドリア内に存在し、最初の2つのステップのみが3つのBCAAに共通であるため、この分解系の特徴的な反応である (図1)。

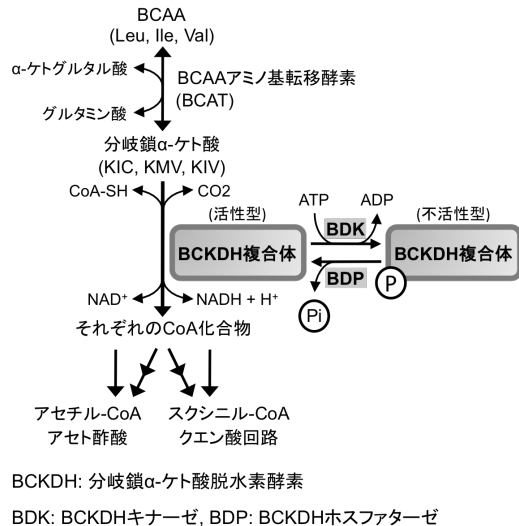


図1. BCAA 分解系

第1ステップは、BCAA アミノ基転移酵素 (BCAT) による可逆的な脱アミノ反応である。第2ステップは、分岐鎖 α-ケト酸脱水素酵素 (BCKDH) 複合体による酸化的脱炭酸反応であり、不可逆である。また、BCKDH 複合体は、酵素タンパク質のリン酸化・脱リン酸化による速やかな活性調節を受けることが報告されている。よって、BCAA 分解系は第2ステップにより律速されると考えられている。

BCKDH 複合体活性は、E1 サブユニットのリン酸化により調節される。そのリン酸化により BCKDH 複合体を不活性化する酵素が特異的キナーゼ (BCKDH キナーゼ: BDK) である。一方、リン酸化型 BCKDH 複合体を脱リン酸化により活性化する酵素が特異的ホスファターゼ (BCKDH ホスファターゼ: BDP) である。BDP の BCKDH 複合体に対する比活性は低いため (4 nmol/min/mg protein)、BCKDH 複合体の活性は BDK により強く左右されていると考えられる。

ヒトやラットでは、他の臓器と比較して、肝臓及び骨格筋における BCKDH 複合体活性が特に高いことが報告されており、血中 BCAA 濃度は肝臓及び骨格筋の BCAA 分解系によって調節されると考えられている。しかしながら、脂肪組織特異的にグルコーストランスポーターをノックアウト (KO) したマウスでは、脂肪組織の BCAA 分解系が抑制され、血中 BCAA 濃度が高値を示すことが近年報告された。この報告は、脂肪組織における BCAA 分解系が血中 BCAA 濃度を調節することを明らかにした最初の報告ではあるが、脂肪組織における糖代謝を抑制したモデル

マウスでの報告であり、脂肪組織の BCAA 分解系のみを調節したモデルマウスを用いた報告はまだない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、脂肪組織の BCAA 分解系が血中 BCAA 濃度に与える影響について解明することである。

### 3. 研究の方法

まず、脂肪組織の BCAA 分解系が血中 BCAA 濃度に与える影響評価するために必要な動物モデルである脂肪組織特異的 BDK-KO マウスを作製した。

本研究では、既に報告されている「Cre-loxP システムを用いて脂肪組織特異的に IRF4 を欠損させる方法 (Eguchi J et al. Cell Metab. 2011;13:249-259)」を応用することで、脂肪組織特異的に BDK を欠損させた。まず、マウスにおける BDK のゲノム DNA (図2A) を単離し、エクソン 9~12 (BDK 活性部位をコードするエクソン) を loxP で挟み込んだターゲティングベクター (図2B) を調製した。そして、このベクターを胚性幹細胞 (C57BL/6 マウス ES 細胞) に挿入し、相同組み換えを起こした ES 細胞を単離した後、ICR 系マウスの胚盤胞に注入することでキメラマウスを作製した。キメラマウスと C57BL/6 系統マウスを交配させることで、BDK を loxP で挟み込んだマウス (BDK-floxed (Neo+) ヘテロマウス: 図2C) を作製し、さらに部位特異的組換え酵素フリッパーゼ (FLP) のトランスジェニックマウスとの交配により BDK-floxed マウス (図2D) を作製した。

続いて、脂肪組織特異的に発現するアディポネクチンのプロモーター配列を持つ 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と、BDK-floxed マウスとを交配させることで、Cre トランスジーンを持つ (Cre+) BDK-floxed ヘテロマウスを作製し、さらにこれらを交配させることで (Cre+) BDK-floxed ホモマウスを作製した。

