

短時間の温熱刺激が骨格筋糖輸送活性促進に及ぼす メカニズムの解明

京都大学・順天堂大学 後 藤 亜由美
(共同研究者) 京都大学大学院 江 川 達 郎
同 林 達 也

Effect of Acute Heat Stress on Muscle Glucose Metabolism

by

Ayumi Goto

*Graduate School of Human and Environmental Studies,
Kyoto University*

*Sportology Center, Graduate School of Medicine,
Juntendo University,*

Tatsuro Egawa, Tatsuya Hayashi
*Graduate School of Human and Environmental Studies,
Kyoto University*

ABSTRACT

Skeletal muscle is the major organ responsible for whole-body glucose metabolism and utilization. Heat stress (HS) has been implicated in the regulation of whole-body glucose homeostasis. Recently, we have demonstrated that short-term HS (for 10 and 30 min) *in vitro* activates insulin-independent glucose transport, at least in part by stimulating 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) via decreased energy status in rat skeletal muscle. However, there have been no reports about the effect of acute HS (< 30 min) on glycogen and protein metabolism in skeletal muscle. The purpose of this study was to investigate the effect of short-term HS on glycogen and protein

synthesis using rat skeletal muscle. Male Sprague-Dawley rats weighing 150 g were killed by cervical dislocation without anesthesia, and epitrochlearis muscles were isolated. Muscle was then incubated in the absence or presence of HS (42°C, 30 min) in alpha minimum essential medium containing 50 μ U/mL insulin. HS decreased glycogen content and activated glycogen synthesis with decreasing the phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 β , without affecting the phosphorylation of glycogen synthase. HS tended to decrease protein synthesis, and correspondingly, HS decreased the phosphorylation of p70 ribosomal protein S6 kinase and 4E-binding protein 1. On the other hand, HS did not affect the mRNA expression of muscle-specific ubiquitin ligases: muscle atrophy F-box/atrogin-1 and muscle ring finger 1, or protein expression of autophagy-related markers: microtubule-associated protein 1 light chain 3 and p62. In conclusion, short-term HS might be a physiologically relevant stimulus that promotes glucose transport/glycogen synthesis axis and inhibit protein synthesis in skeletal muscle. Although further study is warranted, HS has similar action to exercise by acutely activating glycogen synthesis and suppressing protein synthesis with a reduction of the glycogen content in skeletal muscle.

要 旨

我々はこれまでに短時間の温熱刺激が骨格筋糖輸送活性を亢進させることを報告したが、グリコーゲン代謝やタンパク質代謝への影響は不明であった。本研究では、温熱刺激がグリコーゲン合成とタンパク質合成に及ぼす影響を検討した。ラットから滑車筋を単離して、緩衝液中にて熱刺激（42°C，30分間）を与えた。温熱刺激はグリコーゲン含有量を減少させ、グリコーゲン合成速度を亢進させたが、GSK3 β のリン酸化を抑制し、glycogen synthaseのリン酸化に変化を与えなかった。一方、タンパク質合成速度は温熱刺激によって減少傾向を示し、p70S6Kと4E-BP1のリン酸化も抑制された。温熱刺激はタンパク質分解制御因子とオートファジー制御因子には影響を与えなかった。以上より、骨格筋への短時間の温熱刺激は、分子機序は同一でないものの、急性運動と同様に、グリコーゲン合成を促進させタンパク

質合成シグナルを抑制する生理的刺激であることが示唆された。

緒 言

近年、我が国を含めて世界的に2型糖尿病人口が急速に増加し、その克服は国際的な課題となっている。糖尿病は心筋梗塞や脳血管障害などの動脈硬化性疾患の発症リスクを増加させ、活動量の低下や寝たきを誘発する原因となり得る。今後さらに高齢者人口の増加が見込まれる我が国において、糖尿病の予防や改善は寝たきり防止に重要である。

