

高強度・短時間の間欠的運動は骨格筋の インスリン感受性を高めるか？

新潟医療福祉大学 川 中 健太郎
(共同研究者) 同 越 中 敬 一
同 佐 野 明 子

Does High Intensity Intermittent Exercise Increase Insulin Sensitivity in Epitrochlearis Muscles of Fasted Rats ?

by

Kentaro Kawanaka, Keiichi Koshinaka, Akiko Sano
*Department of Health and Nutrition,
Niigata University of Health and Welfare*

ABSTRACT

It is well known that moderate intensity (lactate threshold level) exercise increases insulin sensitivity of glucose uptake in skeletal muscles. However, the effects of high-intensity short duration exercise (e.g. sprint interval exercise), which intensity is far above lactate threshold, on muscle insulin sensitivity is not clear. In the present study, fasted rats underwent high-intensity intermittent swimming (HIS; ten 20-s swimming with a weight equal to 18% of body mass), which intensity is estimated at 140% $\dot{V}O_{2max}$, or low-intensity prolonged swimming (LIS; 180 min swimming without weight), which intensity is estimated at 40% $\dot{V}O_{2max}$. HIS induced 15 fold increase in AMP dependent protein kinase (AMPK) phosphorylation in epitrochlearis (EPI) muscles of fasted rats immediately after exercise. Previous study showed that AMPK activation increases muscle insulin sensitivity (Fisher et al. 2002), so that we hypothesized that HIS increases muscle insulin sensitivity. However, submaximal insulin (7.5 μ U/ml) stimulated increase in glucose uptake above basal uptake (insulin sensitivity) was not increased 4 hrs after HIS

in EPI muscles. On the other hand, although LIS did not increase AMPK phosphorylation in EPI muscles immediately after exercise, insulin sensitivity was increased 4 hrs after LIS. These results suggest the possibility that 1) low intensity prolonged exercise is more effective for increasing muscle insulin sensitivity than high intensity short duration exercise in fasted rats, 2) some factor (s) other than activation of AMPK is necessary for exercise induced increase in muscle insulin sensitivity.

要 旨

運動を行うと骨格筋の糖取り込みに対するインスリン感受性が上昇することが知られているが、どのような種類の運動が有効であるかについては明らかではない。そこで、本研究では、絶食したラットに乳酸閾値を遥かに越えるような推定 $140\% \dot{V}O_{2max}$ に相当する 20 秒間の水泳運動を 10 セット負荷する高強度・短時間運動、ならびに、乳酸閾値以下の推定 $40\% \dot{V}O_{2max}$ に相当する水泳運動を 180 分間持続させる低強度・長時間運動を負荷して、上肢の *epitrochlearis* (EPI) 筋におけるインスリン感受性上昇効果について検討した。

高強度・短時間運動では、絶食安静コントロールに比べて、運動終了直後の EPI 筋における AMP 依存性プロテインキナーゼ (AMPK) の活性レベル、およびインスリン非依存的な糖取り込み速度の顕著な上昇効果がみられた。しかし、高強度・短時間運動終了 4 時間後の最大下インスリン刺激 ($7.5 \mu\text{U/ml}$) に対する糖取り込み速度 (インスリン感受性) については、絶食安静コントロールのレベルと差はみられなかった。一方、低強度・長時間運動は、運動直後の AMPK 活性レベルやインスリン非依存的な糖取り込み速度を上昇させなかったが、運動終了 4 時間後のインスリン感受性を顕著に上昇させた。

