様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 月 １５ 日現在

機関番号：１３９０１
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2014～2017
課題番号：２６２９２０６８

研究課題名（和文）哺乳動物における生体調節因子としての分岐鎖アミノ酸の生理機能

研究課題名（英文）Physiological functions of branched-chain amino acids as regulatory factors in mammals

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）　　11,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、哺乳動物の必須アミノ酸である分岐鎖アミノ酸（BCAA）の分解を調節する酵素BCKDH複合体を不活性化する特異的キナーゼ(BDK)を、全身組織または組織特異的に欠損させることにより、BCKDH複合体がBCAA代謝の主要調節酵素であることを明らかにすると共に、BCAAの生体調節機構の解明を目的とした。これらのBDK欠損マウスでは、組織及び血中のBCAA濃度は有意に低下したので、BCAA代謝調節酵素としてBCKDH複合体の重要性が示された。さらに、これらのBDK欠損マウスを用いた研究により、筋タンパク質代謝、持久運動能力、エネルギー代謝におけるBCAAの重要性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Branched-chain amino acids (BCAA) are essential amino acids in mammals. The aims of the present study were to elucidate the importance of branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase (BCKDH) complex as the rate-limiting enzyme in the BCAA catabolism in vivo and diverse functions of BCAA as important factors to regulate systemic metabolism using global and conditional BCKDH kinase-knockout (BDK-KO) mice. In both global and muscle specific BDK-KO mice, plasma and muscle BCAA concentrations were significantly decreased, indicating that BCKDH complex is an important enzyme to regulate the BCAA catabolism. Furthermore, in the studies using these mice, it was suggested that BCAA play important roles in regulation of muscle protein metabolism, endurance exercise performance, and energy metabolism.

研究分野：農学

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　分岐鎖アミノ酸分解亢進　コンディショナルノックアウト　マウス　筋肉　脂肪組織　運動

１．研究開始当初の背景

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）は、ヒトを含む哺乳動物の体内では合成されない栄養学上の必須アミノ酸である。BCAA は、筋タンパク質の必須アミノ酸の約 35%、食事中の必須アミノ酸の約 50%を占めるため、ヒトは多くのBCAAを体内に保有すると同時に多くの BCAA を摂取している。一方、体内には遊離アミノ酸としての BCAA が存在しタンパク質合成の基質となっているが、体内ではBCAA分解系が存在し過剰なBCAAは速やかに分解されるため、その体内での濃度は安定しており、血中濃度は合計で 0.5 mM 程度の低濃度に保たれている。食事などの摂取によりこの遊離 BCAA 濃度が上昇すると、タンパク質合成が促進されるようである。

これまでに知られているBCAAの生理的機能としては、タンパク質合成の必須成分としての役割が中心であったが、近年の研究において、この BCAA 代謝の恒常性はヒトの健康と密接な関係にあることが明らかにされつつある。古くから知られている先天性 BCAA 代謝疾患であるカエデ糖尿症では、そのアミノ基転移産物である分岐鎖α-ケト酸の蓄積により発達段階の脳に障害が起こることが分かっているが、最近、その生理状態は心臓疾患発生の原因になることも判明した。また、糖尿病や肥満などによりインスリン抵抗性が進展すると、血中 BCAA 濃度の有意な上昇（20%前後）を伴うため、インスリン抵抗性の発生における BCAA の関与が疑われていると同時に、その血中アミノ酸濃度が２型糖尿病のリスク評価に利用できる可能性が示唆されている。一方、肝硬変では逆に血中 BCAA 濃度が有意に低下し、その疾患の低アルブミン血症の原因と考えられている。また、この症状では耐糖能異常（インスリン抵抗性）も伴う。さらに、先天的に BCAA 分解亢進による低 BCAA 血症のヒトは、てんかん発作を伴う自閉症の患者であることが判明した。したがって、BCAA 代謝の異常およびそれに伴う遊離 BCAA 濃度の変動は、タンパク質代謝、グルコース代謝、及び脳機能に大きな影響を及ぼすと考えられる。さらに、15 カ月齢の中高齢マウスを用いた研究において、BCAA を長期（3 カ月間）投与すると、筋ミトコンドリア生合成を増加し運動能力の上昇と平均寿命の延長をもたらすことも報告された。以上のように、BCAA はタンパク質構成成分としての機能以外に種々の重要な生理的役割を担っていると推察されるが、それらの作用機序はほとんど解明されてない。

