

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：14202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20867

研究課題名（和文）アミノ酸代謝産物によるピルビン酸代謝制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulatory roles of amino acid metabolites in pyruvate metabolism

研究代表者

西 清人（Nishi, Kiyoto）

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：30749362

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：分岐鎖アミノ酸（branched-chain amino acid: BCAA）の代謝産物である分岐鎖 ケト酸（branched-chain -ketoacid: BCKA）が、ミトコンドリアピルビン酸担体（mitochondrial pyruvate carrier: MPC）、ピルビン酸輸送を介してミトコンドリア内外のエネルギー代謝をつなぐハブ分子）の阻害を介して、ピルビン酸の代謝を制御することを明らかにした。

また、BCKAによるMPC阻害が、肝細胞において特に強いことを明らかにした。このことは、肝細胞がBCKA量を感じることによって、BCAA代謝のセンサーとなっていることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BCAAの摂取は、運動後の筋損傷や筋疲労からの回復を促進し、マウスでは寿命延長効果も報告されている。一方、肥満や心疾患ではBCAA代謝障害によりBCAAやBCKAが増加し、疾患を増悪させると考えられている。このように、BCAA代謝は生体内において様々な役割を果たしているが、その分子機構は十分に解明されていない。本研究はその一端を明らかにしたものであり、健康を保つための食事の確立などにも役立つ可能性がある。

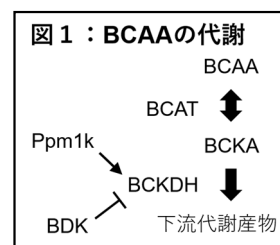
研究成果の概要（英文）：Firstly, we found that the accumulation of BCKAs inhibits hepatic glucose production. Secondly, BCKAs inhibit mitochondrial pyruvate carrier (MPC) in hepatocytes and selectively suppresses pyruvate supported gluconeogenesis. Thirdly, BCATm expression in non-hepatic mitochondria prevents the accumulation of BCKAs and mitigates the inhibition of MPC. Collectively, these results revealed a novel and significant role of BCAA metabolism in liver gluconeogenesis and pyruvate homeostasis.

研究分野：代謝学

キーワード：アミノ酸 ピルビン酸 糖新生 MPC BCAA ミトコンドリア

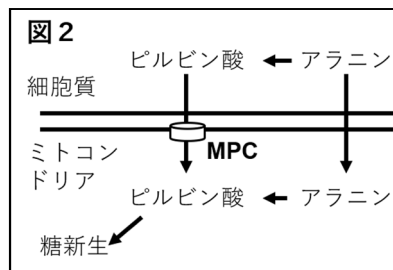
1. 研究開始当初の背景

分岐鎖アミノ酸 (BCAA) は分岐鎖アミノ酸アミノ転移酵素 (branched-chain aminotransferase: BCAT; 肝臓以外に発現) により BCKA へ代謝され、BCKA は分岐鎖 ケト酸脱水素酵素 (branched-chain -ketoacid dehydrogenase: BCKDH) などによる代謝で様々な代謝産物を生じる。BCKDH は BCAA 代謝全体の律速酵素であり、脱リン酸化酵素 PPM1K によって活性化、リン酸化酵素 BDK によって不活性化される (図 1)。



近年、肥満や心疾患において各臓器の BCKDH 活性が低下し、血中や組織中の BCAA/BCKA が増加することがわかってきた。BCAA の増加については、mTOR シグナル活性化を介してインスリン感受性の低下に寄与すること (Newgard 他 CellMetab2009) などが報告されているが、BCKA の役割は明らかでない。高濃度 (100uM 以上) の BCKA が心筋ミトコンドリアを障害することは報告されているが (Sun 他 Circulation2016) 生理的濃度における BCKA の作用は不明である。

申請者は、BCAA 代謝障害モデルである PPM1K 欠損マウスで糖新生 (ピルビン酸などからグルコースを合成する反応。主に肝細胞で起こる) が減弱していることを見出した。マウス初代培養肝細胞を用いた糖新生アッセイ (Yoon 他 Nature2001; 培養液中に糖新生基質を添加し、グルコース産生量を測定) では、BCAA でなく BCKA がピルビン酸



を基質とした糖新生を抑制した。一方、BCKA はアラニンを基質とした糖新生は抑制しなかった。図 2 に示すように、アラニンは、MPC 非依存性にミトコンドリアに輸送されること以外は、ピルビン酸と同じ糖新生経路をたどる (Gray 他 Cell Metab 2015)。以上から、BCKA が MPC 活性阻害を介して糖新生を抑制する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究は、(1) BCKA による MPC 阻害の様式、(2) BCKA による MPC 阻害の分子機構、(3) BCKA による糖新生抑制が MPC 阻害を介したもののか、の 3 点を明らかにすることで、生体内での BCKA の役割、新規 MPC 機能調節機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

主に以下のような実験を行った。実験手法の詳細は、Nishi 他 Cell Rep in press (プレプリントは <http://ssrn.com/abstract=4022706> にアップロード済み) に記載されている。

(1) ピルビン酸取り込みアッセイ: ^{14}C でラベルしたピルビン酸を含むバッファーで単離ミトコンドリアをインキュベートし、取り込まれた ^{14}C の量を測定して、MPC 活性を算出する。

