

加齢が骨格筋のインスリン作用に及ぼす影響

Effect of Aging on Insulin Action in Skeletal Muscle

久保田 正和* 越中 敬一** 秦 柏林***
 大澤 功*** 小池 晃彦*** 押田 芳治***

Masakazu KUBOTA* Keiichi KOSHINAKA** Bolin QIN***
 Isao OSAWA*** Akihiko KOIKE*** Yoshiharu OSHIDA***

Aging is associated with insulin resistance, but the exact molecular mechanism is unknown. The serine/threonine kinase Akt, which is functionally located downstream of the PI3-kinase has been implicated as playing a role in the insulin-signaling pathway to glucose transport. In the present study, we examined the Akt protein levels and the effect of insulin on Akt kinase activity in rat extensor digitorum longus and soleus muscles between 12-week and 30-month-old rats.

There were no significant differences in the Akt protein levels and the Akt activity after insulin stimulation between 12-week- and 30-month-old rats in both skeletal muscles.

These data suggest that the Akt protein levels and the Akt activity after insulin stimulation in aged rat were maintained in skeletal muscle.

はじめに

日本の糖尿病患者数は年々増加し、2003年の厚生労働省の発表によれば、2010年までに1000万人を突破することが推定されており、食生活の欧米化、生活の都市化などにより、インスリン抵抗性の亢進傾向が顕著になっている。一方、ライフスタイルのみならず、加齢に伴いインスリン抵抗性が出現し、高齢者では糖尿病・耐糖能異常を随伴するケースが多く見られる。すなわちインスリン抵抗性は加齢現象の一つと考えられており、加齢に伴うインスリン感受性の低下は、骨格筋におけるインスリン作用の低下が想定されている。その低下の機序の一つとして、インスリン情報伝達機構のタンパクが減少することにより、インスリン抵抗性をもたらすことが報告されている¹⁾。インスリン情報伝達機構は、インスリン受容体 (IR)、インスリン受容体基質 (IRS-1)、PI3-kinase、を介する経路であり、イ

ンスリンの作用を受けてチロシン酸化された IRS-1 は、PI3-kinase などのシグナル伝達分子を結合し、活性化する。PI3-kinase の活性化により、最終的に糖輸送担体 (GLUT4) の細胞内から細胞膜への移動 (トランスロケーション) が起こり、骨格筋や脂肪細胞での糖取り込みが促進される²⁾ (Fig. 1³⁾)。このようにインスリン

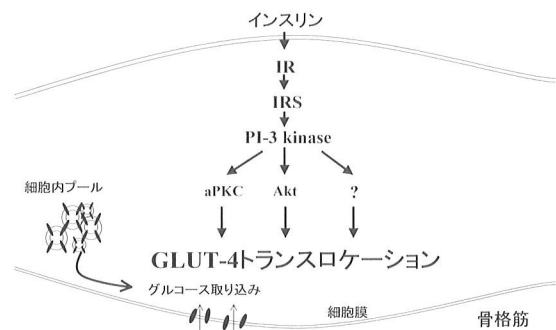


Fig. 1 Insulin signaling pathway

* 名古屋大学大学院医学系研究科 健康・スポーツ医学
 ** 新潟医療福祉大学医療技術学部 健康栄養学科
 *** 名古屋大学総合保健体育科学センター
 * Department of Sports Medicine, Graduate School of Medicine, Nagoya University
 ** Department of Health and Nutrition, Faculty of Medical Technology, Niigata University of Health and Welfare
 *** Research Center of Health, Physical Fitness and Sports, Nagoya University

情報伝達機構は、インスリンによる代謝調節作用において中心的な役割を果たしている。PI3-kinase 下流のインスリンシグナル伝達機構については、Akt や atypical PKC などの重要な分子が存在していることが明らかになってきているが^{4,5)}、加齢に対する影響は不明である。そこで、本研究では、加齢が骨格筋のインスリンシグナル伝達機構に与える影響を明らかにすることを目的とし、インスリンシグナルに関与する因子として知られる Akt に着目して、タンパク量およびインスリン刺激によるリン酸化能について検討した。

