

<平成23年度助成>

運動の抗肥満・抗糖尿病効果を増強・減弱する食品成分の検討 — 高脂肪食による骨格筋 AMP キナーゼ活性化の減弱 —

林 達 也

(京都大学大学院人間・環境学研究科)

緒 言

骨格筋は体内最大のエネルギー代謝器官であり、運動時に生じる筋収縮 (contraction) は骨格筋代謝を活性化させる強力な生理的刺激である。運動による代謝促進効果の発現には、筋収縮に反応して急性的に活性化される情報伝達分子 5' AMP-activated protein kinase (AMPK) が制御的な役割を演じている。これまでの多数の研究によって、骨格筋 AMPK 活性化が、インスリン非依存的糖輸送、インスリン感受性、糖輸送担体 GLUT4 発現、脂肪酸酸化、グリコーゲン代謝調節、転写コアクチベーター PPAR γ coactivator 1 α (PGC1 α) を介したミトコンドリア機能活性化など、抗糖尿病、抗肥満作用を有する多くの生理反応に関与することが明らかになった¹⁻³⁾。また、骨格筋 AMPK は、メトホルミンやチアゾリジン誘導体などの抗糖尿病薬、レプチン、アディポネクチンなどの脂肪細胞由来生理活性因子によっても活性化され、これらの薬理作用発現に寄与すると考えられている^{1,2,4)}。

本研究の目的は、運動時の AMPK 活性化を指標として、運動の代謝促進作用を高める、あるいは逆に弱める可能性を持つ食品成分を明らかにすることである。研究の過程において多くの食品及び食品成分を検討したが、本稿では、高脂肪食の持つ AMPK 抑制作用に焦点をあてて報告する。

実験方法

実験 1 (単離筋実験)：雄性 Wister ラットを、離乳

時から 4 週間、高脂肪食 (5.2 kcal/g, 60% kcal fat, source: soybean/lard) と普通食 (3.6 kcal/g, 12% kcal fat, source: soybean) にて飼育し、実験前に一晩絶食させた。ラットを頸椎脱臼法にて安楽死させた後、滑車筋 (epitrochlearis) を摘出し、既報の単離筋ホルダー⁵⁾を用いてクレブス緩衝液中で 80 分間インキュベートした。AMPK を活性化する最大収縮刺激として、インキュベート終了 10 分前から、緩衝液を介した電気刺激にて 1 回 10 秒間、1 回 / 分、計 10 回の tetanus 収縮を惹起した⁶⁾。また、最大下収縮刺激として、インキュベート終了 2 分前から 5 Hz の twitch 収縮を惹起した⁶⁾。張力は圧トランスデューサーを用いてリアルタイムでモニターした。インスリン刺激 (最大刺激) は、1 μ M インスリンを含んだ緩衝液で 30 分間インキュベートした。筋サンプルは直ちに液体窒素にて凍結し、Western blot による AMPK リン酸化状態の定量⁵⁾、エネルギー指標 (ATP、クレアチンリン酸含有量) の定量⁷⁾を行った。一部のサンプルは凍結せず、引き続き糖輸送活性測定 (³H] 3-O-methylglucose (3MG) transport)⁵⁾を行った。採血は筋サンプルを摘出する 3 日前に尾静脈から行った。また、組織学的解析として、摘出筋切片のミオシン ATPase 染色による筋線維組成解析とオイルレッド O 染色による脂肪染色面積の測定を行った⁸⁾。

実験 2 (運動負荷実験)：実験 1 と同様に、雄性 Wister ラットを離乳時から 4 週間高脂肪食と普通食にて飼育し、実験前に一晩絶食させた。運動負荷として小動物用トレッドミルを用いた持久運

動(15%傾斜、速度19m/min、1時間)を実施した。なお事前検討により、このプロトコールが両群ともに中等強度の運動(血中乳酸濃度4 mmol/L未満)となることを確認した。運動直後に頸椎脱臼法にて安楽死させ、長趾伸筋(extensor digitorum longus: EDL)とヒラメ筋(soleus)を摘出し、実験1と同様の解析を行った。また、あわせて筋線維のタイプ分類とオイルレッドO染色による脂肪染色面積の測定を行った。

データは平均±標準誤差で示し、平均値の検定をt検定または分散分析(ANOVA)及びpost hoc解析としてScheffeまたはDunnの方法を用いて行った。有意水準は5%とした。

