

31. 骨格筋アミノ酸代謝と筋量制御の分子機序解明

亀井 康富

Key words: アミノ酸, 骨格筋, 運動,
遺伝子改変マウス, BCAA

京都府立大学
大学院生命環境科学研究科
分子栄養学研究室

緒言

PGC1 α は様々な核内受容体そして他の転写因子の転写共役因子である。PGC1 α は、骨格筋等において運動により発現増加し、ミトコンドリアの生合成、筋線維タイプの変化、脂肪酸酸化促進など、エネルギー代謝や運動に関連する遺伝子発現を活性化することが知られている。これまでに、骨格筋における PGC1 α の過剰発現が骨格筋においてミトコンドリア生合成および毛細血管の密度を増加させ、運動能力の改善に寄与していることが示されている。

BCAA は骨格筋のタンパク質を構成する必須アミノ酸の 35% を占めており、ヒトは大量の BCAA を体内に貯蔵している。ほとんどの必須アミノ酸は肝臓において主に代謝されているが、BCAA は主に骨格筋で代謝される。BCAA の分解系はすべてミトコンドリアに存在する。BCAA はまず、分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素 (BCAT) により、分岐鎖 α ケト酸となる。この分岐鎖 α ケト酸は、分岐鎖 α ケト酸脱水素酵素 (BCKDH) による酸化的脱炭酸を起こし CoA 化合物となる。それらのふたつの反応を触媒する酵素は 3 つの BCAA (Val, Leu, Ile) に共通している。2 つめのステップの酵素である BCKDH は非可逆的の反応を触媒するので、BCAA の異化経路における最も重要な調節酵素であると考えられている。BCKDH の活性は分岐鎖 α ケト酸脱水素酵素キナーゼ (branched-chain α -keto acid dehydrogenase kinase: BCKDK) というキナーゼによって調節され、BCKDH はリン酸化されることによってその活性は低下する。

BCAA 代謝は運動により活性化することが知られている。骨格筋でエネルギー源として利用される BCAA は、運動によりエネルギー代謝に占める割合が高くなり、それに伴い必要量が増加すると考えられている。

本研究において、マイクロアレイ解析により PGC1 α -Tg マウスの骨格筋において BCAA 代謝経路が活性化していることが示唆された。そこで、PGC1 α が BCAT そして BCKDH のような BCAA 代謝に関与している酵素の発現を増加させ、BCAA 代謝を促進するかどうか、PGC1 α -Tg マウス骨格筋および PGC1 α を過剰発現させた培養細胞を用いて検討したり。

方法および結果

1. PGC1 α -Tg マウスの骨格筋におけるマイクロアレイ解析；BCAA 代謝経路の活性化

PGC1 α -Tg マウスの骨格筋の表現型の特徴を理解するために、遺伝子発現のアレイ解析を行った。そして、どういった遺伝子群が変化しているかバイオインフォマティクス解析を行った。アレイ解析において WT マウスに比べて PGC1 α -Tg マウスで多数の遺伝子発現が変化していた。その中で、2.5 倍以上増加した遺伝子 (315 個) について、パスウェイ解析を行った。パスウェイ解析で 7 個のカテゴリーが検出された (図 1)。

