

参考文献

- 1) Flavier AB, Clough SJ, Schell MA, Denny TP. *Mol. Microbiol.*, **1997**, 26, 251.
- 2) Schneider P, Jacobs JM, Neres J, Aldrich CC, Allen C, Nett M, Hoffmeister D. *ChemBioChem.*, **2009**, 10, 2730.
- 3) Wackler B, Schneider P, Jacobs JM, Pauly J, Allen C, Nett M, Hoffmeister D. *Chem. Biol.*, **2011**, 18, 354.
- 4) Verendel JJ, Li JQ, Quan X, Peters B, Zhou T, Gautun OR, Govender T, Andersson PG. *Chem. Eur. J.*, **2012**, 18, 6507.
- 5) Peixoto PA, Boulangé A, Leleu S, Franck X. *Eur. J. Org. Chem.*, **2013**, 3316.
- 6) Clough J, Schell MA, Denny TP. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **1994**, 7, 621.

転写共役因子による骨格筋アミノ酸代謝制御機構の解明

京都府立大学生命環境科学研究科 亀井康富

背景

骨格筋は人体最大の組織であり、タンパク質（アミノ酸）の形でエネルギー貯蔵を行なっている。エネルギー欠乏時、骨格筋はアクチンやミオシンといった構成タンパク質を分解し、生成したアミノ酸は他臓器にてエネルギー源として利用される。骨格筋は環境の変化に順応する可塑性があり、例えば、適切な運動トレーニングと十分な栄養により肥大する。一方、寝たきりやギプス固定、飢餓や加齢などによって、骨格筋の萎縮が生じる。その結果、エネルギー消費減少（肥満）や、糖取り込み能の低下・血糖値上昇（糖尿病）へと向かう。高齢化社会を迎えている我が国において、生活習慣病の予防や生活の質の維持に大きな役割を果たす骨格筋の機能の変化、特に代謝変化の分子機序を理解する事は、国民の健康の維持・増進を目指した筋萎縮・筋機能不全の予防法の開発のために重要である。

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、筋繊維タイプの変化、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。最近、PGC1 α mRNAにはいくつかのアイソフォームがあることが示されている。我々は以前、PGC1 α mRNAのアイソフォームのうち、PGC1 α -bが運動に応答して顕著に発現増加することを報告した。PGC1 α -bはPGC1 α -1（全長のPGC1 α ）と機能的に類似していると考えられており、アミノ末端の16アミノ酸のみが構造的に異なっている。我々は以前、骨格筋におけるPGC1 α -bの過剰発現が骨格筋においてミトコンドリア生合成、毛細血管の密度を増加させ、運動能力を改善させることに寄与していることを示した。

哺乳動物細胞は分岐鎖アミノ酸（branched-chain amino acids; BCAA）代謝のための高い能力を有している。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（branched-chain aminotransferase; 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（branched-chain α -keto acid dehydrogenase; 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、運動中に利用されるエネルギー代謝に占める割合が高くなると考えられ、それに伴い必要量が増加すると考えられている。

本研究において我々はアレイ解析を行なったところ、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 を過剰発現させた培養細胞とマウスの骨格筋を用いて検討した。

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なった。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なった。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なった。パスウェイ解析で7個のカテゴリーが検出された。その中のいくつかは酸化的リン酸化、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、それは以前より知られている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。さらにBCAA代謝経路（Val, Leu, Ile分解）を検出した。BCAA代謝（異化）に関連する多くの酵素類が発現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。そこで我々は以下の実験を行い、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。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で解析した。PGC1 α は100 kDaのバンドが4倍増加した。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のバンドは、それぞれ1.5倍と11倍に増加していた。これらの結果は、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。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。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トレースレベルであった。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。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。

1. PGC1 α はどのようにしてBCAA代謝酵素の発現を増加させているのか？

PGC1 α Tgマウスはミトコンドリア量が多く、酸化的代謝の高い筋肉を有している。BCAT2, BCKDHはミトコンドリアの酵素である。そのため、PGC1 α Tgマウスの骨格筋におけるBCAA代謝酵素（BCAT2及びBCKDH）の発現増加は、ミトコンドリア量増加が原因かもしれない。もしくは、PGC1 α は、グルココルチコイド受容体（glucocorticoid receptor; GR）やPPAR γ を介してBCAA代謝を活性化させているかもしれない。PGC1 α は核内受容体及びその他の転写因子の転写共役因子である。そしてそれらのうちのいくつかは、BCAT2の遺伝子を活性化することが報告されている。例えば、BCAT2の活性はKLF15のKOマウスにおいて減少している。さらに、ラットのBCAT2プロモーターはKLF15及びGRによって活性化することが報告されている。さらに、肝臓においてPPAR α はBCKDH複合体を活性化させることが知られている。本考察において、パイオインフォマティクス解析により、PGC1 α Tgマウスの骨格筋において増加した、BCAA代謝経路の遺伝子に結合しうる転写因子を調べた。その結果、PPARそしてERRなどを含むいくつかの核内受容体が検出された。それらのデータは、PGC1 α が様々な核内受容体を介してBCAA代謝を亢進していることを示唆している。

