

運動の糖代謝改善効果発現における
骨格筋 AMP キナーゼの意義に関する研究

(課題番号 12671112)

平成 12 年度～平成 13 年度科学研究費補助金
研究基盤 C2 研究成果報告書

平成 14 年 3 月



研究代表者 林 達也

(京都大学医学研究科)

科研
2001
314

運動は糖代謝を活性化しインスリン感受性を亢進する強力な生理的刺激であり、この効果は糖尿病患者における運動療法として広く臨床応用されている。運動時に収縮する骨格筋（以下運動筋と略）では、筋細胞内に蓄積されたグリコーゲンが分解され収縮エネルギー産生の基質として使用される。また、間質液から細胞内への糖輸送過程（glucose transport）が活性化され、取り込まれたグルコースは ATP やグリコーゲンの再合成に利用される。運動筋では運動終了後数時間にわたってインスリン非依存性糖輸送（insulin-independent glucose transport）が活性化されるとともに、運動終了後 24 時間以上にわたってインスリン感受性が亢進し、インスリン依存性糖輸送（insulin-dependent glucose transport）が促進する^{1,2}。グルコースの筋細胞膜通過は糖輸送担体（glucose transporter, GLUT）を介して行われるが、骨格筋に発現している GLUT はその大半が GLUT4 である。GLUT4 は非刺激時には筋細胞内のミクロソーム分画に GLUT4 小胞（GLUT4-containing vesicle）として存在し、筋収縮やインスリンに反応して、筋細胞膜と T 管（transverse tubule）に translocation し間質液中のグルコースを細胞内に流入させる^{1,2}。

現在、運動療法は糖尿病治療の基本治療としての地位を獲得しているが、運動が糖代謝を活性化し糖尿病を改善する分子メカニズムについては十分に明らかではない。本研究では、運動に際して骨格筋内で顕著に活性化を受ける 5'AMP-activated protein kinase（AMPK）に注目し、AMPK が運動による骨格筋糖代謝調節に関与する証拠を明らかにした。本研究の成果は、AMPK が運動の糖代謝改善作用を媒介する重要なシグナル伝達分子であることを提唱するものである。

研究組織

研究代表者 : 林 達也 (京都大学医学研究科助手)

研究分担者 : 吉政康直 (国立循環器病センター動脈硬化・
代謝部部長)

交付決定額(配分額)

(金額単位: 千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成12年度	2,000	0	2,000
平成13年度	1,400	0	1,400
総計	3,400	0	3,400

協同研究者

申請書における研究組織は上記2名となっておりますが、本研究は多くの協同研究者の協力を得て遂行されました。ここに、氏名を記させていただきます。

中尾一和、Laurie J.Goodyear、藤井宣晴、大高 章、西村治男、
伏木 亨、森谷敏夫、榊田 出、井上 元、細田公則、小川佳宏、
益崎裕章、中野雅子、米光 新、宮本理人、豊田太郎、田中早津紀、
佐々木秀樹、浜田 拓

研究発表

(1) 学会誌等

1. Hayashi T, Hirshman MF, Fujii N, Habinowski SA, Witters LA, Goodyear LJ.
Metabolic stress and altered glucose transport: activation of AMP-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism.
Diabetes. 49: 527-31, 2000.
2. Fujii N, Hayashi T, Hirshman MF, Smith JT, Habinowski SA, Kaijser L, Mu J, Ljungqvist O, Birnbaum MJ, Witters LA, Thorell A, Goodyear LJ.
Exercise induces isoform-specific increase in 5'AMP-activated protein kinase activity in human skeletal muscle.
Biochem Biophys Res Commun. 273: 1150-5, 2000.
3. Nakano M, Hayashi T, Yonemitsu S, Masuda I, Masuzaki H, Inoue G, Yoshimasa Y, Nakao K.
Pharmacological activation of 5'AMP-activated protein kinase (AMPK) in vivo acutely decreases blood glucose and chronically increases GLUT4 in normal and diabetic animals.
Diabetes. 49 (Suppl.1): A12, 2000.
4. 林 達也, 中野雅子, 米光 新, 榎田 出, 細田公則, 井上 元, 吉政康直, 中尾一和
運動の糖代謝改善効果発現における AMP キナーゼの役割.
日本臨床分子医学会記録. 37: 36, 2000.
5. 林 達也
生活習慣病の運動療法とインスリン感受性亢進の分子機構.
最新医学. 55: 2525-31, 2000.

6. 林 達也, 中野雅子, 米光 新, 中尾一和
運動による糖輸送活性化の分子機構.
最新医学. 55: 1078-83, 2000.
7. Musi N, Hayashi T, Fujii N, Hirshman MF, Witters LA, Goodyear LJ.
AMP-activated protein kinase activity and glucose uptake in rat skeletal muscle.
Am J Physiol. 280: E677-84, 2001.
8. Yonemitsu S, Nishimura H, Shintani M, Inoue R, Yamamoto Y, Masuzaki H, Ogawa Y, Hosoda K, Inoue G, Hayashi T, Nakao K.
Troglitazone induces GLUT4 translocation in L6 myotubes.
Diabetes. 50: 1093-101, 2001.
9. Shintani M, Nishimura H, Yonemitsu S, Ogawa Y, Hayashi T, Hosoda K, Inoue G, Nakao K.
Troglitazone not only increases GLUT4 but also induces its translocation in rat adipocytes.
Diabetes. 50: 2296-300, 2001.
10. Miyamoto L, Hayashi T, Yonemitsu S, Nakano M, Masuda I, Ogawa Y, Hosoda K, Inoue G, Nakao K.
Effects of 5'AMP-activated protein kinase (AMPK) activation on glycogen regulation in skeletal muscle.
Diabetes. 50(Suppl.2): A61, 2001.
11. Nakano M, Hayashi T, Yonemitsu S, Miyamoto L, Masuda I, Otaka A, Fushiki T, Nakao K.
Alpha 2 isoform-specific activation of 5'AMP-activated protein kinase (AMPK) stimulates glucose transport and GLUT4 expression in mouse skeletal muscle.
Diabetes. 50(Suppl.2): A224, 2001.