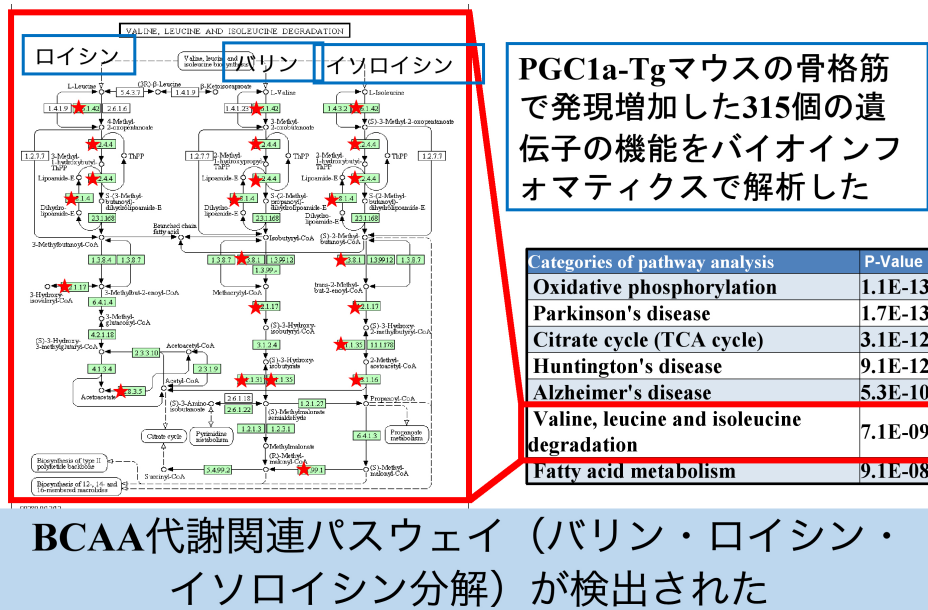


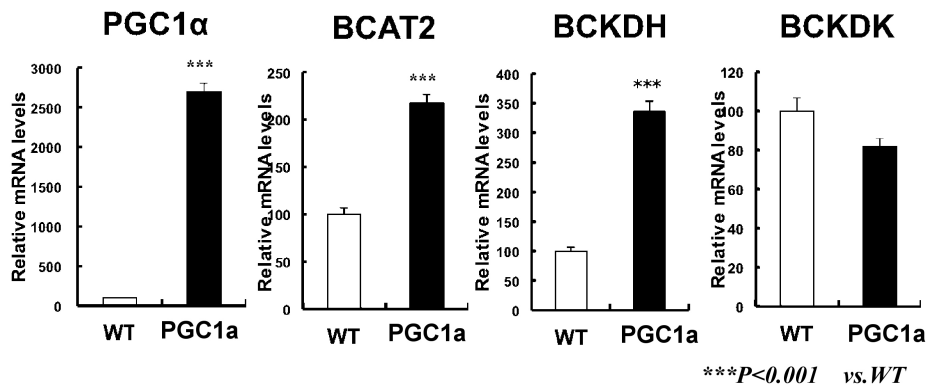
図1. マイクロアレイデータ解析.

マイクロアレイにより、PGC-1 α Tg マウスにおいて2.5倍以上発現増加した遺伝子を抽出したところ、315個の遺伝子が検出された。これらの遺伝子が、どのような機能をもっているか調べるために、バイオインフォマティクス解析を行った。

その中のいくつかは酸化リン酸化、TCA回路、脂肪酸代謝といったミトコンドリア機能に関わるものであり、PGC1 α がミトコンドリアを増加させ、ミトコンドリア機能を増強するという、以前より報告されている知見と一致していた。他にパーキンソン病、ハンチントン病、アルツハイマー病に関するパスウェイのカテゴリーが検出されたが、これらのパスウェイに分類される個々の遺伝子は全てミトコンドリア機能に関連するものであった (data not shown)。さらにBCAA代謝経路 (Val, Leu, Ile 分解) を検出した (図1)。すなわち、BCAA代謝 (異化) に関連する多くの酵素類の遺伝子発現が増加していることが明らかになった。このデータはPGC1 α が骨格筋のBCAA代謝を亢進していることを示唆する。そこで以下の実験を行い、PGC1 α とBCAA代謝について調べた。

2. PGC1 α -Tgマウスの骨格筋におけるBCAA代謝酵素の発現レベル

PGC1 α -TgマウスとWTマウスの骨格筋からRNAを調製し、BCAA代謝酵素 (BCAT2, BCKDH, BCKDK) の遺伝子発現を解析した。PGC1 α -Tgマウスにおいて、PGC1 α の遺伝子発現の増加が確認された (図2)。

