

平成 20 年度
博士論文

分岐鎖アミノ酸代謝の調節に関する研究

名古屋工業大学博士後期課程工学研究科物質工学専攻
(平成 18 年度入学)

秋田 圭一

指導教官
大桑 哲男

目次	1
第1章序論	4
1-1 緒言	4
1-2 参考文献	7
第2章 BCKDH 複合体精製法の改良	10
2-1 緒言	10
2-2 実験方法	11
2-2-1 BCKDH 複合体の精製	11
2-2-1a 試薬と器具	11
2-2-1b BCKDH 複合体の精製	12
2-2-1c タンパク質定量法	13
2-2-1d SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)分析	14
2-2-2 BCKDH 複合体および BDK の活性測定	14
2-2-2a 試薬と器具	14
2-2-2b BCKDH 複合体の活性測定	14
2-2-2c BDK の活性測定	15
2-3 結果	15
2-3-1 BCKDH 複合体精製過程における比活性と回収率	15
2-3-2 SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) パターン	17
2-4 考察	18
2-5 参考文献	19
第3章 BCKDH 複合体活性を制御する特異的キナーゼ(BCKDH キナーゼ)に対する TPP の阻害機構	21
3-1 緒言	21
3-2 実験方法	22
3-2-1 BCKDH 複合体の精製法	22
3-2-2 BDK 反応速度解析	22
3-2-2a 試薬と器具	22
3-2-2b 50%阻害濃度(IC ₅₀)の算出法	23
3-2-2c 阻害形式の決定法	23
3-2-2d 阻害定数 (K_i)の算出法	23
3-3 結果	24
3-3-1 TPP による 50% BDK 阻害濃度 (IC ₅₀)	24
3-3-2 TPP による BDK 阻害形式	26
3-3-3 TPP による BDK 阻害定数 (K_i)	28
3-4 考察	30
3-5 参考文献	31
第4章 骨格筋 BCKDH 複合体活性の新たな測定法の開発	33
4-1 緒言	33
4-2 実験方法	34
4-2-1 IRMS 法による ¹³ CO ₂ の定量	34
4-2-1a 試薬と器具	34

4-2-1b IRMS 測定における至適 CO ₂ 濃度の検討と同位体比 (¹³ CO ₂ / ¹² CO ₂) の測定	34
4-2-1c IRMS 測定用試験管を用いた CO ₂ 同位体比 (¹³ CO ₂ / ¹² CO ₂) の測定検討	34
4-2-2 実験動物	35
4-2-2a 実験動物および飼料	35
4-2-2b ラット飼育条件	35
4-2-2c 骨格筋組織のサンプリング	35
4-2-3 骨格筋組織からの BCKDH 複合体抽出	35
4-2-3a 試薬と器具	35
4-2-3b 抽出の方法	36
4-2-4 BCKDH 複合体の活性測定	36
4-2-4a 試薬と器具	36
4-2-4b 測定手順	37
4-2-4c Lambda protein phosphatase を用いた BCKDH 複合体の脱リン酸化	38
4-2-5 ¹³ CO ₂ / ¹² CO ₂ の同位体比定量	38
4-2-5a 分析機器	38
4-2-5b 統計処理	38
4-3 結果	39
4-3-1 定量限界	39
4-3-2 BCKDH 複合体の酵素用量依存性	41
4-3-3 BCKDH 複合体の酵素反応時間依存性	42
4-3-4 ラット骨格筋の BCKDH 複合体活性	43
4-4 考察	43
4-5 参考文献	44
第 5 章 ヒト血漿遊離アミノ酸組成に対する運動と BCAA 摂取の影響	46
5-1 緒言	46
5-2 方法	46
5-2-1 試験方法	46
5-2-2 被験者	47
5-2-3 試験飲料	47
5-2-4 試験スケジュール	47
5-2-5 検査項目	48
5-2-6 統計処理	48
5-3 結果及び考察	48
5-4 参考文献	51
第 6 章 総括	53
謝辞	57

省略語一覽表

ADP: Adenosine 5'-diphosphate

ATP: adenosine 5'-triphosphate

CoA-SH: reduced coenzyme A

BCAA: branched-chain amino acids

BCAT: branched- chain aminotransferase

BCKA: branched-chain α -keto acids

BCKDH: branched-chain α -keto acid dehydrogenase

BDK: branched chain α -ketoacid dehydrogenase kinase

BSA: bovine serum albumin

E1: branched-chain α -ketoacid decarboxylase/dehydrogenase

E2: dihydrolipoyl transacylase

E3: dihydrolipoamide dehydrogenase

GC-IRMS : gas chromatography isotope ratio mass spectrometry

IB-CoA: isobutyryl- coenzyme A isobutyryl-coenzyme A

IV-CoA: isovaleryl-coenzyme A

KIC: α -ketoisocaproate

KIV: α -ketoisovalerate

KMV: α -keto- β -methylvalerate

NAD: nicotinamide adenine dinucleotide

NADH: reduced nicotinamide adenine dinucleotide

PEG: polyethylene glycol

R-CoA: acyl-coenzyme A

TCA: tricarboxylic acid

TPP: thiamine pyrophosphate

α -KGDH: α -ketoglutaric acid dehydrogenase

第1章 序論

1-1 緒言

バリン、ロイシン、イソロイシンの3種類のアミノ酸はその構造的特徴から分岐鎖アミノ酸(BCAA: branched-chain amino acids)と総称され、哺乳動物にとって体内で合成できない必須アミノ酸である。BCAAは筋タンパク質中に含まれる必須アミノ酸のうち35%を占め、哺乳動物に必要とされる構成アミノ酸の40%を占める¹⁾。これらのことから生体内でのタンパク質合成に必要不可欠な成分といえる。

このBCAA分解系の第二段階までの反応は3つのBCAAに共通している。第1段階の(BCAT: branched-chain aminotransferase)アミノ基転移反応が可逆的なものに対して、第2段階(BCKDH複合体による酸化的脱炭酸反応)は不可逆反応である。それゆえ第2段階の反応がBCAA分解系の律速段階である。

体内に過剰摂取されたBCAAから生成される分岐鎖 α -ケト酸(BCKA: branched-chain α -keto acids)は高濃度に存在すると神経系に有毒であるため、哺乳動物には体内でBCKAを迅速に分解するための制御された酵素システム(Fig.1)がミトコンドリア内に備わっている²⁾。この代謝の調節を司っているのが、分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素(BCKDH: branched-chain α -ketoacid dehydrogenase)複合体である。³⁻⁵⁾この反応により、BCKAはcoenzyme A (CoA)化合物に変換される。

さらにBCKDH複合体が先天的に欠損していると、カエデ糖尿症(MSUD: maple syrup urine disease)を引き起こす⁶⁾。この疾患は、生後1~2週間で突然発症し致命的なアシドーシスや神経障害を引き起こし、生存しても精神的・肉体的発達の障害(遅滞)を引き起こす。以上の理由によりBCKDH複合体の生理的役割は極めて重要である。またその生理的重要性の観点から、BCKDH複合体は今日までに様々な動物組織から精製され⁷⁻¹¹⁾、その特徴が解明されつつある。

生体内におけるBCKDH複合体の活性は還元型 nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)、CoA化合物による生成阻害¹²⁾やBCKDH複合体自身がリン酸化および脱リン酸化される化学的修飾^{13,14)}等により調節される。運動¹⁵⁾や高タンパク質摂取¹⁶⁾はBCKDH複合体の脱リン酸化を促進し、この酵素の活性を上昇させる。一方、低タンパク質食摂取¹⁶⁾ではBCKDH複合体のリン酸化が促進され、酵素活性が低下する。BCKDH複合体をリン酸化して不活性化するのがBCKDHキナーゼ(branched chain α -ketoacid dehydrogenase kinase: BDK; EC 2.7.1.115)^{17,18)}であり、不活性化された

BCKDH 複合体を脱リン酸化して活性化するのが BCKDH ホスファターゼ (branched chain α -ketoacid dehydrogenase phosphatase; EC 3.1.3.52)^{19,20)}である。BCKDH ホスファターゼは依然として未解明な点が多いが、BDK については、遺伝子クローニング¹⁸⁾、構造解析²¹⁻²⁴⁾などさまざまな方面から研究が進められており、BCKDH 複合体の活性調節において重要な役割を演じていることが明らかにされつつある。

この BDK はミトコンドリアに存在する protein kinase の 1 種であり、ミトコンドリア protein kinase として最初にクローニングされた酵素である。この kinase のアミノ酸配列は、細胞質の protein kinase とかなり異なる特徴を持つ。さらに BDK は BCKDH 複合体に結合している結合型および遊離している遊離型があり、BDK が BCKDH 複合体に結合しているときは活性を示し、解離しているときは活性を示さない可能性も報告されている²⁴⁾。これまでに精製された BDK は結合型であり、遊離型 BDK はまだ精製されてない。また、BDK の活性や発現は、様々な栄養状態やホルモンによる調節を受けることが明らかにされている¹³⁾。

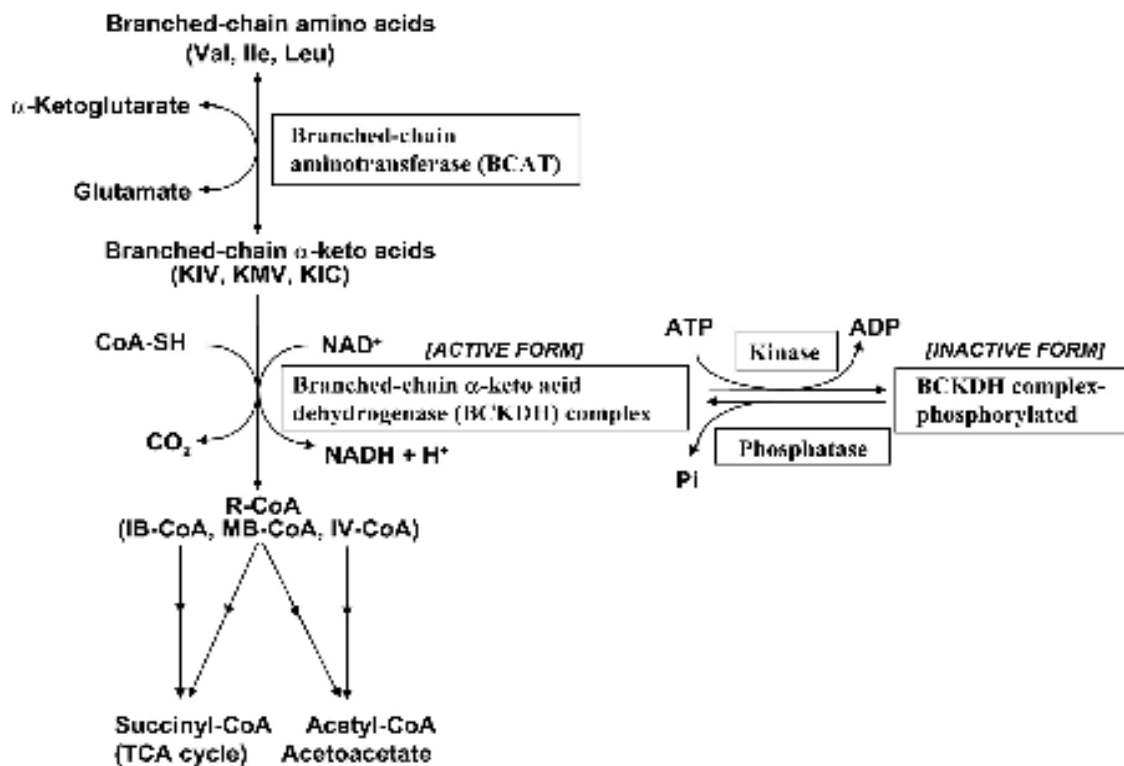


Fig. 1. Catabolism of branched-chain amino acids¹⁾

BCKDH 複合体の構造は、24 個のモノマーから成る dihydrolipoyl transacylase (E2; 2.3.1.168) を核として、それに 4 量体 ($2\alpha+2\beta$)から成る E1 が約 12 分子 branched-chain α -ketoacid decarboxylase/dehydrogenase (E1; EC 1.2.4.4; $\alpha_2\beta_2$ heterotetramer)、複数分子の dihydrolipoamide dehydrogenase (E3; EC 1.8.1.4), さらに BDK および BCKDH ホスファターゼも E2 の特定部位に結合していると推定されている(Fig. 2)。

BCKDH 複合体による分岐鎖 α -ケト酸の分解は、TPP を補酵素とする E1 による脱炭酸反応、リポ酸を補酵素とする E2 によるアシル基転移反応、E3 によるリポアミド脱水素反応から成り、これら 3 つのサブユニットが協調的に機能することにより達成される。Chuang らは E2 にはリポイルドメインが存在し、その各部位に 2 分子の BDK が結合している可能性を報告している²¹⁾。

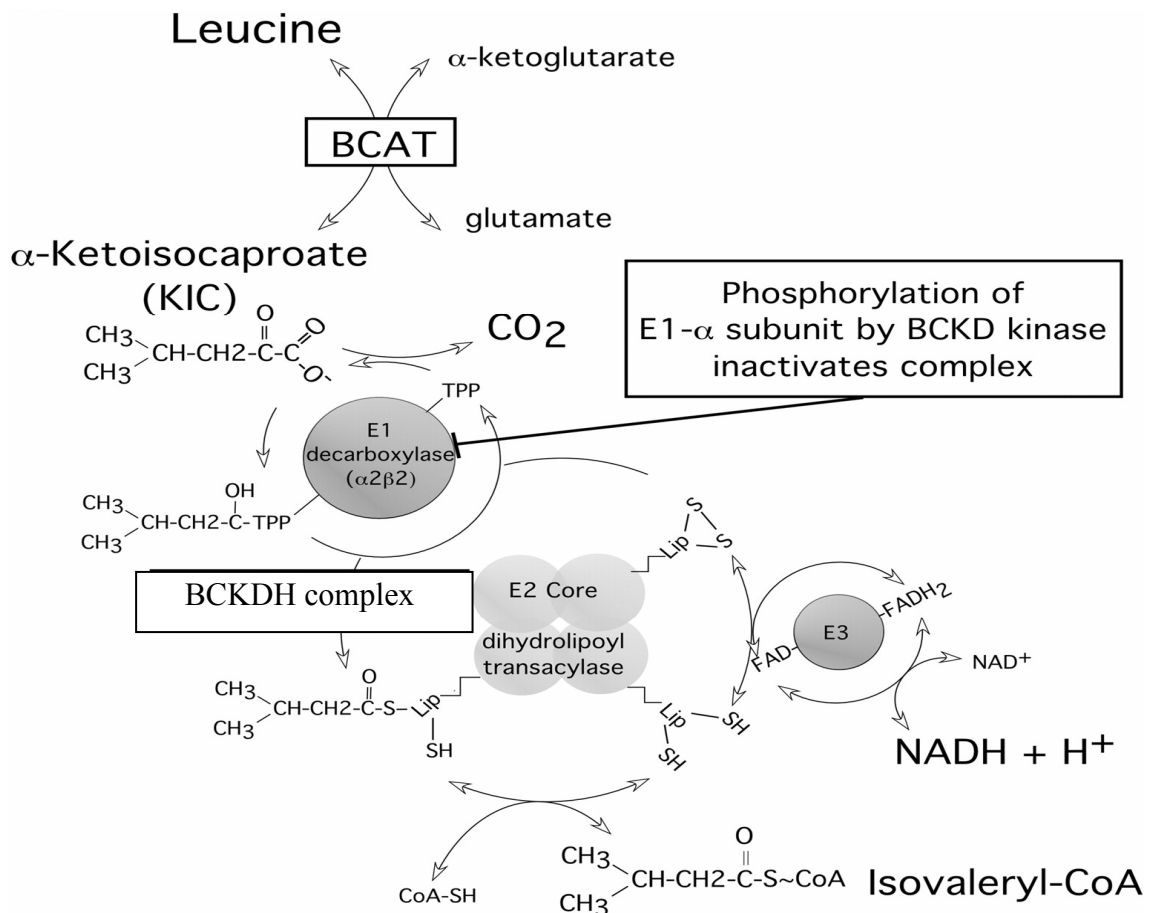


Fig. 2. Schematic representation of the first 2 steps of leucine metabolism²⁵⁾
 “Lip” indicates lipoyl domain.