12. Yonemitsu S, Hayashi T, Nakano M, Miyamoto L, Masuda I, Otaka A, Nakao K.
Thiazolidinediones directly stimulate glucose transport via insulin-independent mechanism in rat skeletal muscle.
Diabetes. 50(Suppl.2): A273, 2001.
13. 林 達也, 中野雅子, 米光 新
5' AMP-activated protein kinase を基準とした糖代謝改善のための新しい運動プログラムの開発.
健康医科学研究助成論文集. 16: 132-141, 2001.
14. 林 達也, 中尾一和
運動不足とインスリン抵抗性.
臨床成人病. 31: 1037-1043, 2001.
15. 林 達也, 中野雅子, 米光 新
運動による糖代謝活性化の分子機構に基づいた新しい運動プログラムの開発.
デサントスポーツ科学. 22: 31-40, 2001.
16. 林 達也, 中野雅子, 米光 新, 中尾一和
5' AMP-activated protein kinase を基準とした糖代謝改善のための新しい運動処方の研究.
(財)中富健康科学振興財団 第12回研究助成業績集. 62-65, 2001.
17. 林 達也, 中野雅子, 米光 新
5' AMP-activated protein kinase を基準とした糖代謝活性化のための新しい動処方の研究.
平成11年度研究報告書 (財)総合健康推進財団. 93-105, 2002.

18. 林 達也
運動の血糖降下メカニズムに基づいた新しい抗糖尿病薬.
医科学研究応用研究財団研究報告. 19: 230-235, 2002.

(2) 学会発表

1. 林 達也, 中尾一和
運動における AMP キナーゼの意義.
第 1 回 Aging Science Forum (京都市), 2000. 4. 8.
2. 中野雅子, 林 達也, 米光 新, 榊田 出, 益崎裕章, 小川佳宏, 細田公則, 井上 元, 吉政康直, 中尾一和
運動によるインスリン感受性改善における 5' AMP-activated protein kinase の役割～正常および糖尿病モデルマウスにおける検討.
第 43 回日本糖尿病学会年次学術集会 (名古屋市), 2000. 5. 25-27.
3. Nakano M, Hayashi T, Yonemitsu S, Masuda I, Masuzaki H, Inoue G, Yoshimasa Y, Nakao K.
Pharmacological activation of 5'AMP-activated protein kinase (AMPK) in vivo acutely decreases blood glucose and chronically increases GLUT4 in normal and diabetic animals.
American Diabetes Association 60th Scientific Sessions (San Antonio, Texas), 2000. 6. 9-13.
4. 中野雅子, 林 達也, 米光 新, 榊田 出, 益崎裕章, 小川佳宏, 細田公則, 井上 元, 吉政康直, 中尾一和
運動による糖代謝活性化の分子機構～5' AMP キナーゼのシグナル伝達分子としての可能性.
第 73 回日本内分泌学会学術総会 (京都市), 2000. 6. 16-18.

5. 米光 新, 西村治男, 新谷光世, 中野雅子, 益崎裕章, 小川佳宏, 林 達也, 細田公則, 井上 元, 吉政康直, 中尾一和
培養骨格筋細胞 (L6) におけるチアゾリジン誘導体の糖取り込みに及ぼす影響.
第 73 回日本内分泌学会学術総会 (京都市), 2000. 6. 16-18.
6. 佐々木秀樹, 林 達也, 中尾一和, 森谷敏夫
筋電気刺激を利用した生活習慣病治療の可能性.
第 55 回日本体力医学会大会 (富山県), 2000. 9. 20-22.
7. 佐々木秀樹, 中村英夫, 林 達也, 中尾一和
筋電気を利用した他動的運動によるエネルギー・糖代謝活性化.
第 37 回日本糖尿病学会近畿地方会 (滋賀県), 2000. 11. 18.
8. 林 達也
創薬ターゲットとしての細胞一筋肉細胞.
第 13 回メディカルサイエンスセミナー 次世代の糖尿病治療を考える (東京都), 2001. 1. 23.
9. 米光 新, 林 達也, 宮本理人, 中野雅子, 榊田 出, 小川佳宏, 細田公則, 井上 元, 中尾一和
成熟骨格筋におけるチアゾリジン誘導体のインスリン非依存性糖輸送促進作用.
第 44 回日本糖尿病学会年次学術集会 (京都市), 2001. 4. 16-18.
10. 林 達也, 中野雅子, 米光 新, 宮本理人, 榊田 出, 小川佳宏, 細田公則, 井上 元, 中尾一和
運動による 5' AMP-activated protein kinase (AMPK) の選択的 $\alpha 2$ isoform 活性化の臨床的意義.
第 44 回日本糖尿病学会年次学術集会 (京都市), 2001. 4. 16-18.

11. 宮本理人, 林 達也, 米光 新, 中野雅子, 栢田 出, 小川佳宏, 細田公則, 井上 元, 中尾一和
5' AMP-activated protein kinase (AMPK) 活性化による骨格筋 glycogen 制御への影響.
第 44 回日本糖尿病学会年次学術集会 (京都市), 2001. 4. 16-18.
12. 佐々木秀樹, 中村英夫, 林 達也, 中尾一和, 森谷敏夫
筋電気刺激を利用した他動的筋収縮による糖・エネルギー代謝の活性化.
第 44 回日本糖尿病学会年次学術集会 (京都市), 2001. 4. 16-18.
13. Miyamoto L, Hayashi T, Yonemitsu S, Nakano M, Masuda I, Ogawa Y, Hosoda K, Inoue G, Nakao K.
Effects of 5'AMP-activated protein kinase (AMPK) activation on glycogen regulation in skeletal muscle.
American Diabetes Association 61th Scientific Sessions (Philadelphia, Pennsylvania), 2001. 6. 22-26.
14. Nakano M, Hayashi T, Yonemitsu S, Miyamoto L, Masuda I, Otaka A, Fushiki T, Nakao K.
Alpha 2 isoform-specific activation of 5'AMP-activated protein kinase (AMPK) stimulates glucose transport and GLUT4 expression in mouse skeletal muscle.
American Diabetes Association 61th Scientific Sessions (Philadelphia, Pennsylvania), 2001. 6. 22-26.
15. Yonemitsu S, Hayashi T, Nakano M, Miyamoto L, Masuda I, Otaka A, Nakao K.
Thiazolidinediones directly stimulate glucose transport via insulin-independent mechanism in rat skeletal muscle.
American Diabetes Association 61th Scientific Sessions (Philadelphia, Pennsylvania), 2001. 6. 22-26.