方 法

1. 実験動物

実験動物には、Wistar 系雄性ラットを用い、高齢ラット群 (30 months, n = 7) と若年ラット群 (12 weeks, n = 6) に分けた。Akt 総タンパク量と、インスリン刺激 (10U/kg) による Akt (Ser473) リン酸化能の測定は、ヒラメ筋および extensor digitorum longus (EDL) を用い、ウエスタンブロッティングにより行った。飼育は水と固形飼料を自由に摂取させ、室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、12時間の明暗サイクル下で行った。筋の摘出は、12時間の絶食後、ペントバルビタール液 (50mg/kg) を腹腔内注射し、麻酔下で腹部下大静脈にインスリンを注入した後、3分後にヒラメ筋と EDL を摘出し、即座に液体窒素で凍結し、以下に示す分析を行うまで -80°C で凍結保存した。

2. 測定

①サンプル作成

筋サンプルの作成は、Krook らの方法⁶⁾ に一部修正を加えたものを用いた。摘出した筋は、50mM HEPEs (pH 7.4)、150mM NaCl、10% Glycerol、1% Triton X-100、1.5mM MgCl_2 、1mM aprotinin、1mM leupeptin、2mM PMSF、を加え、ホモジナイズを行った。得られたホモジネートは 150,000g で 1 時間遠心分離し、回収した上清を試料に用いた。各試料について、タンパク濃度は分光光度計を用いて測定し、電気泳動用サンプルを作成した。

②SDS-PAGE、Western blotting

タンパク質は10%アクリルアミド分離ゲル、および3.5%アクリルアミド濃縮ゲルを用いた SDS-PAGE 法により分離した。通電は 30mA の定電流で行った。電気泳動後のゲルを 25mM Tris、192mM Glycine、の Transfer Buffer で 30 分間洗浄した後、Blotting 装置 (Bio-Rad) を用いて 7V で 1 時間通電し、PVDF 膜にタンパク質を転写した。転写したメンブレンは 5% Skim Milk/20mM Tris HCl pH 7.5、500mM NaCl、0.05% Tween20 (TBS-T)

を用いて 2 時間のブロッキング処理を行い、その後、Akt1/2 (H-136)、(Santa Cruz Biotechnology、sc-8312、 1×10^3 希釈)、または、p-Akt1/2/3 (Ser 473)-R、(Santa Cruz Biotechnology、sc-7985-R、 1×10^3 希釈) を入れ、overnight で一次抗体反応を行った。TBS-T で 1 時間、TBS (20mM Tris HCl pH 7.5、500mM NaCl) で 30 分間の洗浄後、二次抗体反応 (Anti-Rabbit IgG、Bio-Rad、170—6515、 2×10^4 希釈) を室温で 2 時間行った。TBS-T で 1 時間、TBS で 30 分間の洗浄後、タンパク質検出キット (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents) を用いて、Akt、Akt (Ser 473) を検出した。その後、メンブレンをスキャナーでコンピュータに取り込み、画像解析ソフト (Scion Image) を用い、ヒラメ筋、EDL、それぞれについて、若年ラット群を基準にして、Akt 総タンパク量、Akt (Ser 473) リン酸化量を比較検討した。

3. 統計

得られたデータは、平均値 \pm 標準誤差で表した。有意差は unpaired t test で検定を行い、有意水準は危険率 5% 未満とした。

結 果

若年ラット群および高齢ラット群の、体重、空腹時血糖、副腎丸脂肪量、インスリン値を示す (Table 1)。高齢ラットは、若年ラットと比較して、体重 (高齢 vs. 若年: $505\pm 17\text{g}$ vs. $309\pm 4\text{g}$ 、 $P<0.01$)、空腹時血糖 (高齢 vs. 若年: $96.2\pm 4.1\text{mg/dl}$ vs. $75.9\pm 5.2\text{mg/dl}$ 、 $P<0.01$)、副腎丸脂肪量 (高齢 vs. 若年: $10.3\pm 1.6\text{g}$ vs. $3.9\pm 0.3\text{g}$ 、 $P<0.01$) については有意に高値であり、また、インスリン値 (高齢 vs. 若年: $1.3\pm 0.3\text{ng/ml}$ vs. $1.1\pm 0.2\text{ng/ml}$) については、有意差は認められなかったが、高値傾向を示した。