BCKDH 複合体の活性調節は、E1 α サブユニットのセリン残基 (Ser293, Ser303) のリン酸化により達成される^{25,26)}。特に BCKDH 活性に関与するのは E1 α Ser293 である。BDK は、ATP 依存的にこれらのセリン残基をリン酸化し、BCKDH 複合体を不活性化する。

以上、BCKDH 複合体の活性調節の概略について述べた。

以後、本論文の第 2 章では BCKDH 複合体酵素精製法の改善について述べる。

第 3 章では第 2 章で得られた精製酵素 BCKDH 複合体を用いて、BDK 活性阻害剤チアミンピロリン酸 (TPP: thiamine pyrophosphate) について、BDK に対する酵素阻害機構および生理的意義について述べる。

第 4 章ではラット筋由来 BCKDH 複合体の活性測定法について、従来法とは異なる¹³C 同位体元素を用いるマススペクトルによる新分析法の開発について述べる。

第 5 章では、ヒト血漿遊離アミノ酸組成に対する運動と BCAA 摂取の影響について論じる。

第 6 章では、本研究で得られた成果について総括を行なう。

1-2 参考文献

- 1) Shimomura, Y., Murakami, T., Nakai N., Nagasaki, M., Harris, R. A.: Exercise promotes BCAA catabolism: effects of BCAA supplementation on skeletal muscle during exercise. *J. Nutr.*, (2004) **134**, 1583S-7S.
- 2) 下村 吉治 (2002) スポーツと健康の栄養学, NAP, 東京
- 3) Harris, R. A., Hawes, J. W., Popov, K. M., Zhao, Y., Shimomura, Y., Sato, J., Jaskiewicz, J., and Hurley, T. D.: Studies on the regulation of the mitochondrial alpha-ketoacid dehydrogenase complexes and their kinases. *Adv. Enzyme. Regul.*, (1997) **37**, 271-293.
- 4) Harris, R. A., R., Kobayashi, T., Murakami, Y., Shimomura: Regulation of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase expression in rat liver. *J. Nutr.* (2001) **131**, 841S-845S.
- 5) Li, J., Wynn, R. M., Machius, M., Chuang, J. L., Karthikeyan, S., Tomchick, D. R., Chuang, D. T.: Cross-talk between thiamin diphosphate binding and phosphorylation loop conformation in human branched-chain alpha-keto acid decarboxylase/dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, (2004) **297**, 32968-32978.
- 6) Chuang, D. T., Chuang, J. L., and Wynn, R. M.: Lessons from genetic disorders of

- branched-chain amino acid metabolism. *J. Nutr.*, (2006) 136: 243S-9S.
- 7) Paxton, R., Harris, R. A.: Isolation of rabbit liver branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase and regulation by phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, (1982) **257**, 14433-9.
 - 8) Danner, D. J., Lemmon, S. K., Besharse, J. C., Elsas, L. J. 2nd.: Purification and characterization of branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase from bovine liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, (1979) **254**, 5522-6.
 - 9) Pettit, F. H., Yeaman, S. J., Reed, L. J.: Purification and characterization of branched chain alpha-keto acid dehydrogenase complex of bovine kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1978) **75**, 4881-5.
 - 10) Ono, K., Hakozaiki, M., Nishimaki, H., Kochi, H.: Purification and characterization of human liver branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex. *Biochem. Med. Metab. Biol.*, (1987) **37**, 133-41.
 - 11) Shimomura, Y., Paxton, R., Ozawa T., Harris, R. A.: Purification of branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex from rat liver. *Anal. Biochem.*, (1987) **163**, 74-8.
 - 12) Boyer, B., and Odessay, R.: Kinetic characterization of branched chain ketoacid dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, (1991) **285**, 1-7.
 - 13) Shimomura, Y., Obayashi, M., Murakami, T., and Harris, R. A.: Regulation of branched-chain amino acid catabolism: nutritional and hormonal regulation of activity and expression of the branched-chain a-keto acid dehydrogenase kinase. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* (2001) **4**, 419-423.
 - 14) Harris, R. A., Popov, K. M., Zhao, Y., and Shimomura, Y.: Regulation of branched-chain amino acid catabolism. *J. Nutr.*, (1994) **124**, 1499S-1502S.
 - 15) Shimomura, Y., Suzuki, T., Saitoh, S., Tasaki, Y., Harris, R. A., and Suzuki, M.: Activation of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex by exercise: effect of high-fat diet intake. *J. Appl. physiol.*, (1990) **68**, 161-165
 - 16) Miller, R. H., Eisenstein, R. S., and Harper, A. E.: Effects of dietary protein intake on branched-chain keto acid dehydrogenase activity of the rat. *J. Biol. chem.*, (1988) **263**, 3454-3461.
 - 17) Shimomura, Y., Nanaumi, N., Suzuki, M., Popov, K. M., and Harris, R. A.: Purification and partial characterization of branched-chain α -ketoacid dehydrogenase kinase from rat liver and rat heart. *Arch. Biochem. Biophys.*, (1990) **283**, 293-299.

- 18) Popov, K. M., Zhao, Y., Shimonura, Y., Kuntz, M. J., and Harris, R. A.: Branched-chain α -ketoacid dehydrogenase kinase: Molecular cloning, expression, and sequence similarity with histidine protein kinases. *J. Biol. Chem.*, (1992) **267**, 13127-13130.
- 19) Damuni, Z., Merryfield, M. L., Humphreys, J. S., and Reed, L. J.: Purification and properties of branched-chain α -ketoacid dehydrogenase phosphatase from bovine kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (1984) USA **81**, 4335-4338.
- 20) Damuni, Z., and Reed, L. J.: Purification and properties of the catalytic subunit of the branched-chain α -keto acid dehydrogenase phosphatase from bovine kidney mitochondria. *J. Biol. Chem.*, (1987) **262**, 5129-5132.
- 21) Chuang, J. L., Wynn, R. M., and Chuang, D. T.: The C-terminal hinge region of lipoic acid-bearing domain of E2b is essential for domain interaction with branched-chain α -keto acid dehydrogenase kinase. *J. Biol. Chem.*, (2002) **277**, 36905-36908.
- 22) Machius, M., Chuang, J. L., Wynn, R. M., Tomchick, D. R., and Chuang, D. T.: Structure of rat BCKD kinase: nucleotide-induced domain communication in a mitochondrial protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2001) **98**, 11218-11223.
- 23) Hawes, J. W., Schnepf, R. J., Jenkins, A. E., Shimomura Y., Popov, K. M., and Harris, R. A.: Roles of amino acid residues surrounding phosphorylation site 1 of branched-chain α -ketoacid dehydrogenase (BCKDH) in catalysis and phosphorylation site recognition by BCKDH kinase. *J. Biol. Chem.* (1995) **270**, 31071-31076.
- 24) Obayashi, M., Sato, Y., Harris, R. A., Shimomura, Y.: Regulation of the activity of branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase (BCODH) complex by binding BCODH kinase. *FEBS Lett.*, (2001) **491**, 50-54.
- 25) Wynn, R. M., Chuang, J. L., Cote, C.D., and Chuang, D.T.: Tetrameric Assembly and Conservation in the ATP-binding Domain of Rat Branched-chain α -Ketoacid Dehydrogenase Kinase. *J. Biol. Chem.* (2000) **275**, 30512-30519.
- 26) Zhao, Y., Hawes, J., Popov, K.M., Jaskiewicz, J., Shimomura, Y., Crabb, D.W., Harris, R.A.: Site-directed mutagenesis of phosphorylation sites of the branched chain α -ketoacid dehydrogenase complex. *J. Biol. Chem.* (1994) **269**, 18583-7.

第2章 BCKDH複合体精製法の改良

2-1 緒言

序論において述べたように、BCKDH 複合体の生理的な重要性からこの酵素複合体はさまざまな動物組織¹⁾⁻³⁾から精製されている。

BCKDH 複合体を精製するためには、BCKDH 複合体がミトコンドリア内在酵素であることから、まず各種動物組織からミトコンドリアを分離し酵素精製の開始物質として用いることが多い¹⁻³⁾。しかし、ミトコンドリアは凍結、融解によって破壊されるため、冷凍保存された市販の動物組織などは利用できない。そのためミトコンドリアを組織から抽出するためには、動物から採取した直後の組織を用いる必要があり、この BCKDH 複合体精製方法はかなりの制限を受ける。

そこで、Paxton ら⁴⁾は簡便でより収率の高い方法として、凍結したウサギ肝臓の組織ホモジネートから直接 BCKDH 複合体を精製する方法を開発した。この方法では、ポリエチレングリコール (PEG)沈殿、Sepharose CL-2B column を用いたゲルろ過、hydroxyapatite を用いた吸着 chromatography を使用して BCKDH 複合体を精製しており、最終生成物は比活性 3.20 $\mu\text{mol NADH}/\text{min}/\text{mg protein}$ 、収率が 5.2%であった。一方、現在用いられている BCKDH 複合体を凍結ラット肝臓のホモジネートから精製する Shimomura^{5), 6)}らの方法では、文献 5)の報告によれば最終的な比活性は 8.21 $\mu\text{mol NADH}/\text{min}/\text{mg protein}$ 、収率は 34%であり、文献 6)においては比活性は 7.46 $\mu\text{mol NADH}/\text{min}/\text{mg protein}$ 、収率は 55%である。Shimomura らの精製法では、phenyl-Sepharose CL-4B を用いた疎水性 chromatography と hydroxyapatite を用いた吸着 chromatography を使用して、凍結肝臓から直接 BCKDH 複合体を精製できる新しい方法であり、従来行われたミトコンドリアからの精製法⁷⁾と比較してほぼ遜色ない結果を得ている。

しかしながら、現在この Shimomura らの精製法を実施すると、PEG 分画のステップにおいて、従来の方法よりも早い段階で酵素が沈殿することにより予想された回収率が見込めないこと、また、hydroxyapatite を用いたクロマトグラフィーでは、BCKDH 複合体が溶出されると期待されるリン酸塩濃度のバッファーにおいても溶出されてこないため、報告されているような収率で BCKDH 複合体が得られない。この原因の詳細は不明であるが、市販の polyethylene glycol (PEG) や hydroxyapatite のわずかな分子量の違いに起因している可能性が考えられる。

酵素を精製する上でもっとも重要なことは、目的の組織から精製酵素標品を、より高純度で、かつ高収率で得ることである。BCKDH 複合体酵素の研究においてもそれは同じである。また高い精製効率を得るためには高濃度に発現している生体材料から精製を開始することもまた同様に重要である。

そこで、ラット肝臓の BCKDH 複合体活性は、ラットの他の臓器および他の動物の組織より高く、BCAA 代謝の実験モデルとして非常に有用である。そのため、本研究でも従来と同様にラット肝臓からの BCKDH 複合体の精製法を検討した。

2-2 実験方法

2-2-1 BCKDH 複合体の精製

2-2-1 a 試薬と器具

試薬は特に断りのない限り市販の特級試薬を用いた。

ラット肝臓 – Pel Freez (Rogers, Arkansas, USA)

Phenyl Sepharose CL-4B – Sigma (St. Louis MO, USA)

Hydroxyapatite gel Bio-Gel[®] HTP Gel – Bio-Rad (Hercules, USA)

分光光度計 (UV-160A) – SHIMAZU (Kyoto, Japan)

分光光度計 (UV-7500) – ADVANTEC (Kanagawa, Japan)

遠心分離機 (CR 20G) – HITACHI (Tokyo, Japan)

遠心分離機 (1720) – KUBOTA (Tokyo, Japan)

FRACTION COLLECTOR (SF-2120) – ADVANTEC (Kanagawa, Japan)

ペンレコーダー (UNICOEDER U-228) – 日本電子化学 (Tokyo, Japan)

・緩衝液

Extraction buffer (pH 7.5 at 4°C with KOH)

30 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES),

1 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), 0.15 M KCl,

0.5% (w/v) TritonX-100, 2% (v/v) bovine serum,

0.1 mM phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF),

0.01 mM *N*-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK),

10 µg/ml trypsin inhibitor, 1 µM leupeptin, 0.1 mM thiamin pyrophosphate (TPP), and 5 mM dithiothreitol (DTT)

Buffer A: (pH 7.5 at 4°C with KOH)

50 mM potassium phosphate, 0.1 mM EDTA, 10 µg/ml trypsin inhibitor,
0.1 µM leupeptin, and 3 mM DTT

Buffer B: 10%グリセロール, 0.15M KCl を含む buffer A

Buffer C: 10%グリセロール, 2%(w/v) Tween20 を含む buffer A

Buffer D: 0.1% (w/v) Tween20 を含む buffer A

2-2-1 b BCKDH 複合体の精製

以下に示すように BCKDH 複合体は Shimomura¹⁾らの方法を改良してラットの肝臓から精製した。特に断りのない限り全ての操作を 4°C でおこなった。

Pel Freez 社(Rogers, Arkansas)から購入したラットの冷凍肝臓約 300 g に約 600 ml の Extraction buffer を加え、ミキサー(Waring blender)を用い最高速度で 4 分間ホモジナイズし、15000×g で 20 分間遠心分離した。遠心分離して得られた上清を 4 層のガーゼで濾した。ペレットには再抽出のため 300 ml の Extraction buffer を加え、ミキサーを用い最高速度で 1 分間ホモジナイズした。ホモジネートは 15000×g で 20 分間遠心分離して、上清を 4 層のガーゼで濾し、先に濾した上清と混合した。混合した酵素抽出液に 2 M Tris を加え pH を 7.5 に調整し、最終濃度が 0.5 M になるように KCl を加え、10 分間攪拌した。

酵素抽出液に 50% (w/v) polyethylene glycol (PEG) 溶液を最終濃度が 2% となるように加え、20 分間氷上で攪拌し、15000×g で 45 分間遠心分離した。ペレットを取り除き、上清に最終濃度が 4.5% となるように PEG 溶液を加え、20 分間氷上で攪拌し、15000×g で 20 分間遠心分離した。得られたペレットを Potter-Elvehjem homogenizer を用いて約 400 ml の buffer B で懸濁した

ガラスフィルター(直径 9.5 cm) に約 400 ml の phenyl-Sepharose CL-4B を充填し、buffer B で十分に平衡化した後、カラムに PEG 分画で得られた懸濁液を流した。1 liter の buffer B 用いて洗浄し、次いでスパーテルでゲルをかき混ぜながら 3500 ml の buffer B で洗浄し、さらに 1500 ml の buffer B でゲルを洗浄した(この時ゲルはかき混ぜなかった)。次に 1500 ml の buffer A に 10%グリセロールおよび 3% (w/v) Tween 20 になるよう調製した buffer を用いてタンパク質を溶出させた。溶出液に固形の硫酸アンモニウムをゆっくり添加し 75 mM とし、硫酸アンモニウムが完全に溶けた後 PEG 溶

液を加え 6.5%とし、20 分間攪拌した。その後、15000×g で 30 分間遠心分離し、上清を捨てて得られたペレットを Potter-Elvehjem homogenizer を用いて約 60 ml の buffer B に懸濁し、これを 1st phenyl-Sepharose-PEG pellet とした。

次に、phenyl-Sepharose CL-4B を充填したカラム (2.8×12 cm) を buffer B で平衡化した後、サンプルを流した。150 ml の buffer B で洗浄後、スパーテルでゲルをかき混ぜながら 150 ml の buffer B で洗浄し、50 ml の buffer B でさらにゲルを洗浄した(この時ゲルはかき混ぜなかった)。次に 300 ml の Buffer C を流し、UV モニターでタンパク質の吸光度を測定しながらフラクションコレクターにタンパク質を回収した。各フラクションの活性を測定し、活性のあるフラクションをひとつにまとめ、固形の硫酸アンモニウムをゆっくり添加して 75 mM とした後、50%PEG を加えて 6.5%とした。20 分間攪拌した後、18000×g で 30 分間遠心分離した。ペレットを約 15 ml の buffer B に懸濁し、これを 2nd phenyl-Sepharose-PEG pellet とした。

