

ヒト筋グリコーゲン合成酵素活性の調節機序に関する検討

大久保 雅 通

広島大学医学部内科学第二講座 (主任: 山木戸道郎教授)

受付 平成1年6月19日

受理 平成1年9月27日

- 1) グルコース-6-リン酸 (G6P) のヒト筋グリコーゲン合成酵素 (GS) ホスファターゼにおよぼす影響について、正常耐糖能ピマインディアンに大腿筋生検を行って得た筋肉片を用いて検討した。GSホスファターゼ活性は、生理的濃度の G6P により活性化され、ATP (5 mM) とグリコーゲン (0.1%) により抑制された。
- 2) 正常者において、高インスリン血症グルコースクランプの前後で GS および GS ホスファターゼ活性を測定し、インスリンの両酵素におよぼす影響について検討した (N=4)。GS 活性はグルコースクランプ後いずれの症例においても上昇したが、GS ホスファターゼ活性は G6P の存在・非存在下に関わらず有意の変化を認めなかった。
- 3) 次に cyclic AMP (cAMP) 依存性蛋白キナーゼ活性について、同様にグルコースクランプの前後で GS 活性とともに測定を行った (N=5)。インスリン刺激によって全ての症例で GS 活性は上昇する一方で、0.2 μ M の cAMP 存在下における cAMP 依存性蛋白キナーゼ活性は有意に低下していた。なお cAMP 非依存性活性には、明らかな変化を認めなかった。
- 4) 以上の成績から、インスリン刺激による GS 活性の上昇は、GSホスファターゼ活性の上昇よりも、むしろ cAMP 依存性蛋白キナーゼ活性の低下により調節されている可能性が示唆された。

Key words: グリコーゲン合成酵素, インスリン, キナーゼ, ホスファターゼ

インスリンの *in vivo* における主要な作用の一つは、筋と脂肪組織において細胞内へのグルコースの取り込みを促進することである^{23,22}。特に筋肉においては、その取り込まれたグルコースの主な部分は筋グリコーゲンとして蓄積されると考えられている⁷。グリコーゲン合成酵素 (Glycogen Synthase, 以下 GS) はグリコーゲン合成の律速酵素であり、その活性は主としてリン酸化/脱リン酸化によって調節されている¹⁰。脱リン酸化型は活性型と呼ばれ、動物実験の成績からグルコース-6-リン酸 (G6P) の非存在下でも活性を発揮するが、リン酸化型 (不活性型) は G6P の存在下においてのみ活性を発揮することができると報告されている²³。GS の脱リン酸化を触媒する酵素は GS ホスファターゼであり、一方リン酸化を触媒する酵素は GS キナーゼとして知られている³⁴。GS キナーゼとして、最近までに9種類酵素が報告されている^{20,24}。いくつかの動物実験においてインスリンは

ホスファターゼを活性化し^{4,30}、あるいはキナーゼを不活性化する^{35,39} ことで GS の活性を上昇させることが報告されている。しかしながら最近までヒト GS 活性の調整機序について検討した報告はほとんどみられていなかった。

1984年になり Bogardus ら² は、高率にインスリン非依存性糖尿病を発症することで知られているピマインディアン¹⁷ において、グルコースクランプ法によるインスリン感受性の測定と経皮的な大腿筋生検による筋 GS 活性の測定を同一例について行った。その結果ヒト筋肉においても、動物実験と同様の方法で GS 活性を測定する事が可能であり、インスリン抵抗性を示す症例でインスリン刺激後の本酵素の活性が正常者に比し低下していることを示した。また Young ら⁴² はインスリン抵抗性を示す症例にグルコースクランプを行い、グルコース酸化は正常者と差がないにもかかわらず、筋グリコーゲン合成が正常対照より低