結 果

実験1

1. 高脂肪食は筋線維組成を変えずに脂肪含有量を増加させる

普通食群(control diet group: CD)に比して高脂肪食群(high fat diet group: HFD)では摂食量が多かったが、体重には差がなかった(Fig. 1)。滑車筋の組織学的検討では、CDとHFDとの間に筋線維組成に差はなかったが(Table 1、Fig. 2A, B)、筋細胞内脂肪(intramyocellular triglyceride: IMTG)の蓄積量を示す脂肪染色総面積がHFDにおいて大きく、CDに比して3倍と

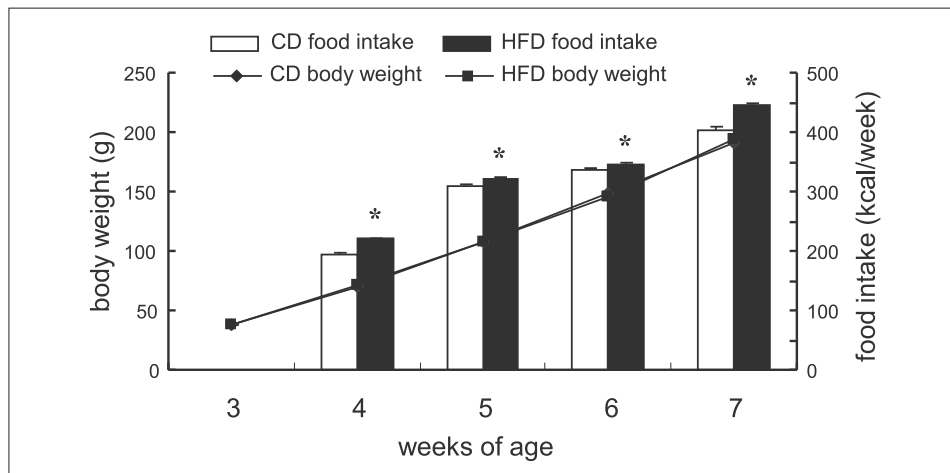


Fig. 1. Body weight and food intake in rats under CD- and HFD-feeding. Rats at the time of weaning were fed CD or HFD for 4 weeks. Data are means ± SE; N = 4-5 per group. *P < 0.05 vs. CD-fed group.

Table 1. Metabolic parameters and fiber type proportions in rats under CD- and HFD-feeding. Rats at the time of weaning were fed CD or HFD for 4 weeks. Body weight and plasma parameters were measured at the end of week 4. Muscles were dissected and fiber type composition was determined with myosin ATPase staining. Data are means ± SE; N = 7-10 per group.

	CD	HFD
Body weight (g)	198.2 ± 5.3	204.6 ± 3.5
Fasting plasma glucose (mg/dL)	107.5 ± 1.6	111.5 ± 2.4
Fasting plasma triglyceride (mg/dl)	155.9 ± 10.5	158.7 ± 16
Fiber type composition (%)		
Epitrochlearis	Type I	5.0 ± 1.1
	Type IIa	28.2 ± 2.2
	Type IIb	66.8 ± 3.2
Soleus	Type I	80.7 ± 1.2
	Type IIa	19.3 ± 1.2
	Type IIb	0.0 ± 0.0
EDL	Type I	3.7 ± 0.8
	Type IIa	12.4 ± 1.1
	Type IIx	33.8 ± 2.9
	Type IIb	50.1 ± 4.1

