

分岐鎖アミノ酸代謝系による脂肪細胞のエネルギー代謝制御機構の解明

後藤 剛^{*1,2}・高橋信之^{1,2}・河田照雄^{1,2}

¹京都大学学際融合教育研究推進センター

²京都大学大学院農学研究科

Study of the Regulatory Mechanism for Energy Metabolism in Adipocyte by Branched-Chain Amino Acid Metabolism

Tsuyoshi GOTO^{*1,2}, Nobuyuki TAKAHASHI^{1,2} and Teruo KAWADA^{1,2}

¹Research Unit for Physiological Chemistry, the Center for the Promotion of Interdisciplinary Education and Research, Kyoto University, Uji 611-0011

²Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Uji 611-0011

ABSTRACT

Dysfunction of obese adipose tissue is one of the main causes of various metabolic disorders, such as diabetes and hyperlipidemia. It is well known that soy proteins have potential health benefit effects on obesity-associated metabolic disorders. Although the molecular mechanisms underlying these effects are not fully understood, the health benefit effects of soy protein on metabolic disorders seem to be, at least partially, due to amino acid composition. In this study, we investigated the effects of amino acids on the functions of adipocytes. At first, we investigated whether the addition of amino acids affects triglyceride accumulation in 3T3-L1 adipocytes, and it was found that the addition of leucine (one of the branched-chain amino acids (BCAAs)) suppressed triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells in insulin non-addition condition. Leucine suppressed 2-deoxy-D-glucose (2-DG) uptake but did not affect lipolytic activity in 3T3-L1 cells. Moreover, mRNA expression levels of genes related to BCAAs catabolism were changed during adipocyte differentiation. In obese KK-Ay mice fed a diet containing leucine (2%) for 3 weeks, blood glucose level and glucose intolerance were improved. These results indicate that leucine intake improves glucose metabolism, and changes in adipocyte functions induced by leucine might contribute to this effect. *Soy Protein Research, Japan* **16**, 133-137, 2013.

Key words : obesity, adipocyte, BCAAs, amino acids

*〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄

肥満は脂肪組織の過剰蓄積状態と定義され、肥満時の脂肪組織の機能異常が肥満に付随する糖尿病や高脂血症などの種々の疾病発症の原因となっていると考えられている¹⁾。大豆たん白質の摂取は肥満に伴う生活習慣病の発症抑制作用を示すことが広く知られている。その詳細な作用機構は未解明であるが、大豆たん白質中のアミノ酸がその作用の一部を担っている可能性が示唆されている。その一例として、大豆たん白質のアミノ酸パターンにより、豚島における遺伝子発現変化、インスリン分泌量の変化が誘導されることが報告されている²⁾。また、肥満状態では多くの血中アミノ酸レベルが変化することが知られており³⁾、肥満に伴う代謝異常症においてアミノ酸パターンの変化が何らかの役割を担っている可能性がある。実際にタウリンやアルギニンなどのアミノ酸摂取動物において、脂肪組織の遺伝子発現に変化が起きていることが示唆されている^{4,5)}。このようなアミノ酸摂取は血中アミノ酸レベルの変動を来し、直接脂肪細胞に作用している可能性があるが、アミノ酸と脂肪細胞機能に関する研究は少なく、未解明部分が多い。そこで、本研究では種々のアミノ酸が脂肪細胞機能に与える影響について、特に大豆たん白質中にも豊富に含まれている分岐鎖アミノ酸 (BCAAs) に着目して検討し、脂肪細胞における分岐鎖アミノ酸代謝経路との関連性も含めて検討を行った。

方 法

(1) 培養脂肪細胞を用いた中性脂肪蓄積量の検討

培養脂肪細胞として、マウス由来の前駆脂肪細胞、3T3-L1を分化誘導した細胞を用いた。3T3-L1細胞に対し、常法に従い分化誘導処理 (dexamethasone, isobutylmethylxanthine, insulin刺激) を行なった場合と、insulin非添加な環境下で分化誘導処理 (dexamethasone, isobutylmethylxanthine刺激) を行なった場合のそれぞれにおいて、中性脂肪蓄積量に対して、各アミノ酸添加が与える影響について検討した。

