

加齢により減弱したインスリン作用を改善する 運動トレーニング効果に関する研究

愛知学院大学 長崎 大
(共同研究者) 名古屋工業大学大学院 下村 吉治
名古屋大学総合保健
体育科学センター 押田 芳治
愛知学院大学 佐藤 祐造

Effects of Aging and Exercise Training on Insulin Signaling Molecules in Rat Skeletal Muscle

by

Masaru Nagasaki, Yuzo Sato

Department of Physical Science,

Faculty of Psychological and Physical Science, Aichi Gakuin University

Yoshiharu Oshida

Research Center of Health,

Physical Fitness and Sports, Nagoya University

Yoshiharu Shimomura

Department of Materials Science and Engineering,

Shikumi College, Nagoya Institute of Technology

ABSTRACT

It is well established that peripheral insulin resistance is exacerbated by aging and sedentarism. On the other hand, long-term exercise training prevents the aging-induced decrease in insulin sensitivity. The training effects represented by improved insulin action in vivo are attributed largely to changes in muscular factors such as increased muscle volume, increased rate of blood flow in the exercising muscle, and changes in the post-insulin receptor mechanisms. However, little is known about the responses to short-term exercise

training of muscular insulin signaling molecules such as insulin receptor, insulin receptor substrate-1 (IRS-1), phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase), 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK-1), and Cbl. In the present study, we examined the effects of aging and short-term exercise training on the protein contents of insulin signaling molecules in rat skeletal muscle. Female Sprague-Dawley rats (7 and 27 wk old) were divided into 2 groups. One half of the rats in each group was kept sedentary (SED) and another half was trained (TR) by swimming exercise. Rats in the training group were swim-trained for 5 days. Dissection procedures to obtain gastrocnemius muscle were carried out approximately 16 h after the last bout of exercise. The contents of the gastrocnemius insulin signaling molecules were determined by Western blotting. Aging and exercise training did not affect the content of insulin receptor, PI 3-kinase, PDK-1, and Cbl, proteins in rat skeletal muscle. On the other hand, while the IRS-1 protein in sedentary rats was significantly decreased with aging (53 % at 27 wk of age relative to the abundance at 7 wk of age), it was not affected by aging in trained animals (TR-7wk: 92%, TR-27wk: 68%). These results suggest that the improvement in insulin sensitivity by training may be due, at least in part, to regulation on the IRS-1 protein content in skeletal muscle.

要 旨

【目的】運動トレーニングが加齢に伴うインスリン感受性の低下を防止することは周知の事実であるが、その機序については不明な点が多い。本研究では、インスリン情報伝達に関与するタンパク量に対する加齢と運動トレーニングの影響について検討した。【方法】7および27週齢のSD系雌性ラットをそれぞれ安静 (S) 群と運動トレーニング (T) 群に分け、T群には水泳運動を5日間行わせた。最終の運動終了後16時間で腓腹筋を摘出し、インスリン受容体、IRS-1、PI 3-kinase、PDK-1およびCblのタンパク量を Western blotting 法により測定した。【結果】IRS-1のタンパク量は、S群では加齢に伴い有意に低下したが ($p < 0.05$)、T群では有意な加齢の影響を受けなかった。すなわち、S群の7週齢 (100%) に比してS群の27週齢では53%であり、T群の27週齢では68%であった。一方、インスリン受容体、PI 3-kinase、

PDK-1およびCblのタンパク量は、加齢および運動トレーニングの影響を受けなかった。【まとめ】以上の成績より、加齢によるインスリン感受性低下に対する運動トレーニングの改善効果には、骨格筋におけるIRS-1タンパク量の調節が関与している可能性が示唆された。

緒 言

加齢に伴い、身体諸機能が低下すること²¹⁾はこれまで多くの報告により明らかとなっている。ことに糖代謝に関して、2型糖尿病の発症率は年齢とともに増加し、40歳以上では約5人に1人以上の割合で糖尿病が発症する (厚生労働省実態調査, 2003年8月)。5年前の前回調査から250万人増え、全国の成人約1億200万人のうち6.3人に1人は糖尿病か、その予備軍に含まれていることになる。年齢別では、70代男性は前回調査の11.3%から21.3%に急増した。加齢に伴う耐糖能障害の成因としては、食事摂取の不良、不活動性、