２．研究の目的

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つのステップが３つの BCAA に共通であり、この分解系の特徴的な反応である。第１ステップは、BCAA アミノ基転移酵素（branched-chain aminotransferase (BCAT)）による脱アミノ反応であり、可逆反応である。第２ステップは、分岐鎖α-ケト酸脱水素酵素（branched-chain α-ketoacid dehydrogenase (BCKDH)）複合体による脱アミノ産物の酸化的脱炭酸反応であり、不可逆である。さらに、BCKDH 複合体は酵素タンパク質のリン酸化サイクルによる調節を受けるので速やかな活性調節が可能である。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。この BCKDH 複合体をリン酸化して不活性化する酵素が BCKDH kinase（BDK）であり、脱リン酸化して活性化する酵素が BCKDH phosphatase（BDP）である。

本研究では、哺乳動物の体内で BCAA 分解を調節（抑制）する酵素である BDK を組織特異的に欠損させることにより、組織特異的な BDK 欠損（BCAA 分解亢進）マウス（コンディショナルノックアウトマウス）を作製して、BCKDH 複合体が BCAA 代謝の主要酵素であることを明らかにすると共に、BCAA の生体調節におけるメカニズムを検討した。BDK を欠損させる組織としては、筋肉及び脂肪組織等を対象とし、筋肉の発達と維持（筋タンパク質代謝）、エネルギー代謝、ミトコンドリア生合成等における BCAA の生理機能の解明を目的とする。

３．研究の方法

［組織特異的（コンディショナル）ノックアウトマウスの作製］

このマウスの作製には、Cre-loxP システム（標的遺伝子の一部を特異的配列 loxP で挟み込み、その部分を部位特異的組換え酵素 Cre で除去する方法：Bruning et al. Mol Cell. 1998;2:559-69）を用いた。研究代表者等は、この方法によりコンディショナル BDK 遺伝子 (BDK)-KO マウス作製の基礎となる BDK-floxed マウスの作製に成功した。その主なステップは次のようである：(1)マウス BDK のエクソン 9～12（BDK 活性部位エクソン）を loxP で挟み込み薬剤耐性遺伝子（Neo+）を持ったターゲティングベクターの調製、(2) このベクターの胚性幹細胞（C57BL/6 マウス ES 細胞）への導入と相同組換えクローンの単離、(3)この ES 細胞を ICR マウス胚に注入することによるキメラマウスの作製、(4)キメラマウスと C57BL/6 系統マウスの交配による BDK を loxP で挟み込んだマウス（BDK-floxed (Neo+) ヘテロマウス）の作製、(5) このマウスから薬剤耐性遺伝子（Neo+）を除去した BDK-floxed マウスの作製。

本研究では、得られたBDK-floxedマウスを、筋特異的酵素であるクレアチンキナーゼ(CK)のプロモーターを持つ CK-Cre トランスジェニックマウスと交配させて(CK-Cre+)BDK-floxed ホモマウス、すなわち筋特異的 BDK 欠損マウス（BDK-mKO マウス）を作製した。

また、脂肪組織特異的 BDK-KO マウス(BDK-adKO マウス)は、BDK-floxed マウスをアディポネクチンのプロモーターを持つアディポネクチン-Cre トランスジェニックマウスと交配させてそのマウスを作製した。

さらに、全身組織でBDKを欠損するマウス(BDK-KO マウス)は、BDK-floxed マウスを作製する過程で得られる BDK-floxed(Neo+)マウス同士を交配することにより作製した。これらのマウスを繁殖して得られたマウスを順次実験に用いた。

４．研究成果

［BDK-mKO マウスにおける筋タンパク質代謝と運動能力］

BDK-mKO マウスでは、絶食時の BCAA 濃度がコントロールマウスに比べて骨格筋で 50%以下のレベルまで低下したが、全身 BDK-KO マウスが示したような体重低下、脳神経系の異常（尾懸垂による後肢抱え込み動作）は認められず（図 1)、骨格筋重量にも変化は見られなかった。

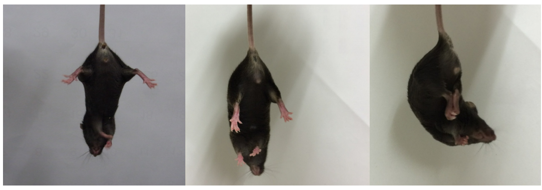

図１．尾懸垂における BDK 欠損マウスのパフォーマンス

Control: 正常マウス、BDK-mKO: 筋特異的 BDK 欠損マウス、BDK-KO: 全身組織 BDK 欠損マウス。

一方、BCAA を一過的に経口投与すると、コントロールマウスに比べて BDK-mKO マウスの骨格筋の mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)活性が有意に上昇したので、このマウスの骨格筋では mTORC1 の BCAA に対する感受性が上昇し、慢性的な BCAA 不足に対して適応していると推察された。

