

## ラット脂肪細胞における $\beta$ -アドレナリン受容体数 に対するトレーニングの影響

須 田 和 裕

### Effects of Exercise-Training on the Number of $\beta$ -Adrenergic Receptors in Rat Adipocytes

Kazuhiro SUDA

#### 1. 緒 言

脂肪細胞は運動に対する適応現象に重要な役割を果たしている。運動時のエネルギー源としては炭水化物と脂肪が主要である<sup>1)</sup>。持久的トレーニングをおこなうと炭水化物の利用を抑制し、脂肪の利用が高まり、疲労困憊の原因である低血糖や筋グリコーゲンの枯渇を遅らせる<sup>2,3,4)</sup>運動を行なうと交感神経が緊張し、血液中のカテコールアミンの濃度が上昇する<sup>5)</sup>。これは脂肪細胞の $\beta$ -アドレナリン受容体に結合し、2次情報伝達物質である細胞内 3':5'-cyclic adenosine monophosphate(cAMP)の増加を引き起こし、これに続きプロテインキナーゼ、ホルモン感受性リパーゼが活性化され脂肪分解が起こる<sup>6)</sup>。

トレーニングを行なうと筋の脂肪利用能力が高まり<sup>7)</sup>、また、 $\beta$ -アドレナリン受容体作動薬に対する脂肪分解が増強することが実験動物<sup>8,9~14)</sup>やヒト<sup>15~18)</sup>で知られている。一方、ある受容体が、その作動薬に連続的に暴露されるとその作動薬に対する反応が低下することが脱感作現象として知られている<sup>19~21)</sup>。トレーニングによる脂肪分解増強は脱感作現象と反対の現象である。トレーニングによる脂肪分解増強のメカニズムについての研究では、 $\beta$ -アドレナリン受容体刺激に対する cAMP 濃度の低下<sup>12,13,22)</sup>、また cAMP に対する脂肪分解の増強が報告されている<sup>9,11,18,23)</sup>。 $\beta$ -アドレナリン受容体数については変化がないと報告されている。これらの研究では cAMP 以降の段階ではトレーニングによる脂肪分解の増強と一致するが、受容体結合が不変でなぜ cAMP 濃度がトレーニング群で低下するか疑問である。ひとつの

可能性は cAMP を分解する酵素である フォスフォジエステラーゼの活性が高まることである<sup>13,22,24)</sup>。一方受容体の情報を cAMP を産生する酵素である アデニル酸シクラーゼに伝達するときに必要な GTP 結合タンパクのうち抑制性のものがトレーニングにより減少し<sup>10)</sup>、このことは cAMP 濃度を増加させることに寄与する。このためさらに受容体のレベルでこれを cAMP 濃度を減少させる現象がトレーニングにより起こっていても不思議ではない。

$\beta$ -アドレナリン受容体数を測定する実験ではこれまで [<sup>3</sup>H]dihydroalprenolol ([<sup>3</sup>H]DHA) が使われて来た<sup>9,11,14)</sup>。これは細胞表面および細胞膜内の受容体に結合する可能性がある<sup>26~29)</sup>。しかし、機能的な受容体は細胞表面にある受容体である<sup>25)</sup>。そこで細胞表面にしか結合できない親水性のアнтаゴニストである [<sup>3</sup>H]CGP を用いラット脂肪細胞の $\beta$ -アドレナリン受容体数にトレーニングが変化を与えるか否かを検討することにした。

#### 2. 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4匹づつ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、室温24℃、12時間点灯、12時間消灯した動物室で飼育した。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。走行条件はすでに報告したもの<sup>11)</sup>と同様であった。トレーニング群のラットは一過性の運動の効果が残らないよう、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。コントロール群はトレッドミル走を行わず、やはり、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 Rodbell<sup>30)</sup>の方法により単離した。実験には精巢上体白色脂肪組織を用いた。Krebs-Ringer Phosphate buffer (110mM NaCl, 4.75mM KCl, 1.27mM CaCl<sub>2</sub>, 1.19mM MgCl<sub>2</sub>, 12.75mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH7.4) に 5mM グルコース, 2%の牛血清アルブミン(fraction V) および 1.5mg/ml のコラゲナーゼを添加した溶液と脂肪組織をプラスチック試験管に入れ、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30秒間遠心分離した。そして、上層である細胞層を上述した緩衝液で3回洗浄した。

#### 脂肪分解実験

プラスチック試験管内のホルモン、酵素等を添加した FFA free の緩衝液(上述)中(最終容量 1ml)で細胞(5~100000 個/ml)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<sup>31)</sup>で測定して、これを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数えて決定した。100 $\mu$ l 細胞懸濁液を20倍に希釈後、5 $\mu$ 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。