除脂肪体重の減少、インスリンの分泌低下、インスリン抵抗性などが指摘されている。すなわち加齢は糖尿病発症の重要な危険因子となっている。この加齢に伴う糖尿病発症の要因として、インスリン抵抗性が最も注目される。われわれも、これまで糖代謝を中心に加齢の影響を検討しており、ヒトおよびラットにおいて、加齢は末梢組織のインスリン感受性を低下させる結果を得ている。一方、身体トレーニングの継続は、個体のインスリン感受性を改善し、糖尿病、肥満をはじめ、インスリン抵抗性関連のすべての病態の予防・治療に有用である²²⁾。今後、高齢化のさらなる進展に伴い、疾病の治療や介護に関わる社会的負担はますます大きくなると予測され、その対策が重要な課題となっている。その対策として身体運動は、健康の維持増進に寄与し、社会負担の軽減に大きく貢献することは確実である。こうした背景から本研究では、加齢に由来するインスリン抵抗性の改善における身体トレーニングの果たす役割に焦点を当て、インスリン感受性の改善をもたらす運動の効果を実証するためにラットに運動トレーニングを行った。

骨格筋はインスリン刺激による糖の取り込みの80%以上を処理しているが、インスリン抵抗性はこの骨格筋におけるインスリン作用の低下によるものであり、その原因としてインスリン受容体(IR)結合低下に伴うインスリンシグナル伝達因子の障害が考えられている。インスリンによる糖取り込みの分子機構は、インスリンが標的組織(骨格筋、脂肪細胞)の細胞表面に存在するインスリン受容体に結合することから始まる。そして、IRの細胞内部分にあるチロシンキナーゼが活性化され、活性化されたIRは細胞内にある数種類のタンパクを基質としてリン酸化し、細胞内へとシグナルを伝える。つまり、インスリンシグナルは、insulin receptor substrate (IRS) -1, 2などをリン酸化し、phosphatidylinositol (PI) 3-kinaseな

どSrc-homology 2 (SH2) ドメインを有するタンパクが結合して活性化する。さらに、活性化されたPI 3-kinaseは、PI (4,5)2リン酸を基質として、PI (3,4,5)3リン酸を産生し、3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK-1)と活性化していく。これらのタンパクの活性化が、GLUT-4を細胞膜上へトランスロケーションさせ、インスリンによる糖代謝の促進や細胞増殖に関与していると考えられている。2型糖尿病患者および肥満者では、IRのチロシンキナーゼ活性が低下していると数多く報告^{10, 12, 14)}されている。そして、IRS-1についてもそのタンパク量やチロシンリン酸化の低下がインスリン作用低下の原因とされている¹⁰⁾。2型糖尿病患者では、インスリン刺激時のIRS-1チロシンリン酸化が正常コントロールよりも低く、インスリンに対するチロシンリン酸化反応が著明に悪化している²³⁾。さらに、IRS-1に結合するPI 3-kinase活性の減少も認められている^{4, 7)}。一方、インスリン感受性改善を中心とするトレーニング効果の発現には、インスリン受容体数、その親和性、レセプターキナーゼ活性、IRS-1, PI 3-kinase, GLUT-4, ヘキソキナーゼII, グリコーゲン合成酵素などの糖代謝に関わる因子が関与する。また、われわれも、長期(6ヶ月)の運動トレーニングによるインスリン感受性改善のメカニズムとして、筋細胞膜画分のGLUT-4タンパク量¹⁷⁾およびIRS-1, PI 3-kinaseタンパク量¹⁶⁾が関与している事実を報告している。急性運動時には関与しないと報告されているIRS-1およびPI 3-kinaseは、運動トレーニングにより発現が高まる理由や、効果発現までの期間などその詳細について明らかになっていないが、インスリン感受性の増加とともにPI 3-kinaseの活性上昇が運動トレーニングによってもたらされること^{9, 11)}が報告されている。また、最近では、インスリン作用のひとつとして、PI 3-kinase以外のシグナル系であるCblの活性化が必要であることが報告されてい