Fig. 2 はヒラメ筋における Akt 総タンパク量について、若年ラットを基準 (100%) にして示したものである。高齢ラットの Akt 総タンパク量 ($83.3\pm 5.5\%$) は、低値傾向を示したが、有意差は認められなかった。また、Fig. 3 はヒラメ筋における Akt (Ser473) リン酸化量を、若年ラット (insulin (-)) を基準 (100%) にして示し

Table 1. Physical characteristics and fasting plasma glucose and IRI of all subjects

Rat	n	BW (g)	FBG (mg/dl)	FAT (g)	IRI (ng/ml)
Young	6	309 \pm 4	75.9 \pm 5.2	3.9 \pm 0.3	1.1 \pm 0.2
Aged	7	505 \pm 17**	96.2 \pm 4.1**	10.3 \pm 1.6**	1.3 \pm 0.3

Values are Means \pm SE. ** $p<0.01$

加齢が骨格筋のインスリン作用に及ぼす影響

たものであるが、インスリン刺激時における、高齢ラットのAkt (Ser473) リン酸化量 ($297.1 \pm 62.5\%$) は、インスリン刺激時における、若年ラットのAkt (Ser473)

リン酸化量 ($226.2 \pm 39.3\%$) に対し、有意差を認めなかった。

Fig. 4 は EDL における Akt 総タンパク量を、若年ラッ

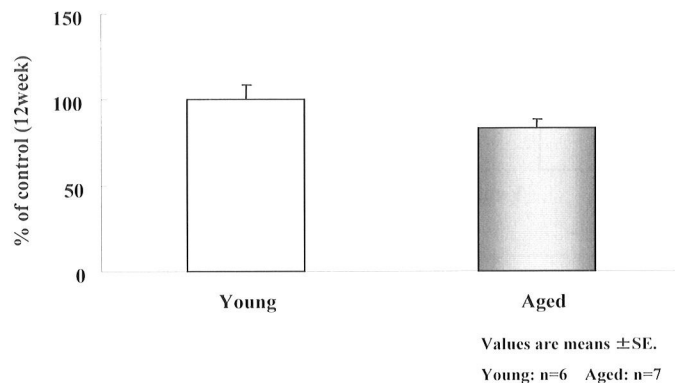


Fig. 2 Akt protein levels in rat soleus muscles

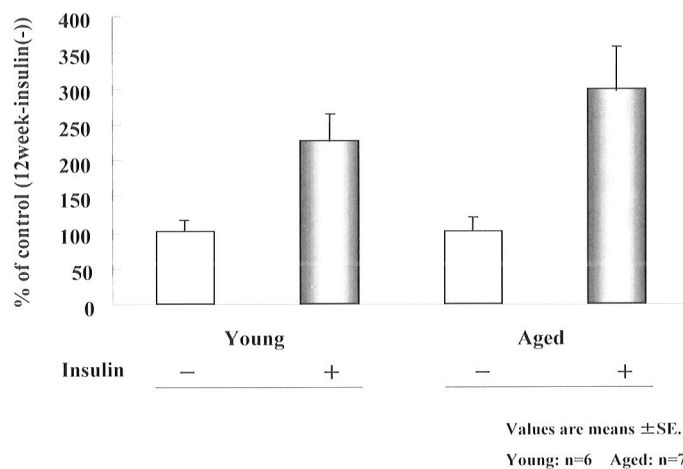


Fig. 3 Insulin-stimulated Akt kinase activity in rat soleus muscle

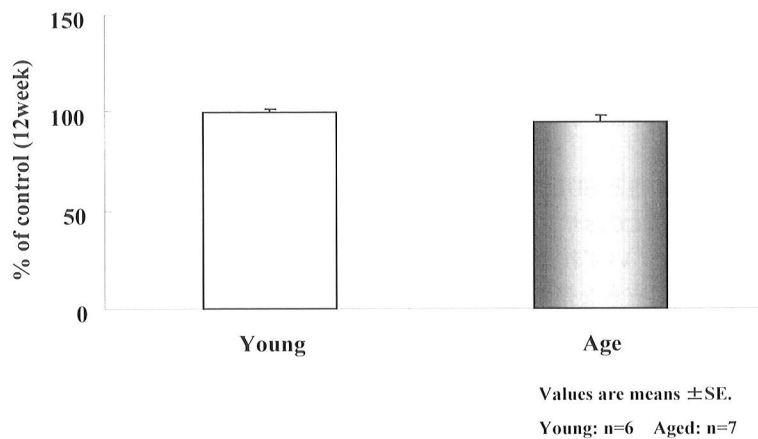


Fig. 4 Akt protein levels in rat EDL muscles

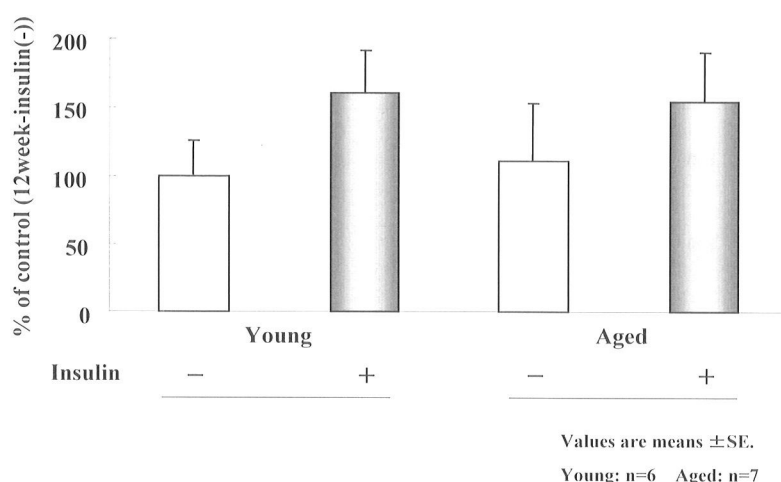


Fig. 5 Insulin-stimulated Akt kinase activity in rat EDL muscles

トを基準 (100%) にして示したものであるが、高齢ラットの Akt 総タンパク量 ($95.0 \pm 3.4\%$) に、有意差は認められなかった。また、Fig. 5 は EDL における Akt (Ser473) リン酸化量を、若年ラット insulin (-) を基準 (100%) にして示したものであるが、インスリン刺激時における、高齢ラットの Akt (Ser473) リン酸化量 ($153.6 \pm 35.9\%$) は、インスリン刺激時における若年ラットの Akt (Ser473) リン酸化量 ($159.8 \pm 31.9\%$) に対し、有意差を認めなかった。

