

牛乳タンパク質の有用性に関する研究： 分岐鎖アミノ酸を豊富に含むタンパク質の糖代謝改善作用

名古屋工業大学 共通講座・健康運動科学 下村 吉治

要 約

分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 含量の異なる食餌タンパク質 (ミルクカゼインと大豆タンパク質) およびBCAA添加食をラットに4週間与えて、食餌中のBCAA含量が耐糖能、血糖と血清インスリン濃度、肝臓と骨格筋のピルビン酸脱水素酵素 (PDH) 複合体活性、および肝臓の分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素 (BCKDH) 複合体活性に及ぼす影響を検討した。実験食として、大豆タンパク質食、ミルクカゼイン食、大豆タンパク質食-BCAA (4.75%) 添加食、もしくはミルクカゼイン食-BCAA (4.75%) 添加食を用いた。ラット体重と摂食量には、全ての食餌群で差は無かった。耐糖能に対する食餌の影響は認められなかったが、血清インスリン濃度は高BCAA食摂取により低下する傾向を示した。よって、高BCAA食摂取はインスリン感受性を上昇する可能性が示唆された。肝臓のPDH活性には食餌による影響が認められなかったが、骨格筋のPDH総活性は、高BCAA食により増加する傾向を示した。この結果は、骨格筋におけるグルコース代謝のキャパシティが高BCAA食摂取により上昇した可能性を示唆しており、PDH活性が高BCAA食による糖代謝改善のメカニズムに関与すると推測された。肝臓のBCKDH活性は、BCAA摂取量に依存して上昇したので、BCAA代謝に関してラットはそれぞれの実験食に適応していたと推測される。本研究では、高BCAA食摂取により、インスリン感受性が上昇する可能性が確認されたが、今後さらに高BCAA食摂取の明確な効果を得ることが必要であろう。そのためには、より長期の摂食かインスリン感受性の低下した動物を用いて検討する必要があると思われる。

キーワード：分岐鎖アミノ酸、ミルクカゼイン、大豆タンパク質、耐糖能、血清インスリン、ピルビン酸脱水素酵素複合体、分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素複合体、ラット

1. はじめに

ロイシン、イソロイシン、バリンよりなる分岐鎖アミノ酸 (branched-chain amino acids: BCAA) は、栄養学的な必須アミノ酸であり、食事タンパク質に含まれる必須アミノ酸の約50%、筋タンパク質の必須アミノ酸の約35%を占める [1]。このようにBCAAはタンパク質に多く含まれるので、BCAA代謝は動物のタンパク質代謝やエネルギー代謝と深く関連することが明らかにされつつある。例えば、ヒトにBCAAを投与して運動を負荷すると、投与したBCAAの酸化分解の促進と共に筋タンパク質の分解が抑制されることが報告されており、タンパク質代謝に対するBCAA投与の影響が認められている [2]。