るが、加齢や短期間の運動トレーニングの影響については不明である。そこで、インスリンシグナル分子に対して、加齢と運動トレーニングが及ぼす影響を検討した。

1. 方法

1.1 実験動物と運動トレーニング

実験動物には7週齢（体重：安静群152g，運動トレーニング群153g，各群n=4）および27週齢（体重：安静群287g，運動トレーニング群283g，各群n=4）のSprague Dawley (SD) 系雌性ラット（日本クレア株式会社）を用いた。室温は22℃に保持し，12時間の明暗サイクルを設定し飼育した。飼料は，市販固形飼料（CE-2，日本クレア株式会社）および水道水を自由摂食させた。それぞれのラットを安静群と運動トレーニング群に分け，運動トレーニング群には，流水式プールを用い水泳運動を5日間行わせた。水温は35℃に設定し，水泳運動の負荷は水流によって調節して，第1日目は2時間の水泳を45分間の休憩をはさみ2セット行わせた。第2日目以降は，各セットで15分ずつ延長し，最終日の第5日目には3時間を2セット行わせた。一方，安静群のラットは，同期間同様の水温で設定した低床プール（足部が着床）にて温水浸漬のみを行った。そして，最終のトレーニング終了から16時間後に骨格筋を摘出し直ちにフリーズクランプ法により凍結して分析するまで-80℃で保存した。なお，安静群および運動トレーニング群は，解剖23時間前から絶食とした。解剖時の体重は，7週齢安静群160g，7週齢運動トレーニング群156g，27週齢安静群288g，27週齢運動トレーニング群281gであった。なお，7週齢安静群をコントロールとした。

1.2 分析 ウェスタンブロット法による

インスリンシグナルタンパク量の測定
骨格筋はホモゲナイズ処理した後に遠心分離し

て上清を回収し，この上清を用いてインスリンシグナル分子タンパク量を測定した。その概略を以下に示した。凍結保存した骨格筋組織を10倍量のホモゲナイズバッファー（20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 100 mM NaF, 10 mM Na₃VO₄, 10 mM EDTA, 1 mg/ml leupeptin, and 1 mg/ml aprotinin）中でポッターホモゲナイザーを用いて均一化し，その後，超遠心機（L5-50B, Beckman）を用いて遠心分離（Type 50.2Ti rotor; 38,000 rpm, 4℃, 1時間）して上清を回収した。そしてこの上清のタンパク濃度をBio-Rad Protein assay 染色液（Bio-Rad Laboratories）にてbovine serum albumin 溶液を標準液として測定した。この測定にもとづき一定量の上清をサンプルバッファー（62.5 mM Tris, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 0.02% bromophenol blue）中で4分間煮沸処理した。次にそのサンプルをポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ，セミドライ式プロテイング装置（Bio-Rad Laboratories）にてタンパク質をpolyvinylidene difluoride membrane（PVDFメンブラン；Millipore Corp.）にWestern blotting法にて転写させた。転写後，TBS-T（20 mM Tris, 0.5 M NaCl, 0.05% Tween-20）で洗浄し，3% BSAを含むTBS-Tにて室温で1時間ブロッキングした。次に，メンブランを各抗体（抗IR; Santa Cruz SC-711, 抗IRS-1; Santa Cruz SC-559, 抗PI 3-kinase; Santa Cruz SC-423, 抗Cbl; Santa Cruz SC-170, 抗PDK-1; Upstate Biotechnology 06-906）と4℃で一晩反応させた。そして，メンブランをそれぞれの一次抗体に対応する二次抗体（Goat Anti-Rabbit IgG-HRP; 170-1019, Protein G-HRP; 170-6425, Bio-Rad Laboratories）を用いて室温で1時間反応させた後，ECL ウェスタンブロット検出試薬（Amersham Pharmacia Biotech）と反応させ，化学発光をX-rayフィルムに露光し，現像処理をした。現像処理によって視

覚化されたタンパクバンドをスキャナーでコンピュータに取り込み，そのタンパクバンドの明暗度を NIH image (version. 1.6.1) にて定量した¹⁶⁾。

1. 3 統計分析

すべての測定値は，平均±標準誤差で示した。加齢と運動トレーニングの効果の判定は，2元配置分散分析を用い，各実験群の種々の測定値の有意差検定には，フィッシャーのPLSD 多重比較を用いた。有意差の判定は，確立水準5%以下を有意とした。

2. 結果

2. 1 IRタンパク量

IRのタンパク量(図1)は，安静群において，27週齢では71%まで低下するが7週齢(100%)との間に有意差は認められなかった。また，運動トレーニングは有意な変動を認めなかった(7週齢；141%，27週齢；101%)。

