

## AICAR およびインスリン刺激による骨格筋グルコース取りこみは一酸化窒素を介さない

AICAR and insulin stimulate glucose uptake in skeletal muscle via nitric oxide independent pathway

越中 敬一\*      押田 芳治\*\*      韓 艶清\*\*  
佐藤 祐造\*\*

Keiichi KOSHINAKA \*    Yoshiharu OSHIDA \*\*    Yanqing HAN \*\*  
Yuzo SATO \*\*

### Summary

It is well known that muscle contraction, insulin and nitric oxide (NO) increase glucose uptake in skeletal muscle. Some reports suggest that NO is a critical mediator of contraction- and/or insulin- stimulated glucose uptake. The AMP-activated protein kinase (AMPK), a known mediator of contraction-stimulated glucose uptake, is activated by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside (AICAR) and stimulates glucose uptake. The purpose of the present study was to determine whether NO contributes to AICAR- and/or insulin-stimulated glucose uptake. Isolated epitrochlearis muscles were stimulated by AICAR or insulin with/without wortmannin (100nM), PI-3 kinase inhibitor, or N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine, NO synthase inhibitor (L-NMMA, 300  $\mu$  M), and measured *in vitro* 2-deoxy-D-[1,2-<sup>3</sup>H]glucose uptake. AICAR-stimulated glucose uptake was not inhibited by wortmannin or L-NMMA. Insulin-stimulated glucose uptake was abolished by wortmannin, but L-NMMA did not affect glucose uptake. These results suggest that AICAR and insulin stimulate glucose uptake in skeletal muscle via NO independent pathway.

### 緒 言

運動は骨格筋のエネルギー需要を増加させ、血中から筋細胞へのグルコース流入を増加させる。近年筋収縮刺激によるグルコース取りこみに AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化が重要であるとの知見が集積しつつある。AMPK はトレッドミルランニング<sup>1)</sup>、電気刺激で活性化されること<sup>2, 3)</sup>、AMPK の薬理的活性化剤である 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside (AICAR) によりグルコース取りこみが惹起されること<sup>2, 4, 5)</sup>、AICAR と筋収縮刺激によるグルコース取りこみには相加性は認められないこと<sup>2)</sup>などが報告されている。また、筋収縮刺激は最終的に

グルコース輸送担体 (glucose transporter 4, GLUT4) を細胞内から細胞膜上に移動させること (translocation) により筋細胞にグルコースを取りこむが、AICAR 刺激においても GLUT4 の translocation が生じることはすでに明らかである<sup>4)</sup>。しかし、筋収縮/AICAR 刺激による AMPK 活性化後のシグナル伝達はほとんど明らかではない。

インスリンも骨格筋のグルコース取りこみを GLUT4 の translocation により亢進させる。インスリンはインスリン受容体に結合後、内因性の基質をチロシン燐酸化し様々な SH 2 蛋白と結合しながら PI-3 キナーゼを経てグルコース取り込みを惹起する。PI-3 キナーゼ以後のシグナルとして Akt/PKB の活性化が重要

\* 名古屋大学大学院医学系研究科 健康・スポーツ医学  
\*\* 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  
\*\* Research Center of Health, Physical Fitness and Sports, Nagoya University

との知見があるが<sup>6)</sup>、依然詳細なインスリンシグナル伝達は不明である。

また、一酸化窒素 (NO) は身体のさまざまな組織で産生されるシグナル分子である。NO は NO 合成酵素によって合成されるが、骨格筋も内皮型および神経型 NO 合成酵素を発現しており<sup>7,8)</sup>、GLUT4 の translocation により骨格筋へグルコースを取りこませることが報告されている<sup>9)</sup>。

そこで本研究では、AICAR およびインスリン刺激によるグルコース取りこみに NO の関与の可能性について検討を加えた。

## 実験方法

### 対象

Wistar 系雄性ラット (体重100–130g) を用い、一晩絶食の後、ペントバルビタール (50mg/kg BW. ip) 麻酔下において滑車上筋を摘出した。本筋は筋層が20程度と非常に薄く、拡散距離が短い。また、酸素化されたインキュベーション溶液内では筋が酸素不足に陥ることがないため、数時間培養をしても高エネルギー磷酸化合物濃度が維持されることが知られている<sup>10)</sup>。