16. 米光 新, 林 達也, 宮本理人, 中野雅子, 益田 出, 小川佳宏, 細田公則, 井上 元, 中尾一和
成熟骨格筋におけるロジグリタゾンの糖輸送促進作用.
第74回日本内分泌学会学術総会 (横浜市), 2001. 6. 29-7.1.
17. 中野雅子, 林 達也, 米光 新, 宮本理人, 榊田 出, 小川佳宏, 細田公則, 井上 元, 中尾一和
運動による糖代謝活性化における 5' AMP-activated protein kinase (AMPK) α 2 isoform の意義.
第74回日本内分泌学会学術総会 (横浜市), 2001. 6. 29-7.1.
18. 林 達也
運動による骨格筋糖輸送活性化の分子機構～AMP キナーゼ説の提唱 (長野県).
第7回成人病の病因・病態の解明に関する研究会 (TMFC), 2001. 7. 7-8.
19. 林 達也
インスリン抵抗性の分子・細胞レベルの機序と運動による改善のメカニズム.
第2回埼玉心臓リハビリテーションセミナー (埼玉県). 2001. 8. 11-12.
20. 浜田 拓, 林 達也, 大島秀武, 森谷敏夫
表面電気刺激法によるエネルギー代謝の亢進.
第4回日本電気生理運動学会 (JSEK) (新潟県) 2001. 10. 5-6.

(3) 出版物

1. 林 達也, 中野雅子, 米光 新
運動による糖輸送促進の機構.
分子糖尿病学の進歩 基礎から臨床まで (矢崎義雄 監修) (金原出版 東京) :178-83, 2000.

2. 糖尿病治療研究会 (林 達也他共著者 11 名)
新版糖尿病運動療法の手引き (医歯薬出版 東京) : 2001.

研究 成 果

実験方法および結果の概要

1 筋収縮による AMPK 活性化とインスリン非依存性糖輸送の関連の検証

1-1 ラットトレッドミル運動における検討 (添付論文 1 参照)

動物に実際に運動を行わせて、生理的な筋収縮における AMPK 活性化と糖輸送との関連を検討した。AMPK は α 、 β 、 γ からなる 3 量体で、活性サブユニットの α サブユニットには $\alpha 1$ と $\alpha 2$ の 2 つのアイソフォームが存在する³。 $\alpha 1$ は広く全身の組織に分布、 $\alpha 2$ は骨格筋と心筋・肝臓に多く発現している。本研究では $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ アイソフォーム別に AMPK 活性を測定し糖代謝過程との関連を検討した。

方法 :

雄性 SD ラットを、安静群、中強度運動群、高強度運動群の 3 グループに分け、中強度運動群は 18m/min、高強度運動群は 32m/min の速度で傾斜 10% のトレッドミル上を 60 分間走らせた。運動終了直後に epitrochlearis 筋を単離し、片方の epitrochlearis 筋を用いて AMPK 活性測定を、もう一方の筋を用いて糖取り込み率 (糖輸送活性) を測定した。

成績 :

AMPK 活性については AMPK $\alpha 2$ 活性が運動強度に相関して亢進した。一方、AMPK $\alpha 1$ 活性には上昇傾向を認めたものの有意の変化を認めなかった。糖取り込み率は AMPK $\alpha 2$ 活性に相関して亢進した。同様の検討をマウス下肢筋において 30 分間の水泳運動を用いて行ったところ、ラットトレッドミル運動と同様 AMPK $\alpha 2$ のみの亢進を認め、AMPK $\alpha 1$ には変化がなかった (data not shown)。以上の結果より、AMPK $\alpha 2$ の活性化が生理的運動時の糖輸送促進に関与することが示唆された。

1-2 ヒト持久運動 (自転車運動) における検討 (添付論文 2 参照)

ヒトにおいて骨格筋糖輸送が促進する 70%VO₂max 強度の持久運動によって、AMPK $\alpha 2$ が活性化を受けるかを検討した。

方法 :

7 名の健常人 (男性 4 名、女性 3 名) に自転車エルゴメータを用いて 50~70%VO₂max の強度で 60 分間運動を行った。外側広筋の針生検を運動前、運動開始後 20 分、運動終了時、終了後 30 分に行い AMPK 活

性を測定した。

成績：

70%VO₂max 強度の自転車運動によって、AMPK α 2 活性は運動開始 20 分後までに安静時の 2 倍、60 分後には 2.5 倍に増加した。また運動終了 30 分後においても約 2 倍と高値を維持。一方、AMPK α 1 活性は、ラットトレッドミル運動、マウス水泳運動と同様、安静時との有意差を認めなかった。50%VO₂max 強度では AMPK α 1・ α 2 とともに活性化が認められなかった。以上より、ヒトにおいても AMPK α 2 活性化が運動時の糖輸送促進に関与することが示唆された。

1-3 ラット単離骨格筋における検討 (添付論文 1 参照)

筋収縮に伴う AMPK 活性と糖輸送活性の関連につき、ラット骨格筋を単離し緩衝液中で電気刺激する実験系^{4,5}を用いて検討した。この系を用いることにより、生体における神経性因子や血流、体液性因子の影響を除いて収縮と AMPK との関連を検討することが可能であった。

方法：

ラット epitrochlearis 筋を単離し筋保持装置に懸架した後、2mM ピルビン酸添加 Krebs 緩衝液中でインキュベートした。収縮は緩衝液中で電気刺激 (train rate: 1/min, train duration: 10 sec, pulse rate 100 pps, volts: 100 V) により強縮 (テタヌス) を惹起した。収縮終了後に AMPK 活性と糖輸送活性を測定した。

成績：

電気刺激によって最大収縮を惹起すると、 α 2 のみならず α 1 アイソフォームの活性化が認められた。

筋収縮に伴う AMPK 活性と糖取り込み率の相関：筋への糖取り込み率は収縮回数の増加とともに亢進し、10 回の収縮でピークとなり、それ以上の収縮回数でさらなる亢進は認めなかった。AMPK 活性は AMPK α 1、AMPK α 2 とも糖取り込み活性と相関して増加し、10 回以上の収縮では頭打ちとなった。

筋収縮後の AMPK 活性と糖取り込み率：10 回の収縮終了後もインキュベーションを続け AMPK 活性と糖取り込み活性の低下を追跡した。AMPK 活性は α 1、 α 2 とともに急速に活性が低下したが ($t_{1/2}=8$ min)、糖取り込み率は緩やかに減少し、収縮終了 60 分後においても 40% の減少にとどまった。

1-4 AMPK 阻害剤を用いた検討 (添付論文 1 参照)

AMPK を薬理的に阻害して骨格筋糖輸送が阻害を受けるかを検討した。

方法 :

8bromoAMP, iodotubercidin, cytosine arabinoside、を 1・3 で使用したラット単離骨格筋のインキュベーション系に添加し、電気収縮刺激 (強縮) を負荷して AMPK 活性と糖取り込み率を測定した。