このように、絶食ラットの EPI 筋については、高強度・短時間運動よりも低強度・長時間運動のほうが運動後のインスリン感受性を効果的に上昇さ

せる可能性が示唆される。

緒 言

骨格筋は、インスリン刺激に対して GLUT4 と呼ばれる糖輸送体を細胞内部から細胞表面へ移行 (トランスロケーション) させることによって、糖取り込みを亢進させる。一方、身体運動を行えば、運動中から運動後短時間の間、筋収縮由来にインスリン非依存的な GLUT4 のトランスロケーションが起こり、活動筋において糖取り込みが亢進する⁶⁾。この、インスリン非依存的な GLUT4 トランスロケーションに対する運動効果は運動終了 3 時間後には消失するが、その後、活動筋では、一定のインスリン刺激に対して、より多くの GLUT4 が細胞表面へ移行できるようになる⁷⁾。つまり、活動筋では、糖取り込みに対するインスリン感受性が亢進する。これは、運動が糖尿病の予防・治療に有効とされる最も大きな理由のひとつである。一般的には、糖尿病の 1 次予防のためには、乳酸閾値レベルでの中強度 ($50 \sim 70\% \dot{V}O_{2max}$) の持久性運動が有効と考えられている。これまで、Richter et al. (1982) および Wallberg-Henriksson et al. (1988) の先駆的研究をはじめとして、運動が活動筋でインスリン感受性を上昇させることが数々の研究において報告されているが^{7, 12, 15)}、その報告のほとんどは乳酸閾値レベルでの中強度運動の効果について検討している。

ところで、近年、若年齢層を中心に多くの人々が、サッカー、バスケットなどの球技系スポーツ

を愛好している。これらは高強度・短時間運動を間欠的に繰り返す運動であるが、この種の運動が運動後のインスリン感受性上昇に対してどの程度の効果をもつか、また、糖尿病の1次予防に有効であるか否かは明らかでない。Kawanaka et al. (1998) は、以前、動物実験において、高強度短時間運動 (140% $\dot{V}O_{2max}$, 20秒×8セット) 直後の筋におけるインスリン非依存的な糖取り込み反応が乳酸閾値の持久性運動 (50% $\dot{V}O_{2max}$, 120分) 直後のそれを大きく凌ぐことを報告した⁹⁾。本研究では、高強度短時間運動がインスリン非依存的な糖取り込みだけでなく、運動終了後のインスリン感受性上昇に対しても効果的であり、糖尿病の1次予防に有効である可能性について検討した。

1. 研究方法

1. 1 被験動物および運動プロトコール

5週齢のWistar系雄性ラットを被験動物として用いた。ラットには運動前日から18時間の絶食を行わせた。ラットは安静群、低強度・長時間運動群、および、高強度・短時間運動群に分けた。低強度・長時間運動を負荷するラットには、35℃の温水を40cmの深さまで注いだ直径40cmの円形タンク内で、錘を装着せずに90分間の水泳運動を10分間の休憩を挟んで2セット行わせた。水泳運動は4匹同時に行わせた。この場合、血中乳酸レベルは安静時の $1.7 \pm 0.3\text{mM}$ に対して $1.8 \pm 0.1\text{mM}$ と変化なく、その運動強度は30～40% $\dot{V}O_{2max}$ と推定できる。したがって、この運動モデルは低強度・長時間運動モデルとして妥当である。また、高強度・短時間運動を負荷するラットには、35℃の温水を30cmの深さまで注いだ直径25cmの円形タンク内で、体重の18%に相当する錘を装着して20秒の水泳運動を40秒間の休憩を挟んで10セット行わせた。水泳運動は1匹づつ行わせた。この場合、血中乳酸は $10.5 \pm 0.7\text{mM}$ まで上昇し、その運動強度は140% $\dot{V}O_{2max}$ と推定で

きる。したがって、この運動モデルは、高強度・短時間運動モデルとして妥当である。

1. 2 摘出筋のインキュベーションと糖取り込み速度の測定

低強度・長時間運動もしくは高強度・短時間運動直後に上肢のEpitrochlearis筋 (以下 EPI筋) を摘出し、糖取り込み速度について測定した。さらに、低強度・長時間運動もしくは高強度・短時間運動終了後、4時間、ラットを安静状態に保ち、その後、EPI筋を摘出し、糖取り込み速度の測定を行った。

摘出したEPI筋は、直ちに40mM mannitolを含んだKrebs-Hensleit-buffer (KHB) 中で30分間インキュベーションすることによって洗浄後、さらに、8mM 2-deoxyglucose (以下2DG)、および、32mM mannitolを含むKHB中で20分間インキュベーションした。インスリン刺激による糖取り込み速度を測定する際には、KHBに $7.5 \mu\text{U/ml}$ 、もしくは、 $10,000 \mu\text{U/ml}$ 濃度のインスリンを加えた。インキュベーションは30℃のもとで、酸素95%、二酸化炭素5%のガスを吹き込みながら行った。ラットEPI筋は筋層が23本の筋線維しかなく非常に薄いので、酸素や2DGが拡散しやすく、*in vitro*でのインキュベーションに適している。インキュベーション終了後は筋を、一旦、凍結して保存した。