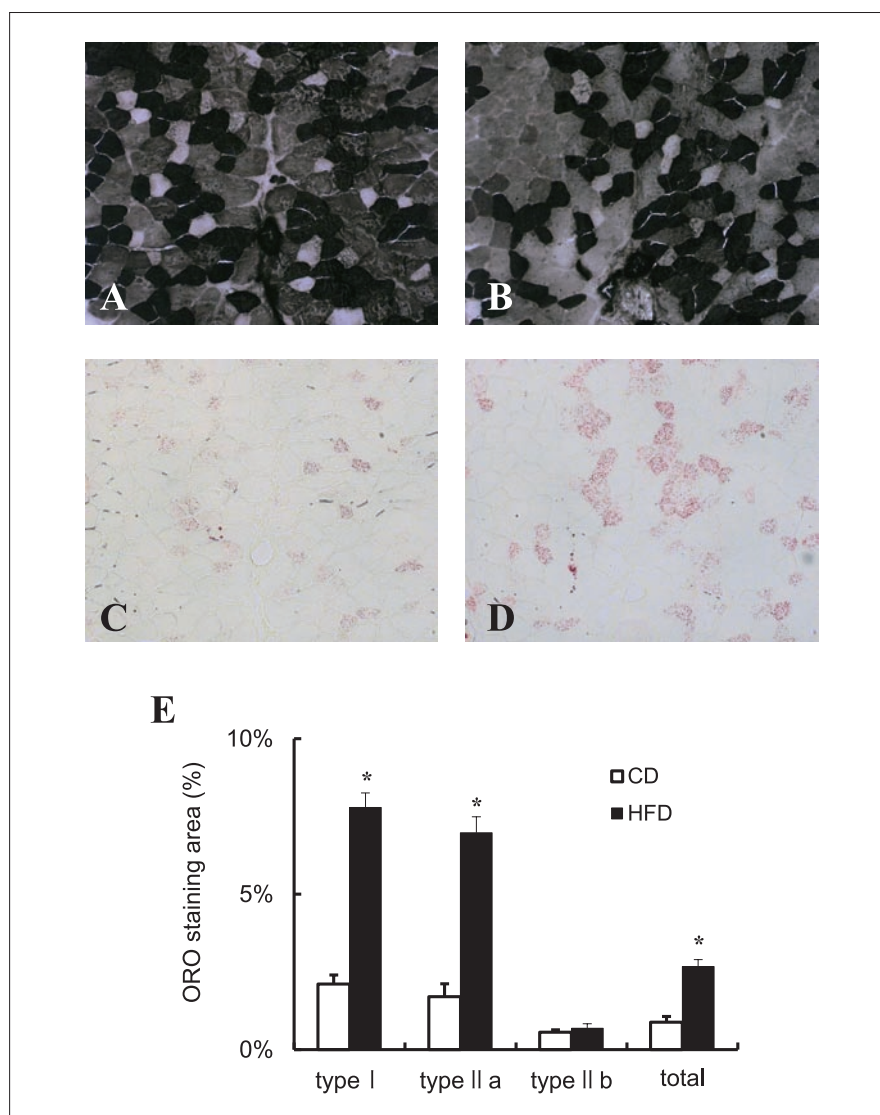


Fig. 2. HFD increases intramyocellular triglyceride (IMTG) content in epitrochlearis muscle. Representative transverse sections of epitrochlearis muscle dissected from CD-fed (A and C) and HFD-fed (B and D) rats (80× magnification). A and B, Myosin ATPase staining (pH 10.7). Light and dark fibers are type I and IIa, respectively. Fibers with intermediate brightness are type IIb. C and D, Oil Red O (ORO) staining of IMTG. ORO stains neutral lipid (mainly triglycerides) with an orange-red tint, and lipid droplets are seen as distinct spots of stain. E. Fiber type-specific and total IMTG content, expressed as a percentage of the area of lipid stained. Data are means \pm SE; N = 7 per group. *P < 0.05 vs. CD-fed group.

なっていた (Fig. 2C, D, E)。筋線維タイプ別の脂肪染色面積は、タイプ I 及び IIa において HFD で大きかったが、タイプ IIb には差がなかった (Fig. 2E)。

2. 高脂肪食は収縮時の糖輸送活性化と AMPK 活性化を減弱させる

骨格筋糖代謝の律速段階は、グルコースが細胞膜を通過する糖輸送 (glucose transport) であり、その本態は、糖輸送担体 GLUT4 の細胞表面への translocation を介した促進拡散である。骨格筋糖輸送は主に異なった 2 つのシグナル伝達メカニ

ズムを介して行われ、その 1 つはインスリン受容体を起点とするインスリン依存的糖輸送である。もう 1 つはインスリン受容体を介さないインスリン非依存的糖輸送であり、AMPK の活性化が深く関与する³⁾。

これまでに、高脂肪食が骨格筋のインスリン依存的糖輸送を障害すること、つまりインスリン抵抗性を生じることが多数の報告がある^{9,10)}。今回の研究においても、インスリン依存的糖輸送活性化が HFD において CD より 38% 減弱していた

(Fig. 3A)。それと同時に、twitchによるインスリン非依存的糖輸送活性化も、HFDにおいてCDより65%減弱し、tetanusによるインスリン非依存的糖輸送活性化も24%減弱していた(Fig. 3A)。なお、western blotにて定量した糖輸送担体 GLUT4 の含有量は両群間で差を認めなかった(data not shown)。