(2) 培養脂肪細胞を用いた糖取込み能、脂肪分解活性の検討

3T3-L1細胞における糖取込み能は、 $[^3\text{H}]$ ラベルした 2-Deoxy-D-glucose (2-DG) の10分間の取込み量を評価した。脂肪分解活性は、20時間の間に培養上清に放出される脂肪酸量により評価した。糖取込み能、脂肪分解活性とも細胞内のたん白質量によって補正した。

(3) ロイシン摂取が肥満に伴う代謝異常症に与える影響の検討

肥満モデルマウスであるKK-Ayマウス (7週齢、雌) を、コントロール食および2%ロイシン含有食下で35日間飼育した。飼育開始20日目に血糖値の測定、21日目に糖負荷試験を行い、飼育開始35日目に屠殺、解剖し、各組織重量を測定した。

(4) 脂肪細胞におけるBCAAs代謝関連遺伝子発現量の検討

3T3-L1細胞を常法に従い分化誘導し、脂肪細胞へと分化させた。分化誘導過程において経時的 (分化誘導開始0, 2, 4, 8, 16日経過時) にRNAサンプルを回収し、リアルタイムPCRにより、BCAAs代謝関連遺伝子発現量の定量を行った。

結 果

(1) 培養脂肪細胞を用いた中性脂肪蓄積量の検討

種々のアミノ酸添加が3T3-L1脂肪細胞の脂肪蓄積に与える影響について検討したところ、インスリン非添加条件で、BCAAsのロイシン添加時に3T3-L1細胞の中性脂肪蓄積量が有意に低下することを見出した (Fig. 1A)。ロイシン添加による中性脂肪蓄積抑制作用はロイシン添加濃度依存적であり、ロイシン添加濃度が500 μM より作用が認められた。また、ロイシン (添加濃度2 mM) による中性脂肪蓄積抑制作用はインスリン添加濃度依存的に減少し、インスリン添加濃度が75 ng/mL以上ではその作用が認められなかった (Fig. 1B)。

(2) 培養脂肪細胞を用いた糖取込み能、脂肪分解活性の検討

ロイシンの中性脂肪蓄積抑制作用について更に検討したところ、ロイシン (添加濃度2 mM) はインスリン非存在下で、脂肪細胞の糖取込み能を低下させることが明らかになった (Fig. 2A)。ロイシンによる糖取込み抑制作用はインスリン存在下では認められなかった。この結果より、ロイシンの中性脂肪蓄積抑制作用の一因として、糖取込みの抑制作用が寄与しているものと考えられた。さらに、脂肪細胞における脂肪分解活性に対するロイシンの作用を検討したが、ロイシン添加による脂肪分解活性の変化は認められなかった (Fig. 2B)。