#### 結合実験

0.03%の牛血清アルブミンを加えた Hepes Buffer に各種濃度の(-)-ノルアドレナリン及び 2nM [<sup>3</sup>H]CGP 12177 を添加した溶液中に 5~100000 個の脂肪細胞を懸濁した。LACASA<sup>32)</sup> らによれば、[<sup>3</sup>H]CGP12177 と $\beta$ -アドレナリン受容体の特異的結合は37°C では30分で平衡に達するので、40分間、37°C でインキュベーションした。反応停止は10倍容量の氷冷した濾過緩衝液(1mM Mg SO<sub>4</sub>, 20mM potassium phosphate, pH7.4)で Whatman GF/C glass fiber filter を用いて急速濾過した。フィルターをさらに 5ml の濾過緩衝液で2回洗浄したあと 4ml のシンチレーションカクテルをいれてカウントした。

#### 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。

### 3. 結果と考察

#### ノルアドレナリンによる脂肪分解に対するトレーニングの影響

脂肪分解の実験では、脂肪分解の指標としてグリセロールの放出量を測定した。

図1にノルアドレナリンに対する脂肪細胞のグリセロール放出量を示している。1 $\mu$ M 以上のノルアドレナリン濃度ではトレーニング群で統計的に有意に放出量が大きかった。これは多くの先行研究と同じものである。脂肪細胞の脂肪分解は $\beta$ -アドレナリン受容体とアゴニストの結合、GTP 結合タンパクの関与によるアデニル酸シクラーゼの活性化、2次情報伝達物質である cAMP の合成、cAMP 依存性プロテインキナーゼの活性化、それにつづくホルモン感受性リパーゼの活性化、脂肪分解というカスケードがある<sup>6)</sup>。加水分解されない cAMP のアナログである dibutyryl cAMP を使った実験でトレーニングによる脂肪分解の増強は主に、cAMP 以降の段階での変化だと考えられている<sup>9,11,18,23)</sup>。しかし、 $\beta$ -アドレナリン受容体と cAMP の間の変化も報告されている<sup>10)</sup>。そこでホルモンの情報の入口である $\beta$ -アドレナリン受容体数を測定した。その結果が図2である。

