

インスリンの脂肪分解抑制作用に対するトレーニング効果およびそのアデノシンとの関連

須 田 和 裕

Effect of Training on Anti-lipolytic Action of Insulin and the Relationship between the Effect and Adenosine

Kazuhiro Suda

緒 言

カテコールアミンとインスリンは脂肪細胞の脂肪分解を調節する主要因¹⁾である。カテコールアミンは β アドレナリン受容体アデニレートサイクラーゼ系を介して脂肪分解を刺激している¹⁾。逆にインスリンはカテコールアミンによる脂肪分解を抑制し、脂肪分解抑制作用を持つホルモンとして重要である。インスリンの脂肪分解抑制のメカニズムは他の抑制物質であるアデノシン、プロスタグランジンE、 α -アドレナリンアゴニストなど²⁻⁷⁾とは異なっている⁸⁾。

実験動物⁹⁻¹²⁾や人間¹³⁻¹⁶⁾の脂肪細胞ではトレーニングにより、カテコールアミンによる脂肪分解が増強することが知られている。しかし、持久的トレーニングによりインスリンの脂肪分解抑制作用が増強するか否かは明白ではない。トレーニングにより脂肪分解が増強しているので、インスリンの脂肪分解抑制作用が増強されることは生理的に適当であるとも考えられる。そこで、著者はインスリンの脂肪分解抑制作用に対するトレーニングの影響を研究した。さらにインスリンと同じく脂肪分解抑制作用を持つアデノシンとの関連についても検討した。

方 法

動物の飼育とトレーニングプログラム

体重120-130gの雄ウィスター系ラット(日本SLC)を購入し、飼育後実験に用いた。動物を無作為に20匹ずつ2群に分け、コントロール群とトレーニング群とし

た。両群とも1ケージに3匹ずつラットを入れ、室温24°C、12時間点灯、12時間消灯する動物室で飼育した。飼料、水ともに自由摂取とした。トレーニング群のラットは、小動物用トレッドミルで1週間に5回、9週間の走行を行なった。トレーニング群のラットは最終走行終了後少なくとも24時間後、1晩の絶食の後実験に用いた。

無傷脂肪細胞の調整とインキュベーション

脂肪細胞は Rodbell¹⁷⁾の方法により単離した。実験には2匹ずつの精巢上体白色脂肪組織を用いた。実験に用いた緩衝液の組成は110mM NaCl, 4.75mM KCl, 1.27mM CaCl_2 , 1.19mM MgCl_2 , 12.75mM Na_2HPO_4 で、これを酸素で10分間バブリングしたあと2%の牛血清アルブミン(遊離脂肪酸なし)を加えpH 7.4に調整した。これにさらに1.5mg/mlのコラゲナーゼ、5mMグルコースを添加した緩衝液に細切れにした脂肪組織を懸濁し、プラスチック試験管中で60分間インキュベーションした。インキュベーション後、ただちに濾過し、100Gで1分間遠心分離した。そして、上清である細胞層を上記した緩衝液で3回洗浄した。つぎに図中に示したような種々のホルモン、酵素等を添加した緩衝液(上述)中(最終容量1ml)で細胞(5000-100000個)を37°Cで1時間インキュベーションした。60分後、緩衝液と細胞の混合液を濾過し濾液中のグリセロールをKorn法¹⁸⁾で測定し、脂肪分解の指標とした。試験管内の平均細胞数は顕微鏡下で細胞を次のように数えて決定した。100 μ l細胞懸濁液を50倍に希釈後、5 μ l中に存在する細胞数を数え、これを3回繰り返し、平均した。

データの表現と統計的方法

脂肪細胞の脂肪分解は細胞1000000個あたりのグリセロール放出で示した。数値は平均 \pm S.E.である。平均

値の差の検定には t 検定を用いた。有意水準は 5 % とした。

結 果

図 1 にノルアドレナリンに対する脂肪細胞の脂肪分解を示している。多くの先行研究⁹⁻¹⁶⁾ と同じく、ノルアドレナリンに対する脂肪分解はコントロール群に比べトレーニング群で大きかった。