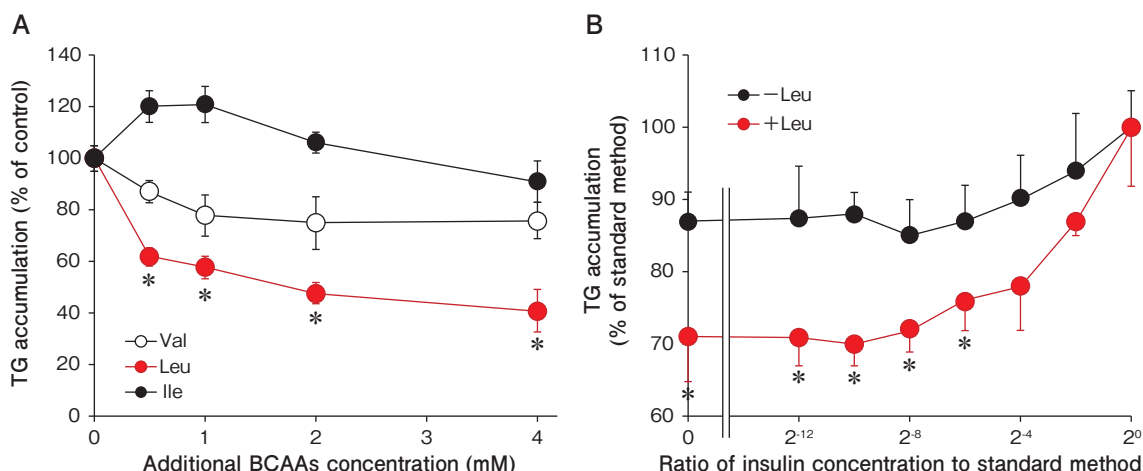


Fig. 1. Leucine suppressed TG accumulation during adipocyte differentiation. (A) TG accumulation in 3T3-L1 cells differentiated by insulin-free method with indicated concentration of additional BCAAs. The values are means $\pm$ SEM (n=6). * p <0.001 compared with vehicle. (B) TG accumulation in 3T3-L1 cells differentiated with various concentration of insulin with or without 2 mM leucine. The values are means $\pm$ SEM (n=4-6). * p <0.05 compared with control cells. TG, triglyceride.

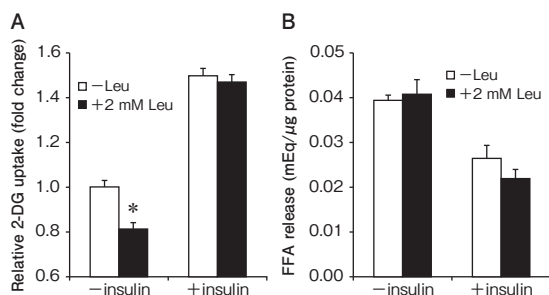


Fig. 2. Leucine decreased 2-DG uptake but did not affect lipolytic activity in 3T3-L1 cells differentiated by insulin-free method. (A) 2-DG uptake activity in 3T3-L1 cells differentiated by insulin-free method with or without leucine (2 mM). Six days after differentiation, cells were treated with or without insulin and leucine for 10 minutes. The values are means $\pm$ SEM (n=5-6). * p <0.05 compared with control cells. (B) Lipolytic activity in 3T3-L1 cells differentiated by insulin-free method with or without leucine (2 mM). The values are means $\pm$ SEM (n=5-6). FFA, free fatty acid.

(3) ロイシン摂取が肥満に伴う代謝異常症に与える影響の検討

ロイシン添加によって、脂肪細胞機能に変化が認められた。脂肪細胞は生体のエネルギー代謝において極めて重要な役割を担っているため、ロイシン摂取がエ

ネルギー代謝に与える影響について検討した。ここでは、肥満によって生じたエネルギー代謝の破綻状態に対するロイシンの作用を検討するため、肥満モデルマウスを用いた実験を行なった。

肥満モデルマウスであるKK-Ayマウスに対し、高脂肪食を負荷し、ロイシン摂取の影響を検討したところ、ロイシン摂取群において血糖値の低下（摂取期間：20日）、および耐糖能異常の改善（摂取期間：21日）が認められた（Figs. 3A, 3B）。一方で、ロイシン摂取は各種白色、褐色脂肪組織（WAT, BAT）重量および肝臓重量には変化を与えなかった。これらの結果より、ロイシンの摂取は、肥満に伴う代謝異常症に対し、有効であることが示唆された。

(4) 脂肪細胞におけるBCAAs代謝関連遺伝子発現量の検討

脂肪細胞分化・発達過程におけるBCAAs代謝関連遺伝子の発現について検討した。その結果、脂肪細胞の分化過程においていくつかのBCAAs代謝関連遺伝子の発現変動が認められた。その中でも抹消組織でのBCAAs代謝の初発酵素であるBCAA transaminase 2 (BCAT2) の発現パターンは、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであるperoxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) の発現パターンと類似することが明らかになった（Fig. 4）。