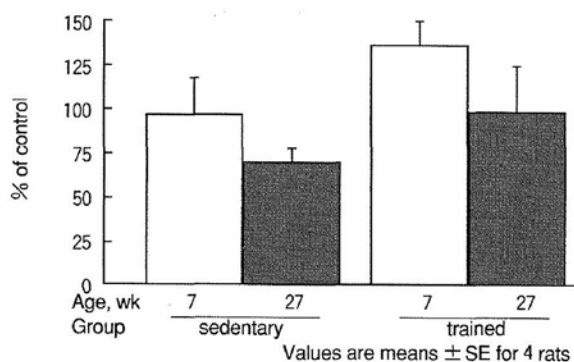


図1 ラット骨格筋のIRタンパク量に及ぼす加齢と運動トレーニングの影響

2. 2 IRS-1タンパク量

IRS-1のタンパク量(図2)は，安静群では加齢に伴い有意に低下した($p < 0.05$)。また，運動トレーニング群では加齢の影響を受けなかった。すなわち，安静群の7週齢(100%)に比して安静群の27週齢では53%であり，運動トレーニング群の27週齢では68%であった。

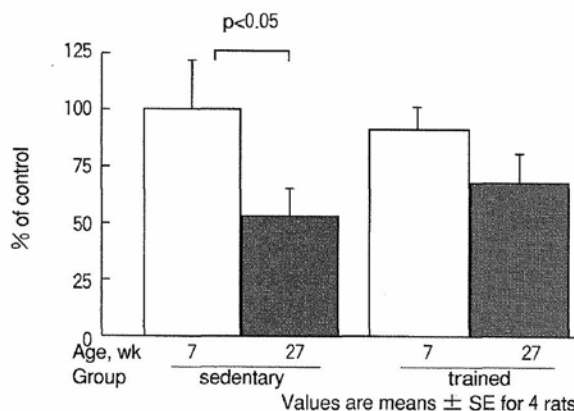


図2 ラット骨格筋のIRS-1タンパク量に及ぼす加齢と運動トレーニングの影響

2. 3 PI 3-kinaseタンパク量

PI 3-kinaseのタンパク量(図3)は，安静群において，27週齢では71%まで低下するが7週齢(100%)との間に有意差は認められなかった。また，運動トレーニングは有意な変動を認めなかった(7週齢；114%，27週齢；96%)。

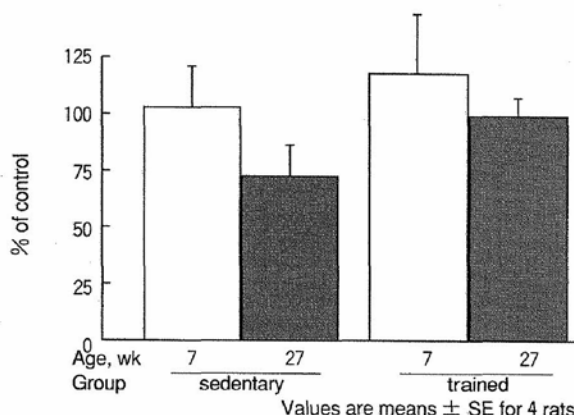


図3 ラット骨格筋のPI 3-kinaseタンパク量に及ぼす加齢と運動トレーニングの影響

2. 4 Cblタンパク量

Cblのタンパク量(図4)は，加齢および運動トレーニングの影響を受けなかった。すなわち，安静群の7週齢(100%)に比して安静群の27週齢では82%であり，運動トレーニング群の7週齢では109%，27週齢では66%であった。

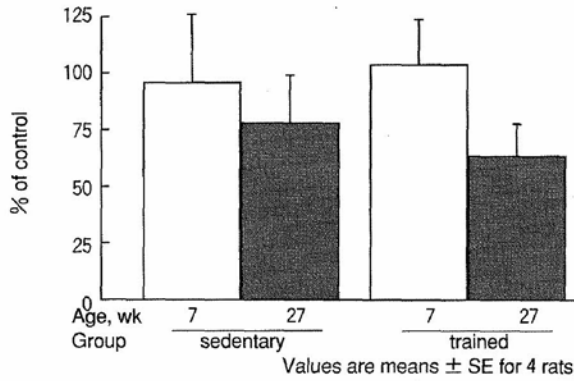


図4 ラット骨格筋のCblタンパク量に及ぼす加齢と運動トレーニングの影響

2.5 PDK-1タンパク量

PDK-1のタンパク量(図5)は、加齢および運動トレーニングの影響を受けなかった。すなわち、安静群の7週齢(100%)に比して安静群の27週齢では90%であり、運動トレーニング群の7週齢では122%、27週齢では96%であった。

