



[原著]

マウス肝組織における L-ロイシン代謝体、 β -ヒドロキシ- β -メチル酪酸によるタンパク質合成の促進効果 —ラジオアイソトープ試験法による解析—

田邊静香¹、大久保友貴¹、藤井朋保¹、上敷領淳¹、本屋敷敏雄²、森田哲生¹福山大学 薬学部 ¹生化学研究室、²代謝生理学研究室

要旨

β -ヒドロキシ- β -メチル酪酸(HMB)はヒトにとっての必須アミノ酸である L-ロイシンの代謝中間体であり、その生理作用として筋肉におけるタンパク質の合成促進作用を有することが報告されている。最近、サルコペニアや褥瘡等の改善のために、HMB の筋タンパク質の合成促進作用に着目した医療への応用が図られている。しかし、HMB の生理作用の詳細は未だ不明な点が多く、種々の検討が進められている。そこで本研究では、筋肉以外の組織として、特に種々の栄養素の代謝の中心臓器である肝臓でのタンパク質合成能に対する HMB の効果について、L-^[3H]ロイシン(Leu)を用いたラジオアイソトープアッセイによって解析した。マウスの肝臓を摘出し、その切片と^[3H]Leu を HMB 存在下温置したところ、肝タンパク質を含有するトリクロル酢酸(TCA)不溶性画分に取り込まれた放射活性は、HMB の濃度の増加に伴って上昇することが認められた。この HMB の効果はタンパク質生合成における翻訳段階を阻害するラパマイシン (Rap) の共存下によって減退した。さらにこの HMB による肝タンパク質への^[3H]Leu の取り込みに対する増強作用は、Rap と異なる翻訳段階を阻害するシクロヘキシミド(CHX)によっても著しく抑制された。すなわちこれらの結果から、HMB は筋肉のみならず、肝臓におけるタンパク質合成をも促進することが示され、この HMB の作用の発現には Rap や CHX に感受性のある翻訳過程の活性化が大きく関与していることが示唆された。また、HMB が肝タンパク質合成能の低下に伴う低タンパク血症の改善に有用性の高い一役を果たす可能性も考えられた。

キーワード： β -ヒドロキシ- β -メチル酪酸、ラジオアイソトープ試験法、タンパク質合成、低タンパク血症、サルコペニア

序論

ヒトにとっての必須アミノ酸である L-ロイシン(Leu)は、糖新生に用いられることのないケト原性分岐鎖アミノ酸であり、タンパク質合成の調節や、窒素平衡の維持に一役を果たしている (1)。Leu の代謝

において、その第一段階であるアミノ酸転移反応は主として筋細胞で起こり、 α -ケトイソカプロン酸(KIC)を生じる。この KIC は次いで筋細胞から遊離し、肝細胞においてその大部分がミトコンドリアでイソバニリル CoA を経てアセト酢酸とアセチル CoA

連絡先：森田 哲生
福山大学薬学部生化学教室
〒729-0290 福山市東村町 985
TEL: 084-936-2111 (内線:5052)
FAX: 084-936-2024
E-mail: morita@fukuyama-u.ac.jp

2020年8月20日受付
2020年9月14日受理

を産生する。その際、KICの5-10%は細胞質中でKICジオキシゲナーゼによって β -ヒドロキシ- β -メチル酪酸(HMB)を生じ、血液中へ移行する(2)。ヒト成人においてこのように産生されたHMBは1日当たり0.2-0.4gになることが報告されている(2, 3)。このHMBは再び筋細胞に取り込まれると、細胞質中でHMB-CoAが生成され、さらに β -ヒドロキシ- β -メチルグルタリルCoAを経てコレステロールに変換されることから、筋細胞は細胞膜の維持などに必要となるコレステロールを血中から十分に供給することが困難な際には、HMBからのコレステロール産生系を用いて、筋細胞内でのコレステロール供給をしていると考えられている(3, 4)。さらにHMBの服用による筋力の増進が報告されて以来、サルコペニアなどに対する医療のみならず、アスリートの運動能の増加の一環としての利用も行われ、HMBの1日当たり3g(30mmol)程度の服用が頻用されている(5)。

一方、HMBの筋細胞に対する生理的な役割や作用について、より多くの検討が進められ、HMBの筋細胞膜の安定化、タンパク質合成の上昇および分解の抑制などが見出され、これらが筋力の増加や崩壊の抑制につながることから、加齢や種々の疾患などによる筋組織の低下や障害に対するHMBの応用(4-6)が考えられている