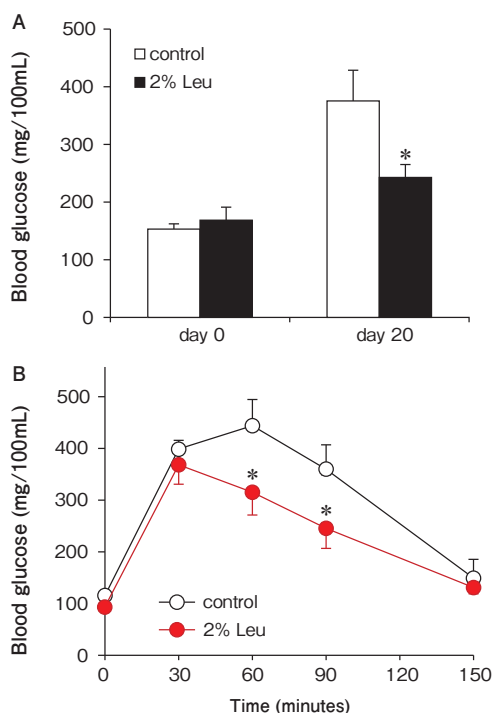


Fig. 3. Leucine supplementation improved glucose metabolism in diabetic KK-Ay mice. (A) Blood glucose in mice fed control diet or diet containing 2% leucine for 0 or 20 days. The values are means $\pm$ SEM (n=3). * p <0.05 compared with mice fed control diet. (B) Changes in blood glucose during oral glucose tolerance test in mice fed control diet or diet containing 2% leucine for 21 days. The values are means $\pm$ SEM (n=3). * p <0.05 compared with cells untreated with leucine.

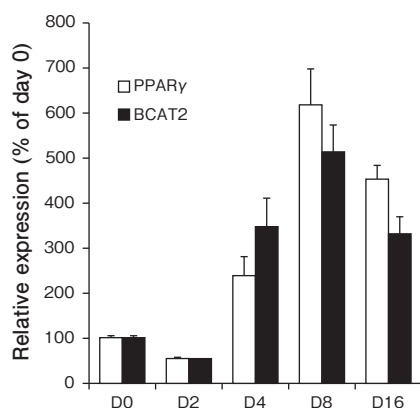
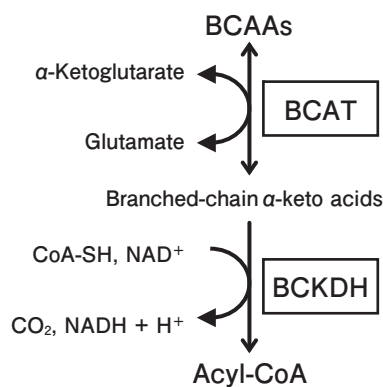


Fig. 4. Expression of BCAT2 and PPAR γ in 3T3-L1 cells. Q-PCR results for BCAT2 and PPAR γ in 3T3-L1 cells during adipocyte differentiation. The values are means $\pm$ SEM (n=4). BCKDH, branched-chain α -keto acid dehydrogenase.

考 察

以上のように、ロイシンは生体の栄養状態に応じて、脂肪細胞機能を変化させることが示唆された。動物実験において、脂肪組織重量や脂肪細胞サイズの変化は認められなかったため、本作用がロイシンの直接的な脂肪細胞に対する作用によるものかどうかについてはさらなる検討が必要である。今回の動物実験の成績のみでは判断できないが、培養細胞を用いた実験で使ったロイシン濃度は、高濃度ロイシン溶液を投与された際の血中濃度として報告されている濃度の範囲内であり⁶⁾、脂肪細胞でも本研究で認められた現象が起こっている可能性はある。そのため、動物実験において認められた血糖低下作用や耐糖能の改善作用が脂肪細胞に対するロイシンの作用によってもたらされた可能性が考えられ、ロイシンの肥満に伴う代謝異常症の予防・改善効果に寄与している可能性が考えられた。また、脂肪細胞におけるBCAAs代謝関連遺伝子のいくつかは脂肪細胞の分化・発達過程で変化しており、脂肪細胞の状態によって体内BCAAs量に変動しうることが示唆された。