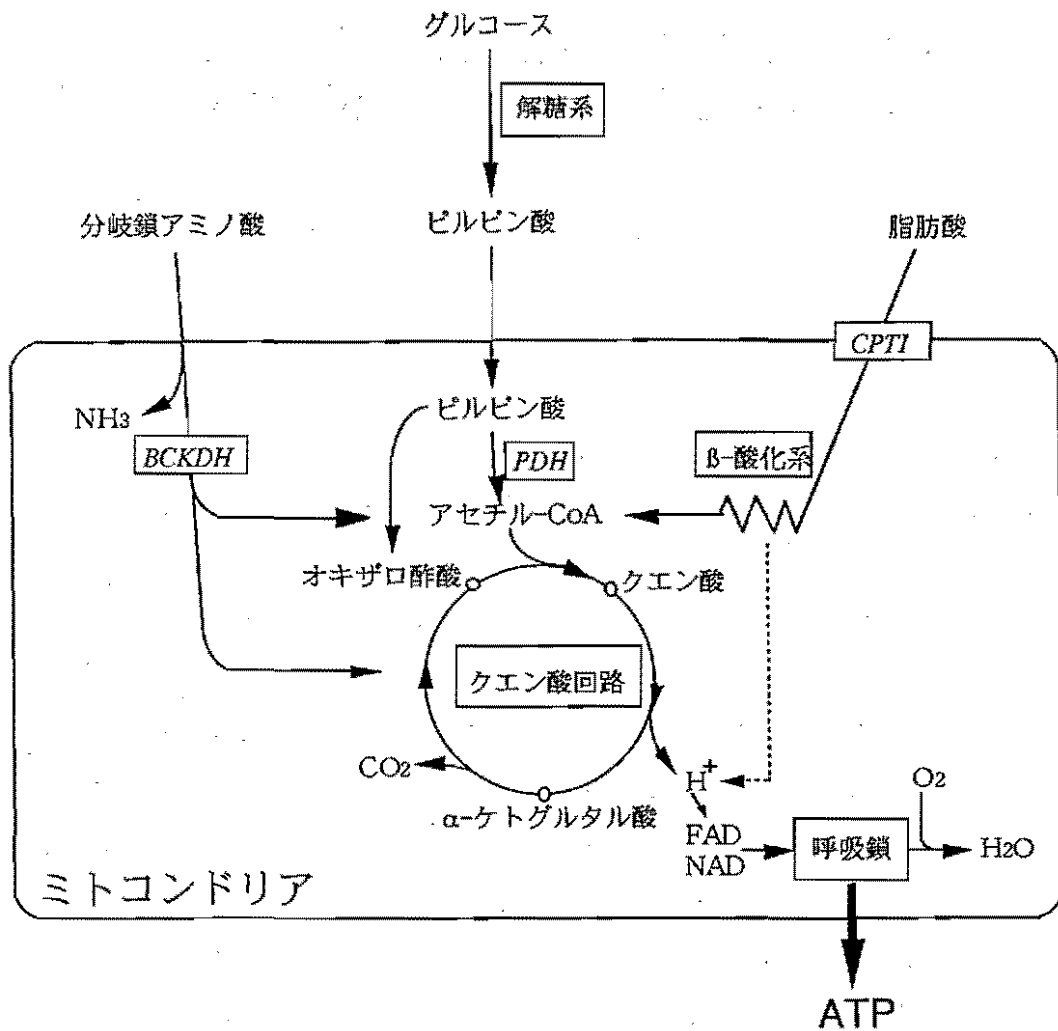


図1 エネルギー代謝系の概略図
 BCKDH：分岐鎖α-ケト酸脱水素酵素、PDH：ピルビン酸脱水素酵素、
 CPTI：カルニチン-パルミトイル転移酵素I

一方、エネルギー代謝には、糖質、脂質、およびアミノ酸代謝が密接に関係しており（図1）、一般的には糖質代謝が低下したときにアミノ酸と脂質代謝が活発になる。これらのエネルギー代謝に対するタンパク質やBCAA投与の影響を検討するためには、長期的な投与（摂取）により動物をその食餌に適応させることが必要であり、このような研究は国内外でも少ない。

牛乳タンパク質に含まれるBCAA量は総アミノ酸量の21.4%であり、他の動物性タンパク質（豚肉、18.6%；牛肉、16.8%；鶏肉、18.3%）や植物性タンパク質（大豆、18.4%；米、16.3%；小麦粉、15.8%）と比べて含量が高い。運動時には上述のようにBCAAの需要が高まるので、激しくスポーツを行う人にとって牛乳タンパク質は有利なタンパク質であると考えられる。

申請者らのこれまでのラットを用いた研究において、20%カゼイン食にBCAAを添加した食餌の長期摂取は、BCAA代謝の促進と共に運動中の血糖低下を抑制し、さらに安静時の血中インスリン濃度を低下させる所見が得られた [3]。この所見は、BCAA豊富なタンパク質もしくはBCAA添加食はグルコース代謝を改善する可能性を示唆している。

グルコース代謝の調節酵素としては、いくつかの酵素が知られているが、それらの中でもピルビン

酸脱水素酵素 (pyruvate dehydrogenase: PDH) 複合体は重要な役割を担う酵素の一つである [4]。PDH複合体は、解糖系で生成されるピルビン酸をアセチル-CoAに変換する酵素であり、その酵素活性は、酵素タンパク質のリン酸化による不活性化と脱リン酸化による活性化により調節されている (図2)。前者の反応は特異的キナーゼ (PDH kinase) により触媒され、後者の反応は特異的ホスファターゼ (PDH phosphatase) により触媒される。PDH複合体の生成産物であるアセチル-CoAは、脂肪酸

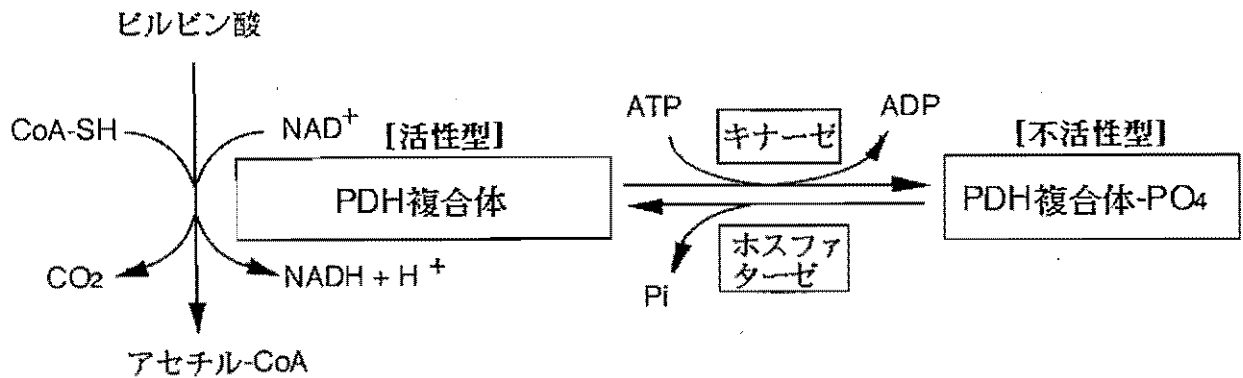


図2 ビルビン酸脱水素酵素 (PDH) 複合体：リン酸化および脱リン酸化によるの活性調節。PDH複合体は、特異的キナーゼ (PDH kinase) による酵素タンパク質のリン酸化により不活性化され、特異的ホスファターゼ (PDH phosphatase) による脱リン酸化により再活性化される。