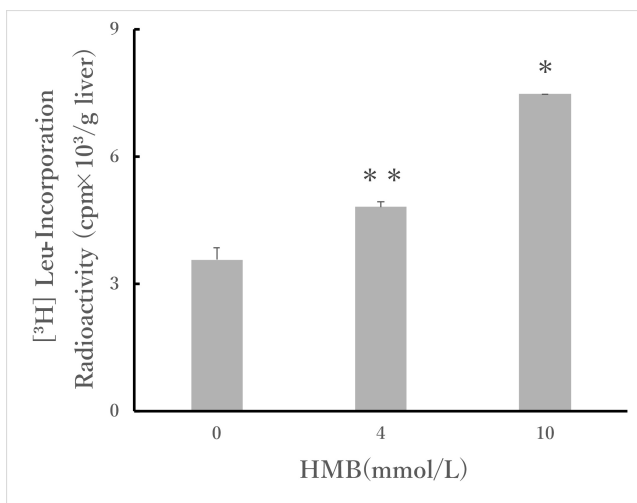


図1 肝タンパク質への³H Leuの取り込みに対するHMBの効果

「材料と方法」中に記載したように肝タンパク質中への³H Leuの取り込みに対するHMB(0-10mmol/L)の効果を検討した。

(HMB(0mmol/L)に対して、* ; p < 0.01, ** ; p < 0.05)

るが、種々の栄養素の代謝における中心的臓器であり、かつ高いタンパク質合成能や組織再生能等を有する肝臓に対するHMBの作用については、詳細な知見は得られていない。

そこで本研究では、肝臓のタンパク合成能に対するHMBの効果について、マウス肝組織標本を用い、ラジオアイソトープアッセイによる検討を行い、解析した。

材料と方法

1 試薬

L-[4,5-³H]ロイシン(Leu)はMoravek Inc社、ウシ血清アルブミン(BSA)は富士フィルム和光純薬(株)より購入した。その他の試薬はすべて生化学用特級試薬を使用した。

2 実験動物

4週令のddY系雄性マウス(清水実験動物(株))にマウス用固形飼料(オリエンタル酵母(株))と水道水を自由に摂取させて、1週間馴化させ、実験前24時間絶食し、実験に供した。なお、実験に当たっては福山大学動物実験倫理審査会の審査後、同審査会の指針に従って実施した。

3 組織標品の調製と肝タンパク質への³H Leuの取り込みの測定

マウスから肝臓を摘出し、これを100mgずつに細切した。これらの切片を2%ウシ血清アルブミン(BSA)/5mMグルコース(Glc)を含有するKrebs-Ringer緩衝液(KRB)中で各種薬剤存在下、³H Leu(18.5KBq/tube)を添加し、37°Cで60分間温置した。反応後、切片を採取し、氷冷下破碎した。このホモジネートを濾紙(Whatman 3MM、サイティバ(株))に滴下し、これをトリクロル酢酸(TCA)で処理し、タンパク質を含む標品を沈着させた。この濾紙に沈着したTCA不溶性画分に取り込まれた放射活性を肝タンパク質の合成の指標とし、検討した(7, 8)。

各実験においての結果は、異なる肝切片を用いた複数の実験における3検体の平均値±標準誤差で示した。

結果

1 肝切片におけるタンパク質画分への³H]Leuの取り込みに対するHMBの効果

肝切片中のタンパク質への³H]Leuの取り込みに対するHMB(0-10 mmol/L)の効果について検討した。本組織片中のタンパク質画分への³H]Leuの取り込みは、HMBの濃度の増加とともに促進した(図1)。

2 HMBによる肝タンパク質合成促進作用に対するラパマイシンの効果

HMB非存在下と比べ、HMB(4mmol/L)存在下によって生じた肝組織片中のタンパク質画分への取り込みの増加に対するmTORC1阻害剤ラパマイシン(9)の効果を検討した。HMBによるタンパク質合成促進作用は、ラパマイシンの濃度の増加に伴って著しく抑制された(図2)。

3 HMBによる肝タンパク質合成促進作用に対するCHXの効果

HMB非存在下と比べ、HMB(4mmol/L)存在下によって生じた肝組織片中のタンパク質画分への³H]Leuの取り込みの増加に対するタンパク質合成阻害剤であるCHX(10)の効果を検討した。HMBによるタンパク質合成の促進作用は、CHXの濃度の増加に伴って大きく減少した(図3)。