身体を温める温熱療法は古来より伝わる療法であり、疼痛の軽減や末梢血管拡張による血流量の増大などの生理学的作用を有することが知られている。近年、温水浴¹⁾やサウナ²⁾などの全身的な温熱刺激が糖尿病患者の血糖値を改善させることが報告された。また温熱刺激は、全身の代謝変化をもたらし、血液中のアディポサイトカイン

3) やインスリン⁴⁾、乳酸⁵⁾などにも影響を与えることが報告されている。さらに我々は、単離骨格筋への短時間の温熱刺激（10分または30分、42℃）が5'-AMP-activated protein kinase (AMPK)の活性化を介して骨格筋糖輸送活性を亢進させることを報告した⁶⁾。したがって温熱刺激は、骨格筋糖輸送活性を亢進させ、全身の糖代謝を改善させる刺激であるといえる。

骨格筋は人体最大の糖代謝器官であり、血糖の80%以上が取り込まれる。骨格筋内に取り込まれた糖は、エネルギー貯蔵形態としてグリコーゲンに変換され、運動や絶食状態により分解されエネルギーを作り出す。Koshinakaら⁵⁾の研究では、温熱刺激は骨格筋内のグリコーゲン含有量の減少と乳酸の増加を引き起こすことが報告されている。さらに我々は、温熱刺激がグリコーゲン含有量のみならず、アデノシン三リン酸 (ATP) とクレアチンリン酸 (PCr) を減少させることを報告している⁶⁾。このことから、温熱刺激はエネルギーレベルの低下を補うために解糖系システムを働かせること、そして低下したグリコーゲンの補充のために糖輸送を活性化させるものと考えられる。しかしながらこれまでのところ、温熱刺激がグリコーゲン代謝に及ぼす影響や、細胞のエネルギーレベルと密接な関係を持つタンパク質代謝に及ぼす影響は明らかではない。

そこで本研究は、骨格筋への短時間の熱刺激がグリコーゲン合成ならびにタンパク質合成に及ぼす影響について、ラット単離骨格筋を用いて検討することを目的とした。ラット単離骨格筋を用いたインキュベーションシステムは、血液循環や液性因子、神経系、消化器系などの影響を除外することができ、温熱刺激の直接的な作用を検討することが可能である。

1. 研究方法

1.1 実験対象

本研究では生後5-6週齢の雄性 Sprague Dawley ラット（体重150g）に54匹を用いた。本実験は京都大学大学院人間・環境学研究科ならびに京都大学放射性同位元素センターの審査・承認を経て実施された。

1.2 処置方法

ラットは一晩の絶食後、頸椎脱臼により安楽死させ、直ちに前肢筋の滑車上筋を摘出した。単離した滑車上筋は、Gupteら⁷⁾の方法を用いて即座に50 μ U/ml インスリンを含む α minimum essential medium (α MEM) 緩衝液中にて35℃、60分間のプレインキュベーションを行った。その後、42℃の α MEM 緩衝液中にて30分の熱刺激を行った。

1.3 電気泳動およびウェスタンブロット法

筋サンプルにおけるタンパク質発現量の解析にはウェスタンブロット法を用いた。得られた筋サンプルはToyodaら⁸⁾の方法を用いてホモジナイズし、16,000gで遠心した後に上清を回収した。回収した上清中のタンパク質(10 μ g)を10%のアクリルアミドゲルを用いて電気泳動・分離し、polyvinylidene difluoride メンブレンに転写した。このメンブレンを0.1% Tween-20を含む Tris buffered saline (TBS-T; pH 7.4) で数回洗浄し、5% skim-milk で1時間ブロッキングした後にTBS-Tで5,000倍希釈した Actin 抗体 (#4968; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), glycogen synthase (GS) Ser641 抗体 (#3891; Cell Signaling Technology), GS 抗体 (#3893; Cell Signaling technology), glycogen synthase kinase (GSK) 3 β Ser9 抗体 (#9336; Cell Signaling Technology), GSK3 β 抗体 (#9315;