2. PGC1 α によるBCAAを含むアミノ酸レベルの変動について

PGC1 α Tgマウスの筋肉ではBCAA代謝酵素遺伝子の発現増加に伴い、骨格筋中のBCAAの含有量もWTマウスに比べて減少していた。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。実際、細胞でもBCAA量の低下が観察されている。一方、BCAA以外にもいくつかのアミノ酸レベルがPGC1 α TgマウスとPGC1 α 過剰発現細胞で変化していた。例えば、PGC1 α Tgマウスではグルタミン酸量が有意に増加した。BCAAがBCATによって分解され、分岐鎖 α ケト酸が生成すると、同時反応で α ケトグルタル酸がグルタミン酸に変換される。そのため、グルタミン酸が増加することはBCAAの分解が進んでいるとい

う現象と一致している。一方、PGC1 α 過剰発現細胞ではグルタミン酸量は増加せず、アラニンが増加した。BCATによってBCAAから産生したアミノ基がピルビン酸に転移されアラニンができたためかもしれない。PGC1 α Tgマウスではアラニンは増加していない。これはPGC1 α Tgマウスでは解糖系の遺伝子発現が低下しているため、基質であるピルビン酸が少ないためであるかもしれない。また、動物では細胞と異なり、血流を通じて他の臓器に運搬されて利用されるためかもしれない。

3. 運動により誘導されるPGC1 α とBCAA代謝

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するので、PGC1 α の発現増加は骨格筋適応にとっ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一般、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分解を増加させ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 を介したミトコンドリア機能の増加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。すなわち、考え合わせると、運動によって生じるBCAAの分解はPGC1 α の発現増加を介している可能性を示唆する。

超好熱アーキア由来酵素の活性化に対するシャペロンの影響の解明

長崎大学大学院工学研究科 郷田秀一郎

1. 序 論

好熱及び超好熱アーキア由来グルタミン酸脱水素酵素(GDH)は大腸菌を宿主に用いて生産させると、ほとんど活性を示さない形で得られ、加熱することによって天然由来のものと同等の活性を有するまでに活性化されることが幅広い種で報告されている¹⁾。種によっては活性化に伴って不活性な単量体が六量体を形成することや²⁾、不活性な六量体の四次構造のアレンジメントが変化することが報告されている³⁾。これら活性化に伴う酵素活性や立体構造変化に関する報告はされているが、ほとんど活性を示さない形で生産される原因については、まったくわかっていない。受領者は高温環境が活性に重要な役割を果たしていると考え、活性型酵素を変性剤によって変性させ、低温環境下でリフォールディングを行ったが、得られた酵素は活性型であり、低温環境でも活性型に折りたたまれた。また、大腸菌体内の還元的な環境が影響しているとも考え、大腸菌セルフリー生産系で生産を行ったが得られた酵素は不活性型であり、菌体内であれ、セルフリーであれ不活性型として生産された。これらのことから、タンパク質の立体構造形成で律速段階として知られているプロリンの異性化及び構造形成を助けるシャペロンの存在が不活性型としての生産に影響しているのではないかと考え、研究を行った。

2. 方 法

プロリンの異性化反応およびシャペロン活性、及び超好熱菌と大腸菌の種の違いを考え、用いるシャペロンには超好熱菌由来FK506 binding protein (FKBP)を用いた。FKBPは海洋研究開発機構、丸山先生から恵与されたものを用いた⁴⁾。シャペロン活性およびプロリン異性化活性に着目し、*Thermococcus* sp. KS-1由来(TcFKBP)および*Pyrococcus horikoshii*由来(PhFKBP)の2種の超好熱菌由来のFKBPを用いた。2種の違いはプロリン異性化活性の強さであり、TcFKBPは高いプロリン異性化活性を有している。大腸菌体内での生産中のFKBPの効果を調べるために、大腸菌体内でGDHとFKBPの共発現を行った。GDHには超好熱アーキア*Pyrobaculum islandicum*由来(Pis-GDH)のものを用いた。

3. 結果および考察

恵与されたFKBPをコードする遺伝子を含むプラスミドから、目的タンパク質をコードする部分をPCRによって増幅し、pACYC184ベクターに挿入した。Pis-GDHはpET-11aに挿入されているものを用いた。Pis-GDHの培養は、TcFKBP、PhFKBPおよびコントロールとしてそれらをクローニングしたpACYC184ベクターをPis-GDHと共発現して行った。得られたPis-GDHは、色素を吸着させた樹脂であるRed-sepharose、陰イオン交換カラムResource Qおよびゲルろ過クロマトグラフィーSuperdex200でSDS-PAGEで単一のバンドを示すまでに精製を行った。培養後の大腸菌の菌体湿重量および生産されたPis-GDHの総活性は、これら3条件で大きな違いは見られず、生育状態や生産量によって影響は受けていないものと