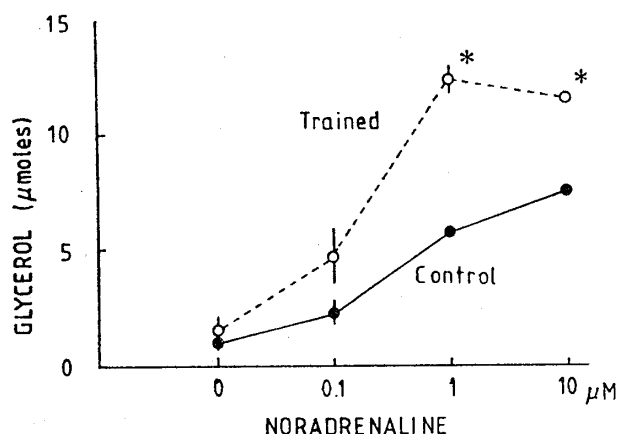


図 1 ノルアドレナリン刺激によるグリセロール放出。縦軸は細胞 1000000 個当たり時間のインキュベーションで放出された量。*はコントロール群に対するトレーニング群の統計的有意差。

図 2 にはノルアドレナリン刺激による脂肪分解に対するインスリンの抑制が示されている。インスリンの抑制は濃度依存的であり、またノルアドレナリンの濃度にも依存している。つまり、ノルアドレナリンの濃度が高くなるに従い、インスリンによる抑制が明らかになっている。このインスリンによる脂肪分解抑制作用のノルアドレナリンに対する依存性はトレーニング群でより明白である。このようにトレーニングは抑制曲線の著名な下向きの移動となって現われる。このインスリンの抑制作用の差はノルアドレナリンに対する脂肪分解反応の差に起因しているのかもしれない。そこで図 1 より両群の最大刺激となるノルアドレナリン濃度を選び（トレーニング群 1 μM, コントロール群 10 μM）、この濃度のノルアドレナリン刺激下で、インスリンの脂肪分解抑制作用をインスリン非存在下に対する割合を調べた。図 3 にあるように脂肪分解抑制作用はトレーニング群で用量作用曲線は左に平行移動した。

以上の結果はアデノシンの存在をコントロールしていない状態で得られたものである。アデノシンはアデニレートサイクラーゼを抑制し、脂肪分解を低下させる。そこでアデノシンをアデノシンデアミナーゼ 0.1 U/ml

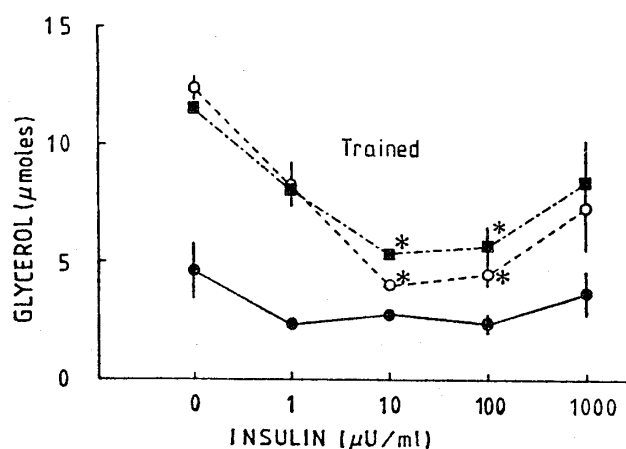
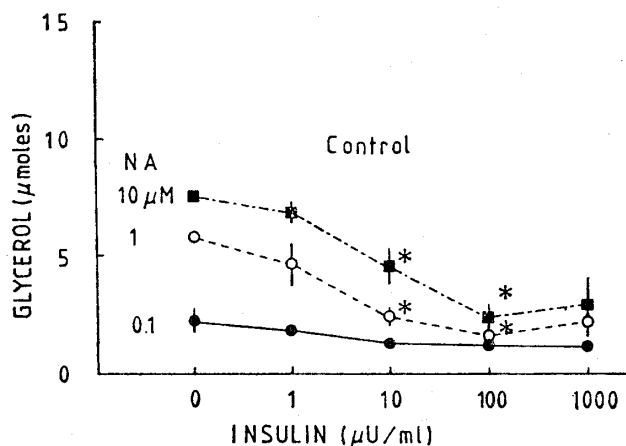