Cell Signaling Technology), phospho-p70 s6 kinase (p70S6K) Thr389 抗体 (9206, Cell Signaling Technology), p70S6K 抗体 (#9202; Cell Signaling Technology), 4E-binding protein 1 (4E-BP1) Thr37/46 抗体 (#9459; Cell Signaling Technology), SQSTM1/p62 抗体 (#5114; Cell Signaling Technology), microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) B 抗体 (#2775; Cell Signaling Technology) 溶液にて4℃で一晩インキュベーションした。このメンブレンを洗浄し、TBS-Tで10,000倍に希釈した anti-rabbit IgG と室温で1時間反応させ、これを化学発光試薬 (ImmunoStar LD, 和光純薬工業, 大阪) を用いてバンドを可視化し、デジタル画像としてコンピュータに取り込んだ。各筋サンプルのバンドは画像解析ソフト Image J を用いて定量化した。

1.4 リアルタイム RT-PCR 法

筋サンプルにおける遺伝子 (mRNA) 発現の解析は、定量リアルタイム逆転写ポリメラーゼ転写反応 (Real-time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction : real-time RT-PCR) にて行った。抽出した骨格筋サンプルは、RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hiden, Germany) を用いて RNA 抽出を行った。抽出した RNA サンプルは、DNase I 処理後、High-Capacity RNA-to-cDNATM Kit (Life Technologies, California, USA) を用いて cDNA に逆転写した。合成した cDNA は Takara SYBR Premix EX Taq II を用いて、RT-PCR を行った。各遺伝子の増幅は表 1 で示したプライマーを用いて行った。また、内在性コントロールとして Rps18 cDNA を用い、Rps18 に対する各遺伝子発現レベルの相対的発現量を評価した。

表 1 本実験で使用したプライマー配列一覧

Primer	Forward	Reverse
Rps18	5'-AAGTTTCAGCACATCCTGCGAGTA-3'	5'-TTGGTGAGGTCAATGTCTGCTTTC-3'
MuRF1	5'-GACTCCTGCCGAGTGACCAA-3'	5'-TTCTCGTCCAGGATGGCGTA-3'
Atrogin-1	5'-CAACATGTGGGTGTATCGAATGG-3'	5'-TGATGTTTCAGTTGTAAGCACACAGG-3'

1.5 グリコーゲン合成速度

筋サンプルにおけるグリコーゲン合成速度の測定は Bouskila ら⁹⁾ の方法を基に実施した。熱刺激終了後、0.5 μ Ci/ml の [14C]-glucose を含んだ α MEM にて 30℃、10 分のインキュベーションを行った。回収した筋サンプルは 30% KOH で溶解し、5% グリコーゲンとエタノールを追加することでグリコーゲンを沈殿させた。沈殿したグリコーゲンは液体シンチレーションカウンターにて [14C]-glucose を測定し、グリコーゲン合成速度を算出した。

1.6 タンパク質合成速度

筋サンプルにおけるタンパク質合成速度の測定は Dardevet ら¹⁰⁾ の方法を基に実施した。熱刺激終了後、2 μ Ci/ml の [14C]-Phenylalanine を含んだ α MEM にて 30℃、10 分のインキュベーションを行った。回収した筋サンプルは 10% Trichloroacetic Acid でホモジネートし、NaOH を加えた後に液体シンチレーションカウンターにて [14C]-Phenylalanine を測定した。また筋のタンパク質濃度は Pierce BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, Waltham) を用いた。上記より得られた値を用いてタンパク質合成速度を算出した。