次いで、餌中のタンパク質含量を 20%から 8%に減らした場合の影響を検討するために、8%タンパク質の低タンパク質食(LPD)で飼育すると、BDK-mKO マウスの骨格筋における mTORC1 活性、筋線維タンパク質濃度が、コントロールマウスに比べて有意に低下した。一方、BDK-mKO マウスに 3%BCAA を含む飲水を与えて飼育すると、筋線維タンパク質濃度の低下が抑制された。よって、BCAA が不足した際に BCAA 分解を抑え、正常な BCAA 濃度を保つことが、筋線維タンパク質を維持するために重要であると考えられる。

トレッドミルを用いた走運動試験により、BDK-mKO マウスの持久運動能力について解析したところ、運動トレーニングを負荷していない状態ではコントロールマウスと同程度であったが、1 日 1 時間の走運動トレーニングを２週間（5 日／週）負荷して２倍程度に上昇した持久運動能力は、コントロールマウスに比べて BDK-mKO マウスで有意に低下していた。このマウスでは、筋中の acetyl-CoA 濃度が半減しており、エネルギー代謝の乱れが認められるとともに、筋グリコーゲン量も有意に低下していたので、BCAA 分解系を正常に保ち、体内の BCAA 濃度を低下させないことは、エネルギー代謝と筋グリコーゲン量を正常に保ち、運動トレーニングの効果を十分に発揮するために重要であることが示唆された。さらに、BDK-mKO マウスとコントロールマウスに 3%BCAA を含む飲水を与えて飼育し、その間に 2 週間のトレーニングを付加すると、BDK-mKO マウスの筋中 acetyl-CoA と筋グリコーゲン濃度はコントロールマウスと同レベルに回復すると共に、持久運動能力はコントロールマウスよりも BDK-mKO マウスで有意な高値を示した。よって、筋中の BCAA 代謝亢進によるエネルギー代謝の乱れよりも、BCAA 不足が持久運動能力を低下させたと結論された。

［BDK-adKO マウスにおけるエネルギー代謝］

哺乳動物における脂肪組織は、余剰のエネルギーを蓄積する組織であるが、BCAA 代謝に対して影響を及ぼすことも知られているが、その機構についてはほとんどわかっていない。そこで、本研究では、逆に脂肪組織の BCAA 代謝を亢進した BDK-adKO マウスにおける血中の BCAA 濃度及びエネルギー代謝について検討を加えた。

BDK-KO マウス及び BDK-adKO マウスは、コントロールマウスに比べて精巣上体脂肪重量が有意に低かった。一方、BDK-KO 及び BDK-adKO マウスの褐色脂肪組織における uncoupling protein 1(UCP1) の mRNA 発現量はコントロールマウスに比べて高い傾向にあった。1 日(24 時間)におけるマウスの酸素消費量を測定したところ、BDK-KO マウスの酸素消費量はコントロールマウスに比べて高い傾向が見られたが、BDK-adKO マウスとコントロールマウスの間に差はなかった。これらの結果から、脂肪組織の BCAA 代謝亢進が腹腔内脂肪蓄積に対して影響することが示唆され、この原因としてマウスのエネルギー代謝の亢進が関与する可能性が示唆されたが、褐色脂肪組織の UCP1 発現量に起因する可能性は少ないと推察された。

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　8　件）

① Xu M, Kitaura Y, Shindo D, Shimomura Y. Branched-chain amino acid (BCAA) supplementation enhances adaptability to exercise training of mice with a muscle-specific defect in the control of BCAA catabolism. Biosci Biotechnol Biochem. 2018 Mar 1:1-4. doi: 10.1080/09168451.2018.1440174.（査読有）

② Xu M, Kitaura Y, Ishikawa T, Kadota Y, Terai C, Shindo D, Morioka T, Ota M, Morishita Y, Ishihara K, Shimomura Y. Endurance performance and energy metabolism during exercise in mice with a muscle-specific defect in the control of branched-chain amino acid catabolism. PLoS One. 2017 Jul 18;12(7):e0180989. doi: 10.1371/journal.pone.0180989. （査読有）

③ Ishikawa T, Kitaura Y, Kadota Y, Morishita Y, Ota M, Yamanaka F, Xu M, Ikawa M, Inoue N, Kawano F, Nakai N, Murakami T, Miura S, Hatazawa Y, Kamei Y, Shimomura Y. Muscle-specific deletion of BDK amplifies loss of myofibrillar protein during protein undernutrition. Sci Rep. 2017 Jan 4;7:39825. doi: 10.1038/srep39825. （査読有）