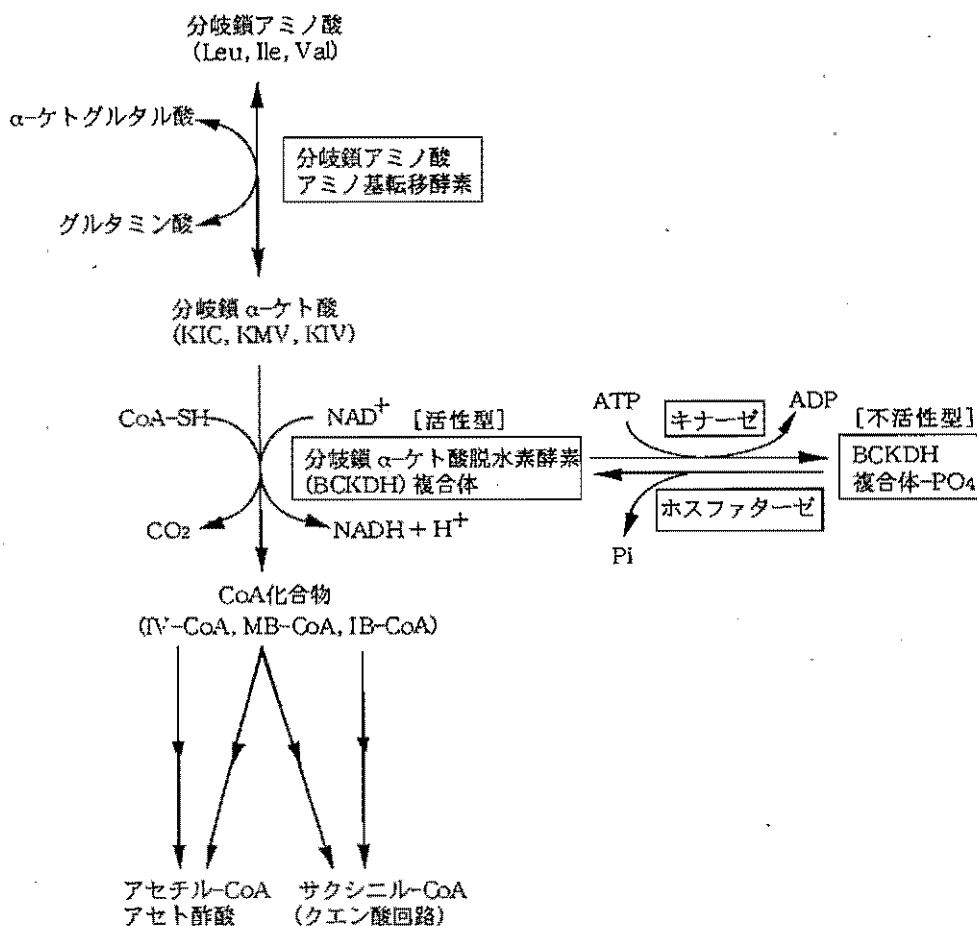


図3 分岐鎖アミノ酸分解系

KIC, α-ケトイソカプロン酸, KMV, α-ケト-b-メチルバレリン酸; KIV, α-ケトイソバレリン酸。

の β -酸化系より生成される産物と共通であるため、脂肪酸分解と競合する。すなわち、脂肪酸分解が促進される場合にはPDH複合体活性は低下し、逆に、PDH複合体活性が高いときには脂肪酸分解は抑制されることが明らかにされている [5]。

そこで、本研究では、ミルクカゼインと大豆タンパク質を食餌タンパク質として用い、これらの食餌タンパク質がラットの耐糖能、グルコースや遊離脂肪酸などの血清成分濃度、および肝臓と骨格筋のPDH複合体活性に及ぼす影響を検討した。さらに、それぞれの食餌にBCAAを添加してBCAA含量の高い食餌が、それぞれの測定項目に対する影響も検討した。

一方、BCAA代謝は、その分解系の第2番目に位置する分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素 (branched-chain α -keto acid dehydrogenase: BCKDH) 複合体により調節される (図3) [6]。この酵素複合体の活性は、PDH複合体と同様に、酵素タンパク質のリン酸化により調節されている (図3)。ラットでは肝臓のこの酵素活性がBCAA代謝の指標となることが示唆されているので、本研究ではそれぞれの食餌に適応したラット肝臓のBCKDH複合体活性も測定し、BCAA代謝に対する食餌タンパク質の影響と高BCAA食の影響も合わせて検討した。

2. 方 法

2-1. 実験動物と飼育

7週齢のSprague-Dawley系雄性ラット (日本クレア) 20匹を実験に用いた。ラットを、最初の1週間、市販の固形飼料 (CE-2、日本クレア) で予備飼育し、その後実験食を4週間与えた。食餌および水は自由に摂取させた。動物飼育室の室温を約23°Cに保持し、明暗周期を12時間 (明期: 9:00~21:00、暗期: 21:00~9:00) に設定した。1つのケージに1~2匹ずつラットをいれ実験期間中飼育した。実験期間中の各ラットの体重を2日ごとに、また実験期間の最後の5日間の摂食量を測定した。

2-2. 実験食

実験食は、大豆タンパク質食、ミルクカゼイン食、大豆タンパク質食-BCAA (4.75%) 添加食、およびミルクカゼイン食-BCAA (4.75%) 添加食からなり、それぞれの組成を表1に示した。これらの食餌の基本的組成は、AIN73の食餌組成 [7] とAIN93の食餌組成 [8] を基本としたものであり、添加した3つのBCAAの比率は、カゼインに含まれるBCAAの組成を基にした [9]。この量のBCAA添加により、ラットの摂食量は影響されることが報告されている [9]。全ての食餌は、日本クレア (株) により調製された。

2-3. 経口糖負荷試験

各群のラットを3週間実験食で飼育した後に、耐糖能試験として経口糖負荷試験をYuanらの方法 [10] に従って行った。実験当日、各群のラットに、12時間 (午前6時~午後6時) の絶食の後、25%グルコース溶液を用いて2g/kg体重のグルコースを経口投与し、負荷前、負荷後15分、30分、45分、60分、90分に尾静脈より採血し、血糖測定器メディセーフリーダー (テルモ (株)) を用いて血糖濃度を

表1. 実験食の組成

Ingredient	Diet			
	20%-Casein	20%-Casein + BCAA	20%-Soybean	20%-Soybean + BCAA
	(g/kg diet)			
Casein, Milk	200	200	-	-
Soybean protein	-	-	200	200
Soybean oil	50	50	50	50
DL-Methionine	3	3	3	3
Mineral mix, AIN 76	35	35	35	35
Vitamin mix, AIN 76	10	10	10	10
Choline bitartrate	2	2	2	2
Sucrose	100	100	100	100
Tert-butylhydroquinone	0.01	0.01	0.01	0.01
Cellulose	50	50	50	50
Free amino acids				
L-Leucine	-	20	-	20
L-Isoleucine	-	12.5	-	12.5
L-Valine	-	15	-	15
Cornstarch		to make 100%		

測定した。

2-4. 血液および組織の採取

4週間の実験食飼育の後、血液および肝臓と筋肉（腓腹筋）組織を採取した。各群のラットを12時間（午前6時～午後6時）絶食させ、上述の耐糖能試験と同様に経口的に糖（2gグルコース/kg体重）を負荷した。負荷後30分にペントバルビタールの腹腔内投与（0.05 g/kg）によって麻酔し、腹部下大静脈より採血し、次いで直ちに肝臓と腓腹筋を摘出し、フリーズ・クランプ法により凍結した。採取した肝臓と筋肉は、分析まで-80℃で保存した。得られた血液より遠心分離により血清を調製し、分析まで-80℃で保存した。