骨格筋では AMPK の急性的活性化に伴ってインスリン非依存的糖輸送が促進される^{11,12)}。AMPK は α 、 β 、 γ サブユニットからなる 3 量体で、その酵素活性は α サブユニットに存在する。AMPK の活性化には α サブユニットの Thr¹⁷² リン酸化 (以下 AMPK リン酸化) が重要であり、こ

のリン酸化の程度が AMPK 活性化の指標となる。今回の研究では、twitch、tetanus ともに AMPK リン酸化を顕著に活性化したが、HFD ではその程度が CD に比して有意に低下していた (Fig. 3B)。

3. 高脂肪食は収縮時のエネルギー状態を変化させない

AMPK は細胞内エネルギー状態の低下を反映して活性化され、細胞の燃料計 (cellular fuel gauge) として位置付けられる²⁾。骨格筋においては、筋収縮のみならず低酸素、酸化的リン酸化及び電子伝達系の薬理的障害、高浸透圧など、エネルギー指標 (ATP、クレアチンリン酸含有量) の減少をきたす刺激に反応して活性化される^{11,12)}。

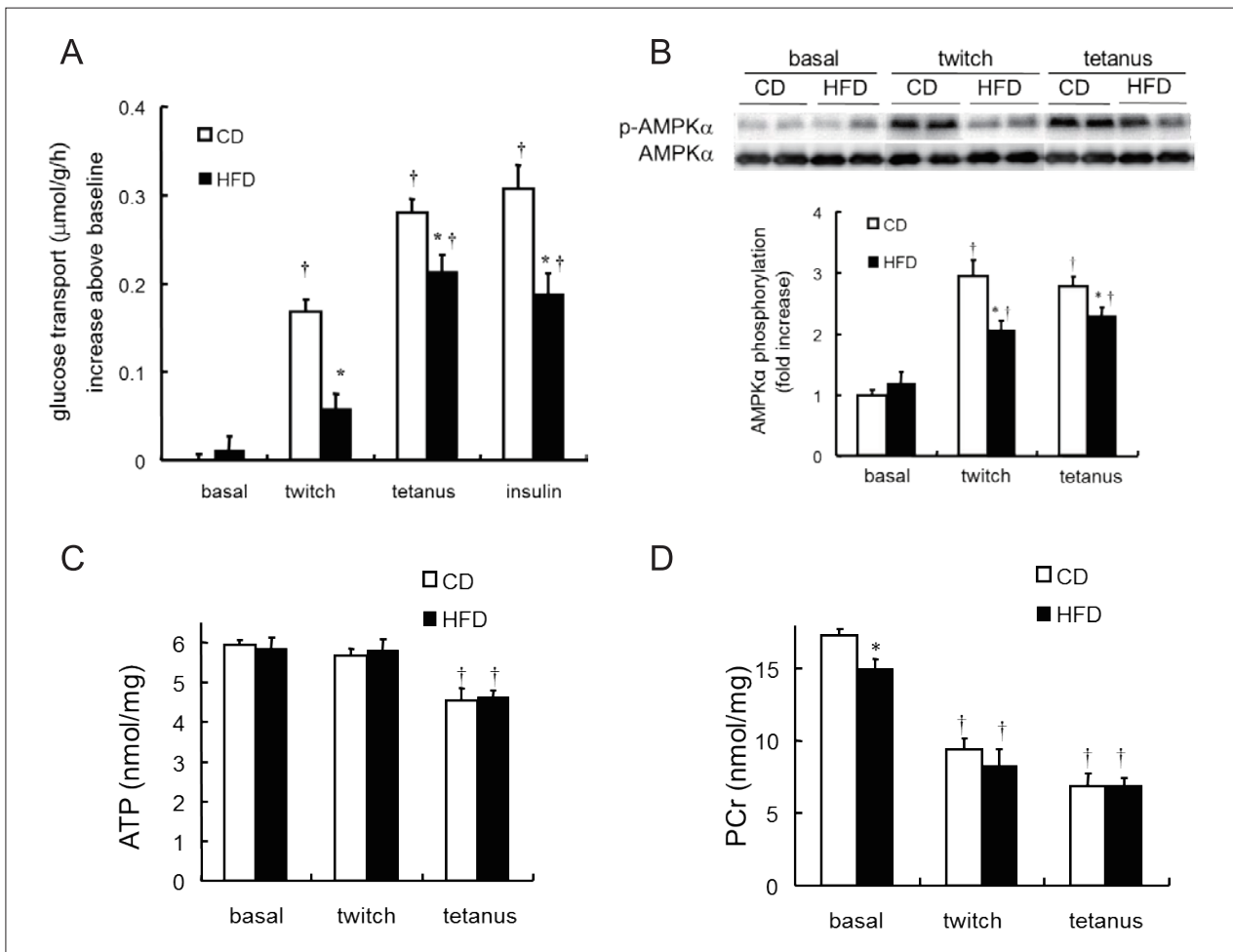


Fig. 3. HFD attenuates contraction-stimulated glucose transport and AMPK phosphorylation without changing energy status in isolated epitrochlearis muscle.

For contraction, isolated muscles were electrically stimulated to contract at 5 Hz for 2 min (twitch) or tetanically for 10 seconds/min for 10 times (tetanus). For insulin stimulation, isolated muscles were incubated with 1 μmol/L insulin for 30 min. Muscles were then subjected to glucose transport assay (A), western blotting (B), adenosine triphosphate (ATP) assay (C) or phosphocreatine (PCr) assay (D). Data are means ± SE; N = 7-26 per group (A), 8-11 per group (B), 7-8 per group (C and D). *P < 0.05 vs. CD-fed group. †P < 0.05 vs. corresponding basal group.

