

(続紙 1)

京都大学	博士（人間・環境学）	氏名	岩中 伸壮
論文題目	Leucine modulates contraction- and insulin-stimulated glucose transport and upstream signaling events in skeletal muscle （筋収縮及びインスリンによる骨格筋糖輸送活性化とそのシグナル伝達におけるロイシンの調節作用に関する研究）		
（論文内容の要旨） 骨格筋における糖代謝の律速反応は、グルコースが細胞膜を通過して細胞内に取り込まれる糖輸送（glucose transport）過程である。生体内での糖輸送を活性化させる主要な生理的刺激として筋収縮とインスリンが知られている。これらの刺激は、骨格筋内に存在する糖輸送担体GLUT4を細胞表面上へトランスロケーションさせることによって糖輸送を活性化する。しかし、筋収縮とインスリンによる糖輸送活性化作用が、どのような生体因子によって調節を受けているかの解明は不十分である。 一方、近年の研究で、分岐鎖アミノ酸（branched-chain amino acid, BCAA）が骨格筋において蛋白質代謝の調節に関与すること、とりわけBCAAの一種ロイシンが蛋白質合成を促進することが明らかにされてきた。しかしながら、ロイシンが糖代謝においてどのような作用を有するかは不明である。そこで本研究では、ロイシンが、筋収縮及びインスリンによる糖輸送活性化に与える影響と、それに関与する分子メカニズムについての検討を行った。 実験方法として、ラットの滑車上筋を単離し、酸素化されたクレブス緩衝液中でインキュベーションする手法を用いた。滑車上筋は薄く平らな骨格筋であり、酸素透過性や薬剤吸収性が良好な実験に適した筋である。生体から筋を単離した実験環境を用いることで、血液循環や体液性因子、神経系、消化器系などの影響を除外して、ロイシンの骨格筋に対する直接的作用を検討することを可能とした。筋収縮は、緩衝液に通電することによって最大収縮（テタヌス収縮）を誘導した。 まず、ロイシン存在下（2mM、30分間刺激）において、テタヌス収縮（刺激時間10秒間/分、10回反復）が骨格筋糖輸送に与える影響を検討したところ、糖輸送速度はロイシン非存在下での筋収縮に比べて24%亢進した。それと並行して、インスリン非依存的糖輸送促進に関わるシグナル伝達分子5' AMP-activated protein kinase（AMPK）の活性指標αサブユニットThr ¹⁷² リン酸化が、ロイシン非存在下に比して有意に亢進した。筋収縮によって活性化されるシグナル伝達分子p70 S6 kinase（p70S6K）の活性指標Thr ³⁸⁹ リン酸化についても、AMPKと同様、ロイシン非存在下に比して有意に亢進した。AMPK活性			

は、細胞内エネルギー状態の低下に反応して亢進するため、エネルギー状態の指標となるアデノシン3リン酸、クレアチンリン酸、グリコーゲン濃度を計測したが、ロイシンによる変化は観察されなかった。また、筋収縮中の張力にもロイシンによる変化は観察されなかった。しかし、AMPKの上流にあってAMPK活性の制御に関わるシグナル伝達分子 Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK) の阻害剤ST0-609を作用させたところ、ロイシンの糖輸送促進作用とAMPKリン酸化促進作用はともに消失した。さらに、p70S6Kの阻害剤ラパマイシンを筋に作用させたところ、ロイシンによる糖輸送促進作用とAMPKリン酸化促進作用はともに消失した。

次に、ロイシン存在下（2mM、30分間刺激）において、インスリン（1 μ M）が骨格筋糖輸送に与える影響を検討したところ、糖輸送速度はロイシン非存在下に比べて33%抑制された。これと並行して、インスリン依存的糖輸送活性促進に関わるシグナル伝達分子Aktの活性指標Ser⁴⁷³リン酸化は、ロイシン非存在下に比して有意に抑制された。さらに、Aktの上流分子insulin receptor substrate 1（IRS1）のAkt抑制性リン酸化（Ser^{636/639}）も、ロイシン非存在下に比して有意に亢進した。また、インスリンによるp70S6KのThr³⁸⁹リン酸化についても、ロイシン非存在下に比して有意に亢進した。一方、ラパマイシンを筋に作用させたところ、ロイシンによる糖輸送抑制作用と、Akt Ser⁴⁷³リン酸化抑制作用、IRS1 Ser^{636/639}リン酸化亢進作用はいずれも消失した。

以上の結果より、ロイシンは筋収縮による糖輸送活性化に対しては促進的調節を、逆に、インスリンによる糖輸送活性化に対しては抑制的調節を示すことが明らかになった。さらに、筋収縮に対する作用にはCaMKKを介したAMPK活性亢進が、インスリンに対する作用にはIRS1の抑制性リン酸化を介したAkt活性の低下が関与することが示唆された。これらのロイシンの作用がすべてラパマイシンによって消失したことから、ロイシンによる糖代謝調節には、p70S6Kを介したシグナル伝達が重要な役割を果たしていることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

