

平成22年 6月21日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20700535
 研究課題名（和文） 骨格筋の糖代謝機能を増強させる栄養物質の探索とAMPキナーゼの活性効果の検証
 研究課題名（英文） Investigation for nutritional substance to enhance skeletal muscle glucose metabolism and the activation effect of AMP kinase

研究代表者

浜田 拓 (HAMADA TAKU)
 大阪体育大学・体育学部・准教授
 研究者番号：00466294

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は骨格筋糖代謝機能を増強させる栄養の候補物質としてカフェインに着目し、骨格筋の糖代謝とAMPキナーゼ（AMPK）活性効果に及ぼす効果を検証した。カフェインは骨格筋のAMPKを活性化させ、糖取り込み量を増加させることが明らかとなった。本研究の成果からカフェインはAMPK活性効果を介した骨格筋の糖代謝機能を増強させる有力な栄養補助物質となり、運動による血糖降下作用と類似した抗糖尿病効果をもつ可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The main purpose of this study was to investigate the effect of caffeine as nutritional substance on AMPK activation and glucose metabolism in rat skeletal muscle. It was found that 3 mM caffeine increased AMPK phosphorylation. The isoform-specific analysis of the enzyme activity revealed that AMPK α 1 and α 2 isoforms were simultaneously activated in skeletal muscle. The enzyme activation by caffeine was associated with a reduction in phosphocreatine and an increased glucose uptake. The present findings suggest that caffeine can acutely activate AMPK and increase insulin-independent glucose transport with a reduction in muscle energy status in skeletal muscles. The pharmacological effects of caffeine on risk reduction for diabetes mellitus may be, at least in part, through muscle AMPK activation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：スポーツ科学

科研費の分科・細目：スポーツ栄養学

キーワード：カフェイン、糖代謝、骨格筋、AMPキナーゼ、糖尿病

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は 21 世紀の国民病ともいふべき疾患であり、その予防・改善対策が重要視される。運動は、生体の糖代謝を活性化させる強力な生理的刺激である。

運動の抗糖尿病効果と類似した様々な栄養物質の抗糖尿病効果が注目されている。中でも、緑茶、紅茶など様々な飲み物に含まれているカフェインの血糖降下作用の急性効果である。近年の大規模な疫学研究からは、コーヒー摂取やカフェインは 2 型糖尿病の発症リスクを軽減することが報告されている。しかしながら、カフェインの糖尿病予防効果や発症リスクを軽減する分子メカニズムに関しては未だ不明である。

近年の分子生物学研究から骨格筋の AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化はインスリン非依存性ブドウ糖取り込み量を促進し、血糖効果作用の制御に直接関わる重要な分子であることが示唆されている。AMPK は、運動による ATP 消費亢進に伴う筋内エネルギー状態の変化 (AMP/ATP 比の上昇、クレアチン/クレアチンリン酸比上昇) に応じて活性化されるセリン/スレオニンキナーゼである。このように、骨格筋の AMPK を介したインスリン非依存性ブドウ糖取り込み量の促進効果の分子メカニズムを明らかにすることは重要である。

2. 研究の目的

本研究は、骨格筋糖代謝機能を増強させる栄養の候補物質として、コーヒー成分に含まれるカフェインに着目して、以下の点を明らかにすることであった。

- ① 異なるカフェイン濃度に対する骨格筋 AMPK リン酸化の検証と筋線維組成の影響を検討した。
- ② AMPK のリン酸化を上昇させるカフェイン濃度を用いて AMPK アイソフォーム活性分析と筋エネルギー状態を検証した。
- ③ カフェインによるインスリン非依存性糖取りこみ量を検証する。
- ④ カフェインの生体投与が骨格筋 AMPK 活性化効果、血糖、インスリンに及ぼす影響について検討した。

3. 研究の方法

本研究は正常 SD ラット (~100g) を用いて行った。本研究で用いた単離骨格筋インキュベーションの実験系は抽出した骨格筋にカフェイン単独刺激を与えることにより、血流、ホルモン、神経系といった骨格筋以外の因子