凍結保存した筋サンプルは、その後、糖取り込み速度測定のための2-deoxyglucose-6-phosphate (2DG6P) 蓄積量の分析に供した。この分析は、Ueyama et al.の方法を一部改変して行った¹⁴⁾。2-deoxyglucose (2DG) は筋によって取り込まれた後、ヘキソキナーゼによってリン酸化されるが、その後、代謝されずに2DG6Pとして筋内に蓄積する。したがって、20分間、2DGとインキュベーションした際の2DG6Pの蓄積量を測定すれば糖取り込み速度を評価できるのである。尚、生理

的条件下ではグルコースの細胞膜輸送速度はヘキソキナーゼによるグルコースのリン酸化速度よりも遅いので、2DG6P蓄積速度は糖輸送速度を反映している。

1. 3 筋グリコーゲン、および、代謝産物濃度

筋グリコーゲンは上記に記述した糖取り込み速度測定のための筋サンプルを用いて Passonneau and Lauderdale の方法で行った¹¹⁾。また、低強度・長時間運動もしくは高強度・短時間運動直後に摘出し、凍結保存したEPI筋における、ATP、AMP、Cr濃度はHPLCを用いて測定した。

1. 4 AMPKならびにAktのリン酸化レベル

低強度・長時間運動もしくは高強度・短時間運動直後に摘出し、凍結保存したEPI筋を用いて、運動直後のAMPKのリン酸化レベルの変化を測定した。また、運動終了4時間後に摘出し、直ちに40mM mannitol, 7.5 μU/ml insulinを含んだKHB中で30分間インキュベーション後に凍結保存したEPI筋を用いて、インスリン刺激によるAktリン酸化レベルの変化を測定した。測定は、AMPKのリン酸化部位(Thr172)に対するウサギIgG抗体(Cell Signaling), Aktのリン酸化部位(Ser473ならびにThr308)に対するウサギIgG抗体(Cell Signaling)を用いて、ウエスタンブロッティング法を用いて解析した。

2. 結果

2. 1 運動終了直後の筋グリコーゲン、インスリン非依存的な糖取り込み速度、および、AMPK活性レベル

低強度・長時間、ならびに、高強度・短時間運動終了直後のEPI筋における筋グリコーゲン濃度は絶食安静コントロールの19.8%、および、6.7%にそれぞれ低下していた(p<0.05, 図1)。これにより低強度・長時間運動ならびに高強度・短時間運

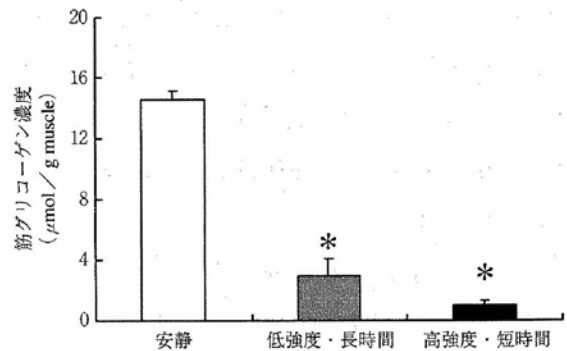


図1 運動終了直後のEPI筋におけるグリコーゲン濃度
Means ± SE (n=3-9) . *p<0.05 vs. 安静群

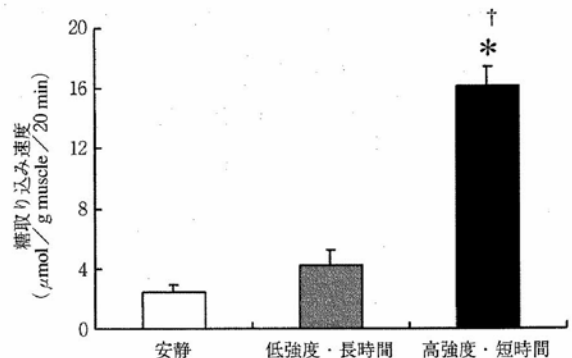


図2 運動終了直後のEPI筋における糖取り込み速度
Means ± SE (n=3-9) . *p<0.05 vs. 安静群.
† p<0.05 vs. 低強度・長時間群