1.7 統計処理

全ての測定値は平均 \pm 標準偏差で示した。統計処理は Student's t-test を用いて行い、有意水準は $p < 0.05$ とした。

2. 結果

図 1 は温熱刺激後の筋内グリコーゲン含有量、

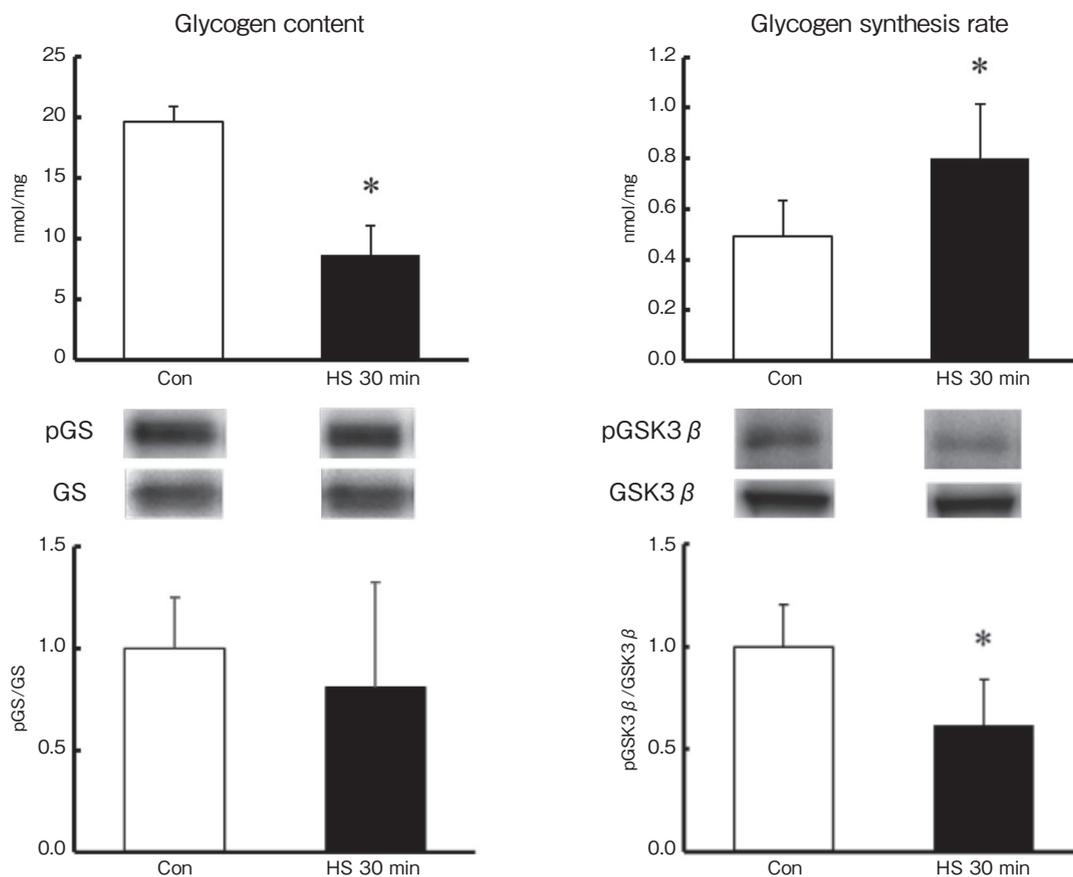


図1 熱刺激におけるグリコーゲン含有量, グリコーゲン合成速度ならびにその因子の変化
n=8-15 * P<0.05 vs. Con

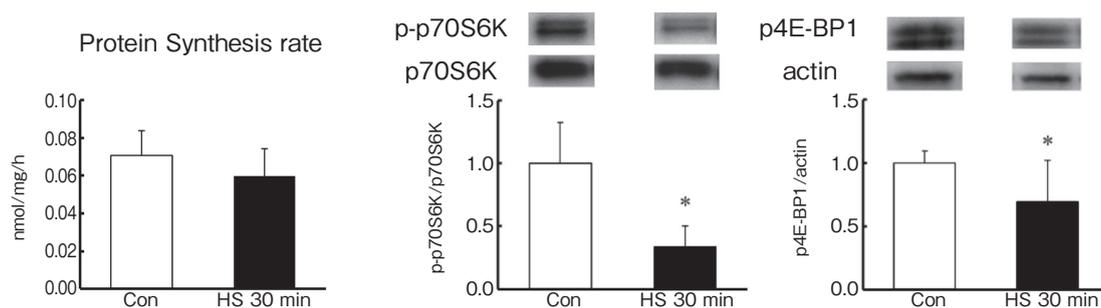


図2 熱刺激におけるタンパク質合成速度ならびにその制御因子の変化
n=5-12 * P<0.05 vs. Con

グリコーゲン合成速度, グリコーゲン合成のシグナル制御因子(GS, GSK3β)の変化を示している. 温熱刺激は筋内グリコーゲン含有量を有意に減少させグリコーゲン合成速度を増加させた. しかしながら, 温熱刺激は GSK3β のリン酸化を有意に抑制し, GS のリン酸化に変化を与えなかった.