本研究結果は、肥満に伴う生活習慣病の発症において重要な脂肪細胞機能が三大栄養素の一つであるアミノ酸によって制御されうること示したものであり、肥満に伴う代謝異常症の食餌による予防・改善戦略創出の一助となることが期待される。



要 約

肥満は脂肪組織の過剰蓄積状態と定義され、肥満時の脂肪組織の機能異常が肥満に付随する糖尿病や高脂血症などの種々の疾病発症の原因となっていると考えられている。大豆たん白質の摂取は肥満に伴う生活習慣病の発症抑制作用を示すことが広く知られている。その詳細な作用機構は未解明であるが、大豆たん白質中のアミノ酸がその作用の一部を担っている可能性が示唆されている。本研究では大豆たん白質中に豊富に含まれているとされる分岐鎖アミノ酸（BCAA）が脂肪組織を構成する脂肪細胞に与える影響について、脂肪細胞における分岐鎖アミノ酸代謝経路との関連性も含めて検討を行った。種々のアミノ酸添加が3T3-L1脂肪細胞の脂肪蓄積に与える影響について検討したところ、分岐鎖アミノ酸であるロイシン添加時に3T3-L1細胞の中性脂肪蓄積量が低下することを見出した。ロイシン添加は脂肪細胞における糖取込み能を低下させたことから、ロイシンの中性脂肪蓄積抑制作用の一因として、糖取込みの抑制作用が寄与しているものと考えられた。また、3T3-L1細胞におけるBCAA代謝に関する遺伝子群の発現量について検討したところ、脂肪細胞の分化過程でいくつかのBCAA代謝遺伝子の発現変動が認められた。次に、肥満・糖尿病モデルマウスであるKK-Ayマウスを用いてロイシンの摂取実験を行い、ロイシン摂取が肥満に伴う代謝異常症の発症に与える影響について検討した。その結果、ロイシン摂取群では血糖値や耐糖能の改善傾向が認められた。以上の結果より、ロイシン摂取は肥満に伴う代謝異常症の発症を抑制することが示唆され、その作用の一部に脂肪細胞に対する作用が関与している可能性が示唆された。

文 献

- 1) Turer AT, Hill JA, Elmquist JK and Scherer PE (2012): Adipose tissue biology and cardiomyopathy: translational implications. *Circ Res*, **111**, 1565-1577.
- 2) Noriega-López L, Tovar AR, Gonzalez-Granillo M, Hernández-Pando R, Escalante B, antillán-Doherty P and Torres N (2007): Pancreatic insulin secretion in rats fed a soy protein high fat diet depends on the interaction between the amino acid pattern and isoflavones. *J Biol Chem*, **282**, 20657-20666.
- 3) She P, Van Horn C, Reid T, Hutson SM, Cooney RN and Lynch CJ (2007): Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **293**, E1552-1563.
- 4) Tsuboyama-Kasaoka N, Shozawa C, Sano K, Kamei Y, Kasaoka S, Hosokawa Y and Ezaki O (2006): Taurine (2-aminoethanesulfonic acid) deficiency creates a vicious circle promoting obesity. *Endocrinology*, **147**, 3276-3284.
- 5) Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Marc Rhoads J, Carey Satterfield M, Smith SB, Spencer TE and Yin Y (2009): Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids*, **37**, 153-168.
- 6) Lynch CJ, Patson BJ, Anthony J, Vaval A, Jefferson LS and Vary TC (2002): Leucine is a direct-acting nutrient signal that regulates protein synthesis in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **283**, E503-E513.