動において、EPI筋が十分に使用されていたことがわかる。

低強度・長時間運動終了直後のEPI筋におけるインスリン非依存的な糖取り込みは、絶食安静コントロールと比べて変化はなかった(図2)。一方、高強度・短時間運動終了直後のインスリン非依存的な糖取り込み速度は安静コントロールの6.5倍へと有意に上昇していた(p<0.05)。

AMPKはATPやCrPの減少、また、AMPの増加によってアロステリックに活性化される。また、上流のキナーゼによってリン酸化されることによっても活性化される。そこで、AMPKの活性レベルを評価するために、EPI筋のATP、AMP、およびCrP濃度、ならびに、AMPKリン酸化レベルを測定した。低強度・長時間運動終了直後のEPI筋におけるATP濃度は絶食安静コントロールに比べて変化なかったのに対して、高強度・短時間運動終了直後のATP濃度は絶食安静コントロ

ールに比べて有意に減少していた ($p < 0.05$). ATP濃度と同様な傾向がPCr濃度にもみられた。さらに、絶食安静コントロール群や低強度・長時間運動群のEPI筋におけるAMP濃度は検出できなかったのに対して、高強度・短時間運動終了直後のEPI筋のAMP濃度は $0.04 \mu\text{mol/g tissue}$ に上昇していた (表1)。

表1 運動終了直後のEPI筋における代謝産物濃度

	安静	低強度・長時間	高強度・短時間
ATP ($\mu\text{mol/g tissue}$)	6.9 ± 0.1	6.9 ± 0.1	$4.6 \pm 0.4^* \dagger$
AMP ($\mu\text{mol/g tissue}$)	ND	ND	0.04 ± 0.1
PCr ($\mu\text{mol/g tissue}$)	9.6 ± 0.4	9.3 ± 0.7	$3.7 \pm 0.5^* \dagger$

Means \pm SE (n=3-8). ND: 検出感度以下, * $p < 0.05$ vs. 安静群.

$\dagger p < 0.05$ vs. 低強度・長時間群

低強度・長時間運動終了直後のAMPKリン酸化レベルは、絶食安静コントロールに比べて変化はみられなかった。しかし、高強度・短時間運動終了直後のAMPKリン酸化レベルは絶食安静コントロールの15.6倍に上昇していた ($p < 0.05$, 図3)。

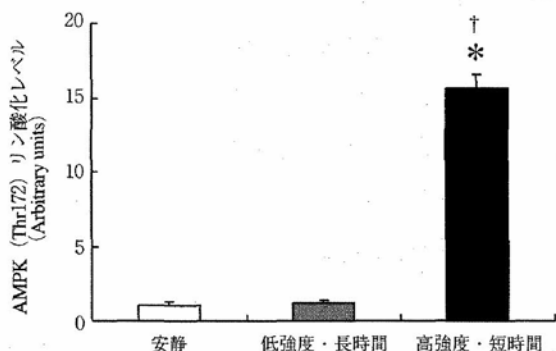


図3 運動終了直後のEPI筋におけるAMPK (Thr¹⁷²)のリン酸化量

Means \pm SE (n=3-8). * $p < 0.05$ vs. 安静群.

