

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350893

研究課題名(和文) 骨格筋のストレッチ誘発性糖取り込みにおけるNO/カルシウム調節機構に関する研究

研究課題名(英文) NO/calcium regulation mechanism in stretch-induced glucose uptake of skeletal muscle

研究代表者

小原 一男(OBARA, Kazuo)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：60117611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋におけるストレッチ誘発性糖取り込み機構について検討した。得られた結果より、骨格筋においてストレッチ刺激は一酸化窒素(NO)合成酵素を活性化しNOを産生することで筋小胞体(SR)のリアノジン受容体をニトロシル化してSRからのカルシウム遊離を引き起こすこと、さらに、この遊離カルシウムによりCaMKIIが活性化され糖取り込みが亢進することが示唆された。一方、ストレッチ刺激による糖取り込み機構はインスリンや筋収縮による糖取り込み機構とは異なると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of stretch-stimulated glucose uptake in skeletal muscle was investigated. Our results suggest that stretch produces NO through nitric oxide synthase activation and increases calcium release from sarcoplasmic reticulum (SR) by S-nitrosylation of ryanodine receptor of SR, resulting increase in glucose uptake through CaMKII activation. Our results also suggest that stretch-induced glucose uptake involves insulin- and contraction-independent pathways.

研究分野：筋生理学

キーワード：骨格筋 糖代謝 ストレッチ インテグリン NO リアノジン受容体 カルシウム CaMKII

1. 研究開始当初の背景

近年、わが国においても、心筋梗塞や脳卒中に代表される致死的心血管疾患の頻度は着実に増加しており、その対策は急務である。心血管疾患の主要因である動脈硬化の多くは、肥満、耐糖能異常、高血圧、脂質代謝異常といった複数の原因が重積して発症することから、最近ではこれらを「メタボリックシンドローム」と呼称することで、病態解明、診断、治療の明確なターゲットとして捉えるようになった。このメタボリックシンドロームの改善には、食事療法、薬物療法とともに、運動療法が極めて重要な位置を占める。しかし、運動療法の有効性に関する科学的根拠は未だ薄弱である。一般的に運動の際には、エネルギー消費に加えて、骨格筋細胞に「受動的ストレッチ刺激」も加わる。しかし、「受動的ストレッチが骨格筋細胞に及ぼす影響」については、これまで詳細な検討はなされてこなかった。申請者らは最近、摘出マウス下肢骨格筋において、5 分間という短時間の周期的(1 Hz)ストレッチにより、糖輸送担体 GLUT4 の細胞質から細胞膜への移行や糖取り込みが促進されることを見出した[1]。すなわち、運動をしなくても、骨格筋を受動的にストレッチするだけで、骨格筋細胞への糖取り込みが促進され、血糖値を下げられる可能性が示唆される。

2. 研究の目的

骨格筋細胞において GLUT4 の細胞膜への移行と糖取り込みを引き起こすストレッチの刺激受容応答機構の全貌を明らかにするとともに、ストレッチを取り入れた 2 型糖尿病の新規治療法の開発を視野に入れて、ストレッチと薬物の併用効果を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 伸展刺激：マウスのヒラメ筋より作製した短冊状の筋線維標本に、リニアステップモーターを装備した自家製伸展装置を用いて、至適生体長から ± 2 mm の伸展量で、1 Hz の周期的ストレッチ刺激を 5 ~ 30 分間与えた。

(2) 糖取り込み量の測定：ストレッチ刺激後、

2-deoxy-D- [3 H]glucose(2-DG) を含む栄養液中で標本を 10 分間静置し、細胞に取り込まれた 2-DG の放射活性を測定した。

(3) ストレッチ刺激を受容するメカノセンサーの同定：インテグリン機能を阻害する RGD ペプチドや中和型抗インテグリン抗体を利用した薬理的解析によりメカノセンサーの同定を行った。

(4) Ca^{2+} /カルモジュリン系の関与：骨格筋の収縮による糖取り込みに関与が示唆されている Ca^{2+} /カルモジュリン系について、筋小胞体(SR)からの Ca^{2+} 遊離を阻害する dantrolene、筋小胞体への Ca^{2+} 再取り込みを阻害する cyclopiazonic acid (CPA)および Ca^{2+} /カルモジュリンにより活性化されるキナーゼ(CaMKII)の阻害薬 KN93 を用いた薬理的解析によりその関与を評価した。

(5) PI3-kinase/Akt 系の関与：Akt のリン酸化を指標にして PI3-kinase/Akt 系の関与について検討した。Akt のリン酸化は抗リン酸化 Akt 抗体を用いてウエスタンブロット法により測定した。また、PI3-kinase 特異的阻害薬 LY294002 や wortmannin を用いた薬理的解析を行った。