図2は温熱刺激後タンパク質合成速度, タンパク質合成のシグナル制御因子(p70S6K, 4E-BP1)の変化を示している. 温熱刺激はタンパク質合成速度を有意には変化させなかったものの減少傾向を示し, p70S6Kと4E-BP1のリン酸化を有意に減少させた. 図3は温熱刺激後のタンパク質分

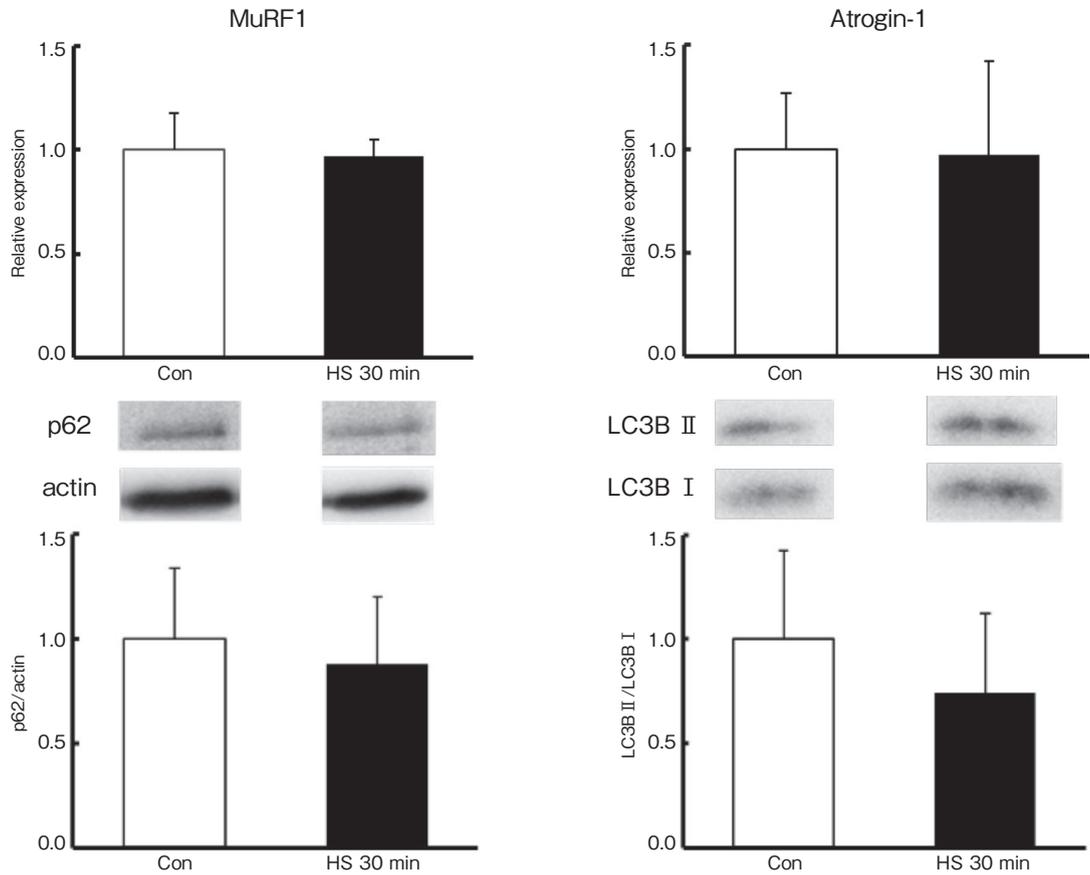


図3 熱刺激におけるタンパク質分解制御因子の遺伝子発現とオートファジー制御因子の変化
n=6-10

解に参与するユビキチン-プロテアソーム系の制御因子 [muscle ring finger 1: (MuRF1), muscle atrophy F-box/atrogin-1 (Atrogin-1)] とオートファジー制御因子 (p62, LC3B II) の発現量を示している。温熱刺激による MuRF1 と Atrogin-1 の mRNA 発現量に有意な変化は認められなかった。また、p62 と LC3B II の発現量においても、温熱刺激による有意な変化は示されなかった。