$\dagger p < 0.05$ vs. 低強度・長時間群

2. 2 運動終了4時間後の糖取り込み速度、および、Aktリン酸化レベル

低強度・長時間運動、ならびに、高強度・短時間運動終了4時間後のEPI筋におけるインスリン非依存的な基礎レベルの糖取り込み速度は絶食安静コントロールの1.9倍ならびに1.7倍と僅かながら、しかし、有意に上昇していた ($p < 0.05$). さらに、EPI筋における $7.5 \mu\text{U/ml}$ 濃度の最大下インスリ

ン刺激に対する糖取り込み反応速度については、低強度・長時間運動終了4時間後は、安静コントロールに比べて85%高かった ($p < 0.05$). しかし、高強度・短時間運動終了4時間後については、安静コントロールとの有意な差は認められなかった。また、低強度・長時間ならびに高強度・短時間運動終了4時間後における $10,000 \mu\text{U/ml}$ 濃度の最大インスリン刺激に対するEPI筋の糖取り込み反応速度については、絶食安静コントロールと比べて有意な差は認められなかった (図4)。

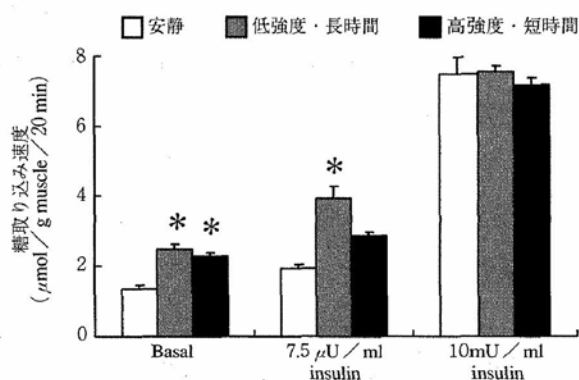


図4 運動終了4時間後のEPI筋における糖取り込み速度

Means \pm SE (n=7). * $p < 0.05$ vs. 同処置内安静群.

$\dagger p < 0.05$ vs. 同処置内低強度・長時間群

また、基礎レベルに対する最大下インスリン ($7.5 \mu\text{U/ml}$) 刺激による糖取り込み速度の増加分を計算したところ、低強度・長時間運動終了4時間後には、絶食安静コントロールに比べて有意な上昇がみられた ($p < 0.05$, 図5)。インスリン感受性は、正確には、インスリン最大反応の2分の1の反応を引き起こすために必要なインスリン濃度と定義されるが、低強度・長時間運動が糖取り込みに対する最大インスリン反応を変化させずに (図4), 最大下反応を上昇させたことから (図4, 5), この運動がEPI筋におけるインスリン感受性を上昇させていることがわかる。一方、高強度・短時間運動終了4時間後にはインスリン感受性の上昇は認められなかった (図5)。

骨格筋における糖取り込み促進を引き起こすイ

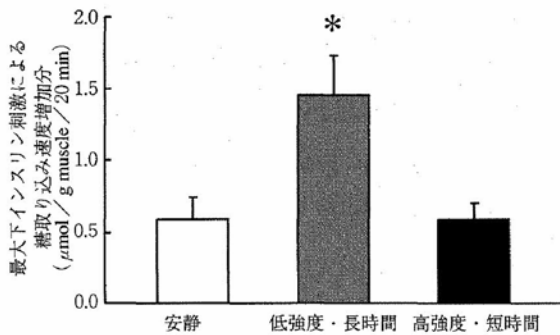


図5 運動終了4時間後の最大下インスリン (7.5 μ U/ml) 刺激に対する糖取り込み速度の増加分
Means \pm SE (n=7). *p<0.05 vs. 同処置内安静群.
† p<0.05 vs. 同処置内低強度・長時間群

ンスリン情報伝達経路で中心的役割を果たしている Akt キナーゼはリン酸化によって活性化される。そこで、インスリン感受性上昇が Akt リン酸化レベルの上昇によって説明できる可能性を検討した。しかし、低強度・長時間運動、ならびに、高強度・短時間運動終了4時間後の EPI 筋における 7.5 μ U/ml 濃度の最大下インスリン刺激による Akt リ

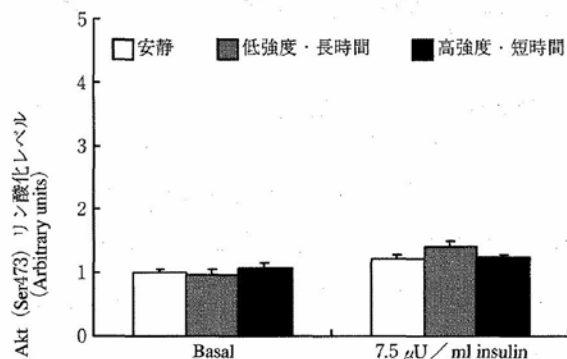


図6 運動終了4時間後のEPI筋におけるAkt (Ser⁴⁷³) のリン酸化量
Means \pm SE (n=6-8)