成績 :

8bromoAMP は筋収縮による AMPK $\alpha 2$ 活性化を 40% 抑制するとともに、3MG 取り込み率の亢進を 30% 抑制し、 $\alpha 2$ と糖輸送との相関を示唆した。Iodotubercidin, cytosine arabinoside については AMPK 活性化剤 AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside)³ による AMPK 活性化は抑制したが、筋収縮による AMPK $\alpha 2$ 活性化を抑制しなかった。いずれの薬剤も AMPK $\alpha 1$ の活性化は阻害しなかった。

2 AMPK 活性化剤 AICAR による選択的 AMPK $\alpha 2$ の活性化

2-1 AICAR による選択的 AMPK $\alpha 2$ 活性化と糖輸送促進

ヒトや動物の生理的持久運動によって AMPK $\alpha 2$ のみが活性化を受けたことから、薬理的に AMPK $\alpha 2$ のみを活性化して、持久運動時と同様に骨格筋糖輸送が促進するかを検討した。

方法 :

AMPK 活性化剤として AICAR を用いた。AICAR は筋細胞に取り込まれ、アデノシンキナーゼによって 1 リン酸化物 (ZMP) となり、これが AMP 様の作用を示すことにより AMPK を活性化する³。AMPK $\alpha 2$ は AMPK $\alpha 1$ に比して AMP 依存性が高いことから⁶、AICAR を至適量投与することで AMPK $\alpha 2$ のみを活性化することが可能と考えられた。基礎検討の結果、C57B6J マウスに対して 250mg/kg 体重を皮下投与または腹腔内投与すると、後肢筋において AMPK $\alpha 1$ を変化させずに AMPK $\alpha 2$ のみを活性化した。

成績 :

AICAR 250 mg/kg 皮下投与 30-60 分後に下肢筋の AMPK $\alpha 2$ 活性は非投与時の 2 倍に亢進した (Fig.1a)。このとき soleus 筋の糖取り込み率は非投与時の 1.5 倍に亢進した (Fig.1b)。血糖値は投与前に比し投与 30-60 分後に約 50% の低下が認められた (132 ± 4 vs. 66 ± 5 mg/dl, $P < 0.05$)。AICAR 腹腔内投与においても、同様に下肢筋の AMPK 活性は $\alpha 2$ のみ

の亢進が認められた (data not shown)。

2-2 AICAR 反復投与による GLUT4 の発現亢進

運動トレーニング (反復運動) を行うと骨格筋の GLUT4 蛋白量が増加することが知られており、糖輸送活性の増大やインスリン感受性亢進に寄与する可能性が示唆されている^{1,2}。本研究では AMPK $\alpha 2$ 活性化が骨格筋 GLUT4 増加に関与するかを検討した。

方法：

AICAR 250mg/kg をマウスに 1 日 3 回、最長 7 日間反復腹腔投与し、 $\alpha 2$ の反復活性化に伴う骨格筋 GLUT4 蛋白量の変化と耐糖能の変化を検討した。

成績：

AICAR 反復投与を 4-7 日間行うと、骨格筋 GLUT4 蛋白量が下肢筋で約 1.5 倍に増加した (Fig.2)。しかしながら、AICAR 投与 7 日後に施行したインスリン負荷試験 (1.2U/kg 腹腔注射)、ブドウ糖負荷試験 (2g/kg 腹腔注射) において耐糖能の改善を認めず、空腹時血糖値・随時血糖値にも変化を認めなかった (data not shown)。

3 筋収縮によるグリコーゲン分解系・合成系の亢進と AMPK 活性

運動は骨格筋のグリコーゲン代謝を強力に活性化する。筋収縮に伴って、グリコーゲン合成系と分解系が同時に亢進し、筋のエネルギー需要に応じてグリコーゲン合成と分解のバランスが決定される。本研究では、AICAR によって AMPK を活性化し、これらの反応に AMPK が関与するかどうかを検討した。

方法：

単離 epitrochlearis 筋を 2mM ピルビン酸添加 Krebs 緩衝液中でインキュベートし、電気刺激 (train rate: 1/min, train duration: 10 sec, pulse rate 100 pps, volts: 100 V)、2 mM AICAR 40 分、1 μ M インスリン 40 分の刺激を加えた後サンプルを液体窒素にて凍結し、glycogen synthase を測定した。また、グリコーゲン分解系については、筋を電気刺激、2 mM AICAR 40 分、3 μ g/ml epinephrine 40 分刺激の後、glycogen phosphorylase を測定した。

成績：

電気収縮に伴い glycogen synthase、glycogen phosphorylase がともに顕著に活性化された。Glycogen synthase はインスリンによっても、また glycogen phosphorylase は epinephrine によっても顕著に活性化された。

しかし、AICAR は glycogen synthase、glycogen phosphorylase とともに活性化しなかった。逆に glycogen synthase は AICAR によって抑制を受けるとともに、AICAR はインスリンによる glycogen synthase の活性化も抑制した (Fig.3)。AICAR は AMPK を顕著に活性化したことから、運動による AMPK 活性化は運動時のグリコーゲン合成や分解の促進には主要な役割をもたないものと考えられた。しかし、AICAR が glycogen synthase を抑制したことから、AMPK がグルコースからグリコーゲンへの変換反応を抑制し、間接的にエネルギー (ATP) 産生を促進する役割を持つことが示唆された。

4 チアゾリジン誘導体による骨格筋 AMPK 活性化と糖輸送の亢進

従来チアゾリジン誘導体については、その主な作用点が脂肪細胞に存在する peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ ⁷ であり、脂肪細胞への作用を会して全身レベルでのインスリン感受性を改善するものと考えられてきた。しかしながら、研究代表者らは骨格筋培養細胞 (L6) を用いた検討で、チアゾリジンが直接に骨格筋細胞に作用して糖輸送を促進する作用を有することを明らかにし、AMPK が関与する可能性についても検討した (添付論文 3 参照)。本研究ではラット骨格筋にチアゾリジン誘導体を作用させて AMPK 活性とインスリン非依存性糖輸送との関連を検討した。

方法 :

単離したラット soleus 筋を α MEM 培地中にてインキュベーションし、チアゾリジン誘導体の rosiglitazone を培地中に添加 ($0 \sim 10^{-5}$ M, $0 \sim 18$ 時間) の後、インスリン非存在下で AMPK と糖取りこみ率を測定した。

成績 :