(6) リアノジン受容体の S-ニトロシル化の測定：SR のリアノジン受容体 (RyR) の S-ニトロシル化を S-ニトロシル化タンパク質ディテクションアッセイキットを用いて測定した。

(7) GLUT4 の細胞内移行の測定：ストレッチ刺激後に液体窒素で凍結した筋線維標本をホモジナイズし、ショ糖密度勾配遠心法により細胞内小胞、細胞膜系の 2 つの膜分画を分取した。各分画における GLUT4 の量は、ウエスタンブロット法にて検出した。

4. 研究成果

(1) ストレッチ誘発性糖取り込み：マウスヒラメ筋にストレッチ刺激を与えると、糖取り込みが増加した(図 1)。しかし、この糖取り込み量はインスリンや筋収縮によるものに比べ少なかった。

(2) メカノセンサーとしてのインテグリンの関与：ストレッチ誘発性糖取り込みはインテグリンを阻害する RGD ペプチドにより抑制された(図 1)。また、中和型抗インテグリン

ン抗体によりストレッチ誘発性糖取り込みが抑制された。さらに、インテグリンが機械的刺激を受容することで活性化される focal adhesion kinase (FAK) がストレッチ刺激により活性化された。これらの結果より、ストレッチ刺激はインテグリンにより感受され、FAK を介して細胞内に伝達されることが示唆された。

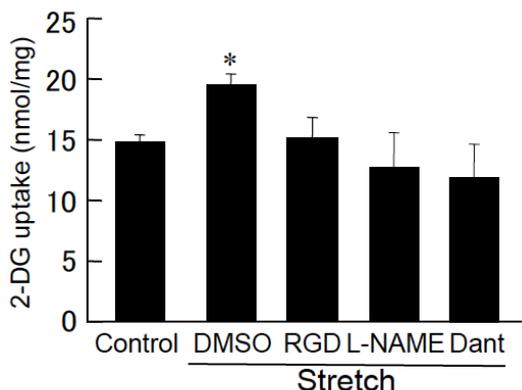


図1 ストレッチ誘発性糖取り込みに対する RGD、L-NAME および dantrolene (Dant) の作用。DEMO: 溶媒。* $P < 0.05$ vs. without stretch.

(3) カルシウムの関与: ストレッチ誘発性糖取り込みは筋小胞体 (SR) からの Ca^{2+} 遊離を阻害する dantrolene や、SR への Ca^{2+} 再取り込みを阻害する cyclopiazonic acid (CPA) により抑制された。また、ストレッチ誘発性糖取り込みは calcium/calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII) の阻害薬 KN-93 により抑制された。一方、EGTA により外液の Ca^{2+} を除去してもストレッチ誘発性糖取り込みは影響されなかった。これらの結果より、ストレッチ誘発性糖取り込みに、外液から流入した Ca^{2+} ではなく、SR から遊離された Ca^{2+} とそれにより活性化された CaMKII が関与する可能性が考えられる。

(4) リアノジン受容体 (RyR) の S-ニトロシル化の関与: ストレッチ刺激により一酸化窒素合成酵素 (NOS) のリン酸化が増加、すなわち NOS の活性が亢進した。また、ストレッチ刺激により RyR の S-ニトロシル化が亢進し、

この亢進は RGD ペプチドにより抑制された (図2)。

さらに、ストレッチ誘発性糖取り込みは NOS 阻害薬の N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) により抑制された (図1)。RyR の S-ニトロシル化により SR からの Ca^{2+} 遊離が惹起されることから、これらの結果はストレッチにより RyR の S-ニトロシル化を介した SR からの Ca^{2+} の遊離が促進されることを示唆する。

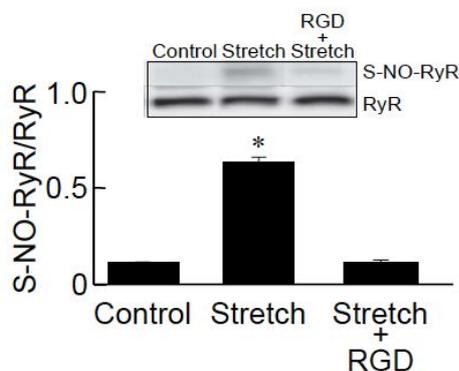


図2 ストレッチ刺激による SR のリアノジン受容体 (RyR) の S-ニトロシル化。* $P < 0.05$ vs. without stretch.