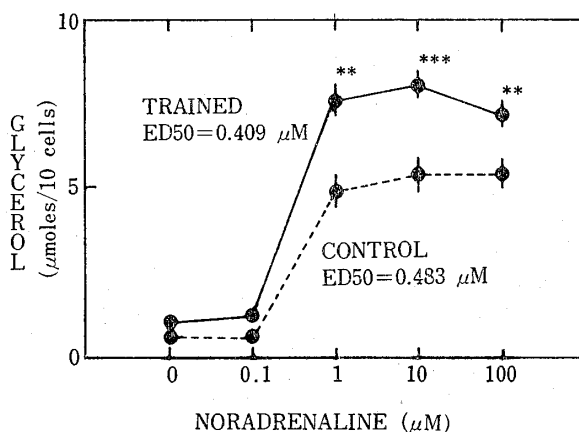


図1 ノルアドレナリンに対する脂肪細胞のグリセロール放出量。\*\*\*, \*\*は群間の有意差。

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

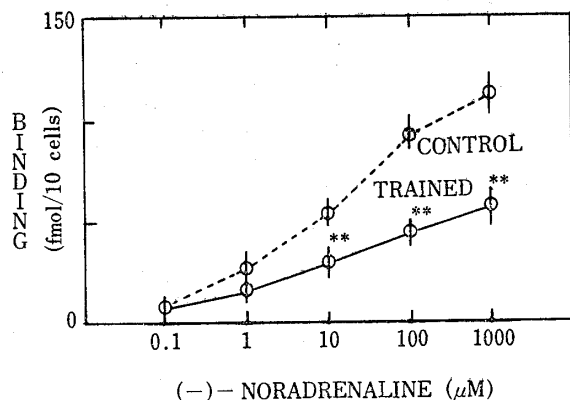


図2 (-)-ノルアドレナリンの置換量。\*\*は群間の有意差。\*\*:  $p < 0.01$ 。

脂肪細胞  $\beta$ -アドレナリン受容体数に対するトレーニングの影響

図2は  $\beta$ -アドレナリン受容体に結合した  $[^3\text{H}]\text{CGP 12177}$  が (-)-ノルアドレナリンに置換された量を示している。この値は  $\beta$ -アドレナリン受容体の数を示している。(-)-ノルアドレナリン  $10\mu\text{M}$  以上ではコントロール群で統計的に有意に大きな値であった。 $\beta$ -アドレナリン受容体はそのアゴニストに暴露されると脱感作が起こる<sup>19-21)</sup>。そしてその一つメカニズムは  $\beta$ -アドレナリン受容体が細胞膜表面から細胞内部へ移行することと考えられる<sup>19-21)</sup>。トレーニングを行なうと交感神経が興奮し、運動時に血液中のカテコールアミン濃度が高まる<sup>33-35)</sup>。そこで今回の実験でも  $\beta$ -アドレナリン受容体数の減少という形の脱感作が起こったものと考えられる。しかし、これまでの報告では  $\beta$ -アドレナリン受容体数のトレーニングによる減少は無傷脂肪細胞<sup>9,11)</sup>や脂肪細胞膜<sup>14)</sup>で観察されていない。本研究の結合実験で用いた、 $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$  は親水性の放射性リガンドで、先行研究でもちいた  $[^3\text{H}]\text{DHA}$  は親油性の放射性リガンドである。親油性のリガンドでは細胞内小胞に内在化された受容体に結合する可能性がある<sup>26-29)</sup>。もし、 $[^3\text{H}]\text{DHA}$  が内在化された  $\beta$ -アドレナリン受容体に結合できたなら脱感作により表面上から失われた、細胞の反応と無関係な受容体の数を測定してしまう。すると細胞数の減少(ダウンレギュレーション)を見逃すことになる。本研究で用いた  $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$  は  $\beta$ -アドレナリン受容体の最も強い作動薬であるイソプリナリンほどではないが親水性であり<sup>36)</sup>、細胞表面の  $\beta$ -アドレナリン受容体だけに結合すると考えられ、さらに細胞に取り込まれることもない<sup>25)</sup>。そして  $\beta$ -アドレナリン作動薬の  $\text{CGP12177}$  置換は  $\text{cAMP}$  の蓄積、脂肪分解にも同等の効力をもつ。このようなこ

とから今回の方法で測定した  $\beta$ -アドレナリン受容体数は細胞表面上の機能的なものを示すと考えられる。

トレーニングによって脂肪分解は増強する。しかし、その脂肪分解を刺激する情報の入口である  $\beta$ -アドレナリン受容体数は減少する。この2つのことは矛盾するように見えるが、脂肪分解に対するトレーニングの影響は情報伝達のカスケードの種々の部分に及んでいるのでこの2つは矛盾しない。 $\beta$ -アドレナリン受容体数は減少するが、受容体と連関する抑制性の  $\text{GTP}$  結合タンパクも減少する<sup>10)</sup>。これは、アデニル酸シクラーゼ活性化を促進し、 $\text{cAMP}$  濃度が増加する方向に進む。このため受容体数の減少は相殺される。しかし、それでも細胞内  $\text{cAMP}$  濃度はトレーニングによって減少する<sup>12,13,22)</sup>。 $\text{cAMP}$  以降のカスケードではトレーニングによって脂肪分解が促進される方向に変化している<sup>9,11,18,23)</sup>。これらのことを総合すると結局、トレーニングが脂肪分解を促進することになると考えられる。

#### 4. 要約

ラット脂肪細胞の脂肪分解および  $\beta$ -アドレナリン受容体数に対するトレーニングの影響について検討した。その結果つぎのようなことがわかった。

1. トレーニングによってラット脂肪細胞のノルアドレナリンによる脂肪分解は増強した。
2. ラット脂肪細胞の  $\beta$ -アドレナリン受容体数はトレーニングによって減少した。

これらのことからトレーニングは脂肪分解の情報伝達の経路で一方向的に脂肪分解の情報を増幅させるのではなく、ある段階では脂肪分解情報を増幅し、また別の段階では抑制させるものと考えられた。そして、これを合計すると結局脂肪分解の増強となるものと考えられた。

#### 文献)

- 1) HODGETTS, V., S. W. COPPACK, K. N. FRAYN, AND T. D. R. KOCKADAY (1991) J. Appl. Physiol. 71: 445-451.
- 2) AHLBORG, B., J. BERGSTROM, L.-G. EKELEND, AND E. HULTMAN. (1967) Acta physiol. Scand. 70: 129-142.
- 3) COSTILL, D. L., E. COYLE, G. DALSKY, W. EVANS, W. FINK, AND D. HOOPES. (1977) J. Appl Physiol. 43: 695-699.
- 4) HICKSON, R. C., M. J. RENNIE, R. K. CONLEE, W. W. WINDER, AND J. O. HOL-