今回の研究では、ATP含有量はtwitchによってHFD、CDともに変化しなかったが、tetanusによってHFDで21%、CDで24%低下し、収縮後の含有量に群間差を認めなかった (Fig. 3C)。またクレアチンリン酸含有量はHFDで13%少なかったが、twitchによってHFDで44%、CDで46%低下、tetanusによってHFDで54%、CDで60%低下し、収縮後の含有量に群間差を認めなかった (Fig. 3D)。収縮中に発揮される張力は、twitch、tetanusともに群間差を示さなかった (data not shown)。

実験 2

高脂肪食はトレッドミル運動時の骨格筋AMPK活性化と糖輸送活性化を減弱する

我々は、これまでに行った実験で、HFDにおいてトレッドミル運動時のヒラメ筋の糖輸送活性化とAMPK活性化とに減弱が認められることを明らかにした (Fig. 4)。CDは運動負荷によってインスリン非依存的糖輸送が非運動時の3.4倍に増加したが、HFDは2.9倍で、CDに比べ25%減弱していた。両群のトレッドミル走行速度に差は

なく、運動強度の指標となる血中乳酸値にも差を認めなかった (CD: 3.1 ± 0.1 mmol/L, HFD: 3.4 ± 0.2 mmol/L)。さらに、同様の検討を、長趾伸筋と滑車上筋において行ったが、ヒラメ筋の結果とは異なり、今回採用した運動負荷プロトコールでは十分な負荷とならず、両方の筋ともに、運動後のAMPKリン酸化の亢進が認められなかった (data not shown)。組織学的検討では、長趾伸筋、ヒラメ筋ともに、CDとHFDとの間に筋線維組成に差はなく (Table 1)、脂肪染色面積は、すべての筋線維タイプにおいてHFDで増加していた (Fig. 5)。

考 察

本研究の第1のポイントは、生体での運動負荷実験と単離筋を用いた試験管内での電気収縮実験が同一の結果 (高脂肪食によるAMPK活性化の減弱とインスリン非依存的糖輸送活性化の減弱) を示したことである。単離筋実験を用いることで、生体の運動負荷時にダイナミックに変化する液性因子や神経性因子、血液循環動態の影響を排除し