④ Kitaura Y, Inoue K, Kato N, Matsushita N, Shimomura Y. (2015) Enhanced oleate uptake and lipotoxicity associated with laurate. FEBS Open Bio. 5: 485-491. doi: 10.1016/j.fob.2015.05.008. （査読有）

⑤ Kadota Y, Toyoda T, Hayashi-Kato M, Kitaura Y, Shimomura Y. (2015) Octanoic acid promotes branched-chain amino acid catabolism via the inhibition of hepatic branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase in rats. Metabolism. 64(9):1157-1164. doi: 10.1016/j.metabol.2015.05.014. （査読有）

⑥ Shimomura Y, Kitaura Y, Kadota Y, Ishikawa T, Kondo Y, Xu M, Ota M, Morishita Y, Bariuan JV, Zhen H. (2015) Novel physiological functions of branched-chain amino acids. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 61 Suppl:S112-S114. doi: 10.3177/jnsv.61.S112. （査読有）

⑦ Zhen H, Nakamura K, Kitaura Y, Kadota Y, Ishikawa T, Kondo Y, Xu M, Shimomura Y. (2015) Regulation of the plasma amino acid profile by leucine via the system L amino acid transporter. Biosci Biotechnol Biochem. 79(12): 2057-2062. doi: 10.1080/09168451.2015.1060845.（査読有）

⑧ Hatazawa Y, Tadaishi M, Nagaike Y, Morita A, Ogawa Y, Ezaki O, Takai-Igarashi T, Kitaura Y, Shimomura Y, Kamei K, Miura S. (2014) PGC-1α-mediated branched-chain amino acid metabolism in the skeletal muscle. PLoS One. 9(3): e91006. doi: 10.1371/journal.pone.0091006. （査読有）

〔学会発表〕（計　12　件）

① 下村吉治．分岐鎖アミノ酸の生理機能の多様性．第 15 回レドックス・ライフイノベーション　シンポジウム．2018.

② Shimomura Y. Diverse functions of branched-chain amino acids (BCAAs). 2017 The Korean Nutrition Society 50th Anniversary International Conference. Seoul, Korea, 2017.

③ 下村吉治．BCAA 代謝を調節するビタミン B1 と B6．日本ビタミン学会第 69 回大会．2017.

④ 下村吉治，北浦康之．恒常的 BCAA 分解亢進は運動トレーニング効果にどのように影響するか．日本農芸化学会 2017 年度大会．2017.

⑤ 下村吉治．分岐鎖アミノ酸（BCAA）の生理機能の多様性．第 63 回日本栄養改善学会学術総会．2016.

⑥ 下村 吉治，北浦 靖之，石川 卓弥，門田吉弘，森下 由佳子，太田 美樹．筋タンパク質代謝の調節における分岐鎖アミノ酸（BCAA）分解制御の重要性．第 70 回日本栄養・食糧学会大会．2016.

⑦ Shimomura Y. Novel physiological functions of branched- chain amino acids. 12th Asian Congress of Nutrition（横浜）, 2015.

⑧ 下村吉治．分岐鎖アミノ酸（BCAA）の生理機能とその応用性．第 18 回日本病態栄養学会年次学術集会．2015.

⑨ Shimomura Y. Nutritional Functions of Amino Acids - Focusing on Therapeutic Aspect of Branched-chain Amino Acids. the 15th National Congress of Indonesian Nutrition Association : Plenary Lecture, 2014.

⑩ 下村吉治、北浦靖之、門田吉弘、石川卓弥、加藤里奈．分岐鎖アミノ酸代謝とグルコース代謝の相互作用．第 35 回日本肥満学会，2014.

⑪ 下村吉治、北浦靖之、門田吉弘、石川卓弥．インスリン抵抗性と分岐鎖アミノ酸(BCAA)代謝，第 14 回日本抗加齢学会，2014.

⑫ Shimomura Y, Ishikawa T, Kitaura Y, Kadota Y, Xu M. Effects of muscle-specific promotion of branched-chain amino acid (BCAA) catabolism on growth in mice. 36th ESPEN CONGRESS ON CLINICAL NUTRITION & METABOLISM (Geneva), 2014.

〔その他〕
ホームページ等
https://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・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・生命農学研究科・講師

研究者番号： 90442954

(3)研究協力者

門田　吉弘（KADOTA Yoshihiro）