

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：53101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20031

研究課題名（和文）不活動が骨格筋のGLUT1依存的な糖取り込みを低下させる機序の解明

研究課題名（英文）The mechanism by which immobilization decreases GLUT1-dependent glucose uptake in rat skeletal muscle

研究代表者

河本 絵美（Kawamoto, Emi）

長岡工業高等専門学校・物質工学科・准教授

研究者番号：40634514

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：骨格筋は血糖の多くを取り込み、エネルギー生成や物質合成に利用している。不活動に陥ると、骨格筋にインスリン抵抗性が引き起こされるとともに、インスリンとは無関係に起こる基礎状態の血糖取り込みも低下する。本研究は、不活動筋における基礎状態の血糖取り込み低下のメカニズムとして、チオレドキシン結合タンパク質TXNIPが糖輸送タンパク質GLUT1の機能を阻害する可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日常生活では就寝やオフィスワークのように、GLUT1依存的な血糖取り込みが主体の時間が1日を通じて多くある。したがって、本研究において、身体活動量が減少した筋（不活動筋）のGLUT1依存的な血糖取り込みが低下するメカニズムを示唆することで、寝たきりやフレイル、不活発な日常生活等、不活動由来の代謝疾患を予防・改善する薬剤、運動や栄養処方の開発に貢献する。また身体活動の重要性を示す科学的根拠となる。

研究成果の概要（英文）：Acute short duration of disuse decreases insulin-independent glucose uptake in skeletal muscle, but the mechanisms is not identified. In this study, we focused on GLUT1, that is a glucose transport protein responsible for basal glucose uptake, and Thioredoxin interacting protein (TXNIP) that is in relative to glucose metabolism. As a result, TXNIP was expressed and increased in plasma membrane of immobilized soleus muscle. However, GLUT1 and GLUT4 protein expression was not different between both Non-immobilized and Immobilized rat soleus muscle. Finally, this study suggested that TXNIP is a key factor for regulating GLUT.

研究分野：運動生理学

キーワード：immobilization soleus muscle GLUT1 TXNIP

### 1. 研究開始当初の背景

食後に上昇した血糖の大部分は、インスリンの刺激に応じて、細胞質から細胞膜に移動する糖輸送タンパク質：GLUT4 を介して骨格筋に取り込まれている。したがって、骨格筋にインスリン抵抗性が起きると、GLUT4 の膜移動が阻害され、血糖取り込みが低下して食後高血糖が起きる。このことは、血糖値を正常に戻すための膵臓のインスリン分泌を促進し、高インスリン血症とそれに続く膵臓の疲弊、2型糖尿病へと発展する。

食後の血糖値が低下してから、次の食事までの間には、インスリンの関与しない GLUT1 を介した基礎的な血糖取り込みが主に行われている。この GLUT1 による基礎状態の糖取り込みは、インスリン依存的な糖取り込みと比較すると少ない量ではあるが、24 時間のトータルで換算するとかなりの積分値となる。つまり、基礎状態の血糖取り込みの低下もまた、食間の高血糖を持続させることで2型糖尿病を惹起する。

立つ・歩くなどの筋活動量が減少した状態である「不活動」は、インスリン刺激時の血糖取り込みと基礎状態の血糖取り込みの両方を低下させる。申請者は、実験動物の後肢をギプスで固定すると、わずか6時間ほどの間に、両者の糖取り込みが有意に低下することを確認している。そして、これまでに、不活動筋における細胞内インスリンシグナルの阻害やストレス応答性キナーゼの活性化、チオレドキシニン相互作用タンパク質 (TXNIP) の発現増加を明らかにしてきた (Kawamoto *et al.*, *J App Physiol*, 2018., Kawamoto *et al.*, *Physiol Reports*, 2016)。しかし、不活動が基礎状態の GLUT1 依存的な血糖取り込みを低下させる分子機序は不明なままである。