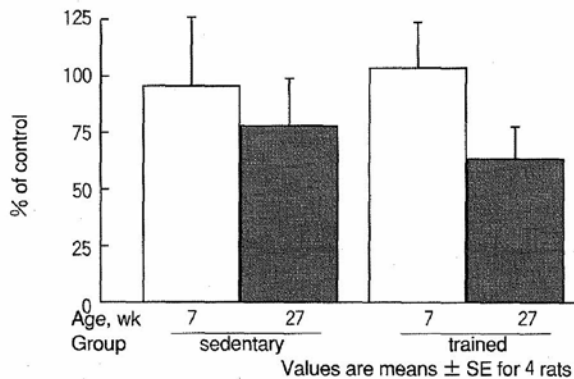


図5 ラット骨格筋のPDK-1タンパク量に及ぼす加齢と運動トレーニングの影響

3. 考察

本研究では、運動トレーニングは加齢に伴うIRS-1の減少を防止することを示した。われわれは、先行研究^{16, 17)}において、加齢に伴うインスリン感受性低下を長期間の運動トレーニングが防止すること、また、その改善効果には骨格筋細胞膜上のGLUT-4、IRS-1およびPI 3-kinaseタンパク量が関与していることを報告してきた。このように、加齢に伴うインスリン感受性低下の防止に対する、長期間の運動トレーニングの改善効果に

は、IRS-1、PI 3-kinaseおよびGLUT-4の調節が関与するのに対して、短期間の運動トレーニングの効果には、IRS-1の調節が関与している可能性が示唆された。

先行研究^{3, 6, 24)}では、加齢に伴うインスリン感受性の低下が数多く報告されている。本研究では、全身のインスリン感受性や筋の糖利用は測定していないが、われわれは、先行研究において、27週齢で抵抗性が現れることを報告している¹⁷⁾。本研究では、そのインスリン抵抗性が出現した際のインスリンシグナル分子に注目し、運動トレーニング効果を検討したところIRS-1が影響を受けることを認めた。先行研究において、IRS-1のmRNAおよびタンパク量の減少は、高インスリン血症や耐糖能障害、すなわち、インスリン抵抗性を発症する要因として報告されているが、本研究でもIRS-1のタンパク量は加齢により低下した。これらのことから、加齢に伴うIRS-1タンパク量の減少は、インスリン抵抗性発現の原因に関与する可能性が示唆された。一方、安静ラットとは対照的に、トレーニングラットのIRS-1タンパク量は加齢による影響を受けなかった。これまでに、単回の筋収縮ではIRS-1のリン酸化を刺激しないことが報告¹⁹⁾されているので、運動トレーニングによるIRS-1発現の誘発は、インスリン抵抗性の改善に貢献する可能性が高い。したがって、トレーニングラットは、安静ラットよりも高いIRS-1タンパクの発現によってインスリン感受性を改善している可能性が示唆された。

本研究では、IRのタンパク量は、安静群の27週齢では71%まで低下し、運動トレーニングによって101%まで回復させた傾向にあったが有意差を認めなかった。しかし、チロシンリン酸化などのIRの機能は加齢によって減少することが報告されているので、運動トレーニングの影響を評価する際においても、そのリン酸化などより生理的なレベルでの測定が必要と考えられ、より詳細