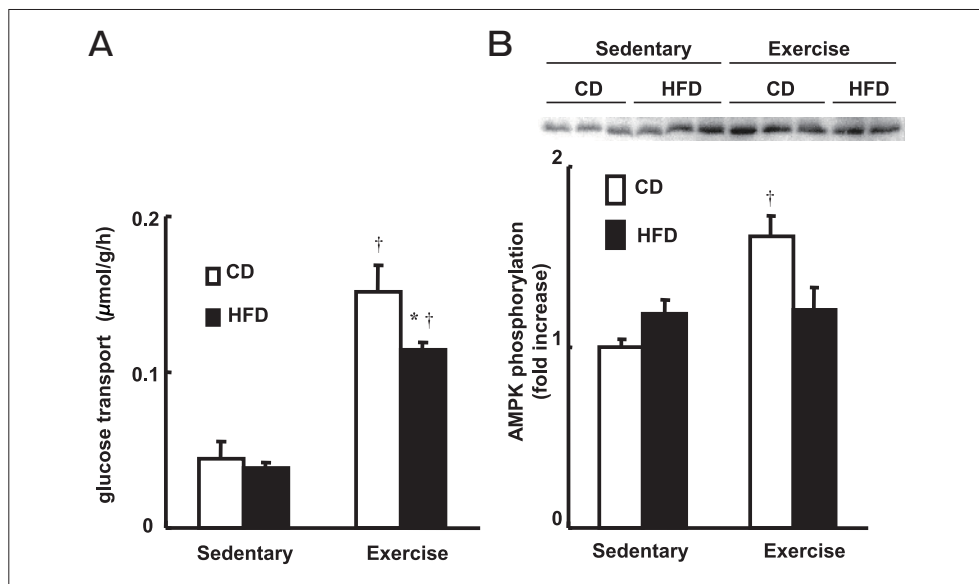


Fig. 4. HFD attenuates exercise-stimulated glucose transport and AMPK phosphorylation in soleus muscle.

Rats at the time of weaning were fed CD or HFD for 4 weeks, and were exercised on a treadmill at a moderate intensity for 60 min. Soleus muscle was dissected immediately after exercise. Soleus muscle was also dissected from non-exercised rats. Muscles were then subjected to glucose transport assay (A) or western blotting (B). Data are means \pm SE; N = 5-9 per group (A) and 13-16 per group (B). *P < 0.05 vs. CD-fed group. †P < 0.05 vs. corresponding basal group. Adapted from Ref. #8.

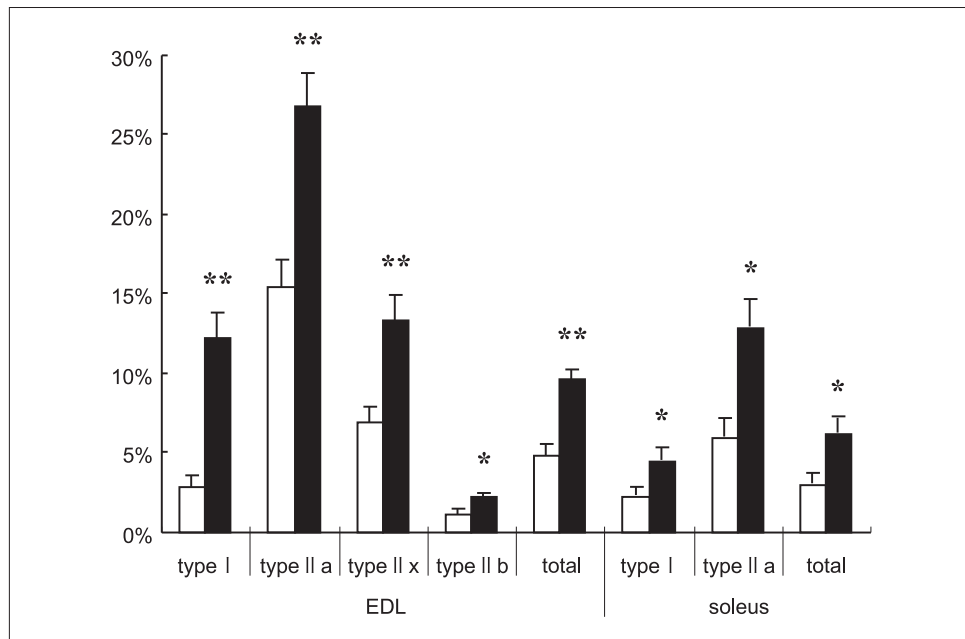


Fig. 5. HFD increases intramyocellular triglyceride (IMTG) content in EDL and soleus muscles. Fiber type-specific and total IMTG content, expressed as a percentage of the area of lipid stained. Data are means \pm SE; N = 8-10 per group. *P<0.05, **P<0.01 vs. CD-fed group.