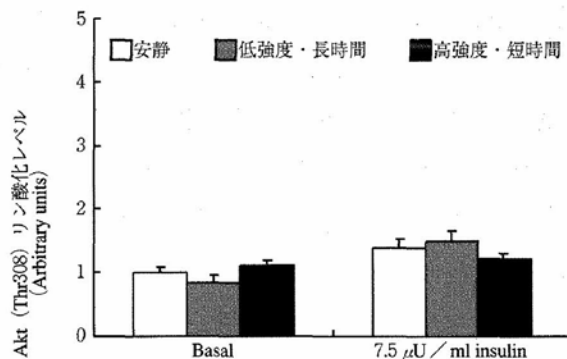


図7 運動終了4時間後のEPI筋におけるAkt (Thr³⁰⁸) のリン酸化量
Means \pm SE (n=6-8)

ン酸化レベルは、安静コントロールに比べて変化は認められなかった (図6, 7)。

3. 考察

乳酸閾値強度を遥かに越えるような高強度・短時間運動 (推定 140% $\dot{V}O_{2max}$, 20秒 \times 8セット) 終了直後のラット EPI 筋における糖取り込み速度は、低強度・長時間の持久性運動 (推定 40% $\dot{V}O_{2max}$, 180分) 終了直後のそれをはるかに凌いだ (図2)。また、本研究では、高強度・短時間運動終了直後には筋の ATP および CrP 濃度の減少や AMP 濃度の増加がみられ、また、AMPK のリン酸化レベルも顕著に上昇していた (図3)。AMPK は AMP によってアロステリックに活性化され、また、ATP によってアロステリックに阻害される。さらに、上流の LKB1 によってリン酸化されることによって活性化される⁴⁾。つまり、本研究の結果は、高強度・短時間運動が EPI 筋の AMPK を顕著に活性化させる運動であったことを示している。AMPK 活性化によってインスリン非依存的な GLUT4 トランスロケーションが引き起こされ、筋の糖取り込みが上昇することが報告されている¹⁰⁾。したがって、本研究の結果より、高強度・短時間運動終了直後にみられる著しく高いインスリン非依存的な糖取り込み速度は、AMPK の活性化によって説明できると考えられる。また、Fisher et al. (2002) は AMPK の薬理的活性化剤である AICAR が筋のインスリン感受性上昇を引き起こすとの実験結果を報告しており³⁾、このことから、AMPK 活性化は、運動後のインスリン感受性上昇を引き起こすメディエータである可能性が示唆される。そこで、我々は、AMPK を顕著に活性化する高強度・短時間運動は、運動後のインスリン感受性も低強度・長時間運動を凌ぐレベルに上昇させると予想した。しかし、この予想に反して、高強度・短時間運動終了4時間後、EPI 筋においてはインスリン感受性の上昇

はみられなかった (図4, 5). このように, 運動によって AMPK が活性化されたとしても, 運動後の筋におけるインスリン感受性が必ずしも上昇するとは限らない. つまり, AMPK 活性化はインスリン感受性上昇の十分条件ではないことが本研究の結果から示唆される.