本研究において着目した TXNIP は、過剰発現によって膵臓におけるアポトーシスやインスリン分泌低下を引き起こすこと、2型糖尿病患者の骨格筋において発現が上昇していることが報告されている (Shalev *et al.*, *Mol Endocrinol*, 2014., Parikh *et al.*, *PLoS Med*, 2014)。さらに、TXNIP は GLUT の制御因子であることが指摘されている (Wu *et al.*, *Mol Cell*, 2013., Waldhart *et al.*, *Cell Rep*, 2017)。

### 2. 研究の目的

不活動が骨格筋の GLUT1 依存的な血糖取り込みを低下させる分子機序を明らかにすることを目的とし、(1) 不活動筋における TXNIP と GLUT1 との関連性、ならびに (2) 不活動筋における TXNIP 発現増加因子の同定に関して検討を行った。

### 3. 研究の方法

(1) Wistar 系オスラットの後肢片側をギプスで固定し、ギプス固定開始から6時間後、両肢から立つ・歩くといった生活動作の主働筋であるヒラメ筋を摘出し、タンパク質発現量を測定した。また、粗膜画分における GLUT1 および TXNIP タンパク質発現量を測定した。膜画分は、Hundal *et al.*の方法を参考に、ヒラメ筋をホモジナイズし、多段階遠心法によって核画分、ミトコンドリア画分を分画した。最終的に、得られた上清画分を超遠心機 (Optima TLX 型, Beckman Coulter) を用いて、4℃、190,000×g、1hr の条件で処理し、形質膜や小胞体膜などの全ての生体膜成分を含む粗膜画分とした。この粗膜画分に関して、免疫沈降およびイムノブロットングを用いてタンパク質発現量を検出した。

(2) 不活動筋における TXNIP 発現増加因子の同定については、Wistar 系オスラットの後肢片側をギプスで固定し、固定開始から6時間後、頸椎脱臼の後にギプス固定側あるいは対側 (非ギプス固定側) のどちらかの肢のヒラメ筋を摘出し、Human Metabolome Technologies, Inc. (HMT)の提供する C-SCOPE を利用して、エネルギー代謝に関連する 116 種類の代謝物質を網羅的に解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 不活動筋における TXNIP と GLUT1 との関連性

ギプス固定6時間後のラットヒラメ筋の粗膜画分における GLUT1 タンパク質発現量は対側 (Non-immobilized) と固定側 (Immobilized) との間に変化は見られなかった (Fig 1. A, C)。一方、粗膜画分における TXNIP タンパク質発現量は1.3倍に増加した (Fig 1. B, C)。また、超遠心後の粗膜画分と分離した上清画分においても TXNIP が検出され、ギプス固定側で有意な増加を示していた。このことから TXNIP は細胞質内

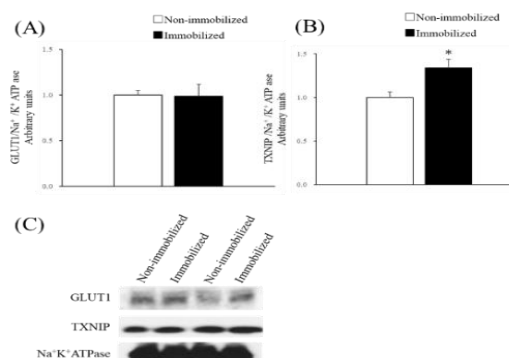


Fig 1. ギプス固定開始から6時間後のヒラメ筋における粗膜画分のタンパク質発現量

部だけでなく、細胞膜近傍にも存在し、両者ともに増加していることが示された。なお、ナトリウムポンプとも呼ばれる  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$  は細胞内外のイオンの濃度勾配を調節する役割を担い、形質膜に局在する。粗膜画分以外からは  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$  タンパク質発現は検出されなかったことから、細胞分画操作は問題なくできていたと考えられる。以上のことから、ギプス固定開始から6時間後の不活動筋における基礎状態の血糖取り込み低下は、GLUT1 タンパク質量の減少とは別の要因によって引き起こされることが示された。