3. 考察

本研究では、ラットから単離した骨格筋を用いて、温熱刺激がグリコーゲン代謝ならびにタンパク質代謝に及ぼす影響について検討を行った。その結果、以下の2点が新たに明らかとなった。1) 温熱刺激は骨格筋のグリコーゲン含有量を低下さ

せ、グリコーゲン合成速度を増加させた。この際グリコーゲン合成の制御因子である GSK3β のリン酸化の低下が認められたが、GS のリン酸化に変化は認められなかった。2) 温熱刺激は骨格筋のタンパク質合成速度を抑制する傾向を示し、タンパク質合成の制御因子である p70S6K と 4E-BP1 のリン酸化は低下した。一方、タンパク質分解に参与するユビキチン-プロテアソーム系の制御因子である MuRF1 と Atrogin-1 の遺伝子発現、およびオートファジーの制御因子である p62 と LC3B II の蛋白質発現には変化が認められなかった。

今回の結果は、温熱刺激が筋収縮に類似したメカニズムによってグリコーゲン合成を活性化している可能性を示すものである。グリコーゲン合成

の活性化は、筋収縮¹¹⁾ など筋内のグリコーゲン含有量が減少することを誘因として生じることが知られている。実際、今回の研究でも、温熱刺激は筋内のグリコーゲン含有量を減少させ、それに伴ってグリコーゲン合成速度が増加した。しかしながら、グリコーゲン合成の制御因子であるGSK3 β のリン酸化は減少し、GSのリン酸化は変化しなかった。一般に、筋収縮後のグリコーゲン合成活性化時には、GSK3 β のリン酸化亢進とGSのリン酸化抑制が生じることが知られている¹²⁾。この差異に関しては今回の研究では解明できておらず、更なる検討が必要である。

今回の研究では、温熱刺激によりタンパク質合成速度の抑制傾向とタンパク質合成制御因子の抑制が認められた。一般に、レジスタンス運動は筋肥大を誘導する運動であるが、レジスタンス運動の直後ではタンパク質合成が抑制され、それに伴って4E-BP1のリン酸化が減少することが報告されている¹³⁾。このことから温熱刺激直後も、筋収縮後と同様に、一時的にタンパク質合成が抑制されている可能性が示唆される。実際、温熱刺激が骨格筋や全身の糖代謝を改善させるだけでなく筋肥大効果も有することが動物¹⁴⁾ やヒト¹⁵⁾ を対象として報告されている。

4. 総括

今回の一連の研究により、骨格筋への短時間の温熱刺激が糖輸送活性化を惹起するメカニズムとして、グリコーゲン量低下に伴うグリコーゲン合成の活性化が関与している可能性が明らかになった。また、タンパク質合成能が抑制されることも明らかになった。これらの結果は、骨格筋への温熱刺激が急性運動と同様の代謝変化をもたらす可能性を提示するものであり、2型糖尿病患者や自発的な運動が困難な人の骨格筋代謝改善のための新しい手段となる可能性が期待される。しかし、温熱刺激と急性運動が誘導する分子機序に異なる

部分が存在する可能性も明らかとなり、今後のさらなる検討が必要である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、助成を賜りました公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に深く御礼申し上げます。また実験補助としてご協力いただきました京都大学大学院人間・環境学研究科運動医科学研究室の皆様にも深く感謝いたします。