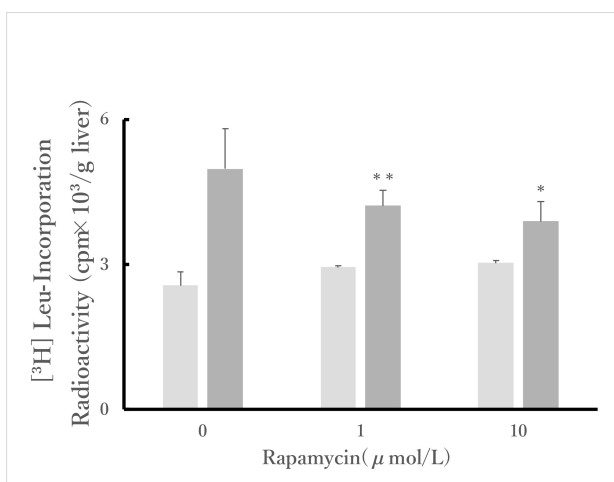


図2 HMBによる肝タンパク質への³H]Leuの取り込み促進効果に対するラパマイシンの効果
「材料と方法」中に記載したようにHMB存在下、非存在下における肝タンパク質中への³H]Leuの取り込みに対するラパマイシン(0-10μmol/L)の効果を検討した。■はHMB 4mmol/L存在下、■はHMB非存在下を示す。(ラパマイシン0μmol/Lに対して、* ; p < 0.01, ** ; p < 0.05)

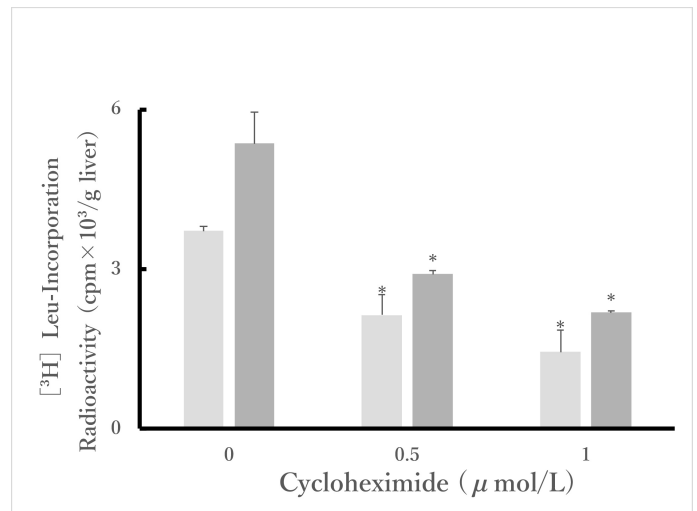


図3 HMBによる肝タンパク質への³H]Leuの取り込み促進効果に対するCHXの効果
「材料と方法」中に記載したようにHMB存在下、非存在下における肝タンパク質中への³H]Leuの取り込みに対するCHX(0-1μmol/L)の効果を検討した。■はHMB 4mmol/L存在下、■はHMB非存在下を示す。(CHX 0μmol/Lに対して、* ; p < 0.01)

考察

Leuの初段階反応であるアミノ基転移反応は主として筋肉で行われ、KICが生成される。次いでそのKICの大部分は肝臓において種々の代謝を受け、5-10%がHMBに変換される。近年、HMBの筋肉増強効果に着目した検討が行われ、筋タンパク質の合成が促進し、分解が抑制されていることが示されている(1)。しかし、HMBが肝臓で生成されているにも拘らず、肝臓に対する作用の詳細は不明な点が多い。最近も部分肝切除ラットを用いたHMBの皮下投与による肝再生に対する効果についての検討などが行われているが、更なる検証が必要と考えられる(11)。

そこで本研究では、HMBの肝臓におけるタンパク質合成に対する作用をより明らかにするため、³H]Leuの肝タンパク質への取り込みをその指標とするラジオアイソトープアッセイを施行し解析したところ、本組織片中のタンパク質画分への³H]Leuの取り込みが、HMBの濃度の増加とともに上昇することを認めた(図1)。すなわちHMBは肝タンパク質の合成を促進することが示された。さらにこのHMBによる肝タンパク質合成の増強作用は、タンパク質合成系におけるリボソームのp70S6キナーゼや翻訳開始因子結合タンパク質1(eIF4-binding protein 1)の抑制作用

を有するラパマイシンの共存下によって阻害されたことから (図2)、HMBによる本増強作用の発現には、その過程の活性化が、部分的に関与していることが示唆された。一方、HMBの肝タンパク質合成に対する促進効果は、タンパク質合成系におけるペプチドの伸長因子-2 (EF-2) 依存性トランスロケーションを阻害作用を有するCHXによっても抑制されることから(図3)、HMBの作用発現がこの過程を一部亢進している可能性も考えられた。

すなわち、HMBは肝臓においてリボソームにおけるペプチド合成の開始段階から、さらにその伸長段階を含む経路を少なくとも活性化することによって、肝タンパク質の合成を促進していることが考えられた。さらにHMBが筋肉におけるタンパク質合成の増強効果のみならず、肝臓においてもタンパク質合成促進作用を有することは、肝タンパク質合成能の低下によって発症する種々の低タンパク血症、中でも肝硬変などのアルブミン合成能の低下によって生じる低アルブミン血症(12)への対応としても、HMBは有用性の高い選択肢のひとつと成り得ることも示唆された。