図 2 インスリンによるグリセロール放出の抑制。縦軸は細胞 1000000 個当たり 1 時間のインキュベーションで放出された量。*はインスリン非存在下のグリセロール放出量に対する統計的有意差。

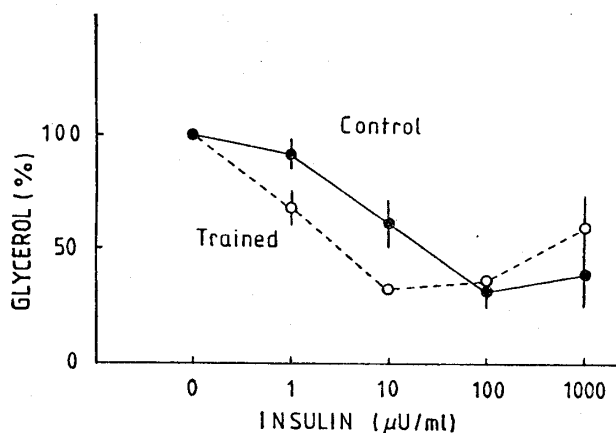


図 3 インスリンによるグリセロール放出の抑制。グリセロール放出はノルアドレナリンによって最大に刺激した（コントロール群 10 μM, トレーニング群 1 μM）。縦軸はインスリン非存在下のグリセロール放出量を 100% とした相対値。

で除去し、ノルアドレナリンによる脂肪分解に対するインスリンによる抑制を調べた。図 4 ではノルアドレナリ

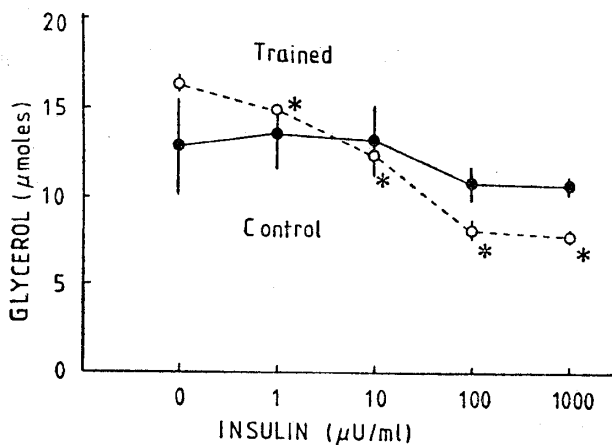


図4 アデノシン非存在下のインスリンによるグリセロール放出の抑制。アデノシンはアデノシンデアミナーゼ 0.1U/ml で除去した。グリセロール放出はノルアドレナリンによって最大の90%で刺激した(コントロール群 0.1μM, トレーニング群 0.05 μM)。*はインスリン非存在下のグリセロール放出量に対する統計的有意差。

ン刺激が最大の90になる濃度(トレーニング群 0.05μM, コントロール群 0.1μM), 図5は最大刺激になる濃度(トレーニング群 0.5μM, コントロール群 1 μM)での結果である。インスリンによる脂肪分解の抑制がみられたのは, 図4のトレーニング群のみであった。

