

氏名(本籍)	白木 亮 (岐阜県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 615 号
学位授与日付	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Activation of Hepatic Branched-Chain $\alpha$ -keto Acid Dehydrogenase Complex by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ in Rats
審査委員	(主査) 教授 森 脇 久 隆 (副査) 教授 岡 野 幸 雄      教授 清 島 満

### 論文内容の要旨

分岐鎖 $\alpha$ -ケト酸脱水素酵素 (branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase: BCKDH) 複合体はミトコンドリア内に存在し、分岐鎖アミノ酸 (branched-chain amino acids: BCAA) 代謝の律速酵素である。本酵素の活性は、酵素タンパク質のリン酸化 (不活性化) / 脱リン酸化 (活性化) によって調節されている。このリン酸化を触媒する酵素が BCKDH kinase であり、この kinase 活性は BCKDH 複合体に結合している結合型 kinase (bound kinase) にのみ示されることが示唆されている。BCKDH 複合体の活性を調節する因子として、食事や運動などが報告されており、肝炎・肝硬変を含む各種疾患の影響も報告されている。また、タンパク質代謝の亢進が認められる重症感染症、癌、外傷、熱傷などの病態では、血中の腫瘍壊死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ : TNF $\alpha$ ) が高値となることが報告されている。さらに、TNF $\alpha$  は BCAA の酸化を促進することが報告されている。本研究では、TNF $\alpha$  が BCAA 代謝の調節機構に及ぼす影響を解明することを目的とし、ラット肝の BCKDH 複合体と BCKDH kinase 活性および bound kinase 量に対する TNF $\alpha$  の影響について検討した。

### 方法

9 週齢の Wistar 系雌ラットを chow diet (CE-2) で 1 週間飼育した後実験に用いた。実験当日の朝 9 時より絶食し、13 時に rat recombinant TNF- $\alpha$  (25  $\mu$ g/kg もしくは 50  $\mu$ g/kg 体重) を尾静脈より single bolus 投与し、4 時間後の 17 時に屠殺し肝臓と血液を採取した。なお、コントロールのラットには、TNF $\alpha$  を含まない溶液を投与し、同様に処理した。それぞれの群のラットについて下記の項目を測定し、比較検討した。

- (1) 血清グルコース、インスリン、遊離脂肪酸、BCAA (ロイシン・イソロイシン・バリン) 濃度を測定した。
- (2) 分光測定法による肝 BCKDH 複合体と BCKDH kinase 活性を測定した。
- (3) BCKDH 複合体の活性は、E1  $\alpha$ -subunit の Ser<sup>293</sup> のリン酸化/脱リン酸化によって規定されているので、Western blot 法にて肝の E1  $\alpha$ -subunit (E1  $\alpha$ ) の量とリン酸化された Ser<sup>293</sup> (pS293) の量を測定した。
- (4) Western blot 法にて肝の BCKDH kinase (total kinase) の量および免疫沈降法を利用して bound kinase の量を測定した。

### 結果

- (1) 血清のグルコース、インスリン、および BCAA 濃度には 3 群間で有意な差は認められなかった。ただし、グルコース濃度はコントロール群に比べて両 TNF $\alpha$  群で低下する傾向を示した。血清遊離脂肪酸濃度は、両

TNF $\alpha$ 群で有意に上昇した。しかし、TNF $\alpha$ 群間での差は認められなかった。

- (2) 肝のBCKDH複合体の総活性は3群間において同様であった。一方、肝の活性型BCKDH複合体活性はコントロール群に比べて両TNF $\alpha$ 群で有意に上昇した。また、BCKDH複合体の活性型の割合は、コントロール群、25 $\mu$ g/kg TNF $\alpha$ 群、50 $\mu$ g/kg TNF $\alpha$ 群においてそれぞれ22%、69%、86%であり、両TNF $\alpha$ 群で有意な上昇が認められた。肝BCKDH kinaseの活性は、コントロール群に比べて両TNF $\alpha$ 群で有意に低下した。BCKDH複合体活性とBCKDH kinase活性の間には逆相関が認められた。
- (3) pS293の量は、コントロール群に比べて両TNF $\alpha$ 群で有意に低下した。また、それは活性型BCKDH複合体の割合と逆相関を示した。一方、E1 $\alpha$ の量では3群間に差は認められなかった。
- (4) Bound kinaseの量は、コントロール群に比べて両TNF $\alpha$ 群では有意に低下したが、総BCKDH kinaseの量には3群間で差は認められなかった。また、bound kinase量とBCKDH kinase活性の間には相関が認められた。

#### 考察・結語

TNF $\alpha$ は様々な生物学的活性を持っており、重症感染症、癌などで血中濃度が高値となり、タンパク質異化作用を引き起こしたり、BCAA酸化を促進すると報告されている。今回申請者は、TNF $\alpha$ はラット肝のBCKDH複合体の総活性を変えないことなく、活性型BCKDH複合体活性を明らかに上昇させるという知見を得た。さらに、活性型BCKDH複合体活性は、pS293の量と逆相関したので、その活性上昇は不活性型BCKDH複合体の減少によることが示された。また、TNF $\alpha$ はラット肝のBCKDH kinase活性とbound kinase量を減少させる知見を得た。すなわち、活性型BCKDH複合体活性の上昇は、bound kinase量の減少に起因すると考えられた。

Bound kinase量の調節が、短時間での肝のBCKDH複合体活性の調節に重要な役割を果たすことが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

申請者 白木亮は、TNF $\alpha$ によるラット肝臓BCKDH複合体の活性化を証明しそのメカニズムを解明した。これらの知見は、肝臓病学、臨床栄養学に少なからず寄与するものと認める。

---

#### 【主論文公表誌】

Activation of Hepatic Branched-Chain  $\alpha$ -Keto Acid Dehydrogenase Complex by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Rats

Biochemical and Biophysical Research Communications 328, 973-978 (2005).