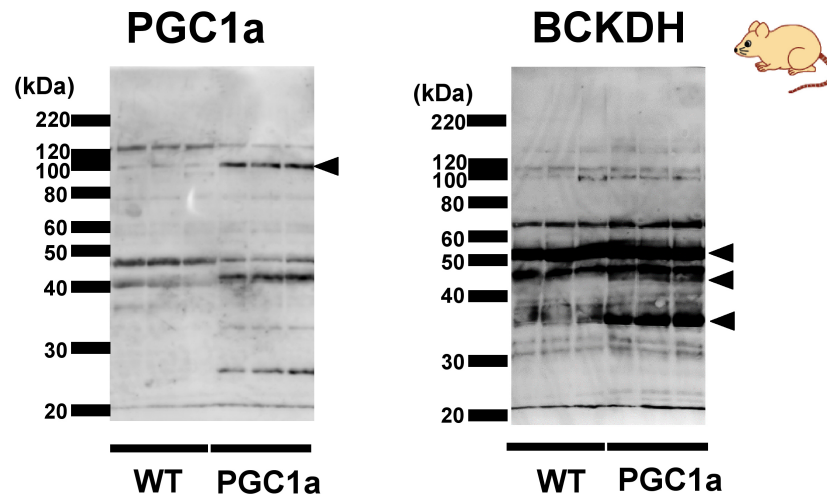


PGC1αの過剰発現によりBCAA代謝酵素であるBCAT2とBCKDHの遺伝子発現が増加した

図2. BCAA代謝酵素の遺伝子発現量.

PGC-1 α Tg マウスの骨格筋における BCAA 代謝酵素の遺伝子発現を定量的リアルタイム PCR を用いて確認した. 白バーが WT, 黒バーが PGC1 α -Tg マウスを示している. 結果, PGC-1 α の過剰発現により BCAA 代謝酵素である BCAT2 や BCKDH の遺伝子発現が有意に増加した (Student の T 検定). 一方で, BCAA 代謝を抑制する酵素である BCKDK の遺伝子発現は増加しなかった.

PGC1 α -Tg マウスで WT マウスに比べて, BCAT2 (2 倍) と BCKDH (3.5 倍) の発現が有意に増加した. 一方, BCKDK は増加せず, むしろ減少した (図2). BCKDK は BCKDH をリン酸化して不活性化するので, BCKDK の遺伝子発現の減少は, BCAA 代謝 (異化) が亢進していることを示唆する. 次に BCAA 代謝酵素のタンパク質発現をウェスタンブロット法で解析した. PGC1 α は 100 kDa のバンドの濃さが4倍増加した (図3).



**PGC1aの過剰発現により、遺伝子発現に加え
BCKDHのタンパク質発現量が増加した**

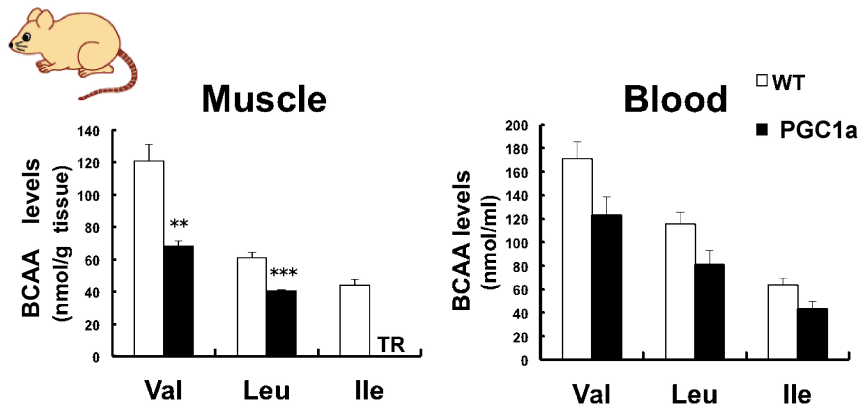
図3. BCAA 代謝酵素のタンパク質発現量の測定.

PGC-1 α Tg マウスの骨格筋において、ウエスタンブロット法により PGC-1 α 及び BCKDH のタンパク質発現を確認した.

BCKDH の抗体で検出したところ、E2 サブユニットを示す 55 kDa のバンドの濃さがわずかに増加した (1.3 倍). さらに、E1 α サブユニット、E1 β サブユニットを示す 45 kDa、35 kDa のバンドの濃さは、それぞれ 1.5 倍と 11 倍に増加していた (図3). ウエスタンブロット解析の結果は、mRNA レベルと相関していた. これらの結果は PGC1 α -Tg マウスの骨格筋において BCAA 代謝が亢進していることを示唆する.

3. PGC1 α -Tg マウスにおける BCAA 量

次に、PGC1 α -Tg マウスと WT マウスの骨格筋における BCAA 量を測定した. Val, Leu は WT マウスに比べて PGC1 α -Tg マウスで有意に減少していた (図4).