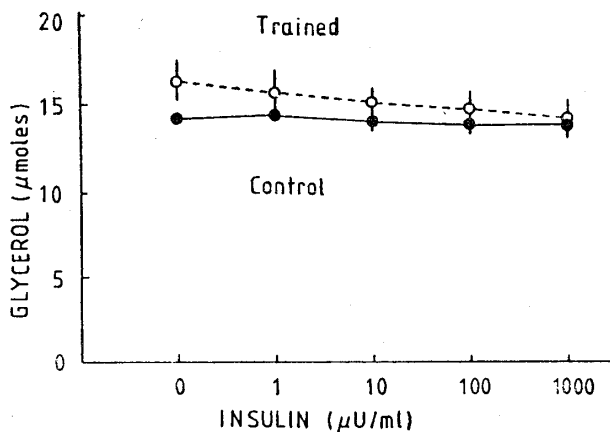


図5 アデノシン非存在下のインスリンによるグリセロール放出の抑制。アデノシンはアデノシンデアミナーゼ 0.1U/ml で除去した。グリセロール放出はノルアドレナリンによって最大に刺激した(コントロール群 1 μM, トレーニング群 0.5μM)。

考 察

脂肪細胞の脂肪分解は促進経路と抑制経路によって制御されている¹⁹⁾。促進性のアゴニストは特異的受容体を介してアデニレートサイクラーゼを活性化し,

cAMPを蓄積させる。このcAMPはcAMP依存性プロテインキナーゼを活性化し, 次にこれはホルモン感受性リパーゼを磷酸化して活性化させ, 脂肪分解を起こさせる。アデノシン, プロスタグランジンEシリーズ, ニコチン酸などの抑制性のアゴニストはアデニレートサイクラーゼを抑制する²⁻⁷⁾。一方主要な循環しているホルモンのひとつであるインスリンはいくつかの脂肪分解経路を抑制して脂肪細胞の脂肪分解を鈍らせる¹⁹⁾。この実験のデータからまずトレーニングによりノルアドレナリンによる脂肪分解に対するインスリンの抑制が強まることが分かった。つまり, 種々の濃度のノルアドレナリンに対するインスリンの抑制が強まった。しかし, トレーニング群でノルアドレナリンによる脂肪分解が増大しているので, このインスリンによる抑制作用は作用は表面的なものである可能性がある。このためノルアドレナリンに対する反応性を消去した条件でインスリンの抑制作用を比較しなければならない。

そこで抑制率を比較する必要がある。図3にはインスリン非存在下に対するグリセロール放出の相対値が示されている。トレーニング群のグラフは左にシフトし, インスリンによる抑制のIC₅₀(表1)も小さい。一般に,

表1 インスリン抑制の50%有効濃度(IC₅₀)

NORADRENALIN(μM)	TRAINED	CONTROL
0.1	0.316228	1.28825
1	1.0715	5.49541
10	0.977237	7.76247

受容体の数が減ると同じ反応を起こすのに必要なホルモンの濃度は上昇し, 用量反応曲線は右に平行移動する²⁰⁾。トレーニング群でこの曲線が左に平行移動したのは逆にインスリンの受容体数が増加したことを示唆するのも知れない。トレーニングによってインスリンの受容体数が増加したという報告はいくつかみられる²¹⁻²⁴⁾。この実験に用いたトレーニング群の脂肪細胞で同様のことが生じていたことは充分考えられる。

一方, アデノシンはアデニル酸サイクラーゼ抑制することが知られている^{25,26)}。これは脂肪分解抑制に働き, インスリンと同じ方向に作用することになる。このため図1~3ではインスリンとアデノシンの作用が重なっていることが考えられる。また Schwabe ら²⁷⁾はインスリンの作用はアデノシンで促進されると報告している。そこでアデノシンの影響を消すために 0.1U/ml のアデノシンデアミナーゼ(ADA)を加え, インスリンの脂肪分解抑制を示したのが図4である。ノルアドレナリンによる脂肪分解の刺激は90%maxの強さ(トレーニング