骨格筋は体内最大の糖代謝器官であり、その代謝速度は、代謝調節ホルモンであるインスリンや、身体活動に伴う筋収縮に反応して促進される。骨格筋における糖代謝の律速段階は、グルコースが筋細胞膜を通過して細胞内に取り込まれる糖輸送 (glucose transport) である。骨格筋が収縮すると、あるいは骨格筋にインスリンが作用すると、糖輸送担体GLUT4が筋細胞表面上へトランスロケーションし、細胞外液中のグルコースが細胞内に流入する。近年、分岐鎖アミノ酸 (branched-chain amino acid, BCAA)、とくにBCAAの一種ロイシンが、シグナル伝達分子mTORを介して蛋白質合成促進作用を発揮するメカニズムが明らかにされてきた。しかしながら、これまでロイシンの糖代謝における役割はほとんど明らかにされてこなかった。そこで申請者は、本研究において、ロイシンが筋収縮及びインスリンによる糖輸送活性化に与える影響とその分子メカニズムについての検討を行った。

申請者は、実験方法として、ラットの滑車筋を単離し、緩衝液中でインキュベーションする手法を用いた。筋収縮については、緩衝液に通電することによって最大収縮であるテタヌス収縮を誘導した。生体から筋を単離した実験系を用いることは、血液循環や体液性因子、神経系、消化器系などの影響を除外して、ロイシンの骨格筋に対する作用を定量的に検討することを可能とした。

申請者は、まず、ロイシンが筋収縮による骨格筋糖輸送活性化に与える影響を検討した。その結果、筋収縮時の糖輸送速度が、ロイシンの存在によって亢進することを見いだした。さらに、糖輸送に促進的に作用するシグナル伝達分子5' AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性指標である α サブユニットThr¹⁷²リン酸化が亢進することを見いだした。また、筋収縮によって活性化を受けるシグナル伝達分子p70 S6 kinase (p70S6K) の活性指標であるThr³⁸⁹リン酸化についても、ロイシンによって亢進することを示した。一般に、AMPKは細胞内エネルギー状態の変化によって活性調節を受けることが知られているが、ロイシンは、アデノシン3リン酸などエネルギー状態を示す指標に有意の変化を与えなかった。一方、エネルギー状態に依存せずにAMPK活性の調節に関わるとされるCa²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK)の阻害剤ST0-609を筋に作用させると、ロイシンの糖輸送促進作用とAMPKリン酸化促進作用はともに消失した。また、p70S6Kの阻害剤であるラパマイシンを作用させても、ロイシンによる糖輸送促進作用とAMPKリン酸化促進作用はともに消失した。

次に申請者は、ロイシンがインスリンによる骨格筋糖輸送活性化に与える影響を検討した。その結果、筋収縮とは逆に、ロイシンの存在によってイン

スリンによる糖輸送活性化が抑制されることを見いだした。さらに、ロイシンによって、インスリンによる糖輸送活性化に関与するシグナル伝達分子Aktの活性指標であるSer⁴⁷³リン酸化が抑制されること、Aktの上流分子insulin receptor substrate 1 (IRS1)におけるAkt抑制性リン酸化 (Ser^{636/639}) が亢進することを明らかにした。また、ロイシンは、筋収縮の場合のみならず、インスリンによるp70S6K Thr³⁸⁹リン酸化についても亢進した。さらに、ロイシンの糖輸送やAkt、IRS1に対する作用は、いずれもラパマイシンを作用させることにより消失した。

以上の結果は、ロイシンが筋収縮による糖輸送活性化に対して促進的に作用すること、そしてインスリンによる糖輸送活性化に対しては抑制的に作用することを明確に示すものである。また、筋収縮による糖輸送促進作用にはCaMKKを介したAMPK活性亢進が、インスリンによる糖輸送抑制作用においてはIRS1の抑制性リン酸化を介したAkt活性の低下が関与することを示唆している。さらには、これらの作用の発現に、ロイシンによるp70S6K活性化を介したシグナル伝達が重要な役割を果たしていることを示唆している。以上の内容はJournal of Applied Physiologyに掲載された (J Appl Physiol. 2010 Feb;108(2):274-82.)。

本研究は、身体活動に伴って必然的に生じる筋収縮や、糖代謝に関わる主要ホルモンであるインスリンによって惹起される骨格筋糖輸送が、日常の食事に含まれるロイシンによって調節を受けている可能性とその分子機構を明らかにした学術的意義の高い研究である。また、本研究は、生物としての人間が、摂食環境に対して適応的に糖代謝調節を行う能力を有していることを示したものであり、認知・行動科学講座身体機能論分野の研究として高く評価できる。

よって、本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成22年1月22日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降