### 骨格筋グルコース取り込み測定法

インキュベーションは全て30℃で行い、酸素95%、二酸化炭素5%のガスで通気した。また浸透圧を一定にするためマニトールを加え全ての溶質濃度の合計を40mMにした。摘出筋をプラスチック容器内でピルビン酸ナトリウム (2mM)、牛血清アルブミン (0.1%) を含む3.6ml の Krebs-Henseleit バッファーで70分間インキュベ

ーションをした。インスリンシグナル系阻害条件では PI-3 キナーゼの阻害剤である wortmannin (100nM)、または NO シグナル系阻害条件では NO 合成酵素の阻害剤である N<sup>ε</sup>-monomethyl-L-arginine (L-NMMA, 300 μM) をバッファーに加えた。これら阻害剤は全てのインキュベーション溶液に同濃度で加えた。70分間のインキュベーション終了後、筋を上記のバッファーにインスリン (2mU/ml) もしくは AMPK の活性化剤である AICAR (2mM) を加えたバッファーに移し30分間刺激をした。次いで筋を 2-デオキシ-D-(1,2-<sup>3</sup>H) グルコース (1mM, 1 μCi), L-グルコース (0.2 μCi), 0.1% 牛血清アルブミンを含む3.6ml の Krebs-Henseleit バッファーで20分間インキュベーションし、グルコース取りこみを測定した。インキュベーション終了後、1 ml の水酸化ナトリウム (0.5M) の中で5分間ボイルし、これを1000g で10分間遠心した上清をサンプルとした。グルコース取りこみ量は筋細胞内水分量あたりに20分間で取り込まれたグルコース量 μmol/ml/20min で示した。

数値は平均値±標準誤差で示した。一元配置の分散分析を行い、有意差が認められた場合には Tukey の HSD 法に基づく多重比較検定を行った。危険率5%をもって統計的に有意とした。

## 結果

図1に AICAR およびインスリン刺激によるグルコース取りこみを示した。AICAR により約2倍、インスリン刺激により約4倍のグルコース取りこみが認められた。

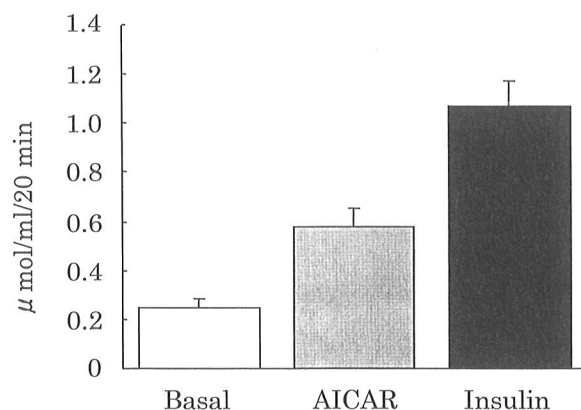


Fig.1 AICAR- or insulin-stimulated glucose uptake. Values are means ± SE; n=5-7 in each group.

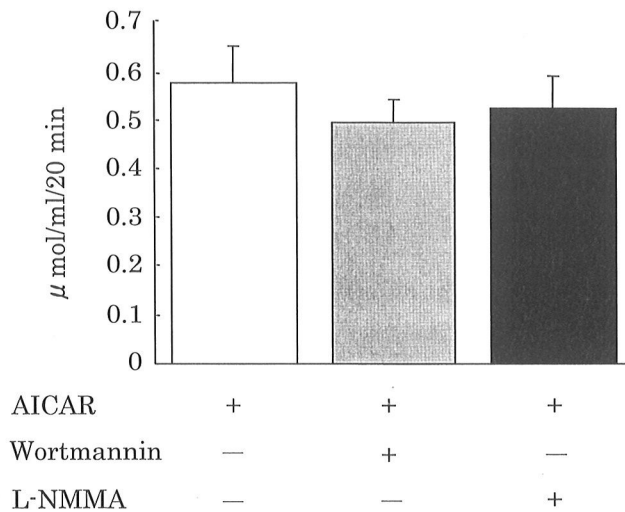


Fig.2 Effect of L-NMMA or wortmannin on AICAR-stimulated glucose uptake. Values are means  $\pm$  SE; n=5-8 in each group.