2-5. 分析

血液成分の分析：血糖を血糖測定器メディセーフリーダーを用いて定量した。血清インスリンをラジオイムノアッセイ法 [11]、血清遊離脂肪酸を酵素法 [12] により定量した。血清BCAAを Gleeson and Maughanの酵素法 [13] を用いて定量した。

PDH活性およびBCKDH活性：骨格筋および肝臓からのPDH複合体とBCKDH複合体の抽出を Shimomuraらの方法 [14] により行った。その抽出液のPDH総酵素活性（total activity）ならびに活性型酵素活性（actual activity）を、arylamine acetyltransferase（acetyl-CoAを用いてp-(p-aminophenylazo)benzene-sulphonic acidをアセチル化する酵素）を用いた酵素カップリング法により分

光学的に測定した [15]。PDH総酵素活性を求めるためのPDH複合体脱リン酸化には、リコンビナントPDHホスファターゼを用いた [16]。肝臓のBCKDH総酵素活性および活性型酵素活性は、分光学的方法により測定した [14]。BCKDH総酵素活性を求めるためのBCKDH複合体脱リン酸化には、lambda protein phosphatase (New England Biolabs, Beverly, MA)を用いた [17]。PDH複合体およびBCKDH複合体の活性型の割合 (activity state) は、生体内における総酵素活性に対する活性型酵素の割合 (%) として算出した。

2-6. 統計解析

本研究で得られた実験データは、平均値±標準誤差で示した。経口糖負荷試験の有意差検定には、2元配置分散分析を、それ以外の項目には1元配置分散分析を用い、各群間の種々の測定値の有意差検定には、FischerのPSLD (protected least significant difference test) の多重比較を用いた。危険率5%以下を有意とした。

3. 結果

3-1. 耐糖能

実験食による3週間の飼育の後、経口糖負荷試験を行った。結果を図4に示した。糖負荷後の血糖濃度の上昇は、BCAA添加および無添加のいずれの実験食でも、ミルクカゼイン食よりも大豆タンパク質食で僅かに低い傾向にあったが、有意な違いは認められなかった。

3-2. ラット体重と摂食量

実験食による4週間の飼育後の体重と、実験期間の最後の5日間に測定した1日当たりの摂食量を表2に示した。各群の体重は、ほぼ同じレベルにあり、群間に差は認められなかった。この体重の結果は、各群の摂食量に違いが見られなかったことの反映であろうと考えられる。実験食への4.75% BCAA添加は、摂食量に影響を及ぼさないことがAndersonら [9] によって報告されているが、本研究でもそれが確認された。

3-3. 血液成分に対する実験食の影響

実験最終日に、経口糖負荷試験と同量のグルコースを投与し、その30分後にラットを麻酔下で屠殺し血液を得た。血中グルコース濃度、血清インスリン、遊離脂肪酸、およびBCAA濃度を表3に示した。

血中グルコース濃度は、いずれの群も150 mg/dl前後であり、群間に差は認められなかった。

血清インスリン濃度は、大豆タンパク質食群とミルクカゼイン食群ではほぼ同レベルであった。一方、それぞれの食餌にBCAAを添加した食餌群では、統計的な有意差は認められなかったが、血清インスリン濃度が低い傾向を示した。この結果は、BCAA添加食の摂取によりインスリン感受性が上昇した可能性を示唆している。

血清遊離脂肪酸濃度は、いずれの食餌群でも同レベルであり、食餌群間に差は認められなかった。

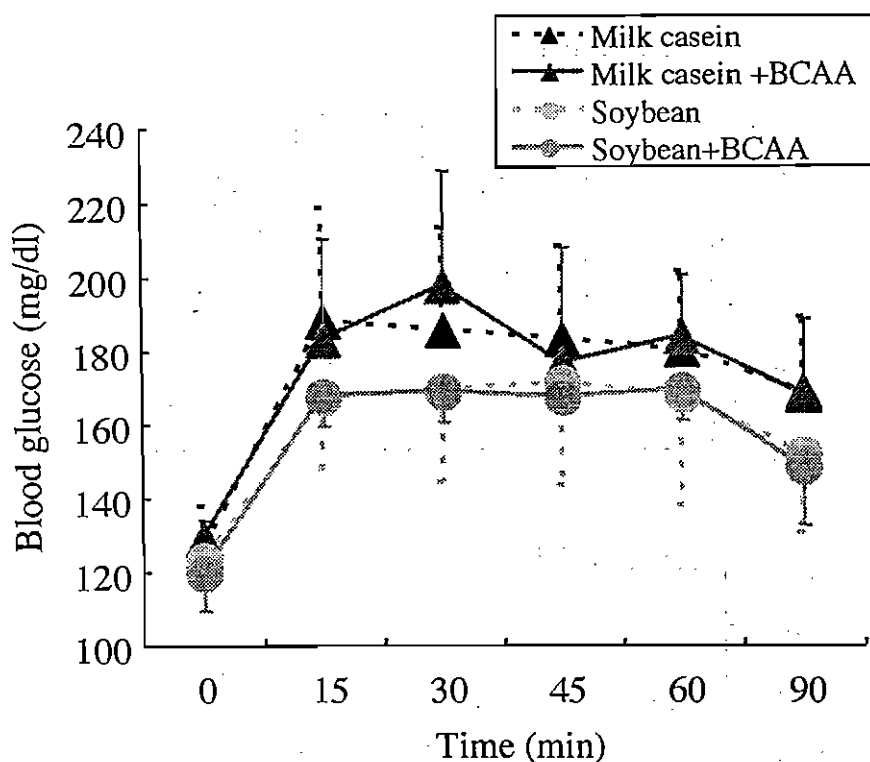


図4 経口糖負荷試験に及ぼす実験食の影響
Values are means \pm SE for 5 rats.