な検討が今後さらに必要である。一方、Cblは、加齢と運動トレーニングの影響を認めなかった。これまでにCblは細胞レベルの実験において、インスリン刺激によるグルコース取り込みの際には、IRS-1と同時に活性化される必要があることが報告²⁾されているが、生体レベルでの報告はこれまでにない。本成績によって、インスリン作用の低下は、Cblのタンパク量低下によるものではなく、IRS-1、PI 3-kinaseを介したシグナル系の低下によるものであることが示唆された。また、インスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン系薬剤による改善機序はCbl、PI 3-kinase系のシグナルを介し、糖取り込みを亢進させると報告⁵⁾されていることから、インスリンシグナルの改善をもたらす標的分子が運動トレーニングと薬剤で異なることが示唆された。一方、PI 3-kinaseは、安静群の27週齢では71%まで低下し、運動トレーニングによって96%まで回復させた傾向にあったが有意差を認めなかった。先行研究において、PI 3-kinaseの活性はインスリン刺激された糖輸送に必要な因子であり¹⁸⁾、PI 3-kinaseの減少はインスリン抵抗性を発症する要因として報告¹⁾されている。本研究におけるPI 3-kinaseタンパク量は、有意ではないが加齢に伴う低下傾向にあった。一方、PI 3-kinaseは筋収縮に伴う糖取り込みに関与しないと報告¹³⁾されているが、本研究では、トレーニングは加齢に伴うPI 3-kinaseタンパク量の低下を改善する傾向にあった。運動トレーニングがPI 3-kinaseタンパク量を改善する機序については明確にされていないが、インスリン刺激によるPI 3-kinase活性の上昇が急性運動によって増幅されることが報告²⁵⁾されている。したがって、トレーニングラットでは運動の繰り返しによって安静ラットよりも高いPI 3-kinase量を誘導し、インスリン感受性を改善する可能性が示唆された。また、PI 3-kinaseは、タンパク量よりも活性化やIRS-1との結合量がインスリン抵抗性との関連が

強いこと^{1,5)}から、運動トレーニングの影響を評価する際においても、その活性化や結合量などより生理的なレベルでの測定が必要と考えられた。一方、PDK-1は加齢と運動トレーニングの影響を認めなかった。PDK-1は、インスリンの代謝調節作用の発現に必須の分子であることが^{8, 20)}報告され、PI 3-kinaseの下流で機能する分子としてその機能が注目されている。しかし、STZ誘発糖尿病ラットにおける、チアゾリジン系薬剤処置はPDK-1タンパク量の発現を増加させない¹⁵⁾ことも報告されている。本研究では、加齢に伴う低下が認められなかったことから、インスリンシグナル分子に対する加齢の影響は、PI 3-kinaseより上流で起きている可能性が示唆された。運動トレーニングの効果についてもPDK-1以前のPI 3-kinaseより上流に作用するものと推察された。

4. まとめ

IRS-1は、加齢に伴い低下し、運動トレーニングはその低下を抑制した。IR、PI 3-kinaseは加齢に伴い低下し、トレーニングによって、増加する傾向にあるが有意ではなかった。一方、PDK-1、Cblは、加齢とトレーニングの影響を認めなかった。以上の成績より、インスリンシグナル分子に対する加齢の影響はIRS-1タンパク量に認められ、運動トレーニングはその低下を改善する可能性が示唆された。

本研究の成績は、運動トレーニングの有効性を示しており、今後、インスリン感受性など、より生理的な分析を行うことで、高齢者のための運動処方ガイドライン作成に対する貴重な情報を提供できる。