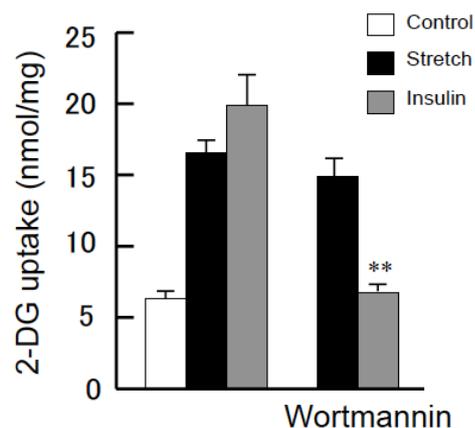


図3 ストレッチ刺激およびインスリン誘発性糖取り込みに対する wortmannin の作用。** $P < 0.01$ vs. without wortmannin.

(5) Akt および AMPK の関与: インスリンにより Akt のリン酸化が、また、筋収縮により

AMP-activated protein kinase (AMPK) のリン酸化が増大した。しかし、ストレッチ刺激による Akt および AMPK のリン酸化の増加は認められなかった。さらに、PI3-kinase 特異的阻害薬 LY294002 や wortmannin はインスリンによる糖取り込みを抑制したが、ストレッチ誘発性糖取り込みは抑制しなかった(図3)。また、インスリンおよびストレッチ刺激により GLUT4 の細胞質から細胞膜への移行が増加した。インスリンによる GLUT4 の移行は wortmannin により抑制されたが、ストレッチ刺激による GLUT4 の移行は wortmannin で抑制されなかった。これらの結果より、ストレッチ誘発性糖取り込みはインスリンや筋収縮とは異なる経路で惹起されることが示唆された。

以上の結果より、骨格筋においてストレッチ刺激はインテグリンにより感受され、FAK を介して細胞内に伝授され NOS の活性化を介して NO 産生を亢進させること、また、産生された NO により SR の RyR がニトロシル化され、SR からの Ca²⁺遊離が惹起されることが示唆された。さらに、この遊離 Ca²⁺により CaMKII が活性化され GLUT4 の細胞質から細胞膜への移行が惹起されることで糖取り込みが増加することが示唆された。しかし、ストレッチ誘発性糖取り込みにはインスリンや筋収縮とは異なる経路が関与する可能性が考えられる。

<引用文献>

- 1) Yoshihiko Ito, Kazuo Obara, Rikuko Ikeda, Megumi Ishii, Yoshiyuki Tanabe, Tomohisa Ishikawa, Koichi Nakayama: Passive stretching produces Akt- and MAPK-dependent augmentations of GLUT4 translocation and glucose uptake in skeletal muscles of mice. *Pflügers Arch.*, 451: 803-813, 2006.

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 1件)

Yukisato Ishida, Kazuo Obara, Richard J Paul: Myosin phosphorylation dissociated from force under hypoxic and glucose-free conditions in the guinea pig taenia caeci. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 35, 243 (2014)
査読無

[学会発表](計 8件)

小原 一男, 宇田 宗晃, 滝口 茂幸, 能代 裕也, 石川 智久: マウス骨格筋の伸展誘発性糖取り込み機構.

第 93 回日本生理学会大会, 2016 年 3 月 22 日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

小原一男: マウス骨格筋における伸展誘発性糖取り込み機構.

筋生理の集い, 2015 年 12 月 19 日, 慈恵会医科大学・高木会館(東京都・港区)

小原一男: 骨格筋糖取り込み増強作用における緑茶エピガロカテキンガレートの脱リン酸化酵素阻害薬としての作用.

静岡県立大学 US フォーラム 2015, 2015 年 9 月 29 日, 静岡県立大学(静岡県・静岡市)

小原一男: プロテインホスファターゼ 2A による平滑筋収縮制御-ミオシン軽鎖 3 リン酸化調節における PP2A の役割.

第 57 回日本平滑筋学会総会, 2015 年 8 月 25 日, 山口大学小串キャンパス(医学部) 総合研究棟(山口県・宇部市)

小原一男, 石川智久: マウス骨格筋における緑茶エピガロカテキンガレートによる糖取り込み増強作用.

第 61 回中部日本生理学会大会, 2014 年 11 月 7 日, 名古屋市立大学医学部(愛知県・名古屋市)

小原一男: 緑茶エピガロカテキンガレートによる骨格筋糖取り込み増強作用への 67LR を介する細胞骨格リモデリング簿関与について.

静岡県立大学 US フォーラム 2014, 2014 年 9 月 25 日, 静岡県立大学(静岡県・静岡市)

Yukisato Ishida, Kazuo Obara, Richard J

Paul: Myosin phosphorylation dissociated from force under hypoxic and glucose-free conditions in the guinea pig taenia caeci. Regulatory Circuits in Cell Motility a Symposium honoring David Hartshorne, 2013年10月11日, (Philadelphia, USA)

小原一男: 緑茶エピガロカテキンガレートによる骨格筋糖取り込み増強機序の解明. 静岡県立大学 US フォーラム 2013, 2013年9月25日, 静岡県立大学(静岡県・静岡市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小原 一男 (OBARA, Kazuo)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号: 60117611