次に、buffer B で平衡化した phenyl-Sepharose CL-4B カラム (2.8×5 cm) にサンプルを流した。50 ml の buffer B でゲルを洗浄後、200 ml の Buffer C を流し、UV モニターでタンパク質の吸光度を測定しながらフラクションコレクターにタンパク質を回収した。フラクションの活性を測定し、活性のあるフラクションをひとつにまとめ、230000×g で 120 分間遠心分離した。ペレットを約 5 ml の Buffer D で懸濁した。これを 3rd phenyl-Sepharose- centrifugation pellet とした。

次に、buffer D で平衡化した hydroxyapatite を充填したカラム (1.8×4.5 cm) にサンプルを流した。50 ml の 50 mM リン酸を含む Buffer D で洗浄し、さらに 100 ml の 150 mM リン酸を含む Buffer D で洗浄した。最後に 200 mM リン酸を含む Buffer D を 50 ml 流し UV モニターでタンパク質の吸光度を測定しながらフラクションコレクターにタンパク質を溶出させた。活性のあるフラクションをひとつにまとめ、230000×g で 120 分間遠心分離した。ペレットを 20% (v/v) グリセロールを含む Buffer D で懸濁し約 5 ml とした。これを hydroxyapatite-centrifugation pellet とし、最終精製物とした。

2-2-1c タンパク質定量法

タンパク質の定量は、Bradford³⁾ 法に従った Bio-Rad Protein Assay を使用して行い、595 nm の吸収を分光光度計で測定した。標準タンパク質として 2 mg/ml の免疫グロブリン G (IgG: Immunoglobulin G) を用いた。

タンパク質の定量は 1 サンプルにつき 2 回行った。

2-2-1d SDSポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)分析

SDS-PAGE は Laemmli⁵⁾らの方法に従っておこなった。ポリアクリルアミドゲルは 12.5 %のアクリルアミド濃度を用いた。泳動したポリアクリルアミドゲルは Coomassie blue G-250 で染色した。

2-2-2 BCKDH 複合体および BDK の活性測定

2-2-2a 試薬と器具

試薬は特に断りのない限り市販の特級試薬を用いた。

BCKDH assay buffer:

- 30 mM potassium phosphate, 0.1% (w/v) Triton X-100, 0.4 mM TPP
- 0.4 mM CoA, 1 mM NAD⁺, 2 mM DTT, 2 mM MgCl₂,
- 4 U/ml porcine heart dihydrolipoamide dehydrogenase (E3)
- 50 mM α -ketoisovaleric acid sodium salt (KIV)

5×Kinase assay buffer (pH 7.35 with KOH)

- 100 mM HEPES, 7.5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 80% (v/v) glycerol.

分光光度計 (UV-160A) - SHIMAZU

ブロックヒーター(Dry Thermo Unit DTU-28) – TAITEC (Saitama, Japan)

恒温槽 (UNITHERMO SHAKER NTS-1200) – EYELA (Tokyo, Japan)

2-2-2b BCKDH 複合体の活性測定

Nakai³⁾らの方法に従い測定した。予め 30°C に温めておいた 960 μ l の BCKDH assay buffer と 20 μ l のサンプルをプラスチック製のセルに入れ、さらに基質として 20 μ l の 50 mM KIV (最終濃度 1 mM)を加えて反応を開始後、酵素反応で生成される NADH に特異的な吸収である 340 nm の吸光度変化を測定した。

ランベルトベールの法則より活性値(U/ml)を求め、タンパク質の濃度(mg/ml)で割った比活性(U/mg protein)を算出した。

なお NADH のモル吸光定数 ϵ は 6.22/mM/cm であり、1 U は 1 分間に 1 μ mol NADH が生成される BCKDH 複合体活性である。

2-2-2c BDKの活性測定

BDK の活性測定は基本的に Nakai³⁾ らの方法に従った。すなわち 1.5 ml のエッペンドルフチューブに 20 μ l の 5 \times kinase assay buffer、50 μ l の BCKDH 精製複合体の各生成段階のサンプルをくわえた。ここで BCKDH 複合体を含む酵素溶液は各精製ステップにおいて使用したバッファーが異なるため、測定条件を一定にする目的で最終濃度が 20 mM HEPES (pH 7.35 with NaOH), 1.5 mM MgCl₂, 10% (v/v) glycerol, 2 mM dithiothreitol, 120 mM KCl を含むようにそれぞれ再調整したものをを用いた。さらに最終濃度が 0.5 mM になるように 5 mM の ATP (pH 7) を 10 μ l 加え、BDK の反応を開始した。反応混合液は一定時間(60, 120, 180, 240 秒)経過毎に 20 μ l を分取し、予め 30 °C に温めておいた 960 μ l の BCKDH assay buffer に加え、さらに 20 μ l の 50 mM KIV を加えた後に 340 nm の吸光度変化を測定した。1 分間あたりの吸光度変化の自然体数値を BDK の反応時間毎に片対数グラフにプロットし、これらの 2 次回帰直線の傾きにより、BDK 活性を算出した。

2-3 結果

2-3-1 BCKDH複合体精製過程における比活性と回収率

ラット肝臓抽出液の各分画で得られた標品の BCKDH 活性を Table 1. に示した。

活性濃度 (U/ml)、タンパク質濃度、及び比活性の値は、2 回測定の平均値である。

4.5% PEG pellet の段階での比活性は 0.01 U/mg と低い値を示すが、1st

phenyl-Sepharose-PEG pellet の段階で 1.08 U/mg と著しく上昇した。2nd

phenyl-Sepharose-PEG pellet の段階ではあまり精製倍率に変化は見られなかった。

3rd phenyl-Sepharose-centrifugation pellet および Hydroxyapatite-centrifugation pellet においては、それぞれのステップで超遠心分離法を用いたので、精製純度を高めることができた。

活性の回収率は、2nd phenyl-Sepharose-PEG pellet の段階まで 81 %を保っていたが、その後 3rd phenyl-Sepharose-centrifugation pellet では 56%、Hydroxyapatite-centrifugation pellet では 31%に低下した。

BCKDH 複合体の最終的な比活性は 6.62 U/mg、収率は 32% であった。

また BDK 活性は 4.5% PEG pellet の時点では測定しなかったが、その後の分画ではこれまでに報告された傾向と類似していた。

Table 1. Rat liver BCKDH complex purification steps.

Purification stage	Dehydrogenase complex activity				Purification fold	Kinase activity (min ⁻¹)
	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg protein)	Total activity (U)	Activity yield (%)		
4.5% PEG pellet	34,600	0.01	328	100	1	ND
1st phenyl-Sepharose-PEG pellet	281	1.08	303	93	108	0.086
2nd phenyl-Sepharose-PEG pellet	138	1.92	266	81	192	0.260
3rd phenyl-Sepharose-centrifugation pellet	46.7	3.91	182	56	391	0.198
Hydroxyapatite-centrifugation pellet	15.8	6.62	105	32	662	0.229

2-3-2 SDS ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)パターン

最終精製標品である Hydroxyapatite-centrifugation pellet の SDS-PAGE の結果を示す。Fig. 1 右レーンの精製酵素である泳動パターンは、高分子側に僅かなバンドが見られるが、主要バンドとしては E1 α (M.W. 46,500)、E1 β (M.W. 38,500)、E2 (M.W. 56,000)のみである。このパターンは以前の報告⁶⁾とほぼ一致しており、BCKDH 複合体がかなり高純度に精製できたことが確認された。

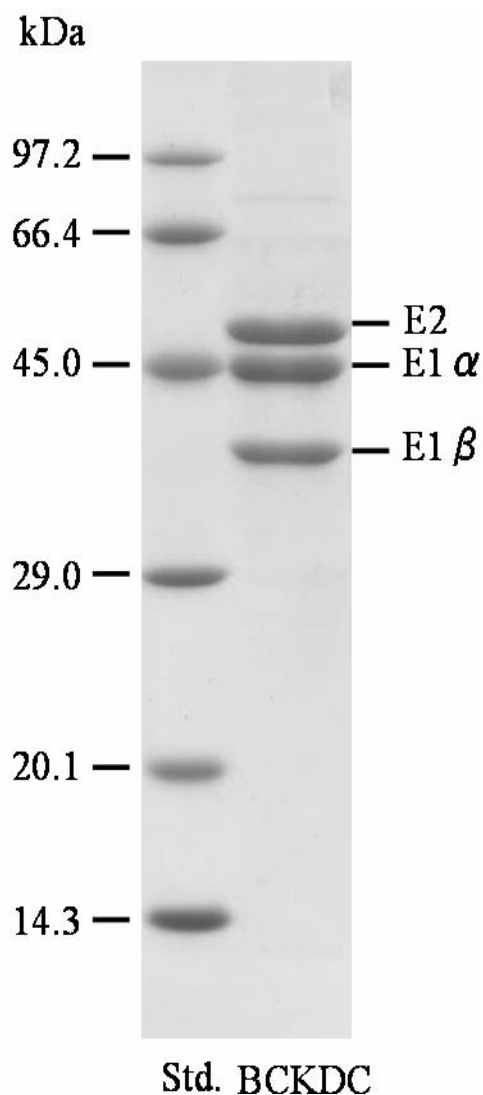


Fig. 1 SDS-PAGE pattern of BCKDC purified from rat liver.

SDS-PAGE was performed using 12.5% polyacrylamide gel. Standards used were phosphorylase b (MW 97.2 kDa), bovine serum albumin (MW 66.4 kDa), ovalbumin (MW 45.0 kDa), carbonic anhydrase (MW 29.0 kDa), trypsin inhibitor (MW 20.1 kDa), and lysozyme (MW 14.3 kDa). Resolved proteins on the gel were detected by Coomassie blue staining.

2-4 考察

今回おこなった酵素精製方法の変更点は以下の3点である。

- (1) 改善前は2% PEG 沈殿処理の段階で BCKDH 複合体のある程度の量が沈殿してしまっていたが、KCl を最終濃度 0.5 M とすることにより、以前の報告と同様に酵素が回収されるようになった。
- (2) Phenyl-Sepharose ゲルを洗浄する際 Buffer A を流しながら穏やかに攪拌して、洗浄の効率を上昇した。
- (3) Hydroxyapatite カラムクロマトグラフィーの段階で、従来は 150 mM リン酸バッファーでカラムを洗浄し、250 mM で溶出していたが、この方法では後者の分画に BCKDH 複合体が回収できない。そこで、カラムをリン酸バッファー100 mM で洗浄し、200 mM で酵素を溶出するようにした。

(1)についてはカリウムイオンが PEG の沈殿能力を弱めることが報告⁶⁾されており、このことから2% PEG pellet に回収される BCKDH の総活性は 24.8% から 1.7%まで減少した。(2)については phenyl-Sepharose ゲルに BCKDH 複合体が強固に結合しているため穏やかな攪拌等ではゲルと BCKDH 複合体の解離はなく、不純物の更なる溶出を促進させることができたと考えられる。(3)については、従来はリン酸バッファー濃度が 150 mM でカラムを洗浄していたが、この段階ですでに BCKDH 複合体が溶出したので、これを改善するため 100 mM に改めたところほぼ溶出がなくなり、精製率は向上した。

4.5% PEG pellet の段階での比活性は 0.01 U/mg と低い値を示すが、1st phenyl-Sepharose-PEG pellet の段階で比活性は 108 倍まで著しく向上した、疎水性クロマトグラフが BCKDH 複合体精製法において極めて有効であることを示している。また、2nd phenyl-Sepharose-PEG pellet の段階ではあまり精製倍率に変化は見られなかったが、3rd phenyl-Sepharose-centrifugation pellet および hydroxyapatite-centrifugation pellet において、超遠心分離法を複合的に用いて BCKDH を分離することができた。この方法は BCKDH 複合体の分子量が極めて大きいことを利用した効果的な精製方法であるといえる。しかしこの段階において、収率が 56%および 31%まで低下することは、超遠心前処理段階におけるタンパク質可溶化の段階で、完全に狭雑タンパク質が溶解しておらず一部凝集した見かけ上分子量の大きいタンパク質も、超遠心分離処理において沈降してきていると推測される。このステップにおいて

は更なる可溶化バッファの検討が必要であると思われる。

最終的な酵素の比活性は6.62 U/mg, 収率は32% (Table 1)でほぼ以前の報告と同様の結果を得ることができた。また、Fig 1.に示した SDS-PAGE 泳動パターンは、以前の精製で報告されたパターンとほぼ一致した。これらのことから精製酵素標品はほぼ単一に精製されたと結論できる。

一方、この精製過程におけるBDK活性については、Table 1. に示したように精製に伴いBDK活性が増加した。この原因については不明であるが、精製の各段階でBDK阻害物質が解離したことに起因すると推測される。

2-5 参考文献

- 1) Ono, K., Hakozaki, M., Nishimaki, H., Kochi, H.: Purification and characterization of human liver branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex. *Biochem. Med. Metab. Biol.* (1987) **37**,133-41.
- 2) Odessey, R.: Purification of rat kidney branched-chain oxo acid dehydrogenase complex with endogenous kinase activity. *Biochem. J.* (1982) **204**,353-6.
- 3) Hakozaki, M., Ono, K., Suzuki, T., Hata, H., Mori, T., Kochi, H.: Characterization of rainbow trout branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex: inter-domain segments of the E2 component affect the overall activity. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* (2002) **132**,433-42.
- 4) Ono, K., Hakozaki, M., Nishimaki, H., Kochi, H.: Purification and characterization of human liver branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex. *Biochem. Med. Metab. Biol.* (1987) **37**,133-41.
- 5) Shimomura, Y., Nanaumi, N., Suzuki, M., Popov, K.M., and Harris, R.A.: Purification and partial characterization of branched-chain α -ketoacid dehydrogenase kinase from rat liver and rat heart. *Arch. Biochem. Biophys.*, (1990) **283**,293-99.
- 6) Shimomura, Y., Paxton, R., Ozawa, T., and Harris, R.A.: Purification of branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex from rat liver. *Anal. Biochem.*, (1987) **163**, 74-78.
- 7) Fatania, H.R., Lau K.S., Randle, P.J.: Inactivation of purified ox kidney branched-chain 2-oxoacid dehydrogenase complex by phosphorylation. *FEBS. Lett.* (1981) **132**, 285-288.

- 8) Nakai, N., Kobayashi, R., Popov, K. M., Harris, R.A., and Shimomura, Y.:
Determination of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase activity state and branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase activity and protein in mammalian tissues. *Methods. Enzymol.* (2000) **324**, 48-62.
- 9) Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* (1976) **72**, 248-54.
- 10) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (1970) **227**, 680-5.
- 11) Ingham, K. C.: Precipitation of proteins with polyethylene glycol: characterization of albumin. *Arch. Biochem. Biophys.*, (1978) **186**, 106-113.