TR; Trace level ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. WT

PGC1 α -Tgマウスの骨格筋及び血中で BCAA量が減少した

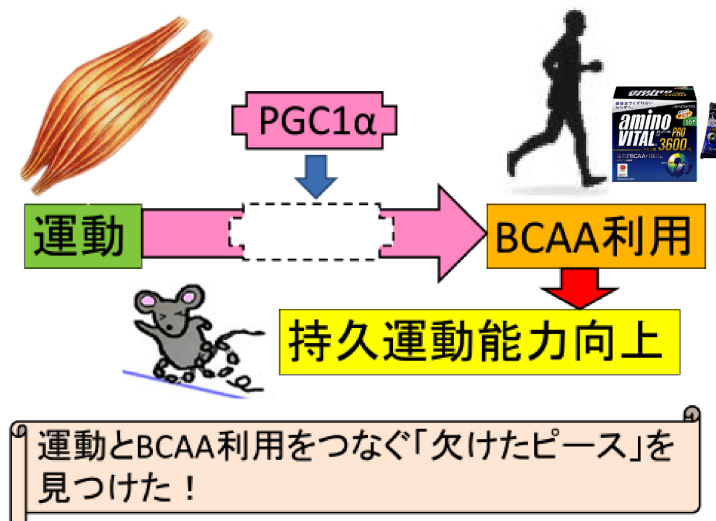
図4. BCAA含有量の測定.

PGC1 α -Tgマウスの骨格筋および血中におけるBCAA量を測定した。(StudentのT検定)

IleはWTマウスでは測定できたが、PGC1 α -Tgマウスでは量が少なく検出限界に近い値であった(図4)。BCAA量が減少するのと対照的にグルタミン酸量の増加が認められた。さらに血中(血漿)のBCAA量も同時に測定した。有意ではないがBCAAはWTマウスに比べPGC1 α -Tgマウスで減少傾向にあった(Valは $P=0.067$, Leuは $P=0.072$, Ileは $P=0.063$, 図4)。それらの結果は、BCAA代謝酵素の発現変化が機能的であり、そして酵素活性変動を伴っていることを示している。

考 察

本研究において、*in vivo*及び*in vitro*においてPGC1 α によりBCAA代謝が亢進することが示唆された。持久的運動トレーニングは、骨格筋において筋線維タイプの変化、ミトコンドリア生合成、血管新生、他の適応的な変化を起こし、げっ歯類とヒトの両方でインスリン感受性そして代謝の能力を改善する。PGC1 α mRNAとタンパク質の発現は持久運動によく応答して増加するので、骨格筋適応において役割を果たしているようである。運動はエネルギー消費を増加させ、結果としてアミノ酸の異化、特にBCAAの酸化を促進させる。これらの知見と一致して、持久運動はヒトとラットの骨格筋においてBCKDHの複合体を活性化し、BCAA分解を促進することが報告されている。骨格筋におけるBCAA代謝の活性化は、PGC1 α によるミトコンドリア機能の活性化に関与する、運動トレーニングの応答のひとつかもしれない。BCAAは運動時の骨格筋の重要なエネルギー源であり、サプリメントとしての需要が高まっている。しかし、運動時にどのようなメカニズムでBCAA利用が生ずるかは不明であった。本研究において、運動とBCAA利用をつなぐ欠けたピース「missing link」を発見した(図5)¹⁾。



Hatazawa et al. PLOS ONE 9. e91006, 2014

図5. 本研究のまとめ.

BCAAは運動時の骨格筋の重要なエネルギー源であり、サプリメントとしての需要が高まっている。しかし、運動時にどのようなメカニズムでBCAA利用が生ずるかは不明であった。つまり、運動により骨格筋においてBCAAが利用され、持久運動能力が向上することが知られているが、この運動とBCAA利用をつなぐ部分はブラックボックスであった。本研究において、運動とBCAA利用をつなぐ欠けたピース「missing link」として、PGC1 α を同定した。

共同研究者

本研究の共同研究者は静岡県立大学食品栄養科学部の三浦進司教授である。

文献

- 1) Hatazawa, Y., Tadaishi, M., Nagaike, Y., Morita, A., Ogawa, Y., Ezaki, O., Takai-Igarashi, T., Kitaura, Y., Shimomura, Y., Kamei, Y. & Miura S. : PGC-1 α -mediated branched-chain amino acid metabolism in the skeletal muscle. *PLoS One*, **9** : e91006, 2014.