TXNIP は、Akt や AMP 依存性プロテインキナーゼ (AMPK) によって 308 番目のセリン残基がリン酸化を受けることで、GLUT の糖取り込みを促進する可能性が報告されている (Wu et al., Mol Cell, 2013., Waldhart et al., Cell Rep, 2017)。本実験モデルの不活動筋ではインスリン非刺激時の Akt リン酸化レベルが低下した (Fig 2. A, B, C)。一方、AMPK のリン酸化レベルに変化はないが、その基質である ACC のリン酸化は低下していた (Fig 3. A, B)。加えて、AMPK は細胞内のエネルギーセンサーとも呼ばれ、AMP/ATP 比率の上昇によってリン酸化を受けて活性化するが、本研究で行ったメタボローム解析の結果では、ATP, ADP, AMP および CrP に変化は見られなかった。

Akt あるいは AMPK の関与を通して、TXNIP がリン酸化を受けている可能性を考え、免疫沈降法 (IP: Phospho-(Ser/Thr) Akt Substrate Antibody, IB: TXNIP) を利用して、粗膜画分において Akt 由来にリン酸化される TXNIP の発現を測定したところ、不活動筋において Akt 由来の TXNIP リン酸化レベルの低下が確認された (Fig 4. A, B)。この結果から、ギプス固定開始から6時間後の不活動筋では TXNIP のリン酸化レベルが低下し、これによって GLUT1 の機能が阻害される可能性が示唆された。

## (2) 不活動筋における TXNIP 発現増加因子の同定

不活動筋における TXNIP の発現増加がどのような代謝産物によって引き起こされるのかを検討するために、代謝産物を網羅的に解析した。その結果、対側 (Non-immobilized) と比較して、ギプス側 (Immobilized) で発現が変化する代謝産物が複数挙げられた。表 1 には、とくに顕著な差が見られた 10 個の物質を示した。これらの結果から、不活動筋における基礎状態の血糖取り込み低下に関わる代謝産物として、分岐鎖アミノ酸やグルタミン酸、カルニチンの増加が挙げられた。今後、これらの因子と TXNIP の発現増加およびリン酸化との関連性の検討を進める。

Table 1. Top 10 differently expressed metabolites in rat soleus muscle between Non-immobilized and Immobilized limbs after 6-h hindlimb immobilization.

Compound	Non-immobilized		Immobilized		Ratio	
	Mean (nmol/g)	SD	Mean (nmol/g)	SD	(Immobilized / Non-immobilized)	p-value
Leu	200	9.1	266	9.4	1.3	3.8E-06
Ile	136	9	179	5.9	1.3	4.9E-05
Val	240	13	311	22	1.3	5.8E-04
Carnitine	381	51	621	65	1.6	2.4E-04
Tyr	71	4.9	91	6.5	1.3	5.7E-04
Phe	97	3.5	116	6.5	1.2	1.0E-03
Arg	306	67	454	31	1.5	5.0E-03
Glu	2543	322	5784	1572	2.3	9.0E-03
Galactose 1-Phosphate	6.6	0.7	4.2	1.1	0.6	5.0E-03
N-Cabamoylaspartic acid	0.6	0.13	0.4	0.05	0.7	9.0E-03