表2 ラットの体重および摂食量に及ぼす実験食の影響

	Soybean	Soybean+BCAA	Milk casein	Milk casein+BCAA
Body weight (g)	470 \pm 14	464 \pm 22	486 \pm 15	486 \pm 22
Food intake (g)	27.9 \pm 0.1	27.1 \pm 0.2	27.7 \pm 1.0	28.2 \pm 0.9

Values are means \pm SE for 5 rats.

表3 ラットの血液成分に及ぼす実験食の影響

	Soybean	Soybean+BCAA	Milk casein	Milk casein+BCAA
Glucose (mg/dl)	151 \pm 7	141 \pm 4	159 \pm 12	153 \pm 7
Insulin (ng/ml)	1.16 \pm 0.43	0.66 \pm 0.16	1.26 \pm 0.34	0.94 \pm 0.28
FFA (mEq/l)	0.20 \pm 0.02	0.18 \pm 0.01	0.29 \pm 0.06	0.25 \pm 0.03
BCAA (μ mol/l)	355 \pm 16	368 \pm 15	373 \pm 23	394 \pm 26

Values are means \pm SE for 5 rats.

血清BCAA濃度は、有意ではないが、各食餌タンパク質にBCAAを添加することにより上昇する傾向を示した。最も高値を示したのはミルクカゼイン-BCAA添加食群であった。BCAA添加による顕著な血清BCAA濃度の上昇が認められなかったのは、採血前の約12時間を摂食させない条件にしたため、食餌BCAAの効果小さくなったものと考えられる。

3-4. 肝臓と骨格筋のPDH複合体活性に対する実験食の影響

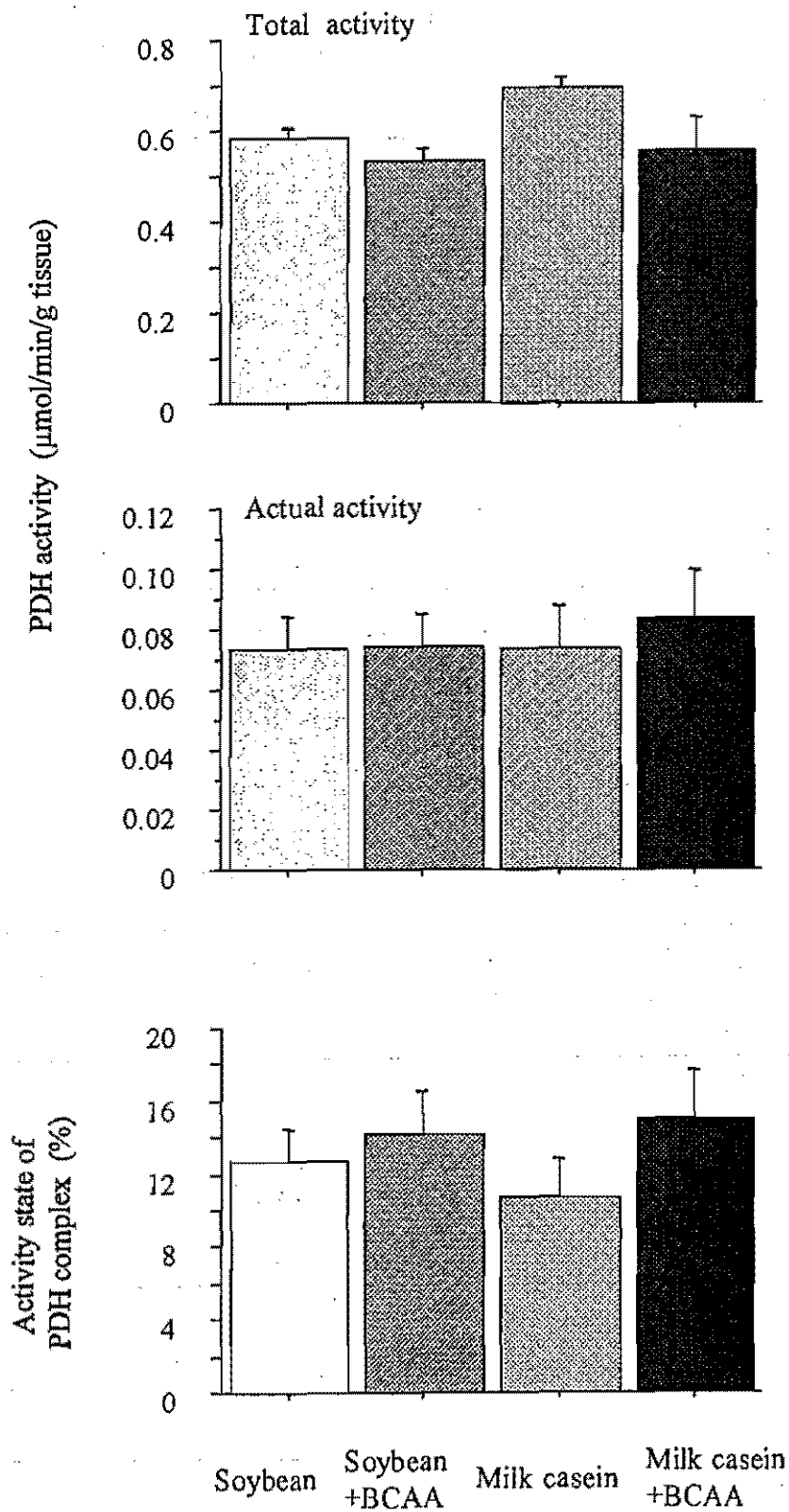


図5 ラット肝臓のPDH活性に及ぼす実験食の影響
Values are mean \pm SE for 5 rats.