第3章 BCKDH複合体活性を制御する特異的キナーゼ(BDK)に対する チアミンピロリン酸(TPP)の阻害機構

3-1 緒言

本章では BCKDH 複合体における TPP による活性調節機構について述べる。

TPP (thiamine pyrophosphate)は、チアミン(thiamine)からチアミンピロホスホキナーゼ(thiamine pyrophosphokinase; EC 2.7.6.2)によって生体内各組織で合成されるチアミン誘導体である。TPP は糖代謝に重要な酵素であるピルビン酸脱水素酵素複合体の E1 [pyruvate dehydrogenase(lipoamido); E1; EC 1.2.4.1]¹⁾ や、TCA 回路を構成する酵素である、2 オキソグルタル酸脱水素酵素複合体 E1[2-oxoglutarate dehydrogenase(lipoamido); E1; EC 1.2.4.2]¹⁾、さらに BCKDH 複合体 E1 などの補酵素として α -ケト酸の脱炭酸反応に機能している。

BCKDH 複合体の活性調節については BDK によるリン酸化、および BCKDH ホスファターゼによる脱リン酸化によって調節されていることは序論ですでに述べた。

この BDK の活性は、一価の金属イオンによって影響を受けることが報告されている²⁾。Shimomura²⁾らの報告によれば、BDK の酵素活性はカリウムイオン (K^+) の影響を強く受けることがわかっており、BDK が最大酵素活性を示すのはミトコンドリア内のカリウムイオン濃度とほぼ同じ 100 mM であると報告されている^{3), 4)}。

一方、その BDK の酵素活性は clofibric acid⁵⁾ および α -chloroisocaproate⁶⁾さらにロイシンの代謝産物である α -ketoisocaproate⁵⁾などにより強く阻害されることが知られているが、TPP は BCKDH 複合体 E1 の補酵素であると同時に BDK に対する強い阻害剤でもあり、その TPP の BDK に対する阻害定数 (K_i) は Lau⁷⁾らの報告で約 4 μ M と算出されている。しかしながら、この報告における酵素活性測定条件のカリウムイオン濃度は約 35 mM と推定され、BDK に対するカリウムイオンの影響はほとんど考慮されていない。

よって、本研究では生理的条件下におけるカリウムイオン濃度が BDK 酵素活性に及ぼす影響を解析するため、第 2 章で精製された BCKDH 複合体を用い、非生体内カリウムイオン濃度 20 mM および、生体内カリウムイオン濃度 100 mM のそれぞれの条件において、TPP の BDK に対する 50%阻害濃度 (IC_{50})を決定し、加えて阻害形式および阻害定数 (K_i) を Lineweaver-Burk plot および Dixon plot⁸⁾ を用いて解析した。併せて、それらの情報から生理的条件下における BDK に対する TPP の生理的

作用について考察を行なった。

3-2 実験方法

3-2-1 BCKDH複合体の精製法

BCKDH 複合体の精製およびタンパク質の定量は基本的に本論文第 2 章の方法に従ったが、実験の便宜上カリウムイオン濃度を調製する必要が生じるため、精製酵素は最終的に 30 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid: HEPES, pH 7.5 adjusted with NaOH at 30°C), 10 mM K₂HPO₄, 0.1 mM EDTA, 20 % glycerol を含むバッファーに懸濁した。なお、この最終精製物は比活性 3.0 μmol NADH/min/mg protein であり、タンパク質濃度は 7.7 mg/ml であった。

3-2-2 BDK反応速度解析

3-2-2a 試薬と器具

試薬は特に断りのない限り市販の特級試薬を用いた。

BCKDH assay buffer:

30 mM potassium phosphate (pH 7.3 at 30°C), 0.1% (w/v) Triton X-100, 0.4 mM thiamine pyrophosphate (TPP), 0.4 mM CoA, 1 mM NAD⁺, 2 mM MgCl₂, dihydrolipoamide dehydrogenase (E3, 154 U/mg)

5×Kinase assay buffer:

100 mM HEPES, (pH 7.35 adjusted with NaOH at 30 °C), 7.5 mM MgCl₂, 10 mM DTT

0.025, 0.05, 0.1, 0.2 mM ATP (pH 7)

0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mM TPP

90 mM K₂HPO₄

800 mM KCl

50 mM α-ketoisovalerate (KIV)

精製 BCKDH 複合体(7.7 mg / ml)

分光光度計 UV-160A-SHIMAZU (Kyoto, Japan)

遠心分離機(CR 20G) – HITACHI (Tokyo, Japan)

遠心分離機(1720) – KUBOTA (Tokyo, Japan)

FRACTION COLLECTOR (SF-2120) – ADVANTEC (Kanagawa, Japan)

ペンレコーダー (UNICOEDER U-228) – 日本電子化学 (Tokyo, Japan)

3-2-2b 50%阻害濃度(IC50)の算出法

BDK の活性測定は基本的に Nakai⁹⁾ らの方法に従った。すなわち 1.5 ml のエッペンドルフチューブに 20 μ l の 5 \times kinase assay buffer, 10 μ l の精製 BCKDH 複合体 (7.7 mg/ml), 10 μ l の TPP を最終濃度がそれぞれ、2, 4, 6, 8 μ M なるように加えた。カリウムイオン濃度を最終濃度 20 mM とするため 10 μ l の 90 mM K_2HPO_4 を加え、100 mM とするために、さらに 10 μ l の 800 mM KCl を加え、最後に ATP (pH \sim 7)を含む全容量が 100 μ l となるように mill-Q 水を加えて 30 $^{\circ}$ C で 2 分間温めた。そこに最終濃度が 5 μ M になるように 50 μ M の ATP (pH \sim 7)を 10 μ l 加え、BDK の反応を開始した。一定時間 (60, 120, 180, 240 秒)経過毎に 20 μ l を分取し、予め 30 $^{\circ}$ C に温めておいた 960 μ l の BCKDH assay buffer に加え、さらに 20 μ l の 50 mM KIV を加えた後に 340 nm の吸光度変化を測定した。1 分間あたりの吸光度変化の自然体数値を BDK の反応時間毎に片対数グラフにプロットし、これらの 2 次回帰直線の傾きにより、BDK 活性を算出した。50%阻害濃度(IC50)の算出は上記反応条件で、酵素の活性を 50%阻害したとき(即ち、IC(%) = 50 のとき)の反応液中での濃度を IC50 値として定義した。IC50 値の具体的な求め方は、TPP それぞれの濃度について、縦軸に阻害率 IC(%)をとり、横軸に反応液中の TPP の濃度(μ M)をとり、50%を挟む 2 点の濃度とその時の阻害率から直線式を作成し、算出した。

3-2-2c 阻害形式の決定法

BDK の活性測定は基本的に 3-2-2b の方法に従った。阻害形式の決定は カリウムイオン濃度 20 mM および 100 mM の条件で TPP の最終濃度が 0, 2, 4, 6, 8, および 10 μ M になるように調製し、そのそれぞれの TPP 濃度について最終濃度が 5 μ M になるように ATP を加えて BDK 活性を測定した。得られた結果を基質の ATP 濃度の逆数および BDK 反応速度の逆数について Lineweaver-Burk plot を作成し得られた各々の直線の勾配と交点から阻害形式を判定した。

3-2-2d 阻害定数(K_i)の算出法

BDK の活性測定は基本的に 3-2-2b の方法に従った。阻害定数(K_i)の決定はカリウ

ムイオン濃度 20 mM および 100 mM の条件下で TPP 最終濃度が各々 0, 2, 4, 6, および 8 μ M になるように調製し、そのそれぞれの TPP 濃度について ATP の最終濃度が 2.5, 5 及び 20 μ M になるように ATP を加え BDK 活性を測定した。得られた結果を BDK の酵素反応速度の逆数および阻害剤 TPP の濃度について Dixon plot⁸⁾を作成し得られた各々の直線の交点から阻害定数を算出した。

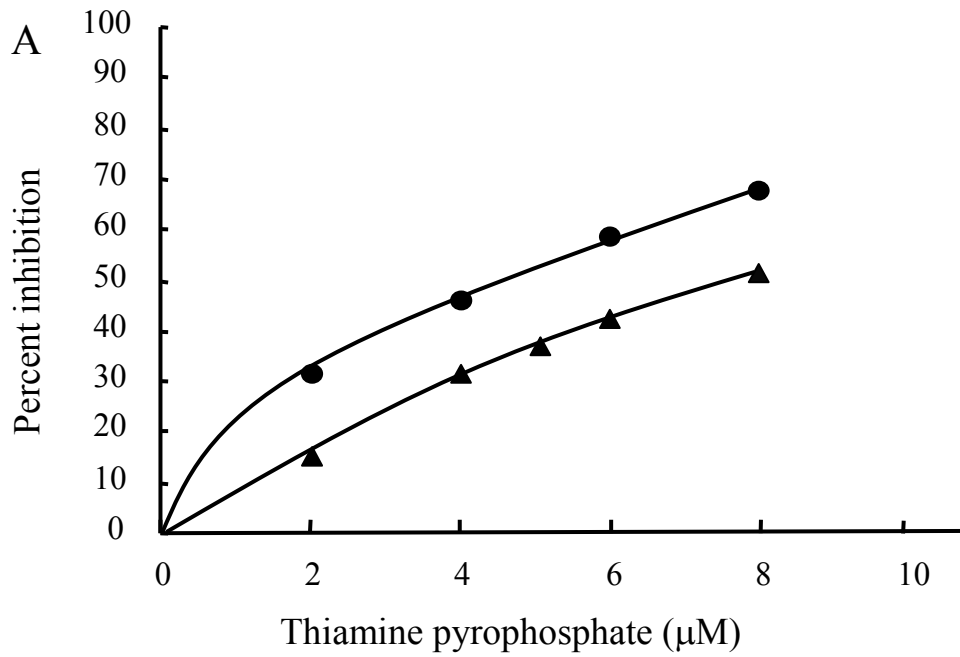
3-3 結果

3-3-1 TPPによるBDKに対しての50%阻害濃度(IC50)

カリウムイオン濃度 20 mM および 100 mM の条件で BDK に対して種々の量の TPP を作用させたときの酵素阻害曲線を示す(Fig. 1 A, B)。

グラフにおいて、TPP による阻害曲線には異なるカリウムイオン濃度で明白な違いが見られた。

カリウムイオン濃度 20 mM 及び 100 mM 条件下での IC₅₀ の値は各々 4.60 μ M, 7.95 μ M であった。また、グラフ上で示していないが TPP 濃度を最終濃度で 1 mM まで上昇させると、BDK 活性は各々 78%, 82%まで阻害され 10 mM でほぼ完全に活性が阻害された。



B

TPP added (μM)	BDK activity (min ⁻¹) (●)	Percent inhibition(●)	BDK activity (min ⁻¹) (▲)	Percent inhibition(▲)
0	0.19	0	0.40	0
2	0.13	32.2	0.34	14.1
4	0.11	45.2	0.28	30.9
5			0.25	37.3
6	0.08	59.0	0.24	40.2
8	0.06	67.3	0.20	50.2

Fig. 1 (A)(B) Inhibition of BCKDH-kinase activity by various concentration of thiamin pyrophosphate in the presence of 20 mM (●) or 100 mM (▲) potassium ion. ATP concentration was fixed at 5 μM.

3-3-2 TPP による BDK 阻害形式

カリウムイオン濃度が 20 mM であるときの TPP 濃度と BDK の反応速度の関係について示した。阻害剤濃度を 4 段階に設定し、それぞれについて基質濃度の逆数に対して反応速度の逆数をプロットした Lineweaver-Burk plot において、3 直線が第 2 象限で交差した(Fig. 2 A)。

TPP 濃度を上昇すると K_m は増大したが、 V_{max} は減少したため、これらの結果より、種々の阻害様式が混ざり合った阻害である混合型阻害であることが明らかとなった。

カリウムイオン濃度が 100 mM の場合は阻害剤 TPP の濃度に応じて勾配は複雑に変化したが、阻害形式を判定する明確な特徴は得られなかった(Fig. 2 B)。

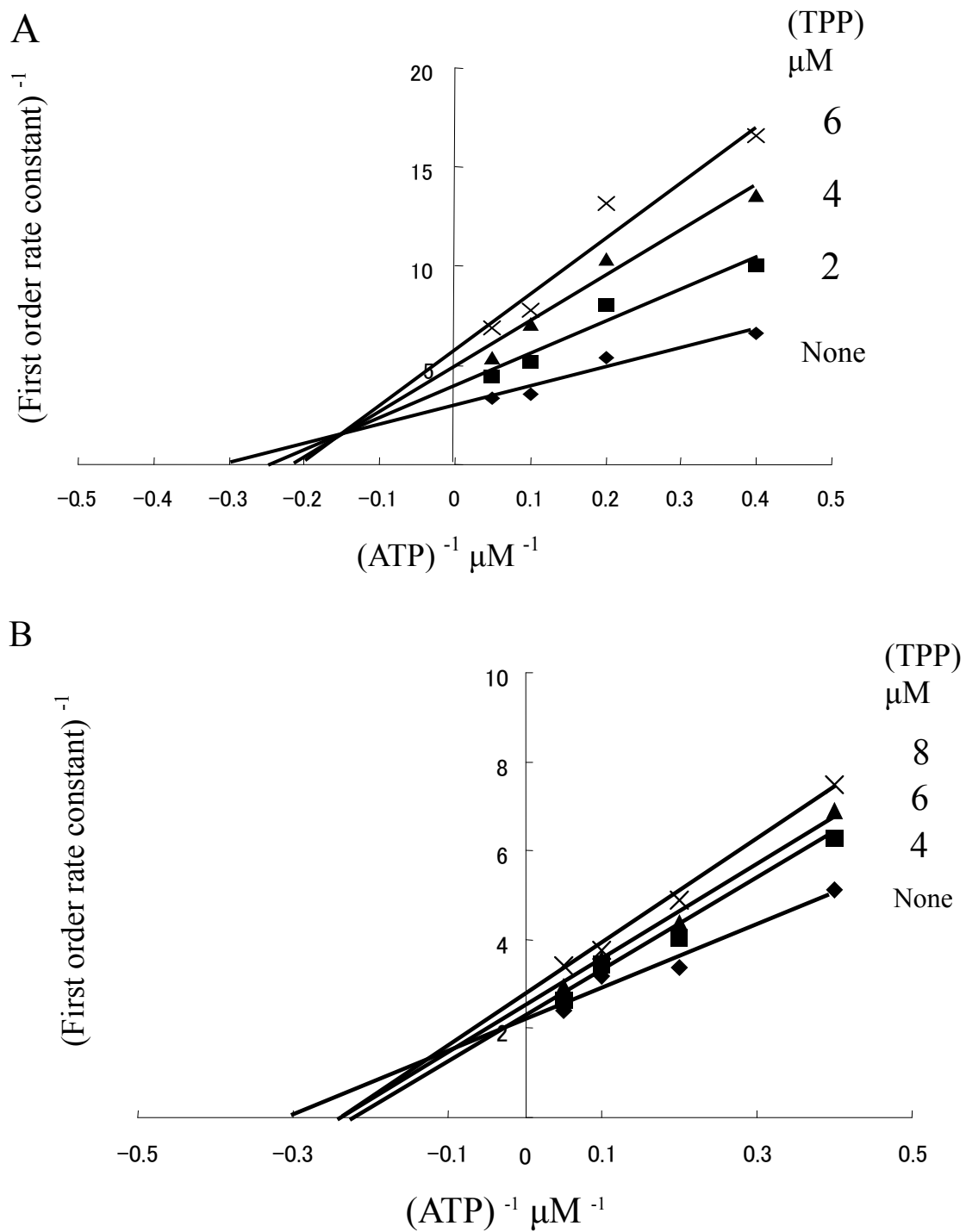


Fig 2 A, B. Lineweaver-Burk plot for thiamine pyrophosphate inhibition of BDK in the presence of 20 mM (A) or 100 mM (B) potassium ion.

ATP concentration was varied from 2.5 to 20 μM.