下していると報告した。これらの成績は、GS 活性が生体におけるインスリン抵抗性と密接に関連している可能性を示唆している。

すでにラット脂肪細胞および横隔膜において、GS 活性の調節機構としてインスリンによる糖輸送の増加に伴う G6P の生成と、その結果生ずる GS ホスファターゼの活性化によって上昇するというモデルが提唱されている^{23,32}。しかしながら正常耐糖能者にグルコースクランプを行った報告のなかで、Yki-Jarvinen ら⁴⁰ は血中インスリン濃度を増加させた際には筋組織 GS の活性化が認められたが、グルコース濃度を増加させたときには活性化が認められなかったと報告している。また、Young ら⁴¹ は、インスリン抵抗性を示す症例では GS ホスファターゼを活性化することで知られている G6P の濃度が上昇しているにもかかわらず、インスリン刺激後の GS 活性が正常者に比し低下しているという報告を行っている。従って、これら正常者およびインスリン抵抗性を示す症例における成績は、ヒト筋肉 GS ホスファターゼが G6P による活性化作用を受けにくくなっているという可能性を示唆している。

以上のようにヒト筋 GS 活性の調節機構について近年少しずつ実験が積み重ねられているが、ヒト筋肉の GS ホスファターゼあるいはキナーゼについては現在までのところ基礎的検討を含め、十分に検討されているとは言えない。今回著者はヒト筋肉における GS 活性におよぼすインスリンの影響を検討する目的で、GS ホスファターゼならびにキナーゼ活性の測定を行い、若干の考察を加えたので報告する。

対 象

National Institutes of Health (アメリカ合衆国フェニックス市) にボランティアとして入院した、明らかな疾患を有しない成人ピマインディアン31名を対象とした。このうちホスファターゼの測定は17名、キナーゼの測定は14名について検討を行った。対象の年齢、体重、BMI (body mass index) および体脂肪率(%body fat) は Table 1 に示すごとくである。実験酸化への承諾を得たのち理学的検査を行い、心電図を記録した。早朝空腹時に血液学的および血液生化学的検査用に採血を行った。少なくとも2日間の 200 g 以上の糖質を含む食事を摂取させたのち、75 g 経口ブドウ糖負荷試験²⁹を行った。薬物を服用中の症例はなく、理学的検査および血液検査に異常を認めず、ブドウ糖負荷試験では1例で空腹時血糖値、他の1例で2時間血糖値が正常者の基準より若干高かったことを除いて異常を認めなかった。体脂肪率は、水面下で求めた体重から同時に測定した残気量を補正することにより概算した²。

方 法

1. 経皮的大腿筋生検

空腹時あるいはグルコースクランプ直後に既述の方法²によって、Bergstorm 針を使用し大腿外側直筋にて筋生検を行った。今回の検討では筋採取量を増加させる目的で 50 ml ディスポーザブル注射器による吸引もあわせて行った。局所麻酔には、1%リドカイン溶液を 5-6 ml 使用した。なお本実験に先立って施行したラット筋肉のホスファターゼ活性測定の際、リドカインの影響は認められないことを確認した。得られ

Table 1. Subjects for GS phosphatase and kinase experiments

	Male	Female	TOTAL	Age (years)	Body Weight (kg)	BMI (kg/m ²)	Body Fat (%)
PHOSPHATASE	13	4	17	28±1	106±8	36±2	32±2
KINASE	9	5	14	26±1	98±8	37±3	33±3