考 察

本研究では、加齢が骨格筋のインスリンシグナル伝達機構に与える影響を明らかにすることを目的とし、インスリンシグナルに関与する因子として知られる Akt に着目して、タンパク量およびインスリン刺激によるリン酸化能について検討した。その結果、高齢ラットにおいて、Akt の総タンパク量は低値傾向であったが、若年ラットに対し、有意差を認めなかった。また、高齢ラットのインスリン刺激による Akt 活性化 (リン酸化量) においても、若年ラットに対し、有意差を認めなかった。

今回、実験に用いた筋はヒラメ筋と EDL であるが、ヒラメ筋は遅筋線維で主に構成されており、EDL は速筋で主に構成されている。しかし、いずれの筋においても若年ラットと高齢ラットの間には有意な差は見られなかった。

これまで安静状態のラット骨格筋の、インスリン刺激による Akt のリン酸化量は、加齢 (20 months) によって減少するという報告がされている⁷⁾。また、以前に Nakai, Nagasaki ら^{8,9)} は、加齢によるインスリン感受

性の低下に対する改善に IRS-1、PI3-kinase、さらには、細胞膜上へトランスポレーションする GLUT4 のタンパク量の調節が関与していることを報告した。インスリン情報伝達機構において Akt は PI3-kinase の下流に存在していることが明らかにされてきているが、今回、PI3-kinase と GLUT4 の間に存在していると考えられる Akt のタンパク量およびリン酸化量に、加齢による有意な変化は認められなかった。

Krook ら¹⁰⁾ は糖尿病モデルラットを用い、血糖を正常化することにより Akt の活性が回復したことを報告している。また、Rojas ら¹¹⁾ は STZ-diabetic rats を用い、インスリン刺激によって IRS-1、IRS-2、PI3-kinase の活性が上がったにも関わらず、Akt のリン酸化量が減少し、高血糖が Akt の活性に影響を与えることを示唆している。今回、我々の実験において、高齢ラットの空腹時血糖は、若年ラットと比較して有意に高値であった。高血糖が Akt の活性に与える影響は、まだほとんど明らかにされていないが¹¹⁾、IRS-1、IRS-2、PI3-kinase の活性とは異なる経路で、Akt の活性が高血糖により独自に調節されている可能性がある。さらに Akt はインスリン情報伝達機構において、糖取り込みに関与する他に、様々なシグナルによって PI3-kinase 依存的に調節されている¹²⁾。したがって、PI3-kinase の下流に存在する Akt ではあるが、PI3-kinase による調節に加え、高血糖をはじめとする、他の様々な因子が Akt の活性に影響を及ぼしている可能性が示唆される。