謝辞

本研究の実施に当たり、教育医学研究所(広島市)並びに安浦病院(呉市)理事長西本慶次先生の御支援に深謝致します。

引用文献

- 1) Duan Y, Li F, Li Y, Tang Y, Kong X, Feng Z, Anthony TG, Watford M, Hou Y, Wu G, Yin Y.; The Role of leucine and its metabolites in protein and energy metabolism. *Amino acids*. 2016. 48,41-51.
- 2) Nissen S, Sharp R, Ray M, Rathmacher JA, Rice D, Fuller JC Jr, Connelly AS, Abumrad N.; Effect of leucine metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training. *J Appl Physiol*. 1996. 81:2095-2104.
- 3) Nissen SL, Abumrad NN.; Nutrition role of the leucine metabolite β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB). *J Nutr.Biochem*.1997.8:300-11.
- 4) Williams JZ, Abumrad N, Barbul A.; Effect of a specialized amino acid mixture on human collagen deposition. *J Surg Res*. 2002. 106:299-302.
- 5) Wong A, Chew A, Wang CM, Ong L, Zhang SH, Young S.; The use of a specialised amino acid mixture for pressure ulcers: A placebo-controlled trial. *J Wound Care*. 2014. 23:259-69.
- 6) Ookubo Y, Fujii T, Aizawa M, Fujioka N, Kamishikiryo J, Morita T.; Effects of oral supplementation with a combination of β -hydroxy- β -methylbutyrate, arginine and glutamine on lipid metabolism. *Med Biol*. 2019. 159:1-6.
- 7) Ashby P, Bennett DP, Spencer IM, Robinson DS.; Post-translational regulation of lipoprotein lipase activity in adipose tissue. *Biochem J*. 1978. 176:865-872.
- 8) Morita T, Fujiwara A, Ueki H, Kanagawa A.; Stimulatory release of hepatic lipase activity from rat hepatocytes by ruthenium red. *Biol Pharm Bull*. 2000. 23:549-554.
- 9) Cruz-Jentoft AJ.; Beta-hydroxy-beta-methyl butyrate (HMB): From experimental data to clinical evidence in sarcopenia. *Curr Protein Pept Sci*. 2018.19:668-672.
- 10) Buse MG, Reid SS.; Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. *J Clin Invest*. 1975. 56:1250-61.
- 11) Holeček M, Vodeničarovová M.; Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate in partially hepatectomized rats. *Physiol Res*. 2018. 14; 67:741-751.

- 12) Nishikawa H, Osaki Y.; Liver cirrhosis: Evaluation, nutritional status, and prognosis. *Mediators Inflamm.* 2015.

Stimulatory Effects of Leucine Metabolite β -Hydroxy- β -Methylbutyrate on Protein Synthesis in Mouse Liver -Analyses by Radioisotope Assay-

Shizuka Tanabe¹, Yuuki Ookubo¹, Tomoyasu Fujii¹,
Jun Kamishikiryo¹, Toshio Motoyashiki², Tetsuo Morita¹

Departments of ¹Biochemistry and ²Metabolic Physiology,
Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Fukuyama University

Summary

β -Hydroxy- β -methyl butyric acid (HMB) is a metabolite of L-leucine (Leu), which is an essential branched amino acid. Leu is reported to promote a stimulatory increase in muscle protein synthesis. Recently, the stimulatory action of HMB was applied in the medical care of pressure ulcers and sarcopenia. Despite these new applications, the physiological functions of HMB in the liver, particularly protein synthesis, remain unknown.

In this study, we investigated the effects of HMB on protein synthesis in the liver using a radioisotope assay of [³H]Leu. The radioactivity in the trichloroacetic acid (TCA)-insoluble fraction containing the protein from the liver incubated with HMB was increased in a dose-dependent manner. The stimulatory effect of HMB was reduced by the coexistence of rapamycin (Rap), which inhibits the translational step in protein synthesis. Furthermore, the enhancing action of HMB on the uptake of [³H]Leu into the liver protein was significantly suppressed with cycloheximide (CHX), which inhibits a translational step different from Rap in protein synthesis. These results show that HMB promotes protein synthesis in the muscle and liver. The action by HMB involves the activation of translation processes sensitive to Rap and CHX. In addition, HMB may be useful in the treatment of hypoproteinemia owing to a decrease in the ability of liver protein synthesis.

Keywords: β -hydroxy- β -methyl butyric acid, radioisotope assay, protein synthesis, hypoproteinemia, sarcopenia

Correspondence address: Tetsuo Morita,

Departments of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University

985 Higashimuramachi, Fukuyama 729-0292, Japan

Phone: +81-936-2111(5052)

E-mail: morita@fukuyama-u.ac.jp