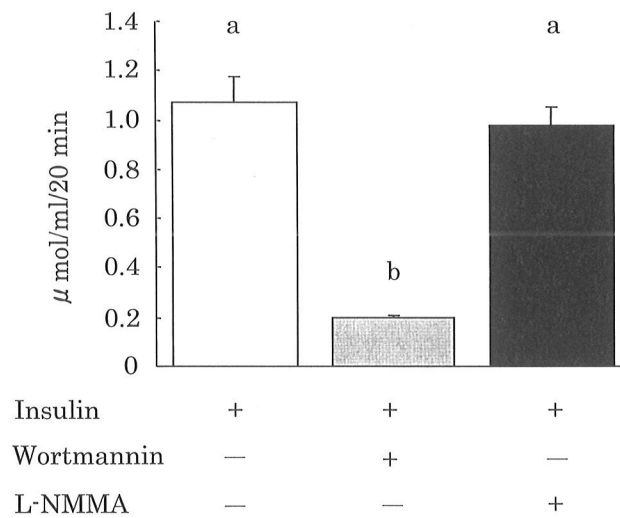


Fig.3 Effect of L-NMMA or wortmannin on insulin-stimulated glucose uptake. Values are means  $\pm$  SE; n=5 in each group. Values designated by different superscript letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

図2にAICAR刺激によるグルコース取りこみに対するPI-3キナーゼ阻害剤およびNO合成酵素阻害剤の影響を示した。AICAR刺激によるグルコース取りこみはwortmannin, L-NMMAによる影響はみられなかった。

図3にインスリン刺激によるグルコース取りこみに対するwortmannin, L-NMMAの影響を示した。wortmanninによりインスリン刺激によるグルコース取りこみは非刺激時と同レベルにまで有意に低下した( $p < 0.05$ )。しかし、L-NMMAはグルコース取りこみに

影響を与えなかった。

## 考 察

本研究ではAICARおよびインスリン刺激による骨格筋グルコース取りこみにNOが関与している可能性について検討を加えることを目的とした。NOは多くの組織で産生され多様な生理作用を有するため、本研究では*in vitro*においてNO合成酵素阻害剤がAICARおよびインスリン刺激によるグルコース取りこみに与

える影響について検索した。

NOはアルギニンからNO合成酵素によって産生される。先行研究により、電気刺激<sup>11)</sup>、トレッドミル走<sup>12)</sup>によりNO合成酵素活性は亢進し、骨格筋からのNOの産生が増加することが報告されている。NOはGLUT4をtranslocationさせ、収縮筋でのグルコース取りこみに関与している可能性が考えられている。Bradleyら<sup>13)</sup>は*in vitro*において筋運動によるグルコース取りこみをNO合成阻害剤により血流の変化を伴わず阻害したと報告している。また、Balonら<sup>7)</sup>やRobertsら<sup>14)</sup>は*in vitro*において急性運動によるグルコース取りこみはNO依存的であるとしている。しかし、Higakiら<sup>3)</sup>やEtgenら<sup>9)</sup>は同様の*in vitro*の検証によりNOの関与を否定する報告をしており、一定した知見が得られていない。

AMPKは近年筋収縮刺激によるグルコース取りこみに対し中心的役割を有すると考えられている酵素である。筋収縮刺激はAMPKを活性化させるが<sup>2, 3)</sup>、AMPKの薬理的活性化剤であるAICARによっても筋収縮を伴わずにグルコース取りこみを惹起させることが可能である<sup>2, 4, 5)</sup>。筋収縮刺激によるグルコース取りこみはインスリンシグナル系蛋白であるPI-3キナーゼの阻害剤wortmanninによって阻害されることが知られており<sup>2, 3)</sup>、本実験においてAICAR刺激によるグルコース取りこみもwortmanninによって阻害されない結果を得た。これは先行研究<sup>2)</sup>に一致しており、AICARと筋収縮刺激によるグルコース取りこみの類似性とインスリンシグナルとの独立性を示していると考えられる。AICAR刺激によるグルコース取りこみに対するNOの関与についてはほとんど研究がなされていないが、唯一Fryerら<sup>5)</sup>はAICAR刺激によるグルコース取りこみはNO合成酵素阻害剤によって低下したと報告している。我々はFryerらとは異なり、本実験からAICARはNO非依存的にグルコース取りこみがみられる結果を得た。筋収縮刺激によるグルコース取りこみがAMPK活性化を介するのであれば、我々の結果はHigakiら<sup>3)</sup>の筋収縮刺激はNOを介さないとの報告と一致している。

次に、インスリンとNOに関して、いくつか報告がなされている。Royら<sup>15)</sup>は*in vivo*におけるインスリン刺激によるグルコース取りこみはNO依存的であることを報告している。インスリンが*in vivo*におけるグルコース取りこみを増加させる作用起序の一つとして、インスリンの有する血管拡張作用に伴う血流の増加がある。この血管拡張は、インスリンが血管内皮細胞の内皮型NO合成酵素に作用し、NOの産生を増加させることによって生じる<sup>16)</sup>。内皮型NO合成酵素は骨格筋に