文献

- 1) Hooper P.L., Hot-tub therapy for type 2 diabetes mellitus. *The New England journal of medicine*, **341**, 924-925 (1999)
- 2) Biro S., Masuda A., Kihara T., Tei C., Clinical implications of thermal therapy in lifestyle-related diseases. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), **228**, 1245-1249 (2003)
- 3) Morera P., Basirico L., Hosoda K., Bernabucci U., Chronic heat stress up-regulates leptin and adiponectin secretion and expression and improves leptin, adiponectin and insulin sensitivity in mice. *Journal of molecular endocrinology*, **48**, 129-138 (2012)
- 4) Gupte A.A., Bomhoff G.L., Swerdlow R.H., Geiger P.C., Heat treatment improves glucose tolerance and prevents skeletal muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Diabetes*, **58**, 567-578 (2009)
- 5) Koshinaka K., Kawamoto E., Abe N., Toshinai K., Nakazato M., Kawanaka K., Elevation of muscle temperature stimulates muscle glucose uptake in vivo and in vitro. *The journal of physiological sciences : JPS*, **63**, 409-418 (2013)
- 6) Goto A., Egawa T., Sakon I., Oshima R., Ito K., Serizawa Y., Sekine K., Tsuda S., Goto K., Hayashi T., Heat stress acutely activates insulin-independent glucose transport and 5'-AMP-activated protein kinase prior to an increase in HSP72 protein in rat skeletal muscle. *Physiological reports*, **3**(2015)
- 7) Gupte A.A., Bomhoff G.L., Touchberry C.D., Geiger P.C. Acute heat treatment improves insulin-stimulated glucose uptake in aged skeletal muscle. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985),

- 110, 451-457 (2011)
- 8) Toyoda T., Hayashi T., Miyamoto L., Yonemitsu S., Nakano M., Tanaka S., Ebihara K., Masuzaki H., Hosoda K., Inoue G., Otaka A., Sato K., Fushiki T., Nakao K., Possible involvement of the alpha isoform of 5'AMP-activated protein kinase in oxidative stress-stimulated glucose transport in skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, **287**, E166-173 (2004)
 - 9) Bouskila M., Hirshman M.F., Jensen J., Goodyear L.J., Sakamoto K., Insulin promotes glycogen synthesis in the absence of GSK3 phosphorylation in skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, **294**, E28-35 (2008)
 - 10) Dardevet D., Sornet C., Vary T., Grizard J., Phosphatidylinositol 3-kinase and p70 s6 kinase participate in the regulation of protein turnover in skeletal muscle by insulin and insulin-like growth factor I. *Endocrinology*, **137**, 4087-4094 (1996)
 - 11) Lai Y.C., Lin F.C., Jensen J., Glycogen content regulates insulin- but not contraction-mediated glycogen synthase activation in the rat slow-twitch soleus muscles. *Acta. physiologica (Oxford, England)*, **197**, 139-150 (2009)
 - 12) Lin F.C., Bolling A., Stuenkel J.T., Cumming K.T., Ingvaldsen A., Lai Y.C., Ivy J.L., Jensen J., Effect of insulin and contraction on glycogen synthase phosphorylation and kinetic properties in epitrochlearis muscles from lean and obese Zucker rats. *American journal of physiology. Cell physiology*, **302**, C1539-1547 (2012)
 - 13) Dreyer H.C., Fujita S., Cadenas J.G., Chinkes D.L., Volpi E., Rasmussen B.B., Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle. *The Journal of physiology*, **576**, 613-624 (2006)
 - 14) Ohno Y., Yamada S., Goto A., Ikuta A., Sugiura T., Ohira Y., Yoshioka T., Goto K., Effects of heat stress on muscle mass and the expression levels of heat shock proteins and lysosomal cathepsin L in soleus muscle of young and aged mice. *Molecular and cellular biochemistry*, **369**, 45-53 (2012)
 - 15) Goto K., Oda H., Kondo H., Igaki M., Suzuki A., Tsuchiya S., Murase T., Hase T., Fujiya H., Matsumoto I., Naito H., Sugiura T., Ohira Y., Yoshioka T., Responses of muscle mass, strength and gene transcripts to long-term heat stress in healthy human subjects. *European journal of applied physiology*, **111**, 17-27 (2011)