今回、我々は高齢ラットを用い、加齢がインスリン情報伝達機構の PI3-kinase の下流に存在する Akt に及ぼす影響について検討し、高齢ラットの骨格筋において、Akt のタンパク量、活性化 (リン酸化量) は維持されているというデータを得た。しかし、加齢によるイン

スリン抵抗性の増加が、糖尿病をはじめとする生活習慣病を引き起こすことはよく知られた現象であり、それはインスリン情報伝達機構による糖取り込みの調節に起因する可能性が高い。インスリンがインスリン受容体に結合し、最終的に GLUT4 のトランスロケーションが起こるまでの経路において、様々な因子が関わっていることが考えられ、今後、さらなる検討が必要である。

文 献

1. Carla R. O. Carvalho, Sigisfredo L. Brenelli, Ana C. Silva, Andre L. B. Nunes, Licio A. Velloso, Mario J. A. Saad: Effect of Aging on Insulin Receptor, Insulin Receptor Substrate-1, and Phosphatidylinositol 3-Kinase in Liver and Muscle of Rats. *Endocrinology*. 137: 151-159, 1996.
2. Shepherd PR, Kahn BB: Glucose transporters and insulin action-implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 341(4): 248-257, 1999.
3. 豊田太郎、林達也、中尾一和：運動中の骨格筋の糖取り込み速度増強の機序：体育の科学 54 (1): 4-9, 2004.
4. Kitamura T., Ogawa W., Sakaue H., Hino Y., Kuroda S., Takata M., et al.: Requirement for activation of the serine-threonine kinase Akt (protein kinase B) in insulin stimulation of protein synthesis but not of glucose transport. *Molecular and Cellular Biology*. 18: 3708-3717, 1998.
5. Klippel A, Kavanaugh WM, Pot D & Williams LT: A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Molecular and Cellular Biology*. 17: 338-344, 1997.
6. Anna Krook, Richard A. Roth, Xin Jian Jiang, Juleen R. Zierath, Harriet Wallberg-Henriksson: Insulin-Stimulated Akt Kinase Activity Is Reduced in Skeletal Muscle From NIDDM Subjects. *Diabetes*. 47: 1281-1286, 1998.
7. Carla R. O. Carvalho, Lucimara Maeda, Sigisfredo L. Brenelli and Mario J. A. Saad: Tissue-Specific Regulation of IRS-2/PI3-Kinase Association in Aged Rats. *Biol. Chem*. 381: 75-78, 2000.
8. Nakai N., Shimomura Y., Ohsaki N., Sato J., Oshida Y., Ohsawa I., Fujitsuka N., Sato Y.: Exercise training prevents maturation-induced decrease in insulin sensitivity. *J Appl Physiol*. 80(6): 1963-1967, 1996.
9. Nagasaki M, Nakai N, Oshida Y, Li Z, Xu M, Obayashi M, Murakami T, Yoshimura A, Fujitsuka N, Shimomura Y, Sato Y: Exercise training prevents maturation-induced decreases in insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in rat skeletal muscle. *Metabolism*. 49 (7): 954-959, 2000.
10. Krook A, Kawano Y, Song XM, Efendic S, Roth RA, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR: Improved glucose tolerance restores insulin-stimulated Akt kinase activity and glucose transport in skeletal muscle from diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Diabetes*. 36: 2110-2114, 1997.
11. Fernanda Alvarez Rojas, Aparecida Emiko Hirata, Mario J. A. Saad: Regulation of IRS-2 tyrosine phosphorylation in fasting and diabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 183: 63-69, 2001.
12. P.J. Coffey, J. Jin, J.R. Woodgett: Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem. J*. 335 (Pt. 1): 1-13, 1998.

(2004年10月28日受付)