の影響がない状態で骨格筋の糖代謝機能の解析を行うことが可能であった。

ラットの前肢筋から抽出した速筋線維比率 ~90% の Epitrochlearis (Epi) と後肢筋から抽出した遅筋線維比率 ~90% の soleus (sol) をカフェインを含んだ緩衝液において、酸素と二酸化炭素の混合ガスと 37 度でインキュベーションを行った。単離筋でカフェインに対する AMPK リン酸化、筋エネルギー状態、インスリン非依存性ブドウ糖取り込み促進効果を含めた糖代謝機能の解析を行った。AMPK と AMPK 基質である下流分子のアセチル-CoA カルボキシラーゼ (ACC) のリン酸化効果は特異的リン酸化抗体を用いてウエスタンブロット法を用いて評価した。AMPK α 1, α 2 アイソフォーム分析は、免疫沈降法を用いて行った。AMPK は、ATP 消費亢進に伴う筋内エネルギー状態の変化 (AMP 濃度の上昇)、AMP/ATP 比上昇、クレアチン/クレアチンリン酸 (PCr) 比上昇) に応じて活性化される。そのため、本研究では、酵素法を用いてカフェインによる ATP、PCr、グリコーゲン濃度も測定した。

4. 研究成果

① 異なるカフェイン濃度に対する骨格筋 AMPK 活性化効果の検証と筋線維組成の影響

雄性 SD ラットから抽出した速筋線維の比率の高い epi と遅筋線維比率の高い sol を、異なるカフェイン濃度を含んだ緩衝液において酸素と二酸化炭素の混合ガスと共に 37 度でインキュベートした。その結果、3mM カフェインは、epi と sol における AMPK のリン酸化を上昇させた (図 1)。コーヒー 4 杯 ~ 6 杯に相当するカフェイン濃度は、骨格筋の AMPK 活性化を惹起することを明らかにした。

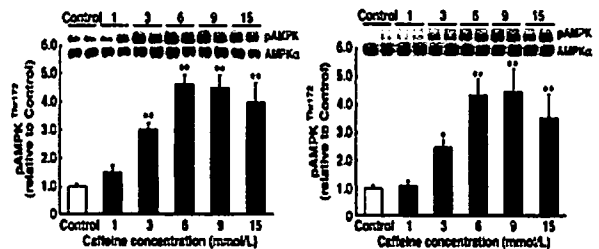


図 1. 異なるカフェイン濃度によるラット抽出筋 epi (right) と sol (left) における AMPK リン酸化効果

② 3mM カフェインによる AMPK アイソフォーム分析の検証

AMPK のリン酸化を促進したカフェイン

濃度 3mM を用いて、免疫沈降法で AMPK アイソフォーム $\alpha 1$, $\alpha 2$ 活性分析を行った。その結果、AMPK は $\alpha 1$, $\alpha 2$ をともに活性化した (図 2) その活性化は ATP, PCr の低下を伴った。

AMPK は、運動による ATP 消費亢進に伴う筋内エネルギー状態の変化に応じて活性化されるセリン/スレオニンキナーゼである。本研究で用いたカフェインは、筋内エネルギー状態を低下させたことで、AMPK の活性化が惹起したものと考えた。