(2) DARTs アッセイ: 小分子と結合した基質タンパク質がプロテアーゼによる分解に抵抗性になることを利用したアッセイ。DARTs は Drug affinity responsive target stability の略。BCKA 有りまたは無し状態で、野生型マウス肝臓ミトコンドリアのタンパク抽出液をプロテアーゼによって消化し、ウエスタンブロットによって MPC1、2 の量を比較する。

(3)糖新生アッセイ： マウス初代培養肝細胞やヒト肝細胞株を用い、培養液中に糖新生基質を添加し、グルコース産生量を測定する。

4. 研究成果

・¹⁴C でラベルしたピルビン酸の取り込みを測定することで、ミトコンドリアピルビン酸担体 (MPC) の活性を測定し、BCKA が濃度依存的に MPC を阻害することを明らかにした。さらに、ピルビン酸濃度を変化させても、BCKA による MPC 阻害率は変化しないため、BCKA による MPC 阻害は非競合阻害であることが示唆された。一方、BCKA の存在下ではプロテアーゼによる MPC の分解が遅延した。以上の結果から、BCKA が MPC と結合し、アロステリックに MPC の活性を制御する可能性が示唆された。

・MPC 阻害薬の存在下では、BCKA による糖新生抑制効果が消失したため、BCKA が MPC を介して糖新生を抑制していることが示唆された。

・これまで用いていたマウス初代培養肝細胞に加えて、ヒト肝細胞株においても BCKA による糖新生抑制に矛盾しない実験結果を得た。

・心臓由来のミトコンドリアでは、肝臓由来のミトコンドリアと比べ、BCKA による MPC 阻害が軽度であった。そのため、分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素 (branched-chain amino acid aminotransferase : BCAT、BCAA-BCKA 間の可逆的代謝を担う酵素であり肝細胞で欠失している) を過剰発現させた肝細胞の解析などを行い、肝臓以外のミトコンドリアでは BCAT により BCKA が BCAA へと代謝され、BCKA による MPC 阻害が減弱することがわかった。

・¹³C で標識したピルビン酸を用いて、ピルビン酸代謝経路の詳細な追跡を行い、BCKA 負荷による代謝経路の変化が MPC 阻害剤と同様であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Saijo Sayaka, Ohno Mikiko, Iwasaki Hirotaka, Matsuda Shintaro, Nishi Kiyoto, Hiraoka Yoshinori, Ide Natsuki, Kimura Takeshi, Nishi Eiichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Nardilysin in adipocytes regulates UCP1 expression and body temperature homeostasis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-07379-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura Kimihiro, Fujita Yukihiro, Ida Shogo, Yanagimachi Tsuyoshi, Ohashi Natsuko, Nishi Kiyoto, Nishida Atsushi, Iwasaki Yasumasa, Morino Katsutaro, Ugi Satoshi, Nishi Eiichiro, Andoh Akira, Maegawa Hiroshi	4. 巻 59
2. 論文標題 Glycaemia and body weight are regulated by sodium-glucose cotransporter 1 (SGLT1) expression via O-GlcNAcylation in the intestine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Metabolism	6. 最初と最後の頁 101458 ~ 101458
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molmet.2022.101458	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nishi Kiyoto, Abell Lauren, Frausto Ricardo, Ritterhoff Julia, McMillen Timothy, Sweet Ian, Wang Yibin, Gao Chen, Tian Rong	4. 巻 -
2. 論文標題 Branched-Chain Keto Acid Inhibits Mitochondrial Pyruvate Carrier and Suppresses Gluconeogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 SSRN Electronic Journal (preprint)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2139/ssrn.4022706	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西 清人、西 英一郎、Rong Tian
2. 発表標題 分岐鎖アミノ酸代謝産物はビルビン酸輸送を介して糖新生を抑制する
3. 学会等名 第24回・第25回日本病態栄養学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西清人, 岩崎広高, 松田真太郎, 松田真太郎, 大野美紀子, 西英一郎
2. 発表標題 肝細胞のナルディライジンは褐色脂肪組織を介して食事誘導性熱産生を制御する
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西 清人、西 英一郎、Rong Tian
2. 発表標題 分岐鎖アミノ酸代謝産物によるピルビン酸代謝制御機構の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田 真太郎、岩崎 広高、西 清人、大野 美紀子、西 英一郎
2. 発表標題 脂肪細胞のNardi lysinは細胞における酸素需要および低酸素誘導因子 (HIF1-) シグナルを介してインスリン感受性を制御する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西清人, 岩崎広高, 松田真太郎, 松田真太郎, 大野美紀子, 西英一郎
2. 発表標題 肝細胞のナルディライジンによる褐色脂肪組織制御機構の解明
3. 学会等名 第53回日本動脈硬化学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 茶谷元晴, 藤井貴之, 藤堂景史, 大野美紀子, 西清人, 平田多佳子, 安藤朗, 西英一郎
2. 発表標題 TおよびB細胞のナルディライジンによる抗体産生調節機構の解明
3. 学会等名 第26回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	ワシントン大学	カリフォルニア大学ロサンゼルス校	シンシナティ大学