Rosiglitazone は時間・濃度依存性にインスリン非依存性糖輸送を活性化した (Fig.4)。また rosiglitazone は AMPK $\alpha 2$ 活性を選択的に亢進させるとともに ($P < 0.05$)、筋肉中のクレアチンリン酸濃度が低下し ($P < 0.05$) 生理的な運動と類似の反応を示した。

考 案

収縮時の骨格筋細胞は、カルシウムや AMP/ATP、pH、酸化還元状態の変化、細胞骨格の収縮と伸張など多様な代謝的・機械的变化にさらされており、これらのいずれもが GLUT4 translocation を惹起するシグナル伝達に關与する可能性がある。しかし、運動強度が高く運動時間が長いほど運動筋への糖輸送が亢進すること、活動筋のエネルギー状態の低下 (ATP、クレアチンリン酸、グリコーゲンの減少) に応じて糖輸送活性が亢進することから、運動筋のシグナル伝達は、消費したエネルギーを補償するための基質供給プロセスと關連する可能性が推測されてきた。

1998 年、代表研究者らはラット骨格筋を用いて、AICAR によって惹起される糖輸送が運動による糖輸送と同様にインスリン非依存性・PI3 キナーゼ非依存性であることを明らかにし、AMPK が骨格筋糖輸送の制御に關与する可能性を世界に先駆けて提唱した⁵。AMPK は AMP : ATP 比やクレアチン : クレアチンリン酸比の上昇に關して活性化を受けることから、細胞のエネルギー状態の低下に反応して活性化を受ける「エネルギーセンサー」としての役割が示唆されている³。実際、代表研究者らは運動のみならず、低酸素、酸化的リン酸化の薬理阻害、浸透圧による細胞ストレスなどによって筋細胞のエネルギー状態を低下させても、AMPK 活性と糖輸送活性が關して亢進することを明らかにした⁴。これらの観察は、AMPK が、低下した筋細胞のエネルギー状態を感知して、糖輸送というエネルギー基質供給反応を促進するシグナル伝達分子であることを示唆するものである。

今回の研究では、ラットの単離骨格筋の電気収縮、ラットトレッドミル運動、マウス水泳運動、において AMPK $\alpha 2$ 活性が運動強度・運動時間に応じて亢進し、糖輸送活性との間に顕著な相関が認められた。ヒトにおいても、GLUT4 トランスロケーションを惹起することが知られている 70%VO₂max の持久運動⁸によって AMPK $\alpha 2$ が顕著に活性化された。また、AMPK 活性化剤 AICAR の至適量の生体投与によって AMPK $\alpha 2$ のみを活性化すると、運動時と同様に骨格筋糖輸送活性が亢進し血糖値が低下した。ラット単離骨格筋を 8bromoAMP 存在下で電気収縮させると AMPK $\alpha 2$ 活性と糖輸送活性が同時に抑制された。これらの成績は、運動によるインスリン非依存性糖輸送における骨格筋 AMPK $\alpha 2$ の重要性を示唆するとともに、骨格筋 AMPK $\alpha 2$ の活性化を促進する薬剤が運動の効果を模倣した新しい抗糖尿病薬となりうる可能性を示唆するものである。

筋収縮によりグリコーゲン分解系・合成系がともに活性化されたが、AICAR による薬理的活性化では分解系・合成系ともに活性化されなかった。このことから、AMPK は運動による骨格筋糖輸送促進には關与するが、運動によるグリコーゲン代謝における積極的な役割を持たないことが示唆された。しかし、

AICAR が glycogen synthase を抑制したことは、AMPK がグルコースからグリコーゲンへの変換を抑制して解糖系での糖利用を促進し、間接的に ATP 産生を促進する役割を持つことを示唆するものである。

単離骨格筋の電気収縮系において AMPK $\alpha 2$ のみならず AMPK $\alpha 1$ が活性化を受けたが、これは電気刺激によって惹起される収縮強度が極度に高いためと考えられる。実際、ヒトにおいても 30 秒間で疲労困憊に至るきわめて強度の高い運動を行うと $\alpha 2$ のみならず $\alpha 1$ も活性化を受けることが報告されている⁹。AMPK の活性化にはアロステリック修飾と上流分子 (AMPK キナーゼ) によるリン酸化との 2 種類の異なったメカニズムが知られており、そのいずれの過程も AMP 依存性である³。近年、 $\alpha 2$ は $\alpha 1$ に比して高い AMP 依存性を有することが明らかにされたが⁶、この AMP 依存性の差が、 $\alpha 2$ が運動に反応して優先的に活性化される機序の 1 つと考えられる。

AMPK の糖輸送への関与の検証には、AMPK の特異的阻害剤によって糖輸送が抑制されるかを検討するのが有力である。今回の検討で用いた 3 種の薬剤のうち iodotubercidin と cytosine arabinoside は筋収縮による AMPK 活性化を阻害しなかった。8bromoAMP は不完全ながら活性の抑制を認め、同時に糖輸送活性の抑制を認めた。しかし、8bromoAMP の阻害機序については不明であり、AMPK を介さない非特異的な活性抑制の可能性につき今後の検討が必要である。

AICAR のマウス生体投与による選択的 AMPK $\alpha 2$ 活性化に伴って血糖値が低血糖レベルまでに低下した。血糖値の低下には骨格筋糖輸送亢進の寄与が大きいものと考えられるが、マウスにおいて AICAR が肝臓からの糖新生を抑制することが報告されていることから¹⁰、本実験にて認められた血糖降下は骨格筋糖輸送亢進と肝からの糖放出抑制との両方の作用によるものであることが推察される。一般に運動時には肝臓からの糖放出が亢進するため、AICAR は肝糖放出に対しては運動と逆方向の作用を有することになる。

単離筋を電氣的に収縮させた後、AMPK 活性は急速に低下する一方で糖輸送活性は長時間維持された。このことは、AMPK 活性が糖輸送促進に重要な役割を有する一方で、糖輸送活性の維持には AMPK 活性が必要でないことを示唆するものである。運動後の糖輸送の持続は筋の細胞膜上に GLUT4 が継続してトランスロケーションするためと考えられるが¹¹、AMPK 活性化剤によって促進された糖輸送促進がどの程度の時間維持されるかは今後の検討課題である。

AICAR の反復投与によって骨格筋 GLUT4 が顕著に増加した。これは運動トレーニングを繰り返し行った場合に観察される現象と一致し¹²、すでに同様の現象が報告されている¹²。骨格筋 GLUT4 の増加は運動がインスリン感受性を亢進させる 1 つの要因であり、AMPK の活性化がインスリン非依存性糖輸送のみならずインスリン感受性の亢進にも関与するシグナル伝達分子であることを示唆するものである。しかし、今回の実験では、AICAR の 7 日間の反復投与後に