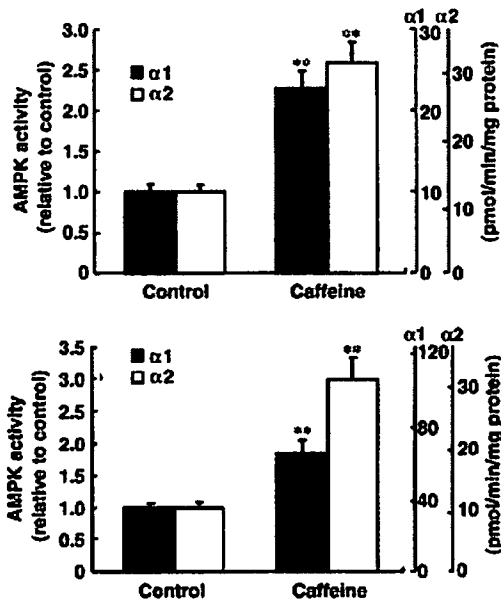


図 2. 3mM カフェインによる Epi(top)と sol(bottom)の AMPK アイソフォーム活性分析。

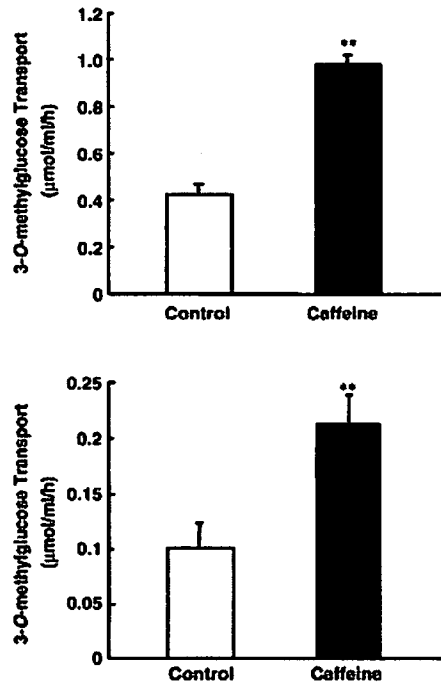
③ カフェインによるインスリン非依存性糖取り込み量の検証

AMPK のリン酸化を促進したカフェイン濃度を用いて、糖取り込み量を測定した結果、3mM カフェインは、Epi と sol とともに糖取り込み量を有意に上昇させた (図 3)。カフェインは骨格筋の AMPK を活性化させ、糖取り込みを促進させることが明らかとなった。本研究の研究成果は、AMPK 活性化がカフェインの糖代謝促進作用を媒介するシグナル伝達分子であることを提唱するものであり、AMPK の活性化を介したカフェインの糖代謝効果の分子機序の一端を解明することができた。

④ カフェインの生体投与が骨格筋の血糖と AMPK 活性効果に及ぼす影響

In vitro 単離実験の研究成果に加えて、本研究は、カフェインの生体投与が骨格筋の血糖と AMPK 活性効果に作用するか否かを検

討した。雄性 SD ラットを対象にして、カフェイン 5mg/kg の尾静脈投与後、30 分、60 分、120 分後に epi と sol を摘出した。その結果、投与後 120 分後において epi と sol とともに AMPK のリン酸化を上昇させた (図 4)。また、AMPK の基質となるアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) のリン酸も上昇させた。カフェイン投与後の血糖値は正常範囲内を維持し、顕著な変動は見られなかった。インスリンは、投与後に減少する傾向が見られ