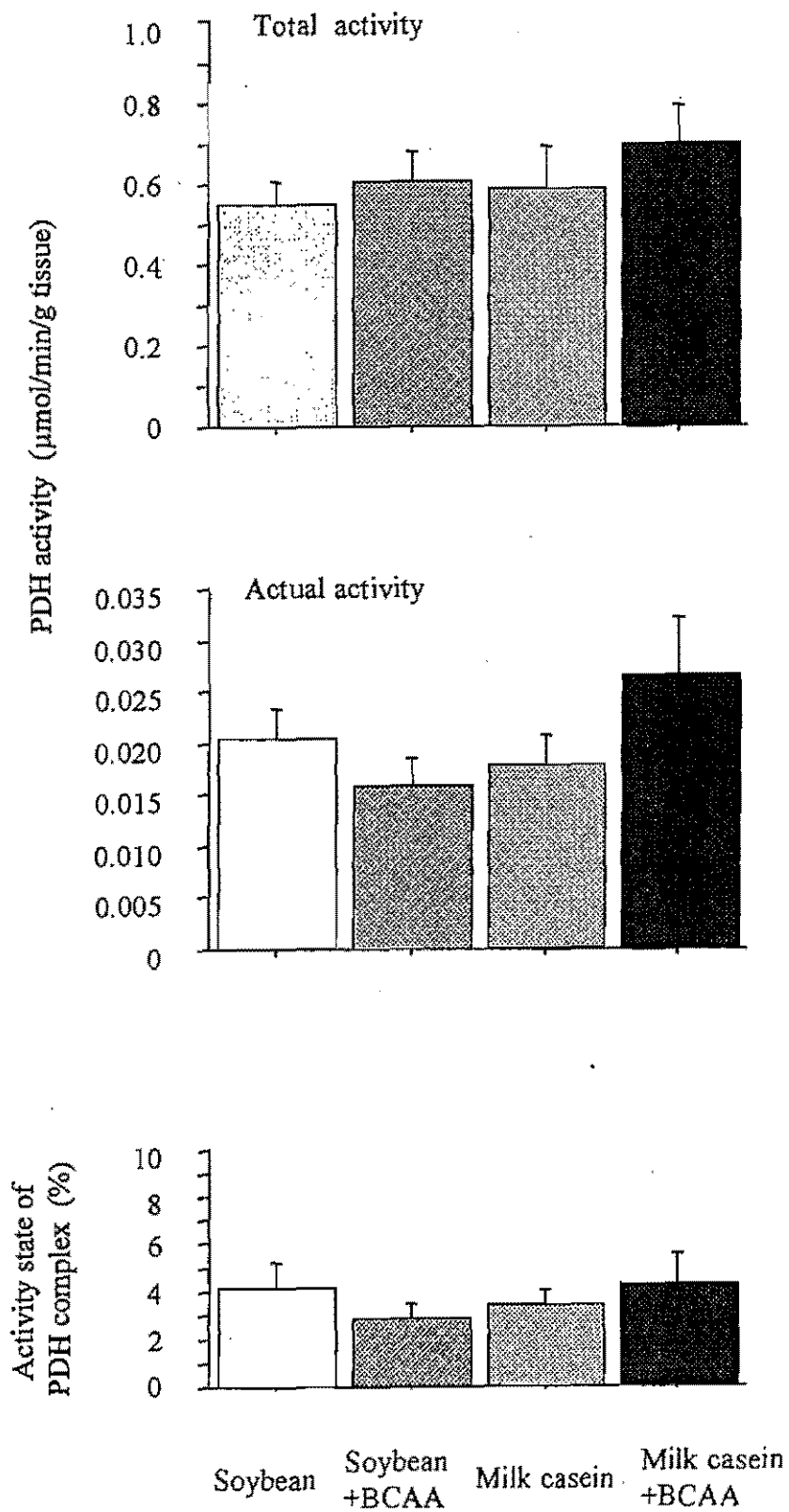


図6 ラット骨格筋のPDH活性に及ぼす実験食の影響
Values are mean \pm SE for 5 rats.