- LOSZY. (1977) *J. Appl. Physiol.* 43: 829-833.
- 5) ASKEN, E.W., R.L.HUSTON, C.G. PLOPPER AND A.L. HECKER. (1975) *J. Clin. Invest.* 56: 521-529.
- 6) FAIN, J. N. AND J. A. GARCIA-SAINZ. (1983) *J. Lipid Res.* 24: 945-966.
- 7) COSTILL, D. L., W. J. FINK, L.H. GETCHELL, J. L. IVY, AND F.A. WITZMANN. (1979) *J. Appl. Physiol.* 47: 787-791.
- 8) ASKEW, E.W., AND A.L. HECKER. (1976) *J. Nutr.* 106: 1351-1360.
- 9) BUKOWIECKI, L., J. LUPIEN, N. FOLLEA, D. PARADIS, D. RICHARD, AND J. LIBLANC. (1980) *Am. J. Physiol.* 239: E422-E429.
- 10) IZAWA, T., T. KOMABAYASHI, S. SHINODA, K. SUDA, M. TSUBOI, AND E. KOSHIMIZU. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151: 1262-1268.
- 11) SHEPHERD, R.E., M.D. BAH, AND K.M. NELSON. (1986) *J. Appl. Physiol.* 61: 1301-1308.
- 12) SHEPHERD, R.E., W.L. SEMBROWICH, H.E. GREEN, AND P.D. GOLLNICK. (1977) *J. Appl. Physiol.* 884-888.
- 13) SHEPHERD, R. E., E. G. NOBLE, G. A. KLUG, AND P. D. GOLLNICK. (1981) *J. Appl. Physiol.* 50: 143-148.
- 14) WILLIAMS, R.S., AND T. BISHOP (1982) *Am. J. Physiol.* 243: E345-E351.
- 15) CRANPES, F., M. BEAUVILLE, D. RIVIERE, AND M. GARRIGUES. (1986) *J. Appl. Physiol.* 61: 25-29.
- 16) DESPRES, J.P., C. BOUCHARD, R. SAVARD, A. TREMBLAY, M. MARCOTTE, AND G. THERIAULT (1984) *Metabolism* 33: 235-239.
- 17) DESPRES, J.P., C. BOUCHARD, R. SAVARD, A. TREMBLAY, M. MARCOTTE, AND G. THERIAULT (1984) *J. Appl. Physiol.* 56: 1157-1161.
- 18) RIVIERE, D., F. CRAMPES, M. BEAUVILLE, AND M. GARRIGUES. (1989) *J. Appl. Physiol.* 66: 330-335.
- 19) SIBLEY, D.R. AND LEFKOWITZ, R.J. (1985) *Nature (London)* 317, 124-129.
- 20) HERTEL, C. AND PERKINS, J.P. (1984) *Mol. Cell. Endocrinol.* 37, 245-256.
- 21) HARDEN, T.K. (1983) *Pharmacol. Rev.* 35, 5-32.
- 22) ASKEW, E.W., A.L. HECKER, V.G. COPPES, AND F.B. STIFEL. (1978) *J. Lipid Res.* 19: 729-736.
- 23) IZAWA, T., T. KOMABAYASHI, T. MOCHIZUKI, K. SUDA, AND M. TSUBOI. (1991) *J. Appl. Physiol.* 71: 23-29.
- 24) KENNO, K.A., J.L. DURSTINE, AND R. E. SHEPHERD. (1986) *J. Appl. Physiol.* 56: 845-848.
- 25) STAEHELIN, M., AND C. HERTEL. (1983) *J. Receptor Res.* 3: 35-43.
- 26) CHUANG, D. AND E. COSTA. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3024-3028.
- 27) HARDEN, T.K., C. U. COTTON, G. L. WALDO, J.K. LUTTON, AND J.P. PERKINS (1980) *Science* 210: 441-443.
- 28) TOEWS, M.L., T.K. HARDEN, AND J.P. PERKINS (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3553-3557.
- 29) FREDERICH, R.C., G.L. WALDO, T.K. HARDEN, AND J. P. PERKINS. *J. Cyclic Nucl. Res.* 9: 103-118.
- 30) RODBELL, M. (1965) *J. Biol. Chem.* 239: 375-380.
- 31) KORN, E.D. (1955) *J. Biol. Chem.* 215: 1-13.
- 32) LACASA, D., B. AGLI, AND Y. GIDICELLI (1985) *Eur. J. Biochem.* 146: 339-346.
- 33) GRAY, I., AND W.P. BEETHMAN. (1957) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 96: 636-638.
- 34) HAGGENDAL, J., L.H. HARTLEY, AND B. SALTIN. (1970) *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* 25: 337-342.
- 35) RAVEN, P.R., T.J. CONNORS, AND E. EVONUK. (1970) *J. Appl. Physiol.* 29: 374-377.
- 36) STAEHELIN, M., SIMONS, K. JAEGGI., AND N. WIGGER, (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 3496-3502.