3-3-3 TPPによるBDK阻害定数 (K_i)

カリウムイオン濃度が 20 mM および 100 mM の条件下で阻害剤濃度に対し反応速度の逆数をプロットする Dixon plot を作成した(Fig. 3 A, B)。

両条件下で、3 直線が第 2 象限で交差し、その各々3 交点の平均値から、阻害定数 (K_i) は 3.19 μM 及び 16.4 μM と算出した。

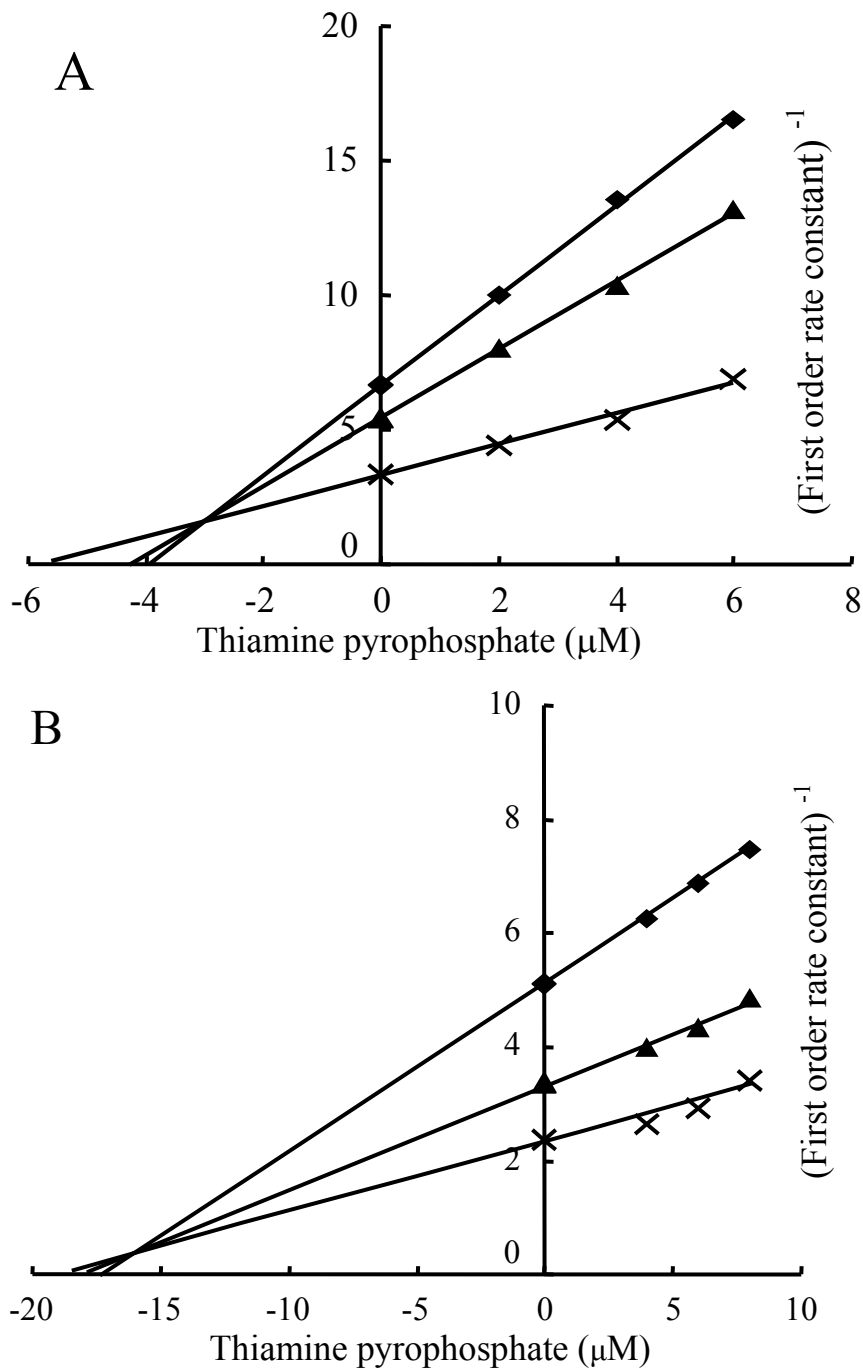


Fig. 3 A, B. Determination of Inhibition constant (K_i) by the Dixon plot analysis. For the inhibition of BDK activity by TPP, the potassium concentration of 20 mM (A) or 100 mM (B) was used.

2.5 μM ATP (◆) 5 μM ATP (▲) and 20 μM ATP (×).

Inhibition constant (K_i) is 3.19 μM for 20 mM and 16.4 μM for 100 mM potassium.

3-4 考察

Shimomura²⁾らは、BDKの代表的な阻害剤である α -chloroisocaproateのIC₅₀値は、カリウムイオン濃度10 mMおよび100 mM条件下において31 μ Mおよび6 μ Mであると報告している。しかし3-3-1の実験の結果から、カリウムイオン濃度20 mMおよび100 mM条件下でのBDKのTPPに対するIC₅₀の値は、各々4.60 μ Mおよび7.95 μ Mであった。この結果から、両者のBDKに対する阻害の傾向は逆であった。

BDK阻害剤がBDK活性を阻害するメカニズムは少なくとも二つ存在すると考えられる。一つは $K_3Fe(CN)_6$ ¹⁰⁾や α -chloroisocaproate¹¹⁾のようにBDKをBCKDH複合体から解離させることによってBDK活性を阻害させるタイプ、もう一方はTPP¹¹⁾のようにこれら二つの酵素を解離させずBDKを阻害するタイプである。

これらのことを考慮に入れると、カリウムイオン K^+ は2つの異なる条件でBDKに対し互いに異なった働きをしていることが予想され、 α -chloroisocaproateの場合にはBCKDH複合体に対する結合BDKを解離する働きがあり、一方TPPの場合にはBDKの酵素活性を安定化させるように働いているのではないかと推測される。カリウム存在下でのBCKDH複合体とBDKの結合様式やBDKに対する阻害形式の違いについての関係は不明な点が多く、今後さらなる検討が必要である。

3-3-2の実験では、カリウムイオン濃度と阻害様式の変化について検討した。3-3-3の実験結果からでは、カリウムイオン濃度が20 mMおよび100 mM双方とも拮抗阻害⁸⁾とみなすことができるが、阻害の形式をDixon plotのみで判定¹²⁾するの好ましくない。阻害の詳細を判定するためLineweaver-Burk plotを用いたところ、20 mMでのパターンから混合型阻害を示し100 mMに濃度が上昇すると阻害様式に変化が見られた。20 mMの阻害様式の結果はLauら⁷⁾が報告した結果とほぼ同じで複合型阻害である。この結果は明確な生体内での酵素の挙動を示したものではないが、生体内でもカリウム濃度の変化とともにBDKの酵素状態が複雑に変化しているのではないかと予想される。

ラットミトコンドリア内のTPP濃度は、ラット肝臓組織内濃度と同等と仮定すると、約41 μ Mであると推定される^{13, 14)}。3-3-3の実験結果より、非生理的濃度のカリウムイオン濃度(20 mM)における K_i は3.19 μ Mであり、この条件ではBDKは強い阻害を受けると推測される。一方、生理的カリウムイオン濃度(100 mM)条件下での K_i は16.4 μ Mであった。この条件であっても、ミトコンドリア内のTPP濃度が41 μ Mであれば

BDK は阻害を受けることが予想される。しかしながら、Harris ら¹³⁾の報告によれば、BCKDH 複合体と同様に TPP を補酵素とする酵素 α -KGDH 複合体は BCKDH 複合体よりも TPP に対する親和性が高いことを示唆されており、ミトコンドリア内では TPP のある程度の量は α -KGDH 複合体にトラップされている可能性がある。したがって、ミトコンドリア内の遊離 TPP (BDK に作用し得る TPP) の濃度は 41 μ M よりも低いことが推察され、生理的カリウムイオン濃度では TPP による BDK 阻害の程度は低いと予想される。

3-5 参考文献

- 1) Reed, L. J.: A trail of research from lipoic acid to α -keto acid dehydrogenase complexes. *J. Biol. Chem.*, (2001) **276**, 38329-38336
- 2) Shimomura, Y., Kuntz, M. J., Suzuki, M., Ozawa, T., and Harris, R. A.: Monovalent cations and inorganic phosphate alter branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase-kinase activity and inhibitor sensitivity. *Arch. Biochem. Biophys.*, (1988) **266**, 210-218
- 3) James, L., and Gamble, J. R.: Retention of potassium by mitochondria. *Am. J. Physiol.*, (1962) **203**, 886-890
- 4) Van Dam, K., and Tsou, C. S.: Accumulation of substrates by mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.*, (1968) **162**, 301-309
- 5) Paxton, R., and Harris, R. A.: Regulation of branched-chain α -ketoacid dehydrogenase kinase. *Arch. Biochem. Biophys.*, (1984) **231**, 48-57
- 6) Harris, R. A., Paxton, R., and DePaoli-Roach, A. A.: Inhibition of branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase kinase activity by alpha-chloroisocaproate. *J. Biol. Chem.*, (1982) **257**, 13915-13918
- 7) Lau, K. S., Fatania, H. R., and Randle, P. J.: Regulation of the branched chain 2-oxoacid dehydrogenase kinase reaction. *FEBS Lett.*, (1982) **144**, 57-62
- 8) Dixon, M.: The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem. J.*, (1953) **55**, 170-171.
- 9) Nakai, N., Kobayashi, R., Popov, K. M., Harris, R.A., and Shimomura, Y.: Determination of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase activity state and branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase activity and protein in mammalian tissues. *Methods. Enzymol.* (2000) **324**, 48-62.
- 10) Nanaumi, N., Shimomura, Y., Suzuki, M.: Branched-chain 2-oxoacid

dehydrogenase kinase activity is regulated by alteration of protein thiol groups.

Biochem. Int., (1991) **25**,137-141.

- 11) Murakami, T. Masayuki, M., Ayako, S., Shimomura, Y.: Dissociation of Branched-Chain α -Keto Acid Dehydrogenase Kinase (BDK) from Branched-Chain α -Keto Acid Dehydrogenase Complex (BCKDC) by BDK Inhibitors. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* (2005) **51**, 48-50.
- 12) 薬物動態 **Vol.16** , No.2(2001) pp.115-126
- 13) Blair, P. V., Kobayashi, R., Edwards, H. M. 3rd, Shay, N. F., Baker, D. H., and Harris, R. A.: Dietary thiamin level influences levels of its diphosphate form and thiamin-dependent enzymic activities of rat liver. *J. Nutr.*, (1999) **129**, 641-648.
- 14) Matsuda, T., Doi, T., Tonomura, H., Baba, A., and Iwata, H.: Postnatal development of thiamine metabolism in rat brain. *J. Neurochem.*, (1989) **52**, 842-846

第4章 ラット骨格筋 BCKDH 複合体活性の新たな測定法の開発

4-1 緒言

BCAA 代謝の研究を行なうにあたって BCKDH 複合体の活性を正確に測定することは重要である。BCKDH 複合体の活性は低蛋白食摂取、絶食、運動などさまざまな生理的条件およびホルモン(glucocorticoid, insulin, thyroid hormone, estrogen)によって影響を受ける^{1),2)}。

BCAA の代謝は臓器によってかなり異なることが明らかにされている。ラット骨格筋やヒトの組織(肝臓、筋肉など)では、ラット肝臓に比べて BCKDH 複合体活性が非常に低い^{3),4)}、骨格筋の活性も貧栄養状態など影響を受けることが明らかにされている⁵⁾。

BCKDH 複合体の研究の多くはラット肝臓を用いているが、それは市販の固形飼料をラットへ与えることで、BCKDH 複合体の高い活性⁶⁾が得られるためである。ラット肝臓抽出物の BCKDH 複合体活性や、ラット肝臓から精製された BCKDH 複合体の酵素活性測定には分光学的活性測定が用いられる⁷⁾。それに対して、ラット骨格筋中の BCKDH 複合体の活性測定では、酵素活性が極めて低いため分光学的方法を用いることができない。そのため、放射性同位元素である ^{14}C でラベルされた基質 $\alpha\text{-keto}[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{isocaproate}$ ($[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{KIC}$)を用いて、BCKDH 複合体による酸化的脱炭酸反応により放出される $^{14}\text{CO}_2$ を測定する方法が用いられてきた^{3),7),8)}。この方法は、これまで骨格筋の BCKDH 活性を測定する唯一の方法であったが、放射性同位元素を用いる不便さと危険性を伴うため、より簡便で感度の高い活性測定法が求められていた。

近年生化学や分析化学の分野では、放射性同位元素を用いる方法に変わって安定同位元素(^{13}C , ^{15}N , ^{18}O など)を用いる安定同位体比質量分析法 IRMS (Isotope ratio mass spectrometry)が開発されつつある。この手法は、安全であり検出感度も高いため、胃内ヘリコバクターピロリのウレアーゼ活性測定⁹⁾などにも応用されつつある。

本研究では標準炭酸ガスおよび $[1\text{-}^{13}\text{C}]\text{K}_2\text{CO}_3$ を用いた $^{13}\text{CO}_2$ の定量、および牛腎臓 BCKDH 複合体による $[1\text{-}^{13}\text{C}]\text{KIC}$ から発生する $^{13}\text{CO}_2$ の定量を GC-IRMS (gas chromatography isotope ratio mass spectrometry)によって検討した。さらに、ラット骨格筋組織抽出物中の BCKDH 複合体活性を測定した。

4-2 実験方法

4-2-1 IRMS法による $^{13}\text{CO}_2$ の定量

4-2-1a 試薬と器具

試薬は特に断りのない限り市販の特級試薬を用いた。

標準炭酸ガス(99.999 %)-Sanami Shoukai Co., LTD. (Yokohama, Japan)

[1- ^{12}C]K₂CO₃ 溶液 Nakarai Tesque (kyoto, Japan)(バス型超音波洗浄機を用いて 10 秒程度脱気した Milli-Q 水で調製)

[1- ^{13}C]K₂CO₃ 溶液 Nakarai Tesque (kyoto, Japan)(バス型超音波洗浄機を用いて 10 秒程度脱気した Milli-Q 水で調製)

針 (22GX1”R.B.)-Terumo(Tokyo, Japan)

注射器 ツベルクリン用(1 mL) -Terumo(Tokyo, Japan)

ホルダー(ベノジェクト II ホルダーS, XX-VPO10HL)-Terumo(Tokyo, Japan)

マルチ針(ベノジェクト II 採血針 S)-Terumo(Tokyo, Japan)

マイクロシリンジ(81220, 1750TLL, 500ul SYR)-Hamilton (Reno, Nevada, USA)

陰圧試験管 (BD vacutainer serum blood collection tube 10mL, 16×100mm, REF366430)

4-2-1b IRMS 測定における至適 CO₂濃度の検討と同位体比($^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$)の測定

本アッセイ系で用いる陰圧試験管内のCO₂濃度の線形性と同位体比($^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$)を検討することにより、IRMSでの同位体比測定にとって最適なCO₂濃度を設定するための検討を実施した(Fig. 1 A, B)。具体的には、0, 0.3, 1, および 3 %の CO₂ 濃度のヘリウムで希釈された標準炭酸ガスを、内容量が12.5 mlの陰圧試験管内に注入し、IRMS測定用のサンプルとした。

4-2-1c IRMS 測定用試験管を用いた CO₂ 同位体比($^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$)の測定検討

次に、CO₂濃度1%条件下で、種々のCO₂同位体比($^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$)をIRMS で測定した(Fig. 1 C, D)。具体的には、内容量が12.5 mlのIRMS 測定用の試験管に、種々の割合($^{13}\text{CO}_2$ として、0, 0.56, 5.58, 16.74, 55.80, および 167.41 nmol/tube)の同位体比($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$)で構成されるK₂CO₃ 溶液0.2 ml、最終濃度 27.9 mM (1% ガス相当量) を、[1- ^{12}C]K₂CO₃および[1- ^{13}C]K₂CO₃を最適な割合で混合することにより調製し、試験管

内にキャップで密封した。その後、2M HCl (1 mL)を試験管内にマイクロシリンジを用いて添加することにより CO₂ (¹³CO₂ および¹²CO₂ 混合)ガスを発生させ、IRMS 測定用のサンプルとした。

4-2-2 実験動物

4-2-2a 実験動物および飼料

Sprague-Dawley ラット、CREA (Tokyo, Japan)

Fisher ラット Charles River Laboratories INC. (Yokohama, Japan)

CE-2 飼料、CREA (Tokyo, Japan)

AIN93G 飼料¹⁰⁾

4-2-2b ラット飼育条件

体重が約 280 g の 7 週齢の雌 Sprague-Dawley ラットを 6 匹 および体重が 100 g の 5 週齢の雌 Fisher (F344)ラット 12 匹を各々個別のケージで飼育した。

Sprague-Dawley ラットは飼料として CE-2 を与え、Fisher (F344)ラットには AIN93G を与えた。飼育室の温度は 22±1 °C であった。照明は 8:00~20:00 が明期、20:00~8:00 が暗期であった。水および餌は常に自由摂取とし 6 日飼育した後、屠殺した。

4-2-2c 骨格筋組織のサンプリング

1 週間の飼育の後、両群ラットともにペントバルビタールナトリウム(50 mg/kg body weight)麻酔下で、全ラットを解剖した。腓腹筋、足底筋を採取し、液体窒素で冷却したアルミクランプ器具を用いて凍結クランプした。採取した組織は抽出まで-80°C で保存した。

4-2-3 骨格筋組織からの BCKDH 複合体抽出

4-2-3a 試薬と器具

試薬は特に断りのない限り市販の特級試薬を用いた。

Extraction buffer (Ex-buffer) (pH 7.4 at 4°C with KOH)

50 mM HEPES, 3% (w/v) Triton X-100, 2 mM EDTA,

5 mM Dithiothreitol (DTT), 0.5 mM Thiamin pyrophosphate (TPP),

2%(v/v)bovine serum,

0.1 mM *p*-Toluenesulfonyl-L-phenylalanine Chloromethyl Ketone (TPCK),
0.1mg/ml Trypsin Inhibitor, 0.02 mg/ml Leupeptin.