AMPK の活性化は運動強度, すなわち, 筋のエネルギー消費速度の上昇とともに生じる⁸⁾. つまり, AMPK は筋のエネルギー消費速度を感知するセンサーである. 一方, 運動強度ではなくて運動量, 換言すると, エネルギー消費速度ではなくてエネルギー消費総量を感じて筋細胞内に情報を送るセンサーも筋には存在しているはずである. 表1ならびに図3に示されるように, 低強度・長時間運動によってEPI筋の高エネルギーリン酸化化合物濃度の変化やAMPKリン酸化の上昇は認められず, この運動はAMPK活性レベルの上昇を引き起こさなかったと考えられる. しかし, 低強度・長時間運動終了4時間後のEPI筋におけるインスリン感受性は上昇していた (図4, 5). つまり, 低強度・長時間運動は運動強度センサーであるAMPKの活性化を介さないメカニズムによってEPI筋におけるインスリン感受性の上昇を惹起しているのではないかと推測される. 我々は, 低強度・長時間運動はエネルギー消費総量を感じ取る筋細胞内センサーを活性化することによって, インスリン感受性上昇を惹起しているのではないかと考えている. 多くの場合, タンパク質のリン酸化・脱リン酸化によって細胞内の情報伝達が行われることから, このセンサーはプロテインキナーゼ, もしくは, ホスファターゼである可能性が高い. 筋線維の細胞質における Ca^{2+} 濃度は安静時30~50nMであるが, 筋収縮は筋小胞体から細胞質への Ca^{2+} 放出によって引き起こされるので, 低強度運動でも筋収縮の度に筋細胞内 Ca^{2+} 濃度は数 μM 程度に増加することが予想される¹⁾. 筋収縮と弛緩にともなった Ca^{2+} 濃度の増減を繰り返

返すことによって, 運動時間依存的にその活性が上昇するキナーゼやホスファターゼが存在するかもしれない. Ca^{2+} によって活性化されるキナーゼとしてカルモジュリン依存性プロテインキナーゼ (CaMK), プロテインキナーゼC (PKC), NO合成酵素などが知られている. また, ホスファターゼとしてカルシニューリンが知られているが, このカルシニューリンは運動時間依存的に活性化される可能性が報告されており⁵⁾, インスリン感受性上昇との関連が注目される.

低強度・長時間運動はインスリン情報伝達を増強することによって, インスリン感受性を上昇させる可能性がある. PI3-キナーゼ依存的に活性化されるAktはインスリン刺激による筋の糖取り込みに必須であり, インスリン刺激によりセリンおよびスレオニン残基がリン酸化されることによって活性化される²⁾. しかし, 低強度・長時間運動はインスリン刺激時のAktリン酸化レベルを上昇させることはなかった (図6, 7). したがって, 少なくともAktを含めてその上流のインスリン情報伝達系が低強度増強・長時間運動によって増強されるわけではないようだ. AktはAS160と呼ばれる分子量160kdaのタンパク質のリン酸化を介してGLUT4の細胞膜移行を引き起こすことが報告されており¹³⁾, AS160リン酸化レベルが低強度・長時間運動によって増強されるか否かについて, 今後, 検討する必要がある.

本研究の結果より, 高強度・短時間運動よりも低強度・長時間運動のほうが運動後の活動筋におけるインスリン感受性上昇にとって効果的である可能性が示唆される. 但し, 本研究で用いたラットのEPI筋は, 速筋線維の占める割合が90%以上であり典型的な速筋タイプの筋である. ヒトの運動を考えた場合, 低強度・長時間運動に動員されるのは遅筋線維であり, 今後, ヒラメ筋などの典型的な遅筋タイプの筋における低強度・長時間運動のインスリン感受性上昇効果について検討す

る必要がある。また、本研究では、多くの先行研究のプロトコールに則って、18時間の絶食後に運動を行い、その後のインスリン感受性を評価している。したがって、安静コントロールラットにも最終的には22時間の絶食が施されている。最近、我々は、絶食自体によって、筋の糖取り込みに対するインスリン感受性が上昇する現象を見出している (Koshinaka et al. unpublished data)。高強度・短時間運動は筋のインスリン感受性を高めるものの、絶食によって既に筋のインスリン感受性が上昇していたため、本研究では、その効果が検出できなかったのかもしれない。つまり、絶食と高強度・短時間運動は同様なメカニズムで筋のインスリン感受性を上昇させる可能性がある。今後、摂食状態のラットを用いて、高強度・短時間運動が筋のインスリン感受性上昇に及ぼす効果を検討する必要があるだろう。