たが、有意な変化は示さなかった (図 5)。
図 3. 3mM カフェインによる Epi(top)と sol(bottom)の糖取り込み量

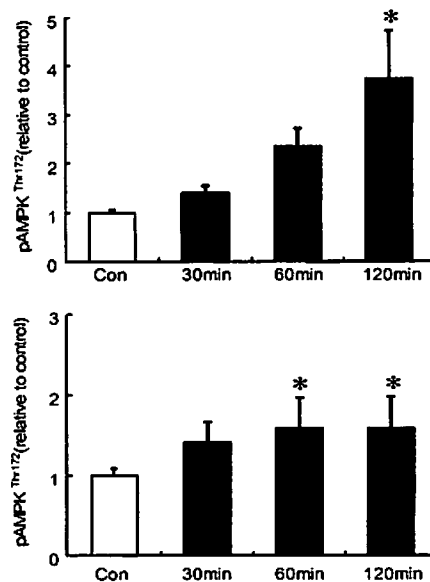


図 4. カフェイン 5mg/kg の尾静脈投与後の Epi(top)と sol(bottom)の AMPK リン酸化効

果

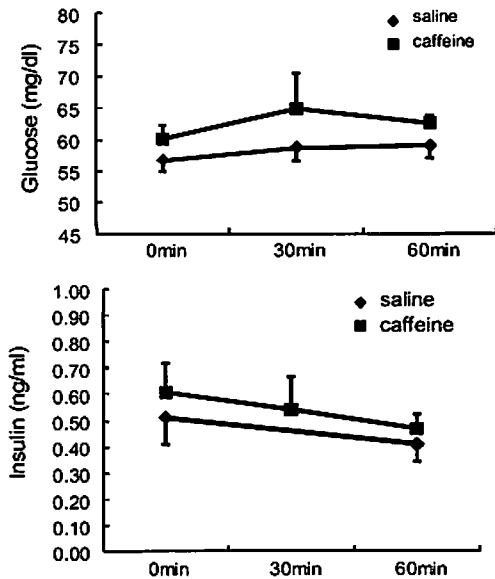


図5. カフェイン5mg/kgの尾静脈投与後の血糖とインスリンの変動

本研究の結果から、カフェインは AMPK 活性化効果を介した骨格筋の糖代謝機能を増強させる有力な栄養補助物質であることが明らかとなり、運動による血糖降下作用と類似した抗糖尿病効果をもつ可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Ma X, Iwanaka N, Masuda S, Karaike K, Egawa T, Hamada T, Toyoda T, Miyamoto L, Nakao K, Hayashi T. Morus alba leaf extract stimulates 5'AMP-activated protein kinase in isolated rat skeletal muscle. J. Ethnopharmacol. 122:54-59,2009, 査読あり
- ② Egawa T, Hamada T, Kameda N, Karaike K, Ma X, Masuda S, Iwanaka N, Hayashi T. Caffeine acutely activates 5'adenosine monophosphate-activated protein kinase and increases insulin-independent glucose transport in rat skeletal muscles. Metabolism 58: 1609-1617,2009, 査読あり
- ③ Hamada T, Kotani K, Fujiwara S, Sano Y, Domichi M, Tsuzaki K, Sakane N. The common -55 C/T polymorphism in the promoter region of the uncoupling protein 3 gene reduces prevalence of

obesity and elevates serum high-density lipoprotein cholesterol levels in the general Japanese population. Metabolism 57: 410-415,2008, 査読あり

- ④ Hamada T, Kotani K, Nagai N, Matsuoka Y, Tsuzaki K, Sano Y, Fujibayashi M, Tanaka S, Kiyohara N, Yoshimura Y, Egawa K, Kitagawa Y, Kiso Y, Moritani T, Sakane N. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and obesity-related metabolic changes in response to low-energy diets in obese women. Nutrition. In press, 査読あり

[学会発表] (計6件)

- ① 江川達郎, 浜田 拓, 林達也. カフェインの抗糖尿病・催糖尿病作用: 骨格筋 AMP キナーゼ活性化とインスリンシグナル抑制. 第64回日本体力医学会, 2009年9月18日, 新潟コンベンションセンター
- ② 江川達郎, 浜田 拓, 亀田菜央子, 唐池浩平, 馬嘯, 林達也. カフェインによるラット骨格筋 5'AMP-activated protein kinase (AMPK) $\alpha 1$ アイソフォームの優先的活性化. 第52回日本糖尿病学会年次学術集会, 2009年5月21日, 大阪国際会議場
- ③ Egawa T, Hamada T, Karaike K, Ma X, Hayashi T. Caffeine can activate 5'AMP-activated protein kinase and increase insulin-independent glucose uptake in rat skeletal muscles. 第63回日本体力医学会 国際セッション, 2008年9月10日, 大分県別府ビーコンプラザ
- ④ 浜田 拓, 江川達郎, 唐池浩平, 馬嘯, 林達也. カフェインによる骨格筋糖代謝と 5'AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化効果. 第16回日本運動生理学会, 2008年8月2日, 帝塚山大学
- ⑤ Hamada T, Egawa T, Karaike K, Ma X, Shimizu Y, Sakane N, Hayashi T. Caffeine can activate 5'AMP-activated protein kinase and increase insulin-independent glucose uptake in rat skeletal muscles. American Diabetes Association 68th Scientific Sessions, 2008年6月6日, San Francisco, California
- ⑥ Schweitzer GG, Castorena CM, Hamada T, Arias EB, Cartee GD. The B2 receptor of bradykinin is not essential for the increase in insulin-stimulated glucose uptake

following acute exercise. American
Diabetes Association 68th Scientific
Sessions, 2008年6月6日, San Francisco,
California

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜田 拓 (HAMADA TAKU)

大阪体育大学・体育学部・准教授

研究者番号: 00466294

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: