

骨格筋糖代謝ならびにアミノ酸代謝関連の遺伝子発現に及ぼす

タウリン投与の影響

石倉恵介¹⁾、宮崎照雄²⁾、松坂賢³⁾、羅成圭³⁾、宮川俊平⁴⁾、大森肇⁴⁾

要約

骨格筋の糖代謝ならびにセリン・グリシン・スレオニンのアミノ酸代謝の遺伝子発現に及ぼすタウリン投与の影響を明らかにすることを目的とした。ラットへ2週間タウリンを経口投与し、腓腹筋内側頭白色部の遺伝子発現をDNAマイクロアレイ法にて網羅的に解析を行った。その結果、タウリン投与によって、骨格筋の糖代謝ならびにセリン・グリシン・スレオニンのアミノ酸代謝には影響を及ぼさなかった。タウリン投与のエネルギー代謝への影響は骨格筋よりむしろ肝臓など他の臓器への作用が関連する可能性が示唆された。

緒言

タウリンの内因性の生合成は欠如しているため、骨格筋のタウリン濃度は、特異的なタウリントランスポーター (TAUT) によって高濃度に保たれている¹⁾。この内因性のタウリン輸送を欠損させたTAUTノックアウトマウスは、他の組織と同様に骨格筋タウリン濃度は枯渇し、運動能が著しく低下する^{2,4)}。このことは、組織タウリン濃度と運動パフォーマンスは密接に関連していることを示唆する。安静時の骨格筋タウリン濃度は、その筋線維組成によって異なり、速筋より遅筋で高濃度である⁵⁾。この筋線維組成の違いによるタウリン濃度の差異は、骨格筋の生理学的特性によると考えられる。我々は疲労困憊運動後に骨格筋タウリン濃度が減少することをラットで見出し、その減少は遅筋線維優位筋に比べ速筋線維優位筋で顕著であった⁶⁾。さらに我々は、この運動誘発性筋タウリンの減少をタウリン投与によって容量依存的に抑制されることを、ラットランニング時の主働筋である速筋線維優位筋の腓腹筋で示し、その結果として運動パフォーマンスが向上したことを明

らかにした⁷⁾。それ故、安静時からタウリン濃度が低い速筋線維優位筋が激運動時の制限因子になるが、事前のタウリン投与によって運動時の恩恵を受けた可能性がある。

タウリン投与による運動能向上のメカニズムについてこれまでの先行研究では、運動誘発性酸化ストレスの軽減⁷⁻⁹⁾、運動時の心収縮力の増大¹⁰⁾、運動誘発性の血中乳酸産生の抑制^{11, 12)}、筋損傷の軽減¹²⁾、運動時の脂質酸化増大¹³⁾などが報告されている。我々はこれまでに、ヒトへのタウリン投与が長時間運動誘発性の血糖低下を抑制することを明らかにした¹⁴⁾。加えて、ラットへのタウリン投与は糖新生系においてピルビン酸の前駆体となるセリン・グリシン・スレオニンの骨格筋濃度が特異的に低下することを示した¹⁵⁾。Ward et al. (1999)は、持久走によって血漿タウリン濃度が上昇し、反対にトータルアミノ酸が減少したことから、このトータルアミノ酸の減少は糖新生に用いられたと考察している¹⁶⁾。これらのことから、タウリンの血糖維持作用のメカニズムとして、骨格筋のセリン・グリシン・スレオニンが骨格筋から放出され肝臓にて糖新生に利用されたと推察した。しかしながら、運動中の血糖は筋における糖利用と肝臓からの糖動員のバランスで規定される。上述の推察は、タウリン投与による骨格筋への糖代謝ならびにセリン・グリシン・スレオニンのアミノ酸代謝への影響を考慮していないものであった。

そこで、骨格筋の糖代謝ならびに、これら減少したアミノ酸代謝の遺伝子発現に及ぼすタウリン投与の影響を明らかにするために、タウリン投与による骨格筋の遺伝子発現の変化をDNAマイクロアレイ法にて網羅的に検討した。

キーワード: 骨格筋タウリン、ランニング、遺伝子発現

1:筑波大学スポーツ R&D コア 2:東京医科大学茨城医療センター共同研究センター 3:筑波大学医学医療系 4:筑波大学体育系

*〒305-8574 茨城県つくば市天王台 1-1-1

E-mail: ishikura.keisuke.fw@u.tsukuba.ac.jp

方法

A. 被験動物

本研究は、筑波大学動物実験指針に基づき、動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。被験動物として5週齢のFischer344系雄性ラット15匹（日本SLC株式会社、静岡）を用いた。

B. 群分けとタウリン投与

タウリン投与群 (n=8)と非投与群 (n=7)に無作為に分けた。タウリン（タウリン散「大正」, 大正製薬, 東京）を蒸留水に溶かし、5%タウリン水溶液を作成した。タウリン投与群には、5%タウリン水溶液をラット用経口ゾンデによって1日1回、2週間投与した。投与量は、1.0 g/kg/dayとした。

D. 組織の採取

2週間投与後、一夜絶食をさせ、翌朝にペントバルビタールナトリウム 50 mg/kg/BWを腹腔に投与し、麻酔下で頸椎脱臼を施し屠殺した。腓腹筋内側頭を採取し、液体窒素にて速やかに凍結させた。採取した組織は分析まで、-80℃で冷凍保存した。

E. total RNA の抽出

タウリン投与群 (n=8)と非投与群 (n=7)の腓腹筋内側頭白色部をRNA採取キット (Sepasol-RNA I Super G : ナカライテック, 京都, 日本)を用いて、AGPC (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction) 法¹⁷によって各個体から抽出したRNAを群ごとにプールした。

F. Microarray 解析

DNAマイクロアレイ解析にAgilent Expression Array2色法を用い、タカラバイオ株式会社ドラゴンジェノミクスセンターへ委託した。DNAマイクロアレイ解析にWhole Rat GenomeオリゴDNAマイクロアレイキット (G2519F, Agilent Technologies, CA, USA)を使用した^{18, 19}。混和した各群のtotal RNA 200ngをQuick Amp Labeling kit, two-color (Agilent Technologies)に順じてcDNAを合成し、その後にcRNAのCyanine3 CTP (Cy3)およびCyanine5 (Cy5)標識cRNAを合成した。Gene Expression Hybridization kit (Agilent Technologies)を用いてCy3およびCy5標識cRNAをハイブリダイゼーションした。その後Gene Expression Wash Pack (Agilent Technologies)を用いて洗浄した。Agilent DNAマイクロアレイスキャナ (Agilent Technologies)で取得してハイブリダイゼーション画像を数値化ソフトAgilent Feature Extraction (Agilent Technologies)を用いて解析した。Liner & LOWES法を用いてデータを標準化し、タウ

リン非投与群とタウリン投与群の発現比率をLog Ratioで算出した。スポットシグナルの有効判定を行い、転写産物が検出されたか判断が難しい、または転写産物が検出されていないと判定されたデータを排除した。

結果

A. 糖代謝の遺伝子発現の変化

DNAマイクロアレイの結果、骨格筋における解糖系酵素、糖輸送担体の遺伝子発現の変化を発現率の順にTable 1に示した。2週間のタウリン投与によって、骨格筋における糖取り込みに関する遺伝子発現において、2倍以上の増加もしくは0.5倍以下の減少を示した変化は認められなかった。

Table 1. Gene expression changes of glycolysis and gluconeogenesis metabolism in rat skeletal muscle following two weeks taurine supplementation in the microarray analyses

Genebank	Symbol	Description	Fold	p-value
NM_012558	Fbp1	fructose-1,6-bisphosphatase 1	1.62	4.12E-03
NM_001106007	Pgm2	phosphoglucomutase 2	1.30	0.07
NM_012949	Eno3	enolase 3, beta, muscle	1.20	0.20
NM_053716	Fbp2	fructose-1,6-bisphosphatase 2	1.09	0.55
NM_017328	Pgam2	phosphoglycerate mutase 2	1.07	0.62
NM_012638	Pygm	phosphorylase, glycogen, muscle	1.04	0.06
NM_017008	Gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.00	0.99
NM_001108772	Pgm3	phosphoglucomutase	0.98	0.89
NM_012497	Aldoc	aldolase C, fructose-bisphosphate	0.96	0.81
NM_012495	Aldoa	aldolase A, fructose-bisphosphate	0.94	0.68
NM_012735	Hk2	hexokinase 2	0.94	0.77
NM_012554	Eno1	enolase 1, (alpha)	0.91	0.51
NM_053297	Pkm2	pyruvate kinase, muscle	0.91	0.50
NM_017025	Ldha	lactate dehydrogenase A	0.91	0.50
NM_053291	Pgk1	phosphoglycerate kinase 1	0.90	0.47
NM_207592	Gpi	glucose phosphate isomerase	0.89	0.41
NR_003722	Gapdh-ps1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, pseudogene 1	0.88	0.39
NM_012751	Slc2a4	solute carrier family 2, member 4	0.88	0.36
NM_001109454	Pgm2l1	phosphoglucomutase 2-like	0.87	0.42
NM_012734	Hk1	hexokinase 1	0.67	0.01

Table 2. Gene expression changes of serine, glycine and threonine metabolism in rat skeletal muscle following two weeks taurine supplementation in the microarray analyses

Genebank	Symbol	Description	Fold	p-value
NM_017084	Gnmt	glycine N-methyltransferase	1.53	0.02
NM_031582	Acc3	amine oxidase, copper containing 3	1.41	0.12
NM_012522	Cbs	cystathionine beta synthase	1.18	0.41
XM_343764	Maoa	Amine oxidase [flavin-containing] A	1.14	0.40
NM_030850	Bhmt	betaine-homocysteine methyltransferase	1.12	0.45
NM_053962	Sds	serine dehydratase	1.07	0.63
NM_199385	Did	dihydroliipoamide dehydrogenase	1.07	0.62
NM_031031	Gatm	glycine amidinotransferase	1.05	0.85
NM_013197	Alas2	aminolevulinatase, delta-, synthase 2	1.04	0.81
NM_001047342	Shmt1	serine hydroxymethyltransferase 1	0.98	0.90
NM_001024277	Gcat	glycine C-acetyltransferase	0.96	0.78
NM_001009979	Psph	phosphoserine phosphatase	0.95	0.75
NM_030656	Agxt	alanine-glyoxylate aminotransferase	0.94	0.72
NM_001008322	Shmt2	serine hydroxymethyltransferase 2	0.94	0.66
NM_001109449	Glytk	glycerate kinase	0.84	0.21
NM_031620	Phgdh	phosphoglycerate dehydrogenase	0.76	0.07
NM_001014004	Amt	aminomethyltransferase	0.60	0.05

B. セリン・グリシン・スレオニン代謝酵素遺伝子発現の変化

骨格筋におけるセリン、グリシン、スレオニンの代謝酵素の遺伝子発現の変化を発現率の順に Table 2 に示した。2 週間のタウリン投与によって、骨格筋におけるスレオニン・セリン・グリシンの代謝酵素の遺伝子発現には変化において、2 倍以上の増加もしくは 0.5 倍以下の減少を示した変化は認められなかった。

C. タウリン投与による骨格筋遺伝子発現の変化

DNA マイクロアレイの結果、2 週間のタウリン投与によって、発現比率が 2 倍以上の増加または 0.5 倍以下の減少を示したすべての遺伝子を発現率の順に文末の Supplemental table 1 に示した。

考察

骨格筋の糖代謝ならびにセリン・グリシン・スレオニンのアミノ酸代謝の遺伝子発現に及ぼすタウリン投与の影響を明らかにすることを目的とした。

本研究において、骨格筋の糖代謝関連の遺伝子発現や骨格筋特異的糖輸送担体 GLUT4 の遺伝子発現にタウリン投与によって変化を認めなかったことから、タウリン投与が骨格筋による糖の需要や糖の取り込みに影響しないことを示唆する。我々はこれまで、ヒトへのタウリン投与が長時間運動誘発性の血糖低下を抑制することを報告し¹⁴、糖新生の亢進を推察したが、運動中の血糖は筋における糖利用と肝臓からの糖動員のバランスで決定されるため、骨格筋による糖の需要や糖の取り込みが抑制されることを否定できなかった。本研究の結果は、タウリン投与の血糖維持作用への影響として、骨格筋側で糖代謝の影響はなく、肝臓側で作用する可能性を示唆する。最近、Ito ら (2014)³は TAUT ノックアウトマウスを用いて、タウリン枯渇マウスの著しい運動能の低下は骨格筋における NADH の利用や ATP 産生が障害されていることを報告した。しかしながら正常な動物へのタウリン投与による骨格筋への生理作用への影響は限定的なのかもしれない。

我々はこれまでにタウリンを投与すると骨格筋セリン・グリシン・スレオニン濃度が低下することを報告し¹⁵、これらアミノ酸の減少は骨格筋から放出され運動時の糖新生に用いられた可能性を推察した。一般的に骨格筋で代謝されるアミノ酸は分岐鎖アミノ酸、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸であるものの、タウリン投与による骨格筋セリン・グ

リシン・スレオニン代謝への影響は不明であった。本研究において、タウリン投与後の腓腹筋内側頭白色部を網羅的に遺伝子解析したところ、骨格筋セリン・グリシン・スレオニン代謝酵素の遺伝子発現に 2 倍以上の大きな変化は認められなかったことから、タウリン投与によって骨格筋において代謝されなかったことが示唆された。これらのアミノ酸だけがタンパク質合成に用いられることもないので、これらアミノ酸は骨格筋から放出されたことが推察される。

ラットのランニング時の主働筋は速筋優位筋である腓腹筋であり²⁰、疲労困憊に至るまで走行させると速筋優位筋においてタウリン濃度が減少する⁶。加えて、我々はタウリンを 3 週間投与すると、骨格筋タウリン濃度は顕著に増加し、その割合は速筋優位筋で大きいことを示した¹⁵。タウリン投与による骨格筋への影響は遅筋優位筋に比べ速筋優位筋の方が大きいと推察され、被験筋として腓腹筋白色部を選定した。タウリン投与による骨格筋の糖代謝ならびに、セリン・グリシン・スレオニン代謝へ関わる遺伝子は多数あることから、遺伝子発現の網羅的な解析が可能であるマイクロアレイにて検討した。Mortensen ら (2009)²¹ は妊娠時の低タンパク食は子の低体重や肝臓と骨格筋の多くの遺伝子発現に大きく影響を及ぼすが、タウリン投与はこれらを抑制することをマイクロアレイによる網羅的な遺伝子解析によって示した。本研究において、タウリン投与によって影響を受けた骨格筋遺伝子発現は少なく、正常な動物の非運動時においては、タウリン投与による骨格筋への影響は限られるのかもしれない。

本研究においては、検討した遺伝子において DNA マイクロアレイ法の妥当性を検討していないために、今後、更なる研究が必要である。しかしながら、本研究の結果は、タウリン投与による長時間運動時の血糖維持作用のメカニズムとして、タウリン投与によって、骨格筋のセリン、グリシン、スレオニンが放出され肝臓にて糖新生に利用されたとする推察を推し進めるものである。

まとめ

腓腹筋内側頭白色部の糖代謝ならびにセリン・グリシン・スレオニンのアミノ酸代謝に及ぼすタウリン投与の影響は認められなかった。これまで報告してきたタウリンの長時間運動時の血糖維持作用は、骨格筋への作用より糖新生などの肝臓への作用が関連する可能性が示唆された。

謝辞

本研究におけるタウリン散を提供いただいた大正製薬株式会社に感謝致します。

文献

- 1) Ramamoorthy et al. *Biochem J* 1994, 300 (Pt 3):893-900.
- 2) Ito et al. *J Mol Cell Cardiol* 2008, 44:927-937.
- 3) Ito et al. *J Amino Acids* 2014, 2014:964680.
- 4) Warskulat et al. *FASEB J* 2004, 18:577-579.
- 5) Iwata et al. *J Neurochem* 1986, 47:158-163.
- 6) Matsuzaki et al. *Med Sci Sports Exerc* 2002, 34:793-797.
- 7) Miyazaki et al. *Amino Acids* 2004, 27:291-298.
- 8) Dawson et al. *Amino Acids* 2002, 22:309-324.
- 9) Zhang et al. *Amino Acids* 2004, 26:203-207.
- 10) Baum and Weiss, *Amino Acids* 2001, 20:75-82.
- 11) Imagawa et al. *Int J Sports Med* 2009, 30:485-488.
- 12) Manabe et al. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2003, 49:375-380.
- 13) Rutherford et al. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2010, 20:322-329.
- 14) 石倉 et al. *体力科学* 2008, 57, 475-484
- 15) Ishikura et al. *J of Sports Sci Med* 2011, 10:306-314.
- 16) Cuisinier et al. *Amino Acids* 2001, 20:13-23.
- 17) Chomczynski and Sacchi, *Anal Biochem* 1987, 162: 156-159.
- 18) Leiske et al. *BMC Genomics* 2006, 7:72.
- 19) Shi et al. *Nat Biotechnol* 2006, 24:1151-61.
- 20) Sullivan and Armstrong, *J Appl Physiol* 1978, 44:358-363.
- 21) Mortensen et al. *In J biomed sci. Volume 17 Suppl 1. England; 2010:S38.*

Supplemental table 1. All gene whose expression were changed by two weeks taurine supplementation in the microarray analyses

Genebank	Symbol	Fold	p-value
NM_023103	Mug1	5.04	1.08E-13
NM_134326	Alb	3.72	1.62E-12
NM_020071	Fgb	3.49	2.06E-09
NM_012901	Ambp	3.20	5.28E-10
NM_024143	Slc27a5	2.84	6.79E-07
NM_203325	Mup5	2.78	2.37E-09
NM_012824	Apoc1	2.73	1.29E-08
AI010917	AI010917	2.70	7.27E-07
AI575641	AI575641	2.69	5.18E-07
NM_147213	LOC259245	2.62	1.05E-07
AA998181	AA998181	2.43	2.68E-06
NM_147212	LOC259244	2.42	1.34E-07
AW140918	AW140918	2.33	6.41E-07
NM_012582	Hp	2.26	6.71E-07
BF403892	BF403892	2.23	8.94E-06
BI275582	BI275582	2.18	7.94E-05
AW918981	AW918981	2.15	8.57E-04
AA901338	AA901338	2.10	2.24E-05
AA899970	AA899970	2.08	1.30E-04
AI105064	AI105064	2.08	3.89E-06
NM_001108536	Tube1	2.08	2.37E-05
AA955851	AA955851	2.05	2.88E-04
AA849763	AA849763	2.04	1.11E-03
BQ194250	BQ194250	2.04	9.04E-05
BG378637	BQ194250	2.03	1.24E-05
AI045870	AI045870	2.01	9.00E-04
NM_031982	Trpv1	2.00	6.53E-04
NM_001033706	Aldh16a1	0.50	1.10E-03
NM_001105841	Ptrf	0.50	7.04E-03
XM_220940	Tmem101	0.50	2.06E-03
NM_001000944	Olr1472	0.50	1.69E-04
NM_001107788	Gzf1	0.49	1.20E-02
NM_001004277	Pla2g15	0.49	3.22E-04
AI101197	AI101197	0.49	4.48E-04
NM_001130695	Zc3h7b	0.49	5.13E-03
NM_057210	Sv2a	0.49	6.34E-04
NM_001170348	kif26a	0.48	5.84E-03
NM_022238	Abcb9	0.48	9.11E-05
NM_053366	Rab6a	0.47	2.08E-04
NM_001108483	Snrp70	0.47	1.94E-03
ENSRNOT00000010471	Pak6	0.46	4.73E-03
NM_001047885	Arse	0.46	2.46E-04
NM_001107166	Tnpo2	0.46	1.17E-04
TC593770	TC593770	0.46	6.63E-04
NM_001107193	Tbx19	0.46	3.09E-03
NM_031070	Nell2	0.46	9.60E-05
BQ199246	BQ199246	0.45	2.28E-03
NM_001012115	Creb3l3	0.45	8.46E-04
NM_001108495	Relt	0.44	3.71E-06
BQ782195	BQ782195	0.44	9.27E-04
BE110169	BE110169	0.43	6.85E-04
AI411618	AI411618	0.43	1.33E-03
AA899157	AA899157	0.43	7.89E-04
XM_218336	Erf	0.42	9.33E-04
NM_017034	Pim1	0.42	5.86E-05
BC083847	RGD1308143	0.42	9.97E-06
NM_001012103	Trim32	0.42	5.34E-04
XM_343995	Chmp2b	0.41	1.35E-05
NM_001109302	Srf	0.39	1.10E-05
AI045775	AI045775	0.39	6.55E-05
NM_012868	Npr3	0.38	6.67E-06
NM_013195	Ii2rb	0.36	3.52E-06
BC107453	BC107453	0.36	7.13E-05
CB545427	CB545427	0.36	7.16E-06
NM_001106140	Atp8b1	0.32	1.59E-06
NM_032063	Dll1	0.29	1.71E-08
NM_138511	Gpc2	0.28	3.8E-08
CB547990	CB547990	0.28	1.81E-10
NM_138867	Hyou1	0.26	6.36E-08