

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

## 主論文の要旨

論文題目 運動における分岐鎖アミノ酸の生理機能

氏名 徐 旻珺

## 論文内容の要旨

筋肉の主要構成成分はタンパク質であるため、筋肉の維持または肥大のためにはアミノ酸栄養（特に必須アミノ酸）が重要である。筋細胞内のタンパク質合成には十分な必須アミノ酸を遊離アミノ酸として供給する必要がある。正常な動物の絶食状態では、筋細胞内の必須アミノ酸濃度はかなり低く保たれており、タンパク質（アミノ酸）摂取により筋細胞へアミノ酸（特に必須アミノ酸）が供給されることにより、筋タンパク質合成が促進される。

アミノ酸の多くは一般的に肝臓で代謝されるが、必須アミノ酸の中でも分岐鎖アミノ酸（**branched-chain amino acids: BCAA**）として総称されるロイシン、イソロイシン、バリンの3つのアミノ酸は筋細胞で主に代謝されると考えられている。骨格筋は運動器であるため、骨格筋における BCAA 代謝は他の代謝に影響して、BCAA がさまざまな生理作用を発揮すると考えられる。例えば、BCAA 投与は運動中のエネルギー基質を節約することや、運動後の筋肉痛を緩和することなどが報告されており、そのため BCAA は運動のための有効なサプリメントとして注目されている。

BCAA の分解系では、最初の2つのステップが3つの BCAA に共通の反応である。その第一ステップは、分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素（**branched-chain aminotransferase: BCAT**）により触媒され、可逆的な反応により分岐鎖  $\alpha$ -ケト酸が生成される。生成された分岐鎖  $\alpha$ -ケト酸は、第二ステップで分岐鎖  $\alpha$ -ケト酸脱水素酵素複合体（**branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase (BCKDH) complex: BCKDC**）により酸化的に脱炭酸され、CoA 化合物に変換される。第3ステップ以降はそれぞれのアミノ酸に特有の経路が存在しており、最終的に **acetyl-CoA** や **succinyl-CoA** が生成され、それらはクエン酸回路で代謝される。この BCAA 分解系は、第2ステップが不可逆反応であることより、BCKDC による反応が律速段階であることが知られている。

さらに、BCKDC は特異的キナーゼ (BCKDH kinase: BDK) による酵素タンパク質のリン酸化により活性調節されることが明らかにされており、種々の生理状態における BCKDC と BDK の活性測定により、BCKDC は BDK により強力にコントロールされていることが明らかにされている。よって、BCAA 代謝は実質 BDK により調節されていると考えられる。

BCAA の生理機能を解明するためには、BCAA を不足した実験動物の作製が有用な実験方法である。しかし、食餌中の BCAA を欠乏させても体タンパク質には豊富に BCAA が含まれるため、組織中の BCAA 濃度を著しく低下することは困難である。そこで、当研究室では、筋特異的 BDK-ノックアウト (BDK-mKO) マウスを作製し、筋肉の BCKDC 活性を上昇することにより BCAA 分解を促進し、筋組織特異的に BCAA 不足の動物を作製することとした。(第一章)

他の研究グループの報告において、BCAA を分解することができない BCAT-KO マウスでは wild-type マウスと比べて運動能力が低下することが認められた。よって、BCAA 代謝は運動能力と密接な関係にあることが推察される。本研究では、BCAA の欠乏と運動の直接的な影響を解析するために、BDK-mKO マウスを用いて実験を行った。8 週齢の雄性 BDK-mKO マウスとコントロールマウスに、トレッドミルを用いて 2 週間の走トレーニング (上り勾配 10%、速度: 15 m/分、60 分/日、5 日/週を 1 週間、それに次ぐ 1 週間では速度: 18 m/分に上昇し他の条件は同じ方法のトレーニング) を負荷した。またトレーニング開始前と終了後にトレッドミルを用いて走運動能力 (上り勾配 10%、15 m/分の速度でスタートし、4 分ごとに 1 m/分速度を上げ、マウスが走れなくなるまでの距離) を測定した。

運動能力測定の結果では、トレーニング前の持久力は BDK-mKO マウスとコントロールマウスで変わらなかった。2 週間のトレーニングにより、両マウスの運動持久力はトレーニング前より約 2 倍に上昇したが、BDK-mKO マウスの持久力がコントロールマウスより有意に低かった。この結果から、BDK-mKO マウスでは、運動トレーニングによる運動持久力の適応力が低い可能性が示唆された。(第二章)

この現象のメカニズムを解明するために、BDK-mKO マウスとコントロールマウスに、上述と同じ方法でトレーニングを負荷した後に、安静群と急性運動群に分け、後者のマウスに 32 分間の走運動 (上り勾配 10%、15m/分の速度からスタートし、4 分ごとに 1m/分ずつ速度を上昇する運動) を負荷した。その直後に、頸部脱臼法で屠殺し、筋肉を採取した。安静群のマウスは急性運動を負荷しない安静状態で解剖した。これらの組織を用いて、運動中のエネルギー代謝変動を調べるために、メタボロミクス解析を実施した。結果として、筋グリコーゲン量は、コントロールマウスと BDK-mKO マウスのいずれも急性運動により有意に低下したが、安静群と急性運動群のそれぞれの群内での比較ではいずれも BDK-mKO マウスで低値を示した。解糖系中間体では、安静群のマウスにおける fructose1,6-diphosphate、2-phosphoglycerate、dihydroxyacetone phosphate および phosphoenolpyruvate が BDK-mKO マウスで低下傾向にあった。また、以上の代謝物がコントロールマウスで運動によって減少する

傾向があったが、BDK-mKO マウスでは運動の影響が見られなかった。生成された acetyl-CoA は、安静群のコントロールマウスより BDK-mKO マウスで低く、急性運動によってコントロールマウスでのみ減少した。TCA サイクルでは、acetyl-CoA を基質とするクエン酸合成酵素の活性は BDK-mKO で低値であり、生成物であるクエン酸のレベルも安静群 BDK-mKO で低下していた。一方、BCAA 代謝系では、筋肉の BCAA と分岐鎖  $\alpha$ -ケト酸が安静群および急性運動群の何でも BDK-mKO マウスで低値を示したが、その下流の代謝物である分岐鎖脂肪酸カルニチンが BDK-mKO マウスで高値を示した。（第二章）

さらに、上記の実験条件に加えて 3% の BCAA 水を与えて同様にトレーニングを負荷する実験も実施した。結果として、2 週間のトレーニング後の持久運動能力は、BDK-mKO マウスでコントロールマウス以上に回復し、血漿 BCAA 濃度、筋グリコーゲン量と acetyl-CoA 濃度も回復した。これらの結果より、十分な BCAA 供給が運動トレーニングに対する適応に重要であることが示唆された。（第三章）

運動により、骨格筋の BCAA 代謝は明らかに促進することが報告されている。この BCAA 代謝の促進は、筋肉におけるタンパク質合成の抑制に繋がることが示唆されているので、運動中または運動後の BCAA 補給は筋タンパク質を維持するために重要と考えられる。本研究における運動と関係した BCAA の機能解明は、筋肉における BCAA 代謝の調節機構の重要性を明らかにできたのみならず、運動による筋肥大、老化による筋萎縮などにおける BCAA の生理作用にも繋がる可能性があり、これらの BCAA の機能を解明するためには更なる研究が必要である。