行った糖負荷試験やインスリン負荷試験において耐糖能の改善は確認できなかった。近年、マウスにおいて骨格筋のインスリン感受性が必ずしも全身レベルのインスリン感受性に反映されない場合が報告されているので¹³、今後引き続き骨格筋レベルでインスリン感受性について検討を行う予定である。また、本研究で用いた動物は耐糖能が正常の動物であったので、今後インスリン感受性の低下した糖尿病モデル動物を用いた検討を計画している。

本研究では、インスリン感受性改善剤として糖尿病治療に臨床応用されているチアゾリジン誘導体が、運動に類似する効果を有すること、すなわち骨格筋に直接に作用しインスリン非依存性糖輸送を促進するとともに、その作用に AMPK $\alpha 2$ が関与する可能性を明らかにした。本研究の成果は新たな薬理作用の存在を提唱するとともに、今後の抗糖尿病薬創薬への示唆を与えるものである。

結 語

運動が糖代謝を活性化させる分子メカニズムの解明は、学術的意義を有するにとどまらず、より効率的な抗糖尿病運動プログラムの確立や、運動の効果を模倣した新しい作用機序の抗糖尿病薬の創薬につながる可能性など予防医学・治療医学への応用が期待される。本研究の成績は、AMPK が運動によって惹起されるインスリン非依存性糖輸送や GLUT4 発現を活性化し、運動による糖代謝・糖利用を促進する役割を担うシグナル伝達分子である可能性を強く示唆するものである (Fig.5)。生理的運動において AMPK $\alpha 2$ が選択的に活性化を受けること、逆に、薬理的な $\alpha 2$ 活性化によってインスリン非依存性糖輸送と GLUT4 発現増加が認められることは、生体における AMPK $\alpha 2$ の重要性を明示している。現在我々は動物の骨格筋に AMPK $\alpha 2$ を発現させる、あるいは $\alpha 2$ の作用を減弱させる遺伝子操作を加えた動物モデルの作成に着手しており、今後はそのモデルを用いてさらに運動時の AMPK 活性化の役割についての詳細を検討して行く予定である。

Fig.1a

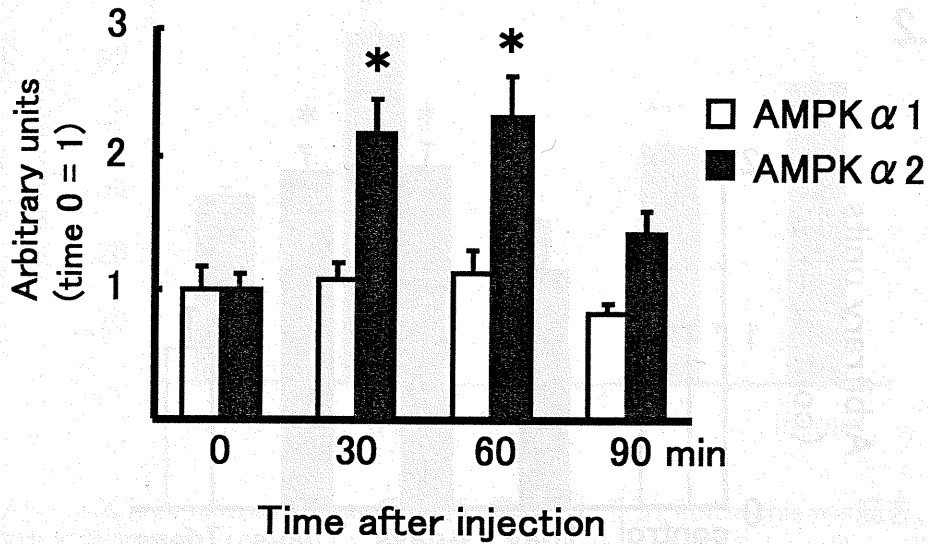
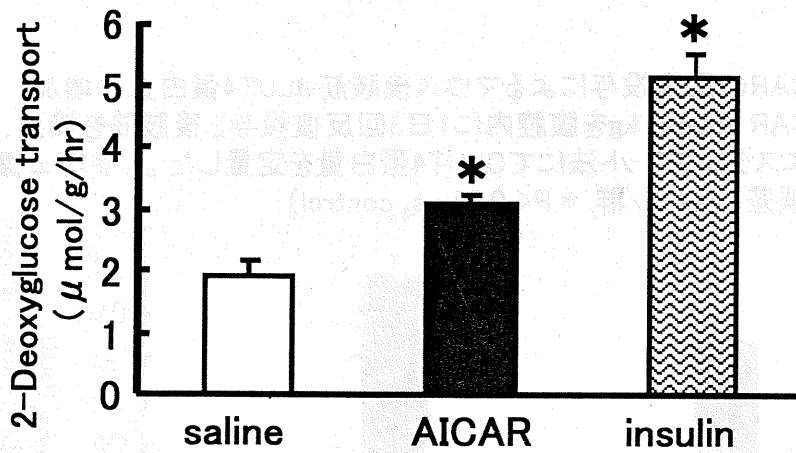


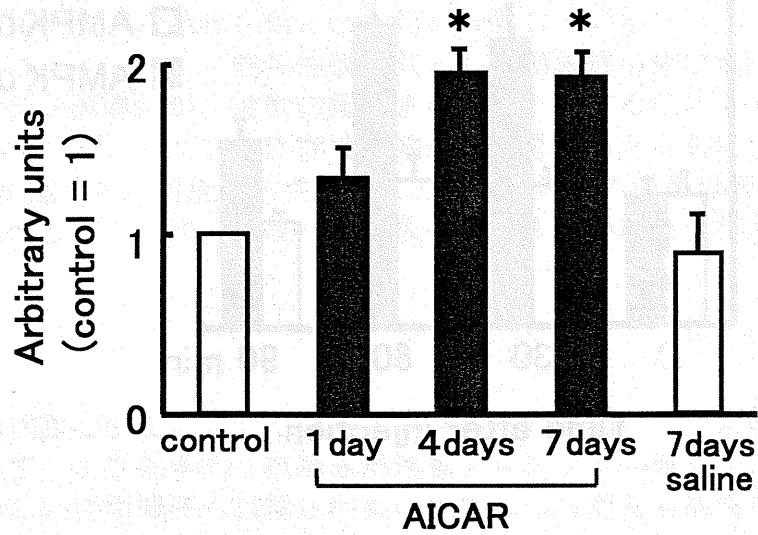
Fig.1b



a: AICAR (250mg/kg皮下投与)によるマウス後肢筋AMPK α 2の選択的活性化:
AICAR 250mg/kgを皮下投与し、0、30、60、90分後に後肢筋を摘出しAMPK活性を測定した。(平均 \pm 標準誤差、n=4-5/群。* P<0.05 vs. 0 min group)