群に対して $0.05\mu\text{M}$ 、コントロール群に対して $0.1\mu\text{M}$)²⁸⁾である。このとき、トレーニング群ではインスリンによる脂肪分解抑制がみられたが、コントロール群ではみられなかった。このことはアデノシン非存在下で同等の脂肪分解刺激時ではトレーニング群でインスリンによる脂肪分解抑制作用が強まることを示している。しかし、この解釈には注意を要する。今回の実験ではノルアドレナリンに対する脂肪分解反応の強弱の影響を除去するため、アデノシン非存在下で相対的に同等のノルアドレナリン刺激²⁸⁾を用いてインスリンの反応を調べた。このためインキュベーションバッファー中のノルアドレナリン濃度はトレーニング群とコントロール群で異なっている。一方トレーニング群とコントロール群では脂肪細胞の β アドレナリン受容体の数、親和性に差がないことがいくつかの研究で示されている^{10,12,29)}。このことは脂肪分解に対する90%maxのノルアドレナリン濃度と受容体結合を90%飽和させるノルアドレナリン濃度が異なっていることを示唆している。生物学的反応の50%有効濃度(ED_{50})とアゴニスト結合測定よりもとめた Kd とは一致しないことがよくある²⁰⁾。今回の実験ではトレーニング群のバッファー中のノルアドレナリン濃度はコントロール群に比べて低く受容体の飽和度もおそらくコントロール群より小さかったであろう。

インスリンの脂肪分解抑制作用のメカニズムの一つとして β アドレナリン受容体の内在化が挙げられる³⁰⁾。 β アドレナリン受容体の数の減少で脂肪分解が低下することは、イソプロテレノール投与によるダウンレギュレーションでも報告されている³¹⁾。こうした β アドレナリン受容体の内在化が起こったとしても生物学的反応を引き起こすのに必要な以上に受容体の飽和度が高ければ、受容体の内在化は脂肪分解に影響を与えないだろう²⁰⁾。しかし、今回の実験ではコントロール群に比べて飽和度が低いと考えられるトレーニング群の脂肪細胞は、 β アドレナリン受容体の内在化がインスリンによって促進されたら結合受容体の数は大きく減るわけで、グリセロール放出の抑制という生物学的反応がでてきてもおかしくない。実際、ノルアドレナリン濃度をさらに10倍にし、グリセロール放出の最大刺激となるようにした図5ではトレーニング群、コントロール群ともにインスリンによる抑制がみられなかった。ここではトレーニング群に対するノルアドレナリンの濃度は図4のコントロール群に対するノルアドレナリン濃度を越えている。この状態では β アドレナリン受容体の結合がより飽和状態に近づき、インスリンによる β アドレナリン受容体の内在化も生物学的反応を引き起こすまでには至らなかったと考えられ

る。

以上のことから本実験ではノルアドレナリン濃度を相対的に等しくしており、絶対的な同濃度を用いなかった、トレーニング効果として結論するには十分な証拠が得られなかったと考える。

要 約

インスリンの脂肪分解抑制作用に対するトレーニング効果およびそのアデノシンとの関係をラット脂肪細胞を用いて検討した。その結果は次のようであった。

1. ノルアドレナリンに対する脂肪分解反応はトレーニング群で有意に増強した。
2. ノルアドレナリンの最大刺激に対するインスリンの脂肪分解抑制ではトレーニング群でインスリンに対する感受性が高まった。
3. アデノシンをアデノシンデアミナーゼで除去すると、90%のノルアドレナリン刺激に対するインスリンの抑制はトレーニング群でみられたものの、コントロール群ではみられなかった。
4. さらにアデノシン非存在下で最大刺激のノルアドレナリンに対するインスリンの抑制は両群ともにみられなかった。

これらのことからアデノシン存在下ではトレーニングによってインスリンに対する感受性は高まると考えられるものの、アデノシン非存在下ではトレーニング効果を認めるに足る明白な証拠は得られなかったと考えられた。

文 献

- 1) Fain, J.N. : Pharmacol. Rev., 25, 67(1973)
- 2) Rodbell, M. : Nature. 284, 17-22(1980)
- 3) Moreno, F.J., Mills, I., Garcia-Saenz, J.A., and Fain, J.N. : J. Biol. Chem. 258, 10938-10943(1983)
- 4) Murayama, T. and Ui, M. : J. Biol. Chem. 253, 3319-3326(1983)
- 5) Olansky, L., Myers, G.A., Pohl, S.L., and Hewlett, E.L. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 6547-6551(1983)
- 6) Bokoch, G.M., Katada, T., Northup, J.K., Ui, M., and Gilman, A.G. : J. Biol. Chem. 259, 3560-3567(1984)
-) Codina, J., Hildebrandt, J. d., Sekura, R. D., Birnbaumer, M., Bryan, J., Manclark, C.R., Iyengar,