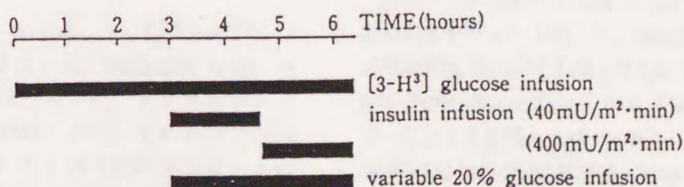


Fig. 1. Schematic diagram of a euglycemic hyperinsulinemic clamp

Table 2. Patient characteristics for euglycemic glucose clamp studies

	Sex	Age	Body Weight (kg)	Body Fat (%)	FPG (mg/dl)	2-hrPG (mg/dl)	F-IRI (μ U/ml)
PHOSPHATASE							
1	M	22	60	22	78	92	11
2	M	20	120	42	79	73	30
3	M	26	113	39	93	78	15
4	F	31	88	31	96	120	51
KINASE							
1	M	20	65	16	91	116	14
2	M	24	77	23	94	92	24
3	M	30	95	30	94	95	26
4	F	31	86	39	98	152	59
5	M	39	117	38	104	118	47

た筋肉片(約80 mg)は直ちに液体窒素中で凍結させ、実験施行時まで -70°C のフリーザー内で保存した。

2. グルコースクランプ法 (Fig. 1)

末梢組織インスリン感受性測定を高インスリン血症グルコースクランプ (Euglycemic hyperinsulinemic glucose clamp) 法⁶⁾を用い、9例の対象につき行った(ホスファターゼ4例とキナーゼ5例, Table 2)。10時間の絶食の後、午前5時に肘窩部静脈にインスリン、グルコースおよび $[3\text{-}^3\text{H}]$ -グルコース注入用のカテーテルを留置した。その後30 μCi の $[3\text{-}^3\text{H}]$ -グルコースを初期量として注入し、以後0.30 $\mu\text{Ci}/\text{min}$ を維持量として実験終了時まで注入した。また他方の前腕を加温した箱の中に固定しカテーテルを留置し、実験中の採血用とした。3時間後インスリン注入を低濃度(40 $\text{mU}/\text{m}^2/\text{min}$)から開始し100分間継続、引き続き高濃度(400 $\text{mU}/\text{m}^2/\text{min}$)のインスリン注入に切り替え更に100分間継続した。最初のインスリン注入より、20%グルコース溶液を血漿グルコース濃度が90 mg/dl を保つように調節しながら注入した。血漿グルコース濃度の測定は5分毎に行い、血漿インスリンおよび $[3\text{-}^3\text{H}]$ -グルコースの測定はインスリン注入開始後60分から100分および160分から200分にかけて20分毎に行った。

3. 酵素活性の測定

a) 試薬および材料

UDP-[U- ^{14}C]-グルコース、 γ - $[^{32}\text{P}]$ -ATPはNEN社製のものを使用した。Sephadex G-25はPharmacia社製のものを用いた。グリコーゲン、G6P、cyclic AMP (cAMP)、ATP、ヒストン (Type II-A, ウシ胸腺由来) およびUDP-グルコースはSigma社より購入したものを使用に供した。その他の試薬は全て市販品特級のものを使用した。

ウサギGSの精製にはLarnerらの方法²¹⁾を使用した。10単位の市販ウサギGSを1.7 mg/ml のグリコーゲンを含んだ緩衝液(50 mM Tris pH 7.8, 5 mM EDTA, 50 mM 2-mercaptoethanol)に対し 4°C で一晩透析を行った。透析後のGS溶液に氷冷下で -70°C の純エタノール液を30%容量になるまで加え、酵素を沈澱させた。次にこの溶液を、 -10°C において10,000 $\times g$ で20分間遠沈し、沈澱を別の緩衝液(10 mM Tris pH 7.8, 1 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoethanol)に溶解、さらに前述の緩衝液にて一晩透析を行った。この溶液を精製ウサギGSとし、使用時まで -70°C に保存した。この精製GSは1 ml あたりの約3単位および1 mg 蛋白あたり約7単位の酵素を含んでいた。なおこの精製GS酵素標品中にGSホスファターゼ活性は認められなかった。

b) GS活性の測定

GS活性の測定にはGuinovartら¹³⁾の高感度アッセイを使用した。すなわちUDP-グルコースの濃度を0.14 mM と低濃度とし、全活性を7.2 mM G6P存在下で、0.17 mM G6P存在下で活性型GSを測定、全活性に占める活性型の割合をGSフラクション活性として表わす方法で測定した。