4. 結 語

本研究では、絶食を施したラットに高強度・短時間または低強度・長時間水泳運動を負荷した。速筋であるEPI筋では、高強度・短時間運動終了直後のAMPK活性レベルと糖取り込みは著しく高いレベルに上昇していたにもかかわらず、運動終了4時間後、筋のインスリン感受性の上昇は認められなかった。一方、低強度・長時間運動終了直後、EPI筋のAMPK活性レベルには上昇が認められず、糖取り込みもほとんど上昇しなかったのに対して、運動終了4時間後にはインスリン感受性の上昇が認められた。これらの結果より、1) 絶食ラットに運動を負荷した際に、運動終了後にみられるインスリン感受性上昇効果については、高強度・短時間運動よりも低強度・長時間運動のほうが効果的である可能性が示唆された。また、2) 低強度・長時間運動はAMPK活性化を介さない経路によってインスリン感受性を上昇させる可能性が示唆された。今後、遅筋タイプの筋を用いて、

さらに、摂食状態のラットを用いて、上記の現象が再現されるかどうか検討を加える必要がある。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に対し助成を賜りました(財)石本記念デサントスポーツ科学振興財団に深く感謝申し上げます。また、高エネルギーリソ化合物濃度の測定に際し、ご協力とご指導を賜りました新潟医療福祉大学健康栄養学科山崎貴子先生に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Chin, E.R. Role of Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity. *J. Appl. Physiol.*, 99, 414-423 (2005)
- 2) Cho, H., Mu, J., Kim, J.K., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Crenshaw, E.B. III, Kaestner, K.H., Bartolomei, M.S., Shulman, G.I., and M.J. Birnbaum. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science*, 292, 1728-1731 (2001)
- 3) Fisher, J.S., Gao, J., Han, D.-H., Holloszy, J.O., and L.A. Nolte. Activation of AMP kinase enhances sensitivity of muscle glucose transport to insulin. *Am. J. Physiol.*, 282, E18-E23 (2002)
- 4) Hardie, D.G. The AMP-activated protein kinase pathway-new players upstream and downstream. *J. Cell Sci.*, 117, 5479-5487 (2004)
- 5) Hitomi, Y., Kizaki, T., Katsumura, T., Mizuno, M., Itoh, C.E., Esaki, K., Fujioka, Y., Takemasa, T., Haga, S., and H. Ohno. Effect of moderate acute exercise on expression of mRNA involved in the calcineurin signaling pathway in human skeletal muscle. *IUBMB Life.*, 55, 409-413 (2003)
- 6) Holloszy, J.O. A forty-year memoir of research on the regulation of glucose transport into muscle. *Am. J. Physiol.*, 284, E453-E467 (2003)
- 7) Holloszy, J.O. Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity. *J. Appl. Physiol.*, 99, 338-343 (2005)
- 8) Jessen, N. and L.J. Goodyear. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, 99, 330-337 (2005)

- 9) Kawanaka, K., Tabata, I., and M. Higuchi. Effects of high-intensity intermittent swimming on glucose transport in rat epitrochlearis muscle. *J. Appl. Physiol.*, 84, 1852-1857 (1998)
- 10) Kurth-Kraczek E.J., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., and W.W. Winder. 5'AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes*, 48, 1667-1671 (1999)
- 11) Passonneau, J.V., and V.R. Lauderdale. A comparison of three methods of glycogen measurements in tissue. *Anal. Biochem.*, 60, 405-412 (1974)
- 12) Richter, E.A., Garreto, L.P., Goodman, M.N., and Ruderman, N.B. Muscle glucose metabolism following exercise in the rat. Increased sensitivity to insulin. *J. Clin. Invest.*, 69, 785-793 (1982)
- 13) Sano, H., Kane, S., Sano, E., Miinea, C.P., Asara, J.M., Lane, W.S., Garner, C.W., and Lienhard, G.E. Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J. Biol. Chem.*, 278, 14599-14602 (2003)
- 14) Ueyama, A., Sato, T., Yoshida, H., Magata, K., and N. Koga. Nonradioisotope assay of glucose uptake activity in rat skeletal muscle using enzymatic measurement of 2-deoxyglucose 6-phosphate in vitro and in vivo. *Biol. Signals Recept.*, 9, 267-274 (2000)
- 15) Wallberg-Henriksson, H., Constable, S.H., Young, D.A. and J.O. Holloszy. Glucose transport into rat skeletal muscle: interaction between exercise and insulin. *J. Appl. Physiol.*, 65, 909-913 (1988)