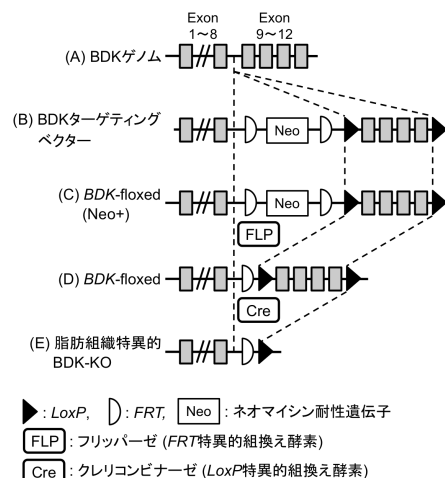


図2. 組織特異的 BDK-KO マウスの作製

(Cre+) BDK-floxed ホモマウス及びそのコントロールマウス((Cre-) BDK-floxed ホモマウス)に標準食(D12450B、エルエスジー株式会社)を与えて予備飼育し、血液及び脂肪組織(腎周囲脂肪、後腹膜脂肪、副睾丸周囲脂肪)、その他の組織(肝臓、骨格筋、心臓、腎臓、脾臓、睾丸(雄)、脳)を採取した。種々の組織サンプル中に存在する BDK をウェスタンブロット法で検出することで、脂肪組織のみで BDK が欠損していることを確認した。そして、血中及び種々の組織中に含まれる遊離 BCAA 濃度を測定することで、脂肪組織特異的に BCAA が不足していることを確認し、脂肪組織特異的な BDK の欠損が、全身の BCAA 代謝に対して与える影響を解明した。

続いて、脂肪組織特異的な BDK-KO マウス及びそのコントロールマウスを 4 に設定した低温室にて 24 時間飼育後、褐色脂肪組織を採取した。採取した褐色脂肪組織における PGC-1 の発現をリアルタイム PCR 法によって測定することで、脂肪組織特異的な BDK の欠損によるエネルギー代謝への影響について検討した。

#### 4. 研究成果

(Cre+) BDK-floxed ホモマウス及びそのコントロールマウス((Cre-) BDK-floxed ホモマウス)の脂肪組織(腎周囲脂肪、後腹膜脂肪、副睾丸周囲脂肪)及びその他の組織(肝臓、骨格筋、心臓、腎臓、脾臓、睾丸(雄)、脳)を採取し、BDK の発現をウェスタンブロット法にて検出した。その結果、(Cre+) BDK-floxed ホモマウスの脂肪組織でのみ BDK が検出されなかった。この結果により、本試験で作製した(Cre+) BDK-floxed ホモマウスが、脂肪組織特異的な BDK-KO マウスとして続く試験に使用できることが確認された。

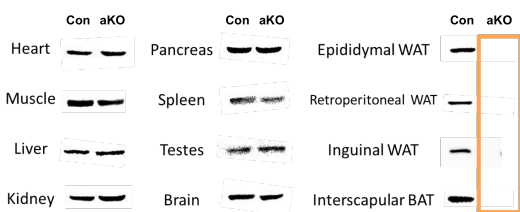


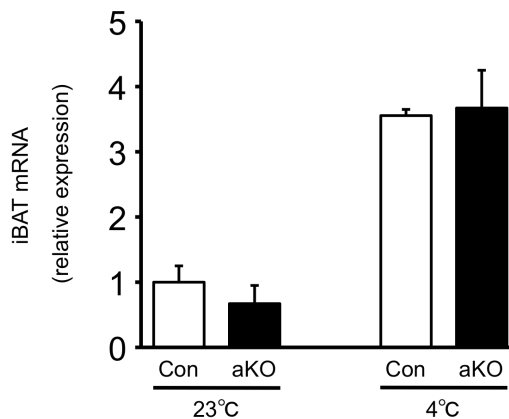
図 3. 脂肪組織特異的な BDK-KO マウスの各組織における BDK の発現

また、脂肪組織特異的な BDK-KO マウスにおける血漿及び脂肪組織の遊離 BCAA 濃度を測定した結果、コントロールマウスと比較して、低値を示す傾向が見られた。この結果は、「脂肪組織における BCAA 分解系が血中 BCAA 濃度を調節する」という過去の報告と一致しており、脂肪組織における BCAA 分解系と血中 BCAA 濃度との関係について直接評価した、世界初の成果である。

さらに、脂肪組織特異的な BDK-KO マウスおよびそのコントロールマウスを寒冷暴露し

た結果、脂肪組織特異的な BDK-KO マウスの褐色脂肪組織における PGC-1 の発現が、コントロールマウスと比較して増加することが明らかとなった。

#### UCP-1



#### PGC-1α

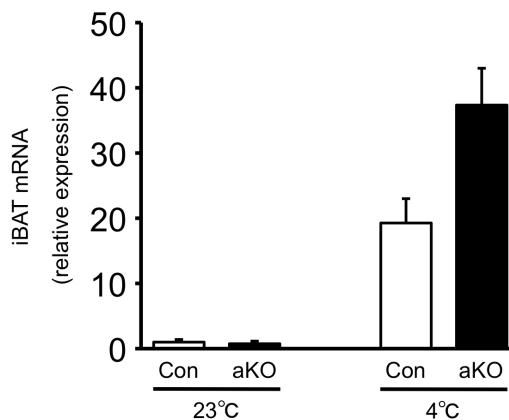


図 4. 寒冷暴露による mRNA の増加に対する脂肪組織特異的な BDK-KO の影響

この結果より、脂肪組織における BCAA の分解系を亢進させることによって、寒冷暴露時のエネルギー代謝が亢進する可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕

ホームページ等

## **6 . 研究組織**

(1)研究代表者

門田 吉弘 (KADOTA, Yoshihiro)

名古屋大学大学院・生命農学研究科・研究員

研究者番号：1 0 7 2 4 7 7 6