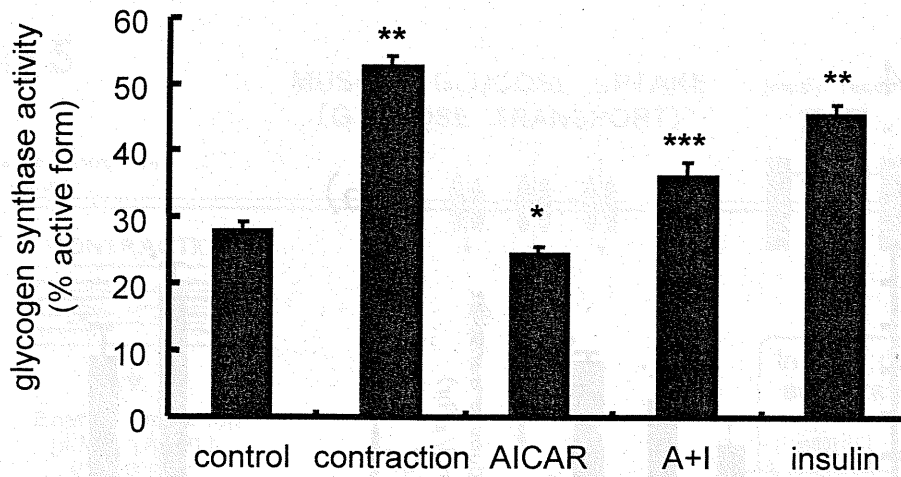
b: マウスsoleus筋における糖取り込み率:生理食塩水、AICAR (250mg/kg)、insulin (5 単位)を皮下注射し、30分後にsoleus筋を摘出し2-deoxyglucose取り込み率を測定した。(平均 \pm 標準誤差、n=4-5/群。* P<0.05 vs. saline group)

Fig.2



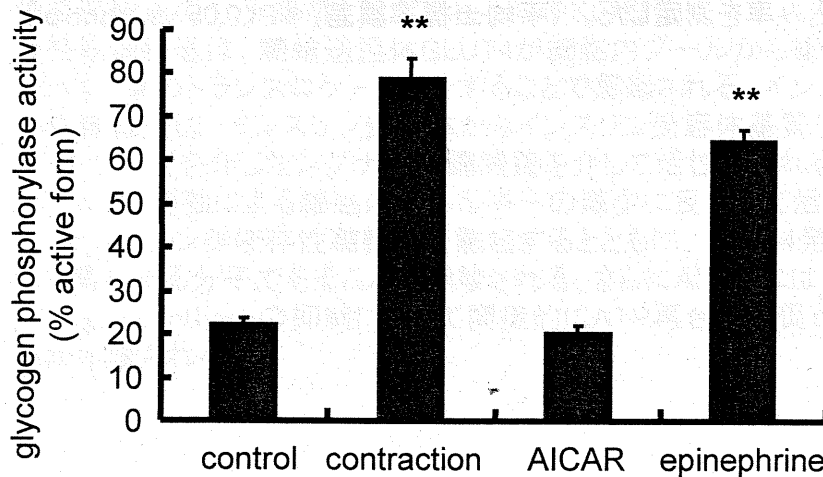
AICARの反復投与によるマウス後肢筋GLUT4蛋白量の増加:
AICAR 250mg/kgを腹腔内に1日3回反復投与し後肢筋を摘出、
ウエスタンブロット法にてGLUT4蛋白量を定量した。(平均±標
準誤差、n=4-5/群.* P< 0.05 vs. control)

Fig.3a



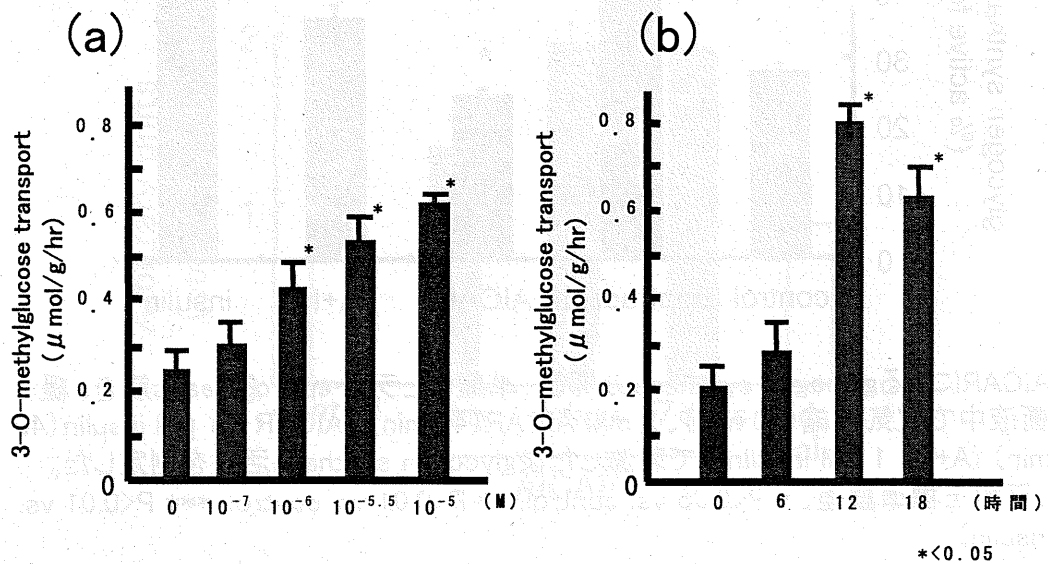
AICARによるglycogen synthaseの抑制: 単離したラットepitrochlearis筋を、緩衝液中で電気収縮(10 min)、2 mM AICAR(40 min)、AICAR+1 μ M insulin(40 min) (A+I)、1 μ M insulinにて刺激した後glycogen synthase活性を測定した。(平均 \pm 標準誤差、* $P < 0.05$ vs. control, ** $P < 0.01$ vs. control, *** $P < 0.01$ vs. insulin)