Suspension buffer (Susp-buffer) (pH 7.4 at 37°C with KOH)

25 mM HEPES, 0.1%(w/v) Triton X-100, 0.2mM EDTA,

0.4 mM TPP, 1mM DTT, 50mM KCl, 0.02 mg/ml Leupeptin.

27% (w/v) polyethylene glycol (PEG)

PP-16 チューブ Maruemu-(Osaka, Japan)

テフロンホモジナイザー

4-2-3b 抽出の方法

ラット骨格筋中 BCKDH 複合体の抽出は Shimomura⁸⁾らの方法に従って抽出した。特に断りのない限り全ての操作を 4°C でおこなった。ステンレス製乳鉢を用いて、液体窒素中で骨格筋組織を粉末化し、あらかじめ液体窒素中で冷却した PP-16 チューブにサンプリングした。サンプリングした組織粉末は骨格筋組織 300 mg あたり 1.5ml の Extraction buffer を加えてテフロンホモジナイザーでホモジナイズした。組織を完全にすりつぶした後 12000×g で 5 分間遠心分離し、得られた上清全てを新しい PP-16 チューブに移した。そこへ最終濃度が 9%になるように 0.8 ml の 27% (w/v) polyethylene glycol (PEG)溶液を加えてよく混ぜ、氷中にて 20 分放置した後 12000×g で 10 分遠心分離した。上清をできるだけ取り除き、沈渣に 1 ml の Suspension buffer を加えてテフロンホモジナイザーを用いて再度懸濁し最終的な酵素抽出溶液とした。

4-2-4 BCKDH 複合体の活性測定

4-2-4a 試薬と器具

試薬は特に断りのない限り市販の特級試薬を用いた。

2×Assay buffer: (pH 7.3 at 30°C)

60 mM potassium phosphate, 0.2% (w/v) Triton X-100, 0.8 mM TPP,

0.8 mM CoA, 2 mM NAD⁺, 4 mM DTT, 4 mM MgCl₂,

4U/ml porcine heart dihydrolipoamide dehydrogenase (E3).

20 mM α -keto[1-¹³C]isocaproate ([1-¹³C]KIC)-Cambridge Isotope Laboratories, Inc.(Andover, MA, USA)

Lambda protein Phosphatase (New England Biolab Inc., Herts, UK)

2 M HCl,

17.5 mM [$1-^{12}\text{C}$]K₂CO₃ (バス型超音波洗浄機を用いて 10 秒程度脱気した Milli-Q 水で調製)

牛腎臓 BCKDH 複合体酵素-Globozymes (Carlsbad, CA, USA)

ボルテックスミキサー

Mill-Q system (Nihon Millipore K.K.)-(Tokyo, Japan)

ブロックヒーター (Dry Thermo Unit DTU-28)-TAITEC (Saitama, Japan)

恒温槽 (UNITHERMO SHAKER NTS-1200) -EYELA (Tokyo, Japan)

遠心分離機 (LC-120)-TOMY SEIKO(Tokyo, Japan)

バス型超音波洗浄機 (USM-1)-AS ONE(Tokyo, Japan)

ダブルシリコンキャップ(W-16.5) -AS ONE(Osaka, Japan)

針 (22GX1”R.B.)-Terumo(Tokyo, Japan)

注射器 ツベルクリン用(1mL) -Terumo(Tokyo, Japan)

ホルダー(ベノジェクト II ホルダーS, XX-VPO10HL)-Terumo(Tokyo, Japan)

マルチ針(ベノジェクト II 採血針 S)-Terumo(Tokyo, Japan)

マイクロシリンジ(81220, 1750TLL, 500ul SYR)-Hamilton (Reno, Nevada, USA)

陰圧試験管 (BD vacutainer serum blood collection tube 10mL, 16×100mm, REF366430)

4-2-4b 測定手順

ガラス試験管(高さ 105 mm×直径 17 mm)に 2x Assay buffer 750 μl および牛腎臓 BCKDH 複合体酵素 200 μl (0, 0.025, 0.05, 0.25, 0.5, 2.5, 5, 25, および 50 mU per/tube) または、ラット骨格筋抽出サンプル 200 μl を入れ、30 °C で 3 分間プレインキュベーションした。その後あらかじめ 30°C に温めておいた 20 mM の [$1-^{13}\text{C}$]KIC を最終濃度が 1 mM になるように 50 μl 入れ攪拌した後、素早く試験管にダブルシリコンキャップをかぶせた。

30 °C に保った恒温槽でサンプルを 50/min. で振盪し適当な反応時間(0,10,30 min) の後針付き注射器を用いて反応停止液 2 M HCl を 1 ml 加え反応停止とした。その後ボルテックスミキサーで攪拌し、さらに内部標準として 17.5 mM [$1-^{12}\text{C}$]K₂CO₃ を 200 μl マイクロシリンジを用いて注入し攪拌した。バス型超音波洗浄機で 10 秒脱気後、表

面の泡を消す目的で 3000 rpm, 3 min, 室温条件下で遠心した。その後、ホルダー付きマルチ針を刺した後、直ちに、陰圧試験管を、ホルダー側に刺し(約 10~20 秒程度保持)、CO₂ を回収した。酵素反応はサンプル条件ごとに二連で行い、得られたサンプルは GC-IRMS による ¹³CO₂/¹²CO₂ の同位体比測定まで常温で保存した。

酵素活性の定義は 1 分間に 1 μmol の CO₂ が生成される酵素量を 1 U とした。

4-2-4c Lambda protein phosphatase を用いた BCKDH 複合体の脱リン酸化

1.5 ml のエッペンドルフチューブに 2 倍濃度の Suspension buffer 175 μl, ラット骨格筋抽出サンプル 350 μl, 20 mM MnCl₂ 70 μl, 400,000 U/ml の Lambda protein phosphatase を 3.5 μl (1400 U) および Milli-Q 水 101.5 μl を加え、全量を 700 μl とした。その後 30°C で 20 分間インキュベーションし、BCKDH 複合体の脱リン酸化処理をおこなった。この 200 μl を用いてラット骨格筋抽出物の総活性を測定した。

4-2-5 ¹³CO₂/¹²CO₂ の同位体比定量

4-2-5a 分析機器

オートサンプラー GC-PAL autosampler system (CTC Combipal, Chromtech GmbH, Idstein, Germany)

ガスクロマトグラフシステム Gasbench gas chromatograph system (Thermo Electron Corporation, Bremen, Germany)

同位体比質量分析計 Delta plus IRMS system (Thermo Finnigan MAT GmbH, Bremen, Germany)

サンプルの ¹³CO₂/¹²CO₂ の同位体比測定は GC-IRMS によっておこなった。得られた CO₂ サンプルはオートサンプラーからガスクロマトグラフシステムに供給され、CO₂ と他の物質に分離した後、同位体比質量分析計によって ¹³CO₂/¹²CO₂ の同位体比を定量した。

4-2-5b 統計処理

得られたデータは統計処理ソフト Graphpad Prism 5 for windows, ver 5.00 (Graphpad Software. Inc., La Jolla, CA, USA) を用いて統計解析をおこなった。結果は mean (平均値) ± S.E. (標準誤差) で表した。

サンプルの $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ の同位体比測定は GC-IRMS によっておこなった。得られた CO_2 サンプルはオートサンプラーからガスクロマトグラフシステムに供給され、 CO_2 と他の物質に分離した後、同位体比質量分析計によって $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ の同位体比を定量した。

4-2-5b 統計処理

得られたデータは統計処理ソフト Graphpad Prism 5 for windows, ver 5.00 (Graphpad Software. Inc., La Jolla, CA, USA)を用いて統計処理をおこなった。結果は mean(平均値)± S.E.(標準誤差)で表した。

4-3 結果

4-3-1 定量限界

IRMS における CO_2 の検出(IRMS signal intensity [mV])は、0, 0.3, 1, および3 % の CO_2 濃度に依存する線形性が認められ(Fig.1 A)、この時の同位対比($^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$)は、いずれの CO_2 濃度の場合にも約0.01 %で一定の値が測定された(Fig. 1 B)。これらの結果から、 CO_2 濃度がこの範囲にある時の CO_2 の同位体比は安定に測定できる事が示された。

さらにGC-IRMS測定用の試験管内に、種々の割合($^{13}\text{CO}_2$ として、0, 0.56, 5.58, 16.74, 55.80, および167.41 nmol/tube)の同位体比($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$)に調整した27.9 mMの K_2CO_3 溶液 (1 % ガス相当量)に、HCl溶液を添加する事によって遊離する CO_2 ガスの濃度は、いずれのサンプルにおいても約1%の CO_2 ガスが確認され(Fig. 1 C)、水溶液中に存在する CO_2 とその塩はほぼ100%が試験管内にガスとして遊離されることが示めされた。さらに、種々の割合の同位体比 ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$)に調整した K_2CO_3 溶液中の $^{13}\text{CO}_2$ の割合の増加に従って、線形性を示す用量依存的 ($^{13}\text{CO}_2$ として、0.56 から 167.41 nmol/tube)な同位体比の増加が認められた(Fig. 1 D)。

また、本実験における $^{13}\text{CO}_2$ として添加した最低容量である0.56 nmol/tubeは、 $^{13}\text{CO}_2$ の検出限界を示している。

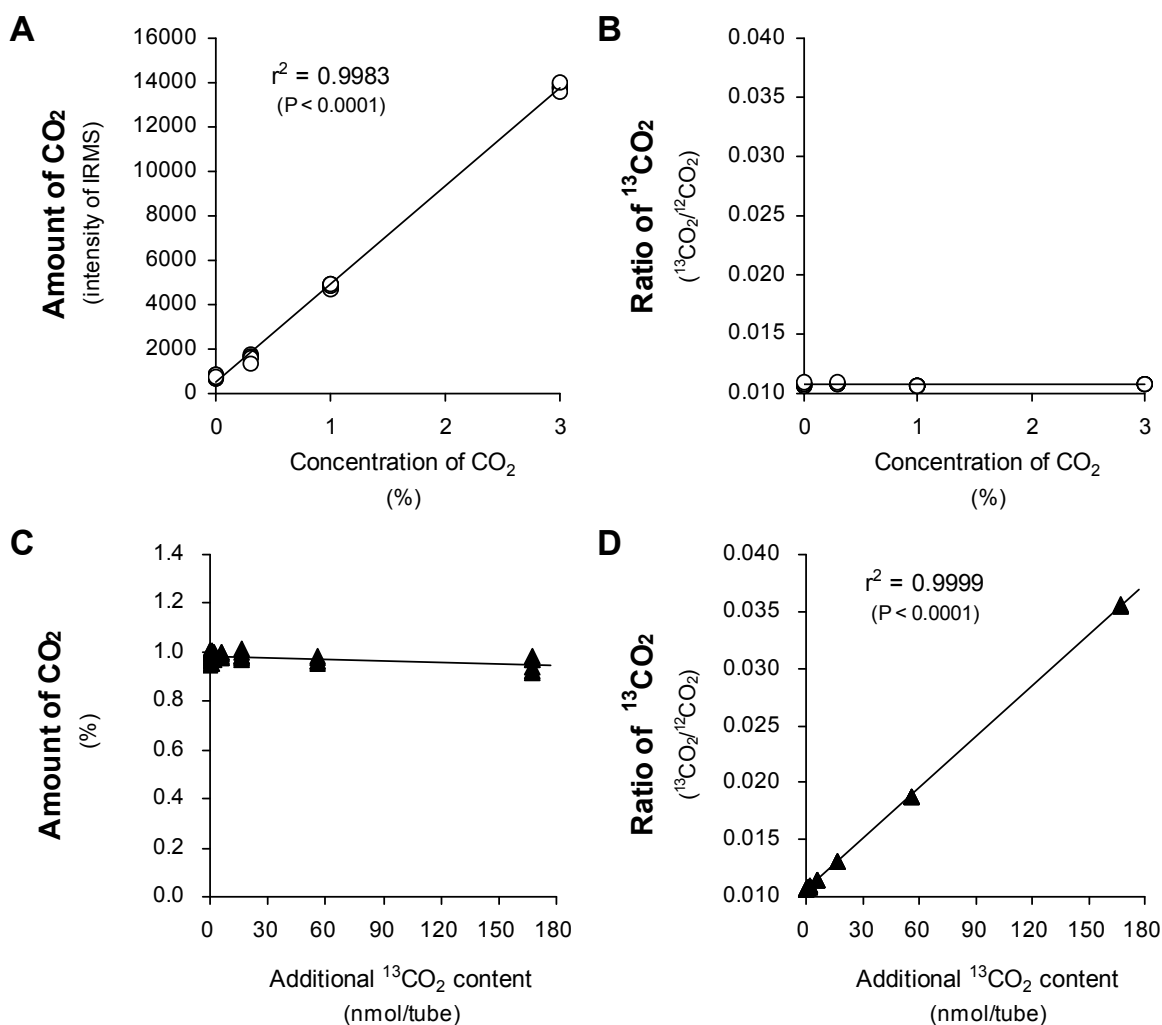


Fig. 1 Detection of the concentration of CO₂ and ratio of ¹³CO₂/¹²CO₂ with IRMS in our developed assay procedure. Each value displayed relationship between the measured CO₂ intensity (A) or ratio of ¹³CO₂/¹²CO₂ (B) and the several concentration of CO₂ (0, 0.3, 1 and 3 %) with the IRMS assay. The all number (n = 24) of data points used for the correlation coefficient is given in each figure. Each point represents one sample (open circle). These assay samples prepared from the ultra pure CO₂ standard gas. And each value investigated relationship between amount of CO₂ (C) or ratio of ¹³CO₂/¹²CO₂ (D) and additional ¹³CO₂ content (0, 0.56, 1.67, 5.58, 16.74, 55.80 and 167.41 nmol per sample tube). The all number (n = 42) of data points used for the correlation coefficient is given in each figure. Each point represents one sample (closed triangle). These assay samples prepared from the ¹³C-labeled and non-labeled K₂CO₃ solution.