た状態で収縮実験を行うことが可能となる。しかし、単離筋実験は生理的条件下での検討ではないため、本研究で生体の運動負荷実験との類似性が得られたことの意義は大きい。

第2のポイントは、HFDが筋収縮時のAMPKリン酸化の減弱を示した一方で、エネルギー指標には差がなかったことである。これは、HFDにおいて、エネルギー状態の変化に関係しないメカニズムによってAMPKの活性化及びインスリン非依存的糖輸送活性化が減弱したことを意味している。AMPKリン酸化は、LKB1やcalcium-calmodulin-dependent protein kinase (CaMKK) などの上流キナーゼやprotein phosphatase 2Aなどによって調節されるが¹⁾、現在のところ、HFDがどのようなメカニズムでAMPKリン酸化を抑制するのかについては不明である。Taylorら¹³⁾は、*in vitro*実験において、長鎖アシルCoAがLKB1を直接的に抑制し、その結果AMPKリン酸化が抑制される可能性を報告している。しかし、HFDの筋細胞内で実際に生じている現象がどのようなものなのかは今後の解明が必要である。

第3のポイントは、今回検討したHFDとCDとの間に体重差がなく、血糖値や血漿トリグリセリド値、筋線維組成、GLUT4やAMPKの含有量に差がなかったことである。高脂肪食下での長期飼育は肥満や高血糖をきたすのみならず、GLUT4やAMPKの含有量の低下を来することが知られている¹⁴⁾。本研究では、若い週齢のラットに対する比較的短期間(4週間)の高脂肪食負荷によって、AMPKや糖輸送に影響を及ぼす混乱因子を可能な限り少なくして検討した。

第4のポイントは、高脂肪食が、運動とインスリンの糖輸送活性化作用とともに減弱させたことである。骨格筋は生体のインスリン感受性を規定する器官であり、骨格筋におけるインスリン依存的糖輸送の減弱は生体の「インスリン抵抗性」を惹起する¹⁵⁾。運動によるインスリン非依存的糖輸送の減弱を「運動抵抗性」と呼ぶならば、高脂肪食は「インスリン抵抗性」と「運動抵抗性」の両方を誘導することになる。糖輸送は骨格筋糖代謝の律速段階であり、その障害は単に骨格筋細胞がグルコースを取り込む過程だけではなく、骨格筋糖代謝全体の障害を意味している¹⁵⁾。骨格筋AMPK

はインスリン感受性とも密接に関連しており¹⁻³⁾、この意味からも高脂肪食がAMPKリン酸化を抑制するメカニズムの解明は興味もたれる。

運動負荷実験では、ヒラメ筋で運動によるAMPKリン酸化の亢進が認められた一方、滑車上筋と長趾伸筋では認められなかった。これは、今回採用した運動プロトコールでは、滑車上筋と長趾伸筋が運動中に十分に動員されず、ヒラメ筋に比してAMPKリン酸化の程度が小さかったためと考えられる。骨格筋AMPKは、筋を摘出する際の機械的刺激や血流遮断によってアーチファクトとして活性化されやすく⁶⁾、生体の運動負荷実験では非運動群と運動群のリン酸化の差が検出しにくくなる。単離筋実験では、プレインキュベーション中に解剖時に生じたAMPK活性化が沈静化するため、弱い収縮(twitch)によるAMPKの活性化であっても十分に検出が可能である⁶⁾。

結 語

ラット単離筋を用いた電氣的収縮実験とラット生体に対する運動負荷実験において、離乳時より4週間高脂肪食で飼育したラットは、普通食で飼育したラットに比して、骨格筋AMPKリン酸化とインスリン非依存的糖輸送の活性化が有意に減弱していた。高脂肪食は筋の脂肪含有量を増加させたが、筋線維組成には影響を与えず、筋のエネルギー指標やAMP発現量、GLUT4発現量にも影響しなかった。本研究から得られた結果は、高脂肪食がエネルギー状態の変化を介さないメカニズムで骨格筋AMPKの活性化を減弱し、その結果、運動が本来もたらすはずの代謝促進効果が十分に発揮されない可能性を示唆するものである。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり貴重な研究助成をいただきました公益財団法人浦上食品・食文化振興財団、そして本研究の実施にあたり多大な貢献を