Fig.3b



AICARはglycogen phosphorylaseを変化させない: 単離したラットepitrochlearis筋を、緩衝液中で電気収縮(10 min)、2 mM AICAR(40 min)、3 μ g/ml epinephrine(40 min)にて刺激した後glycogen phosphorylase活性を測定した。(平均 \pm 標準誤差、** $P < 0.01$ vs. control)

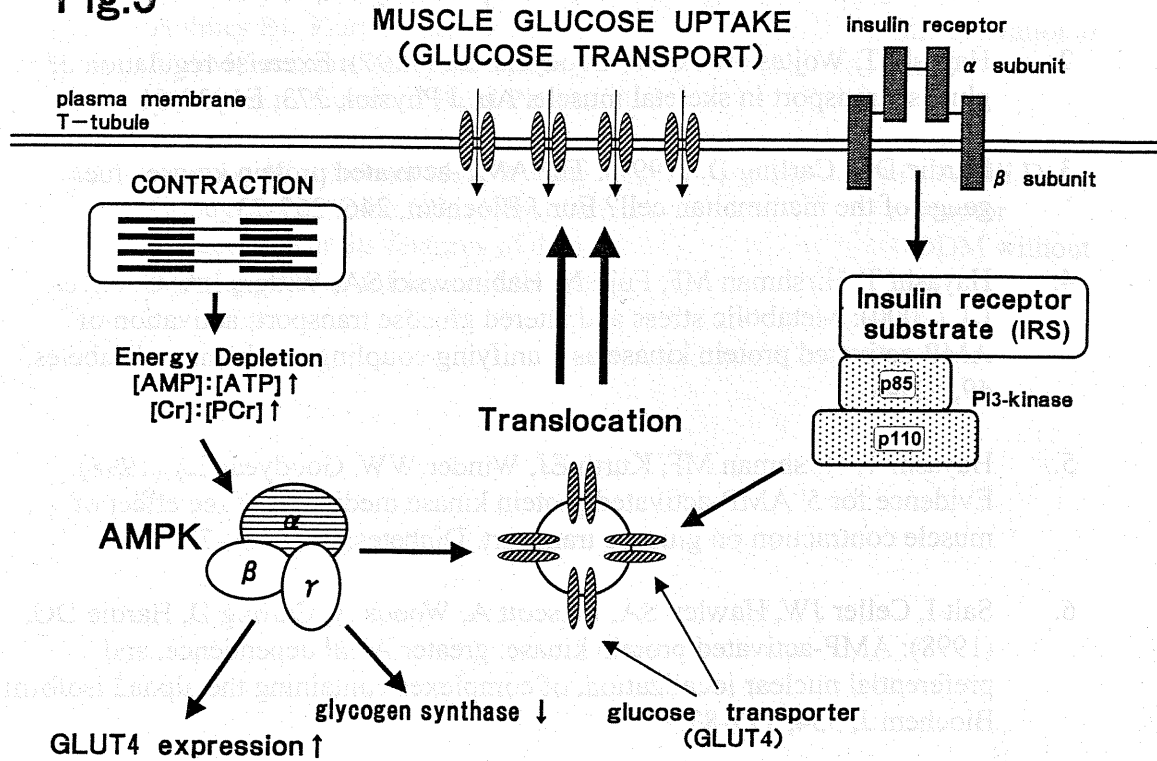
Fig.4



* < 0.05

Rosiglitazoneによるインスリン非依存性糖輸送の促進: 単離したラットsoleus筋をrosiglitazoneを含むαMEM培地中で濃度と時間を変えてインキュベーションした後糖取り込み率を測定した。(平均±標準誤差、* P<0.05 vs. control)

Fig.5



骨格筋輸送の分子機構と想定されるAMPKの役割:

骨格筋糖輸送は、糖輸送担体GLUT4が細胞内プールから細胞膜あるいはT管のトランスロケーションすることで惹起される。インスリン依存性糖輸送は、インスリン受容体からインスリン受容体基質(IRS)、PI3キナーゼを介したシグナル伝達経路を介して活性化される。AMPKは、運動による細胞内エネルギーの減少に反応して活性化され、インスリン非依存性糖輸送を惹起するとともに、GLUT4発現亢進にも関与する分子であることが示唆される。さらにAMPKには、glycogen synthaseの抑制によって間接的にATP再合成を促進する役割が示唆される。

参 考 文 献

1. Hayashi T, Higaki Y, Goodyear LJ. (1999): Exercise regulation of skeletal muscle glucose transport. *Adv Exerc Sports Physiol*, 5, 1-8.
2. Hayashi T, Wojtaszewski JF, Goodyear LJ. (1997): Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. *Am J Physiol*, 273, E1039-51.
3. Hardie DG, Carling D. (1997): The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem*, 246, 259-73.
4. Hayashi T, Hirshman MF, Fujii N, Habinowski SA, Witters LA, Goodyear LJ. (2000): Metabolic stress and altered glucose transport: activation of AMP-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism. *Diabetes*, 49, 527-31.
5. Hayashi T, Hirshman MF, Kurth EJ, Winder WW, Goodyear LJ. (1998): Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. *Diabetes*, 47, 1369-73.
6. Salt I, Celler JW, Hawley SA, Prescott A, Woods A, Carling D, Hardie DG. (1998): AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform. *Biochem J*, 334, 177-87.
7. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. (1995): An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem*, 270, 12953-6.
8. Kennedy JW, Hirshman MF, Gervino EV, Ocel JV, Forse RA, Hoenig SJ, Aronson D, Goodyear LJ, Horton ES. (1999): Acute exercise induces GLUT4 translocation in skeletal muscle of normal human subjects and subjects with type 2 diabetes. *Diabetes*, 48, 1192-7.
9. Chen ZP, McConell GK, Michell BJ, Snow RJ, Canny BJ, Kemp BE. (2000): AMPK signaling in contracting human skeletal muscle: acetyl-CoA carboxylase and NO synthase phosphorylation. *Am J Physiol*, 279, E1202-6.
10. Vincent MF, Erion MD, Gruber HE, Van den Berghe G. (1996): Hypoglycaemic effect of AICAriboside in mice. *Diabetologia*, 39, 1148-55.

1003-1004

11. Goodyear LJ, Hirshman MF, King PA, Horton ED, Thompson CM, Horton ES. (1990): Skeletal muscle plasma membrane glucose transport and glucose transporters after exercise. *J Appl Physiol*, 68, 193-8.
12. Holmes BF, Kurth-Kraczek EJ, Winder WW. (1999): Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. *J Appl Physiol*, 87, 1990-5.
13. Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Horsch D, Accili D, Goodyear LJ, Kahn CR. (1998): A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell*, 2, 559-69.