4-3-2 BCKDH 複合体の酵素用量依存性

BCKDH 複合体の脱炭酸酵素反応によって[1-¹³C]KIC から発生する ¹³CO₂ の酵素用量依存性の検討を行った。用いた酵素量(0, 0.025, 0.05, 0.25, 0.5, 2.5, 5, 25, および 50 mU per /tube, n=18)と ¹³CO₂ 発生量は強い相関関係にあり線形性を示した(Fig. 2)。しかし、250 mU/tube の酵素量を加えると ¹³CO₂ 発生量は 722 nmol であり、線形性を示さなかった。

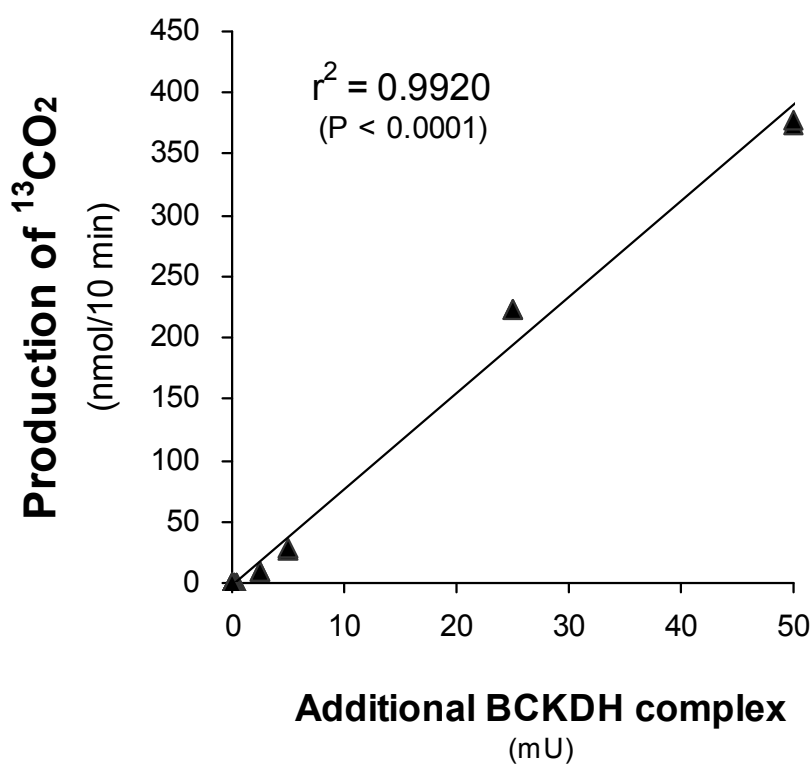


Fig. 2. Relationship between the production of ¹³CO₂ and the quantity of additional BCKDH complex. Each value displayed relationship between the production of ¹³CO₂ and the several quantity of additional BCKDH complex (0.025, 0.05, 0.25, 0.5, 2.5, 5, 25 and 50 mU per sample tube). The all number (n = 18) of data points used for the correlation coefficient is given in each figure. Each point represents one sample (closed triangle). The several quantity of enzyme sample prepared from the purified bovine kidney BCKDH complex. All samples were incubated for 10 minute at 30 °C.

4-3-3 BCKDH 複合体の酵素反応時間依存性

牛腎臓 BCKDH 複合体酵素の酵素活性量を(0.5 mU (n = 6)および 5 mU (n = 6))に固定し、反応時間を(0, 10, および 30 分)に変化させたときの $^{13}\text{CO}_2$ の発生量を示した (Fig. 3 A, B)。0.5 mU (A), 5 mU (B)ともに線形性を示し、反応時間に依存して $^{13}\text{CO}_2$ の濃度が増大した。

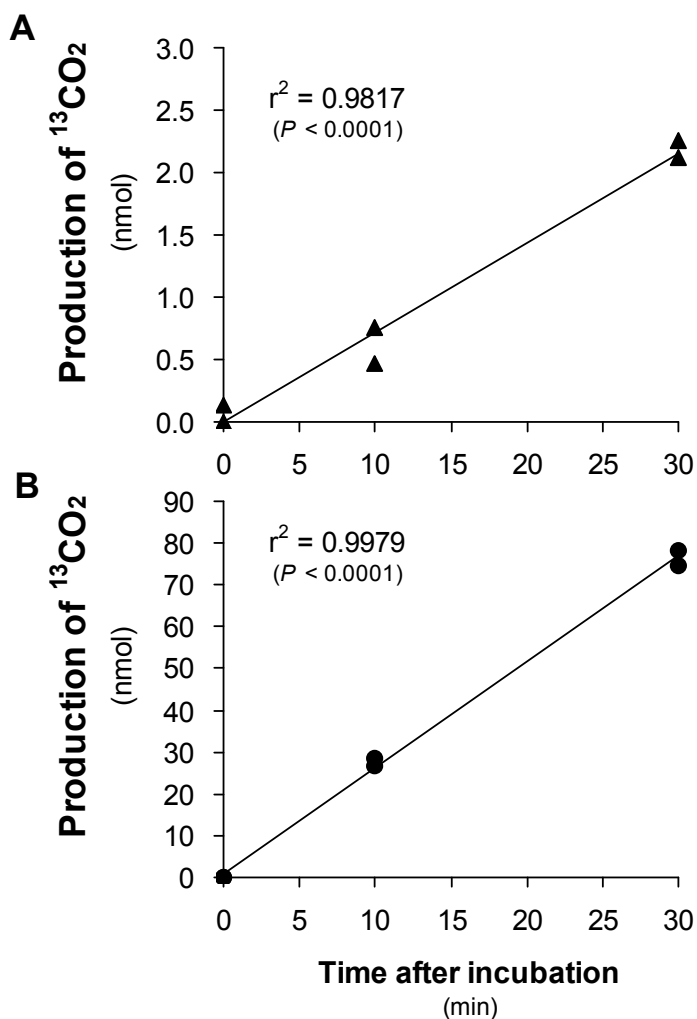


Fig. 3. Relationship between the production of $^{13}\text{CO}_2$ and the reaction time for BCKDH complex. Each value displayed relationship between the production of $^{13}\text{CO}_2$ and the several incubation times (0, 10 and 30 minute) including the 0.5 mU (A) or 5 mU (B) of purified Bovine BCKDH complex. The all number (0.5 mU (n = 6) and 5 mU (n = 6)) of data points used for the correlation coefficient is given in each figure. Each point represents one sample (closed circle and closed triangle). The 0.5 mU and 5 mU of enzyme sample prepared from the purified bovine kidney BCKDH complex. All samples were incubated at 30 °C.

4-3-4 ラット骨格筋抽出 BCKDH 複合体の活性測定

ラット骨格筋抽出液中の BCKDH 複合体活性を、ホスファターゼ処理しない活性 (actual activity) とホスファターゼ処理後の総活性(total activity)として測定し Table 1 に示した。実験では、Sprague-Dawley 系と Fischer 系の 2 種類の系統ラットを用いたが、いずれもほぼ同様の actual activity と総活性を示し、活性状態(activity state)はそれぞれ 3.08%と 5.45%であった。これらの結果は、Shimomura⁴⁾ らが報告した [1-¹⁴C]KIC を用いた活性値とほぼ同様であった。

Table 1. Actual and total activities and activity state of BCKDC in rat skeletal muscle. Data are for male Sprague-Dawley and Fischer rats for similar muscle preparation. Value are the mean \pm S.E.M.

Rats strain	n	BCKDC activity		Activity state (%)
		Actual (nmol/min/g wet tissue)	Total	
Sprague Dawley	6	1.17 \pm 0.21	38.07 \pm 2.34	3.08 \pm 0.52
Fischer	12	1.43 \pm 0.12	33.06 \pm 4.31	5.45 \pm 0.20

4-4 考察

本研究において開発した IRMS による ¹³CO₂/¹²CO₂ 比率の測定では、酵素量および酵素反応時間に依存して直線的に ¹³CO₂/¹²CO₂ 比率が上昇することより、活性の低い BCKDH 複合体活性の測定に適応できることが明らかとなった。

[1-¹³C]KIC を用いた ¹³CO₂/¹²CO₂ 比率の測定法には以下の利点がある。

1. ¹³CO₂ 法は活性測定のための反応混合液を 1 ml よりも多くすることができ、測定感度を高めることが可能である。一方 ¹⁴CO₂ 法では反応は 2 ml のエッペンドルフチューブでおこなうため反応混合液を多くすることができない。

2. $^{13}\text{CO}_2$ 法では一定の反応時間が経過した後、反応停止液をすばやくボルテックスミキサーで混合し反応を停止できる。一方 $^{14}\text{CO}_2$ 法ではシンチレーションバイアル中にシリンジを刺し反応停止液を混合させるため、失敗が起こりやすい。 $^{13}\text{CO}_2$ 法では KOH 水溶液を用いないためそのような失敗は起こらない。
3. $[1-^{13}\text{C}]\text{KIC}$ は固体状態で市販されており、溶液の凍結状態で販売されている $[1-^{14}\text{C}]\text{KIC}$ よりも安定に保管できる。この利点から、Fig. 1 に示したように 0.56 nmol/tube の $^{13}\text{CO}_2$ を検出できた。一方、この濃度は $^{14}\text{CO}_2$ 法においてほぼ限界の測定値であり、さらに $^{14}\text{CO}_2$ 法では基質の凍結融解により $[1-^{14}\text{C}]\text{KIC}$ が不安定になり崩壊による高いバックグラウンドが上昇し、検出感度が低下することが認められている。

これらの利点から、新たな骨格筋中の BCKDH 複合体活性測定法としてだけでなく、同じような反応機構を持つ脱炭酸酵素であるピルビン酸脱水素酵素複合体や、 α -ケトグルタル酸脱水素酵素の活性測定法に応用されることが期待される。

4-5 参考文献

- 1) Shimomura, Y., Obayashi, M., Murakami, T., and Harris, R.A.: Regulation of branched-chain amino acid catabolism: nutritional and hormonal regulation of activity and expression of the branched-chain α -keto acid dehydrogenase kinase. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, (2001) **4**, 419-423.
- 2) Shimomura, Y., Honda, T., Shiraki, M., Murakami, T., Sato, J., Kobayashi, H., Mawatari, K., Obayashi, M., and Harris, R.A.: Branched-chain amino acid catabolism in exercise and liver disease. *J. Nutr.*, (2006) **136**, 250S-253S.
- 3) Shimomura, Y., Fujii, H., Suzuki, M., Murakami, T., Fujitsuka, N., and Nakai, N.: Branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex in rat skeletal muscle: regulation of the activity and gene expression by nutrition and physical exercise. *J. Nutr.*, (1995) **125**, 1762S-1765S.
- 4) Suryawan A., Hawes, J.W., Harris, R.A., Shimomura, Y., Jenkins A.E., Hutson S.M.: A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.*, (1998) **68**, 72-81.
- 5) Paul, H.S., Adibi, S.A.: Leucine oxidation and protein turnover in clofibrate-induced muscle protein degradation in rats. *J. Clin. Invest.*, (1980) **65**, 1285-93.
- 6) Harris, R.A., Zhang, B. Goodwin, G.W., Kuntz, M.J. Shimomura, Y., Rougraff, P.,

- Dexter, P. Zhao, Y., Gibson, R., Crabb, D.W.: Regulation of the branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase and elucidation of a molecular basis for maple syrup urine disease. *Adv. Enzyme. Regul.*, (1990) **30**,245–263.
- 7) Nakai, N., Kobayashi, R., Popov, K. M., Harris, R.A., and Shimomura, Y.: Determination of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase activity state and branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase activity and protein in mammalian tissues. *Methods. Enzymol.*,(2000) **324**, 48-62
 - 8) Shimomura, Y., Suzuki, T., Saitoh, S., Tasaki, Y., Harris, R.A., Suzuki, M.: Activation of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex by exercise: effect of high-fat diet intake. *J. Appl. Physio.*, (1990) **68**, 161–165.
 - 9) Ohara S., Kato, M., Asaka, M., Toyota, T.: Studies of ¹³C-urea breath test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in Japan. *J. Gastroenterol.*, (1998) **33** 6-13.
 - 10) Subcommittee on Laboratory animal nutrition, committee on animal nutrition, board on agriculture, National Research Council, [Nutrient Requirements of Laboratory Animals – 4th rev. ed.], National Academy Press, Washington, D.C. (1995) pp15

第 5 章 ヒト血漿遊離アミノ酸組成に対する運動と BCAA 摂取の影響

5-1 緒言

人の身体でもっとも大きな臓器は骨格筋であり、体重の約 40 %を占める。BCAA はこの筋タンパク質中の必須アミノ酸の約 35%を占めると報告されている¹⁻³⁾。さらに、食事タンパク質中の必須アミノ酸の 40~50%を占めていることから、人は多くの BCAA を体内に保持し、また多くの BCAA を摂取している。

多くのアミノ酸は肝臓で分解されるのに対して、BCAA は筋肉で直接分解される。これは BCAA 分解系の代謝の第 1 段階を司っている BCAT 活性が肝臓では極めて低く、骨格筋で高いことに起因している^{4,5)}。しかし、BCAA 分解系の第 2 段階を司る BCKDH 複合体活性は筋肉で極めて低い。一方、肝臓では BCAT が殆ど発現していないにも関わらず BCKDH 複合体活性は高い。すなわち正常な動物の安静な状態では、BCAA は筋肉でアミノ基転移反応を受けるが、それ以上の分解は受けず、逆に肝臓では BCAA を直接分解できないがそのアミノ基転移産物である BCKA を分解する。

運動により骨格筋のエネルギー代謝は著しく増大するため、主要なエネルギー源である、糖質や脂質ばかりでなく、タンパク質やアミノ酸の代謝も促進される。このことからヒトやラットの骨格筋中 BCKDH 複合体活性は運動によって上昇する⁶⁻⁸⁾。結果としてそれは BCAA の酸化を促進させる。

さらに筋肉組織は運動により損傷を受けるが、その修復においてタンパク質合成とエネルギー代謝は亢進するため、アミノ酸の利用は高まる。これらの事から運動はタンパク質やアミノ酸の代謝に大いに影響すると考えられる。

さらに BCAA はタンパク質を合成し分解を抑制⁹⁻¹⁶⁾するため、運動前に BCAA を摂取することは運動による筋損傷のダメージからの回復を促進させる可能性が考えられる。その状況では BCAA 以外のアミノ酸代謝も影響を受ける可能性が示唆される。

また、詳細は不明ではあるが、この BCAA 摂取の効果は男性より女性の方が高いことが示唆されている。そこで本研究では、運動前 BCAA 摂取と血漿アミノ酸濃度の関係について、女性を被験者として検討した。

5-2 方法

5-2-1 試験方法

本研究はヘルシンキ宣言の精神に則り実施され、被験者には予め研究の詳細を説明し、文書による承諾書を得た。また本研究は、味の素株式会社及び名古屋大学医学部総合診療部の佐藤寿一講師らとの共同研究であり、名古屋大学医学部臨床受託研究審査委員会の承認を得た後に実施された。

試験はダブルブラインドのクロスオーバー法で行われ、クロスオーバーの2試験は約3ヶ月の間隔をあけて実施された。

5-2-2 被験者

定期的な運動を行っていない、20~24歳の名古屋工業大学と椙山女学園大学の学生および大学院生12名を被験者とした。被験者の身体的特徴を以下に示した。

身長[cm]	体重[kg]	BMI[kg/m ²]	体脂肪率[%]
158±1	48.5±1.5	19.4±0.5	22.7±1.0

Values are means±SE.(n=12)

5-2-3 試験飲料

試験飲料として、200 ml 中に 5.5 g の BCAA、1 g のインスタント緑茶粉末(味の素ゼネラルフーズ(株))および 1.2 g のパルスweet(味の素(株))を添加した BCAA 飲料、もしくは BCAA の代わりに同量のデキストリンを添加したプラセボ飲料を用いた。

BCAA は食品として製造された分岐鎖アミノ酸(味の素(株))を用いた。その配合組成は、FAO/WHO/UNU による必須アミノ酸の基準パターン(1985年)の比率 Ile : Val : Leu = 1 : 2.3 : 1.2 とした。なお、BCAA が呈する苦味を緩和する目的で代替甘味料であるパルスweet及びインスタント緑茶粉末を添加した。

これらの飲料を体重 1 kg あたり 0.1 g BCAA 又はデキストリンとなるように、各被験者の体重に合わせて摂取させた。なお、試験飲料は蓋付の紙コップに入れて被験者に手渡し、両飲料の判別がつかないようにした。

5-2-4 試験スケジュール

試験日初日、前夜より約 12 時間の絶食の後、午前 8 時 30 分に被験者を実験室に

集合させ、体重測定および約 13 ml の採血を行った。その後 100 kcal の糖質を主体としたエネルギーゼリー(大塚製薬(株))を朝食代わりに摂取させた。その 45 分後より、スクワット運動(20 回×7 セット)を被験者に負荷した。なお、スクワット運動は 2 秒に 1 回の割合で行わせ、各セット間には 3 分間のインターバルを設けた。運動終了直後に、再び約 13 ml の採血を行い、その 1 時間後、2 時間後に同様の採血を行った。試験 2 日目、3 日目も試験初日と同様に夜間絶食の後、採血を行った。

5-2-5 検査項目

血漿アミノ酸濃度を L-8500 自動アミノ酸分析計(日立)により測定した。

5-2-6 統計処理

結果は全て平均値±標準誤差の形式で表示した。BCAA 群とプラセボ群間でのデータは 2-way repeated measures ANOVA と Tukey post hoc test を用いて処理した。Placebo 又は BCAA それぞれの群内でのデータは 1-way repeated measures ANOVA を用いて処理した。2-way repeated measures ANOVA の検定では Stat View 5.0 を用い、その他の検定では Stat mate 3.14 を用いた。

5-3 結果および考察

血漿中各アミノ酸濃度の経時的変化の結果を示した(Table 1)。

プラセボ飲料摂取群の血漿中 BCAA 濃度は、運動前のレベルに比べて運動直後 1～2 時間後にかけて有意に減少した。しかし、BCAA 飲料摂取により、血漿中 BCAA 濃度は有意に上昇し、運動前の約 2～3.5 倍と高く維持されることが示された。

BCAA 以外のアミノ酸では、BCAA 摂取群において運動直後および 1～2 時間後にかけてグルタミン酸の濃度が有意に上昇した。一方、メチオニン、および芳香族アミノ酸であるフェニルアラニン、チロシンの濃度はプラセボ群に対し運動 1～2 時間後の間有意に低下した。

BCAA 代謝の律速段階を司る BCKDH 複合体は、肝臓でのメチオニン代謝に影響を与え^{17,18)}、またラット肝 BCKDH 複合体は BCAA 中のロイシンにより活性化されるという報告¹⁹⁾がある。ヒトの肝 BCKDH 複合体活性はラットのそれと比べはるかに低い^{20,21)}、ヒトにおいても BCAA 摂取により BCKDH 複合体が活性化され、結果と

して血漿メチオニン濃度が低下した可能性が示唆される。

BCAA 摂取により、血漿芳香族アミノ酸濃度が低下したことは大変興味深い。しかし、他の研究において、運動前の BCAA 摂取により芳香族アミノ酸の濃度が低下したという報告はない。この矛盾は、運動方法、年齢、性等の違いによるかもしれない。本実験において、BCAA 摂取により血漿中芳香族アミノ酸濃度とメチオニン濃度が減少した要因を解明するためにも、これらのアミノ酸代謝に対する BCAA 摂取の影響について更なる研究が必要である。

Table 1. Plasma free amino acid concentrations.