いただきました京都大学医学研究科・田中早津紀氏、京都大学人間・環境学研究科・清水瑤平氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Witczak CA, Sharoff CG, Goodyear LJ. 2008. AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: from structure and localization to its role as a master regulator of cellular metabolism. *Cell Mol Life Sci* 65:3737-55
- 2) Hardie DG. 2008. Role of AMP-activated protein kinase in the metabolic syndrome and in heart disease. *FEBS Lett* 582:81-9
- 3) Friedrichsen M, Mortensen B, Pehmoller C, Birk JB, Wojtaszewski JF. 2013. Exercise-induced AMPK activity in skeletal muscle: role in glucose uptake and insulin sensitivity. *Mol Cell Endocrinol* 366:204-14
- 4) Egawa T, Tsuda S, Oshima R, Goto K, Hayashi T. 2014. Activation of 5'AMP-activated protein kinase in skeletal muscle by exercise and phytochemicals. *J Phys Fitness Sports Med* 3:55-64
- 5) Toyoda T, Hayashi T, Miyamoto L, Yonemitsu S, Nakano M, et al. 2004. Possible involvement of the alpha1 isoform of 5'AMP-activated protein kinase in oxidative stress-stimulated glucose transport in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E166-73
- 6) Toyoda T, Tanaka S, Ebihara K, Masuzaki H, Hosoda K, et al. 2006. Low-intensity contraction activates the alpha1-isoform of 5'-AMP-activated protein kinase in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290:E583-90
- 7) Egawa T, Hamada T, Kameda N, Karaike K, Ma X, et al. 2009. Caffeine acutely activates 5'adenosine monophosphate-activated protein kinase and increases insulin-independent glucose transport in rat skeletal muscles. *Metabolism* 58:1609-17
- 8) Tanaka S, Hayashi T, Toyoda T, Hamada T, Shimizu Y, et al. 2007. High-fat diet impairs the effects of a single bout of endurance exercise on glucose transport and insulin sensitivity in rat skeletal muscle. *Metabolism* 56:1719-28
- 9) Storlien LH, James DE, Burleigh KM, Chisholm DJ, Kraegen EW. 1986. Fat feeding causes widespread *in vivo* insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 251:E576-83
- 10) Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, Chisholm DJ, Storlien LH. 1991. Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. *Diabetes* 40:1397-403
- 11) 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

- 12) Mu J, Brozinick JT, Jr., Valladares O, Bucan M, Birnbaum MJ. 2001. A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell* 7:1085-94
- 13) Taylor EB, Ellingson WJ, Lamb JD, Chesser DG, Winder WW. 2005. Long-chain acyl-CoA esters inhibit phosphorylation of AMP-activated protein kinase at threonine-172 by LKB1/STRAD/MO25. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E1055-61
- 14) Liu Y, Wan Q, Guan Q, Gao L, Zhao J. 2006. High-fat diet feeding impairs both the expression and activity of AMPKa in rats' skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 339:701-7
- 15) DeFronzo RA. 1988. Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 37:667-87

Modulation of exercise-induced anti-obesity and anti-diabetes properties by food components: an inhibitory effect of high-fat diet on exercise-stimulated 5'AMP-activated protein kinase in skeletal muscle

Tatsuya Hayashi

Laboratory of Exercise and Sports medicine

Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University

High-fat diet (HFD) is an important risk factor that leads to insulin resistance in skeletal muscle. We have demonstrated that HFD feeding for 4 weeks impairs the activation of glucose transport (GT) that is induced by 1 h treadmill running in rat soleus muscle, accompanied with blunted activation of 5'AMP-activated protein kinase (AMPK). This finding provides the hypothesis that HFD impairs the effect of exercise on GT by reduced muscle AMPK activation, since AMPK is an important signaling intermediary leading to exercise-stimulated GT. To investigate this hypothesis, we used an *in vitro* preparation that allowed us to contract skeletal muscle in the absence of physiological confounders including humoral, neural and circulatory conditions. After epitrochlearis muscles were isolated from sedentary rats that had been fed HFD or control diet (CD) for 4 weeks, the muscles were incubated in Krebs-Ringer buffer containing pyruvate, and then further incubated in the presence of insulin or electrically stimulated to contract at submaximal or maximal intensities. Although HFD did not alter the total amount of glucose transporter 4 (GLUT4), insulin-stimulated GT in muscles from HFD-fed rats was 38% lower than in muscles from CD-fed rats, accompanied with marked increases in intramuscular triglyceride (IMTG). Similarly, contraction-stimulated GT induced by submaximal and maximal contraction was 65% and 24% lower, respectively, in HFD-fed rats than in CD-fed rats. Correspondently, contraction-induced activation of AMPK was significantly blunted in muscles from HFD-fed animals, but HFD did not affect muscle phosphocreatine (PCr) and ATP contents in contracting muscle. HFD did not affect fiber-type proportions or the total amount of AMPK, either. Taken together, our findings provide evidence to suggest that HFD not only elicits muscle insulin resistance at rest, but also evokes impaired activation of contraction-stimulated GT, at least in part by attenuating AMPK activation without altering muscle energy status during contraction.