- R. and Birnbaumer, L. : J. Biol. Chem. 259, 5871-5886(1984)
- 8) Kather, H. Aktories, K., Schulz, G. and Jakobs, K.H. : FEBS Lett. 161, 149-152(1983)
- 9) Askew, E.W., Huston, R.L., Plopper, and Hecker, A.L. : J. Clin. Invest. 56, 521-529(1975)
- 10) Bukowiecki, L., Lupien, J., Follea, N., Paradis, D., Richard, D. and LeBlanc, J. : Am. J. Physiol. 239, E422-E429(1980)
- 11) Shepherd, R.E., Bah, M.D. and Nelson, K.M. : J. Appl. Physiol. 61, 1301-1308(1986)
- 12) Williams, R.S. and Bishop, T. : Am. J. Physiol. 243, E345-E351(1982)
- 13) Depres, J.P., Bouchard, C., Savard, R., Tremblay, A., Marcotte, M. and Theriault, G. : J. Appl. Physiol. 53, 25-30(1984)
- 14) Depres, J.P., Bouchard, C., Savard, R., Tremblay, A., Marcotte, M. and Theriault, G. : Metabolism 33, 235-239(1984)
- 15) Depres, J.P., Bouchard, C., Savard, R., Tremblay, A., Marcotte, M. and Theriault, G. : J. appl. Physiol. 56, 1157-1161(1984)
- 16) Mratin III, W.H., Coyle, E.F., Joyner, M., Santeusano, D., Ehsani, A.A. and Holloszy, J.O. : J. Appl. Physiol. 56, 845-846(1984)
- 17) Rodbell, M. : J. Biol. Chem. 239, 375(1964)
- 18) Korn, E.D. : J. Biol. Chem. 215, 1(1955)
- 19) Davies, J.I. and Souness, J.E. : Rev. Pure Appl. Pharmacol. Sci. 2, 1-112(1981)
- 20) Yamamura, H.I., Enna, S.J. and Kuhar, M.J. : Neurotransmitter Receptor Binding 2nd ed. 38 Raven Press Books, Ltd. (1985)
- 21) Craig, B.W., Hammons, G.T., Garthwaite, S.M., Jarett, L. and Holloszy, J.O. : J. Appl. Physiol. 51, 1500(1981)
- 22) Craig, B.W., Thompson, K. and Holloszy, J.O. : J. Appl. Physiol. 54, 571(1983)
- 23) Vinten, J. and Galbo, H. : Am. J. Physiol. 244, 129(1983)
- 24) Foley, J. E., Laursen, A. L., Sonne, O. and Gliemann, J. : Diabetologia 19, 234(1980)
- 25) Fain, J.N. and Malbon, C.C. : Mol. Cell. Biochem. 25, 143-169(1979)
- 26) Shima, S. and Akamatu, N. : Japan. J. Pharmacol. 53, 473-478(1990)
- 27) Schabe, U., Schonhofer, P.S. and Ebert, R. : Eur. J. Biochem. 46, 537-545(1974)
- 28) Shinoda, S. Izawa, T. Komabayashi. T. Suda, K. Tsuboi, M. and Iwane, H. : Res. Com. Chem. Pharmacol. 66, 397-410(1989)
- 29) Izawa, T., Komabayashi, T. Tsuboi, T and Koshimizu, E. : J. Physical Fitness Japan 34, 119-127 (1985)
- 30) Engfeldt, P., Hellmer, J. Wahrenbers and Arner, P. : J. Biol. Chem. 263, 15553-15560(1988)
- 31) Izawa, T., Komabayashi, T., Suda, K., Kunisada, Y., Shinoda, S. and Tsuboi, M. : Res. Com. Chem. Pathol. Pharmacol. 60, 253-256(1988)