Amino acid	Trial	Before exercise	After exercise					<i>P</i> -value ¹
			Day 1			Day 2	Day 3	
			0 h	1 h	2 h			
$\mu\text{mol/L}$								
BCAA	P ²	386 ± 16	304 ± 10	281 ± 6	308 ± 5	353 ± 12	354 ± 13	<0.001
	B	382 ± 11	1011 ± 60#	855 ± 48#	600 ± 35#	352 ± 9	355 ± 10	<0.001
Ala	P	344 ± 16	465 ± 17	388 ± 16	337 ± 15	367 ± 30	383 ± 29	<0.001
	B	377 ± 22	460 ± 17	390 ± 12	350 ± 15	386 ± 25	377 ± 28	<0.001
Arg	P	95 ± 4	84 ± 4	79 ± 3	82 ± 4	93 ± 6	96 ± 3	<0.001
	B	103 ± 4	106 ± 4	94 ± 4	87 ± 4	96 ± 5	91 ± 4	<0.001
Asn	P	38 ± 3	37 ± 3	35 ± 2	34 ± 2	39 ± 3	42 ± 3	<0.001
	B	43 ± 3	37 ± 2	30 ± 2	30 ± 2	38 ± 2	39 ± 2	<0.001
Asp	P	10 ± 1	8 ± 1	8 ± 1	9 ± 1	9 ± 1	9 ± 1	>0.1
	B	8 ± 1	8 ± 1	8 ± 1	8 ± 1	8 ± 1	8 ± 1	>0.1
Gln	P	560 ± 10	530 ± 13	529 ± 9	543 ± 11	553 ± 17	585 ± 12	<0.001
	B	599 ± 14	607 ± 14#	598 ± 11#	597 ± 7#	583 ± 11	573 ± 11	>0.05
Glu	P	20 ± 1	13 ± 2	17 ± 2	17 ± 1	25 ± 3	22 ± 2	<0.001
	B	19 ± 2	14 ± 2	16 ± 2	16 ± 2	24 ± 3	22 ± 2	<0.001
Gly	P	236 ± 8	225 ± 9	226 ± 7	221 ± 8	251 ± 14	257 ± 10	<0.001
	B	259 ± 11	224 ± 9	213 ± 9	210 ± 8	256 ± 13	248 ± 14	<0.001
His	P	74 ± 2	71 ± 2	68 ± 2	71 ± 2	74 ± 2	76 ± 2	<0.001
	B	78 ± 2	78 ± 2	68 ± 2	68 ± 1	74 ± 2	74 ± 1	<0.001

Lys	P	196 ± 9	179 ± 9	177 ± 9	181 ± 9	186 ± 10	180 ± 7	<0.001
	B	203 ± 9	200 ± 8	184 ± 9	174 ± 9	183 ± 9	181 ± 8	<0.001
Met	P	25 ± 1	21 ± 1	18 ± 1	18 ± 1	24 ± 1	24 ± 1	<0.001
	B	25 ± 1	21 ± 1	12 ± 1#	10 ± 1#	22 ± 1	23 ± 1	<0.001
Phe	P	54 ± 2	48 ± 2	45 ± 1	46 ± 2	52 ± 2	52 ± 2	<0.001
	B	54 ± 3	46 ± 2	29 ± 2#	26 ± 2#	51 ± 2	52 ± 1	<0.001
Pro	P	122 ± 6	126 ± 5	117 ± 5	109 ± 5	121 ± 7	130 ± 8	0.022
	B	140 ± 7	129 ± 8	108 ± 5	102 ± 6	121 ± 7	128 ± 8	<0.001
Ser	P	143 ± 5	130 ± 5	121 ± 3	123 ± 4	140 ± 6	143 ± 6	<0.001
	B	142 ± 6	123 ± 5	108 ± 4	108 ± 4	137 ± 5	139 ± 6	<0.001
Thr	P	130 ± 6	122 ± 6	111 ± 5	108 ± 4	120 ± 8	123 ± 7	0.001
	B	141 ± 5	125 ± 4	103 ± 4	97 ± 3	115 ± 4	120 ± 5	<0.001
Trp	P	45 ± 2	42 ± 1	43 ± 2	38 ± 2	44 ± 2	42 ± 1	0.011
	B	45 ± 2	41 ± 2	33 ± 2	29 ± 1	43 ± 2	43 ± 1	<0.001
Tyr	P	62 ± 3	52 ± 2	47 ± 2	49 ± 2	57 ± 3	58 ± 2	<0.001
	B	62 ± 2	51 ± 2	34 ± 1#	27 ± 1#	57 ± 2	56 ± 2	<0.001

Data are presented as the mean ± SE. ¹P-values were calculated for changes over time within each trial using 1-way repeated-measures ANOVA. ²“P” stands for placebo and “B” for BCAA. #Significantly different from the placebo of the corresponding time point (*P*<0.05).

5-4 参考文献

- 1) Riazi, R., Wykes, L.J., Ball, R.O., Pencharz, P.B.: The total branched-chain amino acid requirement in young healthy adult men determined by indicator amino acid oxidation by use of L-[1-¹³C]phenylalanine. *J. Nutr.*, (2003) **133**, 1383-9.

- 2) Layman, D.K., Baum, J.I.: Dietary protein impact on glycemic control during weight loss. *J Nutr.*, (2004) **134**, 968S-73S.
- 3) Harper, A.E., Miller, R.H., Block, K.P.: Branched-chain amino acid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.*, (1984) **4**, 409-54.
- 4) Suryawan, A., Hawes, J.W., Harris, R.A., Shimomura, Y., Jenkins A.E., Hutson S.M.: A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.*, (1998) **68**, 72-81.
- 5) Harris, R.A., Zhang, B., Goodwin, G.W., Kuntz, M.J., Shimomura Y., Rougraff, P., Dexter, P., Zhao, Y., Gibson, R., Crabb, D.W.: Regulation of the branched-chain α -ketoacid dehydrogenase and elucidation of a molecular basis for maple syrup urine disease. *Adv. Enzyme. Regul.*, (1990) **30**, 245-63.
- 6) Shimomura, Y., Fujii, H., Suzuki, M., Murakami, T., Fujitsuka, N., Nakai, N.: Branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex in rat skeletal muscle: Regulation of the activity and gene expression by nutrition and physical exercise. *J. Nutr.*, (1995) **125**, 1762S-5S.
- 7) Xu M., Nagasaki, M., Obayashi, M., Sato, Y., Tamura, T., Shimomura, Y.: Mechanism of activation of branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex by exercise. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, (2001) **287**, 752-6.
- 8) Wagenmakers, A.J.M., Brookes, J.H., Coakley, J.H., Reilly, T., Edwards, R.H.: Exercise-induced activation of the branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase in human muscle. *Eur. J. Physiol.*, (1989) **59**, 159-67.
- 9) Anthony, J.C., Yoshizawa, F., Anthony, T.G., Vary, T.C., Jefferson, L.S., Kimball, S.R.: Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J. Nutr.*, (2000) **130**(10), 2413-2419.
- 10) Anthony, J.C., Anthony, T.G., Kimball, S.R., Jefferson, L.S.: Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *J. Nutr.*, (2001) **131**(3), 856S-860S.
- 11) Kimball, S.R., Jefferson, L.S.: Regulation of global and specific mRNA translation by oral administration of branched-chain amino acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2004) **313**(2), 423-427.
- 12) Kimball, S.R., Jefferson, L.S.: Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *J. Nutr.*, (2006) **136** (1 Suppl), 227S-231S.
- 13) Crozier, S.J., Kimball, S.R., Emmert S.W., Anthony, J.C., Jefferson, L.S.: Oral leucine

- administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *J. Nutr.*, (2005) **135**(3),376-382.
- 14) Kimball, S.R., Jefferson, L.S.: Amino acids as regulators of gene expression. *Nutr. Metab.*, (2004) (Lond) **17**(1), 3.
 - 15) Garlick, P.J.: The role of leucine in the regulation of protein metabolism. *J. Nutr.*, (2005) **135**, 1553S-1556S.
 - 16) Hay, N., Sonenberg, N.: Upstream and downstream of mTOR. *Genes. Dev.*, (2004) **18**(16), 1926-1945.
 - 17) Jones, S.M., Yeaman, S.J.: Oxidative decarboxylation of 4-methylthio-2-oxobutyrate by branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase complex. *Biochem. J.*, (1986) **237**(2),621-623.
 - 18) Paxton, R., Scislowski, P.W., Davis, E.J., Harris, R.A.: Role of branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase in 2-oxobutyrate metabolism. *Biochem. J.*, (1986) **234**(2), 295-303.
 - 19) Ishiguro, H., Katano, Y., Nakano, I., Ishigami, M., Hayashi, K., Honda, T., Goto, H., Bajotto, G., Maeda, K., Shimomura, Y.: Clofibrate treatment promotes branched-chain amino acid catabolism and decreases the phosphorylation state of mTOR, eIF4E-BP1, and S6K1 in rat liver. *Life Sci.*, (2006) **79**(8), 737-743.
 - 20) Suryawan, A., Hawes, J.W., Harris, R.A., Shimomura, Y., Jenkins, A.E., Hutson, S.M.: A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* (1998) **68**(1), 72-81.
 - 21) Taniguchi, K., Nonami, T., Nakao, A., Harada, A., Kurokawa, T., Sugiyama, S., Fujitsuka, N., Shimomura, Y., Hutson, S.M., Harris, R.A., Takagi, H.: The valine catabolic pathway in human liver: effect of cirrhosis on enzyme activities. *Hepatology*. (1996) **24**(6), 1395-1398.

第6章 総括

本研究では BCAA 代謝律速酵素である、BCKDH 複合体について酵素学的な諸研究を行い新たな知見を得た。

第2章では、従来の BCKDH 複合体精製法に更なる改良を加えた。すなわち、2% PEG 沈殿処理の段階における KCl 添加、phenyl-Sepharose ゲルクロマトグラフィー段階でのゲル攪拌による改善、hydroxyapatite カラムクロマトグラフィー段階での酵素溶出法の改善により、精製倍率は向上しほぼ以前の報告と同様の結果を得ることができた。

第3章では、BCK の阻害剤 TPP についてカリウムイオン濃度の違いにおける 50% 阻害濃度(IC50)の算出、阻害形式および阻害定数の決定を行い、TPP 阻害に対するカリウムイオンの影響は BCK の代表的な阻害剤である α -chloroisocaproate に対する影響とは異なる点を見出した。また α -KGDH 複合体と BCKDH 複合体に対する TPP の親和性の違いおよびミトコンドリア内では TPP が結合して存在する可能性が高いことから、生体内における TPP による BCK 阻害について生理的に重要と考えられる新たな考察を加えた。

第4章では、 $^{13}\text{CO}_2$ 濃度に依存して GC-IRMS 強度は増大しいずれの濃度においても線形性は維持され、 $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 同位体比は一定であることを見出した。その定量限界は 0.56 nmol/tube と極めて低く、放射性同位体元素 ^{14}C を用いた測定法と同様の検出感度であることが示された。牛腎臓 BCKDH 複合体酵素を用いた実験からの $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 同位体比質量分析により、酵素反応により基質から生ずる $^{13}\text{CO}_2$ 濃度が酵素量依存的であることを明らかにした。さらに実際の骨格筋抽出物 BCKDH 複体の酵素活性測定結果から、従来の放射性同位体元素を用いた測定法に変わり得る新たな測定法であることを示した。

第 5 章では、ヒト血漿遊離アミノ酸組成に対する運動と BCAA 摂取の影響を検討し、アスパラギン酸とアラニン以外の遊離アミノ酸濃度は運動により低下すること、また運動負荷前に BCAA を摂取すると血漿メチオニンと芳香族アミノ酸濃度が有意に低下する現象を見いだした。これらの結果は、BCAA 摂取がメチオニンと芳香族アミノ酸代謝に影響することを示唆している。

本論文に関する出版物

- 1) Fujimura, Y., Muramatsu, Y., Akita, K., Bajotto, G., and Shimomura, Y., Modified method for purifying rat liver branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (in press) (第 2 章)
- 2) Akita, K., Fujimura, Y., Bajotto, G., and Shimomura, Y., Branched chain α -ketoacid dehydrogenase kinase inhibition by thiamine pyrophosphate at different potassium ionic levels. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (in press) (第 3 章)
- 3) Matsumoto, H., Akita, K., Sakai, R., and R., Shimomura, Y., Analysis of activity and activity state of branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex in rat skeletal muscle by isotope ratio mass spectrometry using ^{13}C -labeled stable isotope substrate. *Anal. Biochem.*, (submitted) (第 4 章)
- 4) Yoshiharu Shimomura, Hisamine Kobayashi, Kazunori Mawatari, Keiichi Akita, Asami Inaguma, Satoko Watanabe, Gustavo Bajotto, and Juichi Sato, Effects of squat exercise and branched-chain amino acid supplementation on plasma free amino acid concentrations in young women. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, (in press) (第 5 章)

謝辞

本研究を進めるにあたって、終始多大なる御指導並びに御助言を賜りました大学院物質工学専攻の大桑哲男教授、名古屋大学の下村吉治教授に心より感謝いたします。また、実験を進める上で数多の助言や協力をしていただきました、下村研究室の博士前期課程の藤村幸裕氏とポストドクターのグスタヴ・バジヨット氏に心より感謝を申し上げます。本論文第3章の GC-IRMS 測定、解析にご尽力賜りました、味の素株式会社ライフサイエンス研究所の松本英希氏、小玉りほ氏に厚く御礼申し上げます。最後に、経済的に支援していただいた親族、学業を遂行することが極めて困難な時期に精神的に支えてくれた友人、ならびに本論文を見ることなく他界した、亡き母にこの論文を捧げます。