謝 辞

本研究に対して助成を賜りました財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Carvalho C.R., Brenelli S.L., Silva A.C., Nunes A.L., Velloso L.A., and Saad M.J., 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) Chiang S.H., Baumann C.A., Kanzaki M., Thurmond D.C., Watson R.T., Neudauer C.L., Macara I.G., Pessin J.E., and Saltiel A.R., Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature*, 410, 944-948 (2001)
- 3) Davidson M.B., Primary insulin antagonism of glucose transport in muscle from the older-obese rat. *Metabolism*, 27, 1994-2005 (1978)
- 4) Dresner A., Laurent D., Marcucci M., Griffin M.E., Dufour S., Cline G.W., Slezak L.A., Andersen D.K., Hundal R.S., Rothman D.L., Petersen K.F., and Shulman G.I., Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J. Clin. Invest*, 103, 253-259 (1999)
- 5) Farese R.V., Function and dysfunction of aPKC isoforms for glucose transport in insulin-sensitive and insulin-resistant states. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab.*, 283, E1-11 (2002)
- 6) Goodman M.N., Druz S.M., McElaney M.A., Belur E., and Ruderman N.B., Glucose uptake and insulin sensitivity in rat muscle: changes during 3-96 weeks of age. *Am. J. Physiol.*, 244, E93-100 (1983)
- 7) Griffin M.E., Marcucci M.J., Cline G.W., Bell K., Barucci N., Lee D., Goodyear L.J., Kraegen E.W., White M.F., and Shulman G.I., Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes*, 48, 1270-1274 (1999)
- 8) Hajduch E., Litherland G.J., and Hundal H.S., Protein kinase B (PKB/Akt) --a key regulator of glucose transport? *FEBS Lett.*, 492, 199-203 (2001)
- 9) Houmard J.A., Shaw C.D., Hickey M.S., and Tanner C.J., Effect of short-term exercise training on insulin-stimulated PI 3-kinase activity in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, 277, E1055-1060 (1999)
- 10) Kahn B.B. and Flier J.S., Obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, 106, 473-481 (2000)
- 11) Kirwan J.P., del Aguila L.F., Hernandez J.M., Williamson D.L., O'Gorman D.J., Lewis R., and Krishnan R.K., Regular exercise enhances insulin activation of IRS-1-associated PI3-kinase in human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, 88, 797-803 (2000)
- 12) Lebovitz H.E. and Banerji M.A., Insulin resistance and its treatment by thiazolidinediones. *Recent Prog. Horm. Res.*, 56, 265-294 (2001)
- 13) Lee A.D., Hansen P.A., and Holloszy J.O. Wortmannin inhibits insulin-stimulated but not contraction-stimulated glucose transport activity in skeletal muscle. *FEBS Lett.*, 361, 51-54 (1995)
- 14) Maegawa H., Shigeta Y., Egawa K., and Kobayashi M. Impaired autophosphorylation of insulin receptors from abdominal skeletal muscles in nonobese subjects with NIDDM. *Diabetes*, 40, 815-819 (1991)
- 15) Meyer M.M., Levin K., Grimmsmann T., Perwitz N., Eirich A., Beck-Nielsen H., and Klein H.H., Troglitazone treatment increases protein kinase B phosphorylation in skeletal muscle of normoglycemic subjects at risk for the development of type 2 diabetes. *Diabetes*, 51, 2691-2697 (2002)
- 16) Nagasaki M., Nakai N., Oshida Y., Li Z., Xu M., Obayashi M., Murakami T., Yoshimura A., Fujitsuka N., Shimomura Y., and Sato Y., Exercise training prevents maturation-induced decreases in insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in rat skeletal muscle. *Metabolism*, 49, 954-959 (2000)
- 17) Nakai N., Shimomura Y., Ohsaki N., Sato J., Oshida Y., Ohsawa I., Fujitsuka N., and Sato Y., Exercise training prevents maturation-induced decrease in insulin sensitivity. *J. Appl. Physiol.*, 80, 1963-1967 (1996)
- 18) Okada T., Kawano Y., Sakakibara T., Hazeki O., and Ui M., Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. *J. Biol. Chem.*, 269, 3568-3573 (1994)
- 19) Sakamoto K. and Goodyear L.J., Invited review: intracellular signaling in contracting skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, 93, 369-383 (2002)
- 20) Sakaue H., Nishizawa A., Ogawa W., Teshigawara K., Mori T., Takashima Y., Noda T., and Kasuga M., Requirement for 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1) in insulin-induced glucose uptake in immortalized brown adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 278, 38870-38874 (2003)
- 21) 佐藤祐造編著：高齢者運動処方ガイドライン，南

- 江堂 (2002)
- 22) Sato Y., Nagasaki M., Nakai N., and Fushimi T., Physical Exercise Improves Glucose Metabolism in Lifestyle-Related Diseases. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 228, 1208-1212 (2003)
- 23) Storgaard H., Song X.M., Jensen C.B., Madsbad S., Bjornholm M., Vaag A., and Zierath J.R., Insulin signal transduction in skeletal muscle from glucose-intolerant relatives of type 2 diabetic patients [corrected]. *Diabetes*, 50, 2770-2778 (2001)
- 24) Torlinska T., Mackowiak P., Nogowski L., Hryniewiecki T., Witmanowski H., Perz M., E. Md, and Nowak K.W., Age dependent changes of insulin receptors in rat tissues. *J. Physiol. Pharmacol.*, 51, 871-881 (2000)
- 25) Zhou Q. and Dohm G.L., Treadmill running increases phosphatidylinositol 3-kinase activity in rat skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 236, 647-650 (1997)