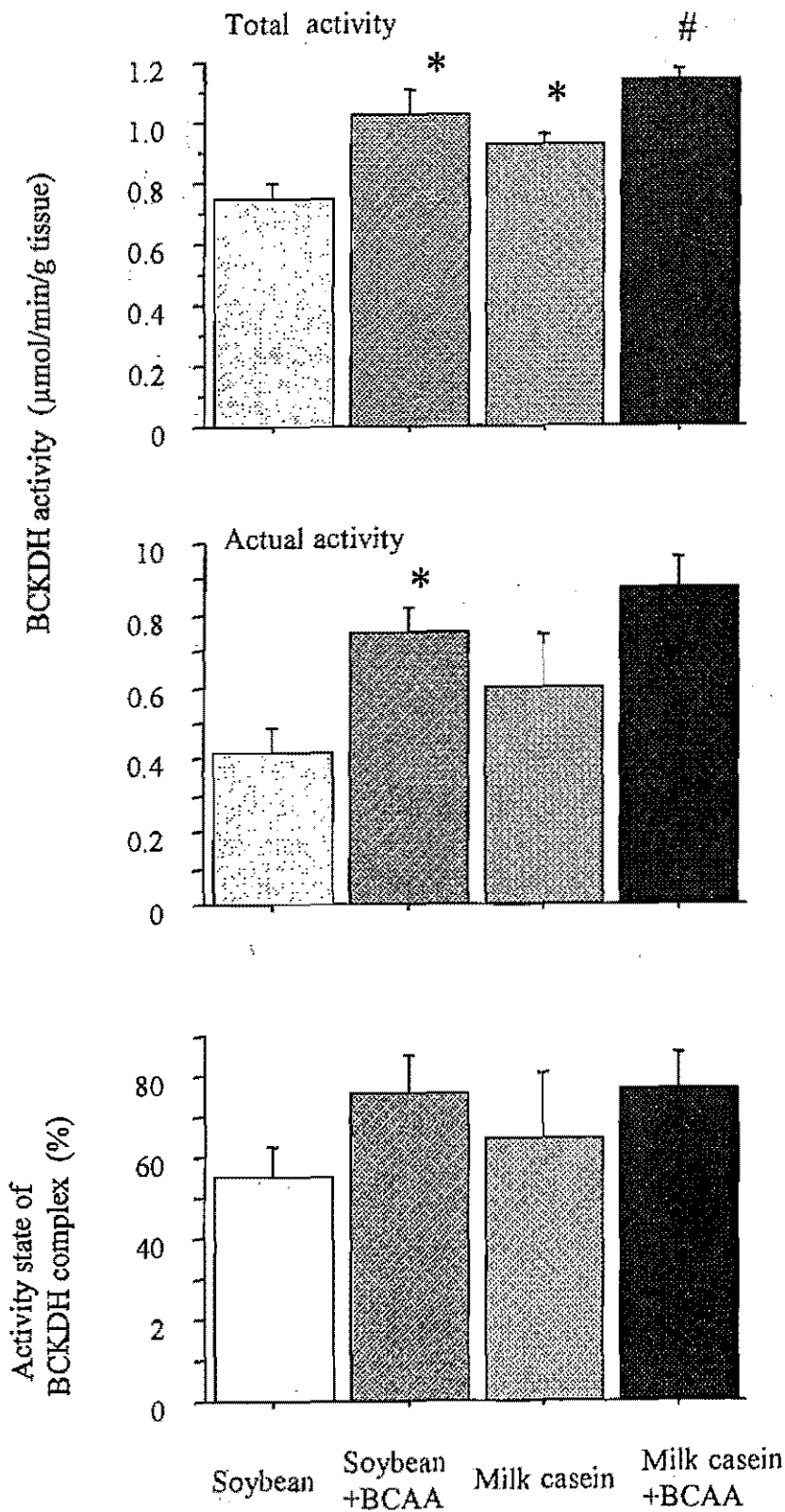


図7 ラット肝臓のBCKDH活性に及ぼす実験食の影響
 Values are mean \pm SE for 5 rats.
 *Significantly different from soybean diet group.
 #Significantly different from milk casein diet group.

肝臓と骨格筋のPDH複合体活性の結果をそれぞれ図5と図6に示した。

肝臓のPDH総活性は、ミルクカゼイン食群が他の食餌群よりも高い傾向を示したが、食餌タンパク質およびBCAA添加による一定の傾向は認められなかった。活性型酵素の活性(actual activity)は、いずれの食餌群もほぼ同レベルであった。また、活性型酵素の割合を示す活性状態(activity state)も全ての群で同レベルにあり、差は認められなかった。

骨格筋のPDH総活性は、大豆タンパク質食群とミルクカゼイン食群では同レベルであったが、BCAA添加食群ではそれぞれの食餌タンパク質群よりも高い傾向にあった。最も高値を示したのは、ミルクカゼイン-BCAA添加食群であった。活性型酵素の活性は、ミルクカゼイン-BCAA添加食群で高い傾向にあったが、各群で有意な違いは認められなかった。酵素の活性状態は、全ての食餌群で同レベルであった。

3-5. 肝臓のBCKDH複合体活性に対する実験食の影響

肝臓のBCKDH複合体活性を図7に示した。

BCKDH総活性は、大豆タンパク質食群とミルクカゼイン食群を比べると、後者が有意に高かった。それぞれのBCAA添加食群では、各タンパク質食群よりも有意な高値を示した。活性型酵素活性も総活性と類似の傾向を示したが、大豆タンパク質食群と大豆タンパク質-BCAA添加食群の間にのみ有意差が認められた。また、酵素の活性状態も、総活性と類似の傾向を示したが、有意差は認められなかった。

4. 考 察

糖尿病患者およびその予備軍が急増している現代社会では、インスリン作用を改善する有効な方法を早急に開発しなければならない。これまでに、運動によるインスリン作用の改善が明らかにされており、実際に糖尿病の予防や治療に運動療法が利用されている。運動効果のメカニズムは十分には明らかにされていないが、運動による骨格筋Glut-IVの増加がメカニズムの一つとしてあげられている。

我々の研究室の研究目的の一つは、インスリン作用の改善効果を期待できる食成分を見いだすことであり、これまでの研究において、BCAAを添加した食餌をラットに4週間摂取させると、安静時の血清インスリン濃度が低下すること、およびその期間に運動トレーニングを負荷しても骨格筋のGlut-IVの増加が認められないことを明らかにした [3]。これらの所見は、高BCAA食はインスリン感受性を高め糖代謝を改善する可能性を示唆しており、糖代謝改善のための食品の開発にも応用できるかもしれない。

そこで本研究では、さらに食餌BCAAの作用を明らかにするため、経口糖負荷試験による耐糖能と、グルコース代謝の調節酵素であるPDH複合体とBCAA代謝の調節酵素であるBCKDH複合体の活性に対するBCAA含量の異なる食餌の影響について検討を加えた。

耐糖能に対する食餌タンパク質およびBCAA添加の影響は認められなかった。また、実験最終日に

経口的に糖負荷した30分後にラットを屠殺し、再度耐糖能に対する食餌BCAAの影響を見たが、やはり各食餌群間で差は認められなかったので、本実験の条件下における血糖に対しての食餌BCAAの影響はないと結論される。ただし、これまでの研究では、すべて正常なラットを用いており、糖尿病などの糖代謝の異常なラットに対しての影響は不明である。

一方、屠殺時の血清インスリン濃度では、食餌タンパク質（ミルクカゼインと大豆タンパク質）の間で差は認められなかったが、それぞれの食餌のBCAA添加食の場合では低値を示す傾向にあった。以前の報告では、これらの食餌タンパク質の間で統計的に有意な差が認められたが、本研究ではグルコースを負荷した後に採血したことよりこの食餌タンパク質の効果が減弱されたものと考えられる。しかし、BCAA添加により、血清インスリン濃度が減少する傾向を示したことより、やはり高BCAA食の摂取はインスリン感受性を高め糖代謝を改善する可能性が示唆された。