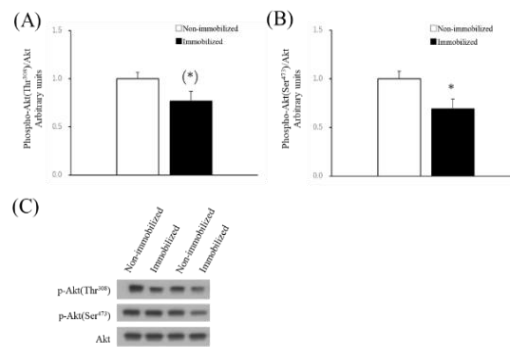


Fig 2. ギプス固定開始から6時間後のヒラメ筋におけるAktリン酸化タンパク質発現量

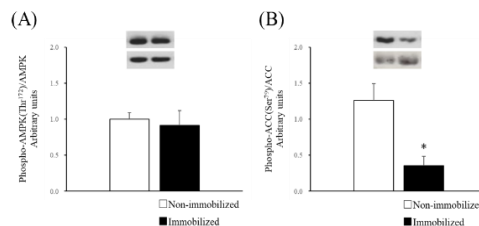


Fig 3. ギプス固定開始から6時間後のヒラメ筋におけるAMPKリン酸化タンパク質発現量

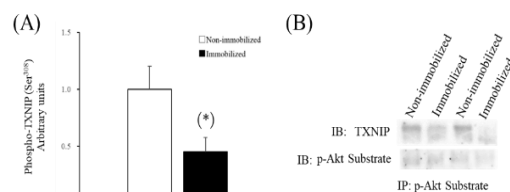


Fig 4. ギプス固定開始から6時間後のヒラメ筋におけるAkt由来のTXNIPリン酸化タンパク質発現量

### (3) まとめ

本研究は、実験動物の後肢片側をギプスで固定した不活動動物モデルを用いて、インスリンによらない基礎状態の血糖取り込み低下の分子メカニズムを検証した。そして、チオレドキシニン相互作用タンパク質 (TXNIP) が膜近傍に存在し、糖輸送タンパク質 GLUT1 の働きを阻害している可能性が示唆された。ただし、筋収縮由来に細胞膜へ移動する GLUT4 との関係性、ならびに、不活動筋における TXNIP 発現増加や TXNIP リン酸化が GLUT1 を阻害するメカニズムについては今後の検討課題である。

### 【参考文献】

- (1) Kawamoto E *et al.* Immobilization rapidly induces thioredoxin-interacting protein gene expression together with insulin resistance in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 125(2):596-604, 2018.
- (2) Kawamoto E *et al.* Immobilization rapidly induces muscle insulin resistance together with the activation of MAPKs (JNK and p38) and impairment of AS160 phosphorylation. *Physiol Rep* 4(15):e12876, 2016.
- (3) Shalev A. Minireview: Thioredoxin-interacting protein: Regulation and function in the pancreatic  $\beta$ -cell. *Mol Endocrinol* 28(8): 1211-1220, 2014.
- (4) Parikh H *et al.* TXNIP regulates peripheral glucose metabolism in humans. *PLoS Med* 4(5): 868-879, 2007.
- (5) Wu N *et al.* AMPK-dependent degradation of TXNP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1. *Mol Cell* 49(6): 1167-1175, 2013.
- (6) Waldhart AN *et al.* Phosphorylation of TXNIP by Akt mediates acute influx of glucose in response to insulin. *Cell Rep* 19(10): 2005-2013, 2017.
- (7) Hundal HS *et al.* Insulin induces translocation of the alpha 2 and beta 1 subunits of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase from intracellular compartments to the plasma membrane in mammalian skeletal muscle. *J Biol Chem* 267(8):5040-3, 1992.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ra Song Gyu, Kawamoto Emi, Koshinaka Keiichi, Iwabe Maiko, Tomiga Yuki, Iizawa Hiroki, Honda Hiroki, Higaki Yasuki, Kawanaka Kentaro	4. 巻 8
2. 論文標題 Acute bout of exercise downregulates thioredoxin interacting protein expression in rat contracting skeletal muscles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e14388
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.14388	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 羅成圭, 河本絵美, 越中敬一, 岩部万衣子, 富賀裕貴, 飯澤拓樹, 本田紘基, 檜垣靖樹, 川中健太郎
2. 発表標題 一過性の運動は活動筋の骨格筋TXNIP発現量を低下させる
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 府川凱, 霜田靖, 越中敬一, 川中健太郎, 河本絵美
2. 発表標題 不活動が骨格筋のGLUT1依存的な血糖取り込みに及ぼす影響
3. 学会等名 第76回日本体力医学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------