も発現が認められているため<sup>7, 8)</sup>、インスリン刺激によるグルコース取りこみにNOが関与している可能性が推察される。先行研究により、Balonら<sup>7)</sup>はインスリンによる最大刺激のグルコース取りこみは、NOドナーであるSNPを加えても相加的にはならないことを報告している。一方、インスリン刺激によるグルコース取りこみはNO合成酵素阻害剤によって阻害しないとの報告<sup>5, 7, 8, 9, 14)</sup>もあり、諸家の見解は一致していない。我々はNOの関与について、*in vitro*での再検討を試みた結果、NOは関与しないとの結論を得た。この結果は多くの*in vitro*を用いた報告<sup>5, 7, 8, 9, 14)</sup>と一致している。インスリンは骨格筋のNO産生を増加させないとの報告<sup>8)</sup>や、インスリン刺激とSNP刺激によるグルコース取りこみは完全に相加的になること(未発表データ)などから、少なくとも*in vitro*におけるインスリン刺激によるグルコース取りこみにNOは関与していないものと考えられる。

以上の結果から、AICARおよびインスリン刺激によるグルコース取りこみにNOは関与していない可能性が示唆された。

## 参考文献

1. Winder, W. W. and D. G. Hardie: Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *Am. J. Physiol.* 270: E299-E304, 1996.
2. Hayashi, T., M. F. Hirshman, E. J. Kurth, W. W. Winder and L. J. Goodyear: Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. *Diabetes.* 47: 1369-1373, 1998.
3. Higaki, Y., M. F. Hirshman, N. Fujii, and L. J. Goodyear: Nitric oxide increases glucose uptake through a mechanism that is distinct from insulin and contraction pathways in rat skeletal muscle. *Diabetes.* 50: 241-247, 2001.
4. Kurth-Kraczek, E. J., M. F. Hirshman, L. J. Goodyear and W. W. Winder: 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes.* 48: 1667-1671, 1999.
5. Fryer, L. G. D., E. Hajdуч, F. Rencurel, I. P. Salt, H. S. Hundal, D. G. Hardie and D. Carling: Activation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via stimulation of nitric oxide synthase. *Diabetes.* 49: 1978-1985, 2000.
6. Hajdуч, E., G. J. Litherland and H. S. Hundal: Protein kinase B (PKB/Akt) -a key regulator of glucose transport? *FEBS Letters.* 492: 199-203, 2001.
7. Balon, T. W. and J. L. Nadler: Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 82: 359-363, 1997.
8. Kapur, S., S. Bedard, B. Marcotte, C. H. Cote and A. Marette: Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle. A novel role for nitric oxide as a modulator of

- insulin action. *Diabetes*. 46: 1691-1700, 1997.
9. Etgen, G. J., Jr., D. A. Fryburg and E. M. Gibbs: Nitric oxide stimulates skeletal muscle glucose transport through a calcium/contraction- and phosphatidylinositol-3-kinase-independent pathway. *Diabetes*. 46: 1915-1919, 1997.
  10. Neshler, R., I. K. Karl, K. E. Kaiser and D. N. Kipnis. Epitrochlearis muscle. I. Mechanical performance, energetics, and fiber composition. *Am. J. Physiol.* 239: E454-E460, 1980.
  11. Balon, T. W. and J. L. Nadler: Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. *J. Appl. Physiol.* 77: 2519-2521, 1994.
  12. Roberts, C. K., R. J. Barnard, A. Jasman and T. W. Balon: Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 277: E390-E394, 1999.
  13. Bradley, S. J., B. A. Kingwell and G. K. McConnell: Nitric oxide synthase inhibition reduces leg glucose uptake but not blood flow during dynamic exercise in humans. *Diabetes*. 48: 1815-1821, 1999.
  14. Roberts, C. K., R. J. Barnard, S. H. Scheck and T. W. Balon: Exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle is nitric oxide dependent. *Am. J. Physiol.* 273: E220-E225, 1997.
  15. Roy, D., M. Perreault and A. Marette: Insulin stimulation of glucose uptake in skeletal muscles and adipose tissues in vivo is NO dependent. *Am. J. Physiol.* 274: E692-E699, 1998.
  16. Zeng, G. and M. J. Quon: Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 98: 894-898, 1996.

(2003年1月10日受付)