PDH複合体は、解糖系とクエン酸回路の接合点に位置するミトコンドリア酵素であり、グルコース代謝の運命を決定する重要な酵素である [4]。本研究では、肝臓と骨格筋のこの酵素活性に対する食餌BCAAの影響を検討した。肝臓のPDH活性に対する高BCAA食の一定の影響は認められなかったが、骨格筋のPDH総活性は、食餌タンパク質に関係なく高BCAA食摂取により上昇する傾向が認められた。この結果は、骨格筋におけるグルコース代謝のキャパシティが高BCAA食摂取により上昇した可能性を示唆しており、高BCAA食による糖代謝改善のメカニズムに関連すると推測されるが、詳細は不明である。なお、PDHの活性型酵素活性 (actual activity) は、絶食により著しく低下することが明らかにされているが [18]、本研究ではラットに12時間の絶食負荷後に屠殺したため、いずれの食餌群でも比較的low値を示したものと考えられる。

BCAA代謝の律速酵素であるBCKDH複合体は、ラット肝臓でかなり高い活性を示すので、BCAA代謝のマーカーともなりうる [6]。本研究で得られた結果では、肝臓のBCKDH総活性は大豆タンパク質食群よりもミルクカゼイン食群で高く、それぞれの食餌にBCAAを添加することによりさらに上昇した。すなわち、この結果は、大豆タンパク質よりもミルクカゼインの方がBCAA含量が高いことの反映であり、さらにBCAA添加によりさらに活性が上昇したことは、BCAAの代謝キャパシティがさらに上昇したと考えられる。よって、ラットはそれぞれの食餌に適応していたと考えられる。活性型酵素の活性と活性状態も同様な傾向にあったことより、BCAAの摂取量が多くなるとその代謝が促進されていたと考えられる。

このように、ラットはBCAAの摂取量によりBCAA代謝には明確な適応現象が認められるが、糖代謝の指標では、高BCAA食摂取により血清インスリン濃度を低下させる傾向が認められたのみであり、耐糖能には明確なBCAA摂取の影響は認められなかった。よって、今後さらに検討を加えるためには、さらに長期の高BCAA食摂取による影響を見るか、もしくは耐糖能が低下した動物に高BCAA食を摂取させることにより、BCAA摂取による糖代謝への影響を明確にすることができるものと考えられる。

文 献

1. Harper AE, Miller RH, Block KP. 1984. Branched-chain amino acid metabolism. *Annu Rev Nutr* 4: 409-454.
2. MacLean DA, Graham TE, Saltin B. 1994. Branched-chain amino acids augment ammonia metabolism while attenuating protein breakdown during exercise. *Am J Physiol* 267: E1010-E1022.
3. Shimomura Y, Murakami T, Nakai N, Nagasaki M, Obayashi M, Li Z, Xu M, Sato Y, Kato T, Shimomura N, Fujitsuka N, Tanaka K, Sato M. 2000. Suppression of glycogen consumption during acute exercise by dietary branched-chain amino acids in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 46: 71-77.
4. Behal RH, Buxton DB, Robertson JG, Olson MS. 1993. Regulation of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Annu Rev Nutr* 13: 497-520.
5. Shimomura Y, Murakami T, Nakai N, Nagasaki M. 2001. Exercise and Metabolism in muscle cells: molecular aspects of energy metabolism during exercise and adaptation to exercise training. In: *Exercise, Nutrition, and Environmental Stress* (Nose H, Gisolfi CV, Imaizumi K, eds), pp 89-116, Cooper Publishing Group, Traverse City, MI.
6. Harris RA, Zhang B, Goodwin GW, Kuntz MJ, Shimomura Y, Rougraff P, Dexter P, Zhao Y, Gibson R, Crabb DW. 1990. Regulation of the branched-chain α -ketoacid dehydrogenase and elucidation of a molecular basis for maple syrup urine disease. *Advan Enzyme Regul* 30: 245-263.
7. American Institute of Nutrition. 1977. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J Nutr* 107: 1340-1348.
8. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951.
9. Anderson SA, Tews JK, Harper AE. 1990. Dietary branched-chain amino acids and protein selection by rats. *J Nutr* 120: 52-63.
10. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE. 2001. Reversal of obesity-and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of $Ikk\beta$. *Science* 293: 1673-1677.
11. Morgan CR, Lazarow A. 1963. Immunoassay of insulin: two-antibody system. *Diabetes* 12: 115-126.
12. Sugo S, Matsumoto Y, Yamaoka T, Sakurabayashi I (1990) Improved enzymatic method for determining free fatty acids in serum with use of 3-octenoic acid. *Clin Chem* 36: 163.
13. Gleeson M, Maughan RJ. 1987. A simple enzymatic fluorimetric method for the determination of branched-chain L-amino acids in microlitre volumes of plasma. *Clin Chim Acta* 166: 163-169.
14. Shimomura Y, Suzuki T, Saitoh S, Tasaki Y, Harris RA, Suzuki M. 1990. Activation of branched-

chain α -keto acid dehydrogenase complex by exercise: effect of high-fat diet intake. *J. Appl. Physiol.* 68: 161-165.

15. Wu P, Sato J, Zhao Y, Jaskiewicz J, Popov KM, Harris RA, 1998. Starvation and diabetes increase the amount of pyruvate dehydrogenase isoenzyme 4 in rat heart. *Biochem J* 329: 197-201.
16. Kolobova E, Tuganova A, Boulatnikov I, Popov KM, 2001. Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites. *Biochem J* 358: 69-77.
17. Nakai N, Kobayashi R, Popov KM, Harris RA, Shimomura Y. 2000. Determination of branched-chain α -keto acid dehydrogenase activity state and branched-chain α -keto acid dehydrogenase kinase activity in mammalian tissues. *Methods Enzymol* 324, 48-62.
18. Nakai N, Sato Y, Oshida Y, Yoshimura A, Fujitsuka N, Sugiyama S, Shimomura Y. 1997. Effects of aging on the activities of pyruvate dehydrogenase complex and its kinase in rat heart. *Life Sci* 60: 2309-2314.