c) GSホスファターゼ活性の測定

Millerらの方法²¹⁾に準じてGSホスファターゼ活性の測定を行った(Fig. 2)。凍結筋肉片をホモジナイズ用緩衝液(50 mM Tris pH 7.8, 10 mM EDTA, 50 mM 2-mercaptoethanol)中でVirtis 4Sホモジナイザーにより3秒間ホモジナイズし(Step 1)、 4°C にて10,000 $\times g$ で20分間遠沈後(Step 2)、GSホスファターゼを含む筋上清を得た(Step 3)。GSホスファターゼ活性の測定は以下の二通りの方法で行った。ま

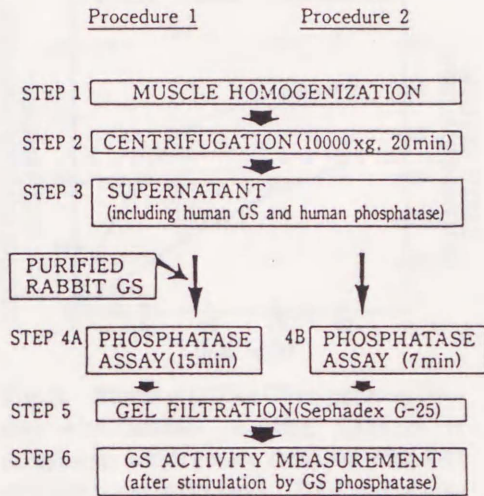


Fig. 2. Procedures for GS phosphatase assay

ず第一の測定系では、ホスファターゼ反応の直線性を増加させる目的で精製ウサギ GS を反応液に加えて検討を行った (Step 4A)。すなわちホスファターゼ活性の測定は、あらかじめ 30°C で 20 分間加温した精製ウサギ GS (30 μ l, 約 25 mU, ヒト筋上清中の GS の約 4 倍量にあたる) を含む 75 μ l の溶液に、Step 3 で得た 100 μ l の筋上清を加え反応を開始した。原則として 15 分間反応させた後、ただちに 25 μ l を反応液から取り出し、フッ化カリウムを含む 2 ml の反応停止液 (50 mM Tris pH 7.8, 20 mM EDTA, 130 mM フッ化カリウム) を加えることによってホスファターゼによる GS 活性化を終了させた。この中から 500 μ l を Sephadex G-25 カラムに加えゲル濾過を行い (Step 5), GS 活性に影響を与える低分子量物質を除去した。筋上清ホスファターゼによって活性化された GS を前述の GS 活性測定系で測定, GS 活性の変化量として間接的に GS ホスファターゼ活性を測定した (Step 6)。第二の測定系では、純粋にヒト骨格筋 GS ホスファターゼの反応をみるため、ウサギ GS を反応液に加えずに実験を行った (Step 4B)。この測定系ではウサギ GS のかわりにホモジナイズ用緩衝液を使用し, Step 5, 6 は第一の測定系と同様に行った。なおこの場合ホスファターゼ活性の測定時間は原則として 7 分間とした。ATP または低濃度の G6P の影響を調べる実験では, GS ホスファターゼを含む筋上清 (Step 3) を Sephadex G-25 でゲル濾過することにより低分子量物質を除去した後, 実験に供した。GS ホスファターゼ活性は, 1 グラム蛋白あたりの unit 数 (1 unit は 1 分間あたり 10^{-6} M の UDPG のグリ

コーゲンへの取り込みをあらわす) で表わした。また蛋白定量は, Bradford の方法によって行った³⁾。

d) 蛋白キナーゼ活性の測定

Walkenbach らの方法³⁹⁾に基づきキナーゼ活性を測定した。凍結した筋肉を, 液体窒素中で冷却した陶製の容器内で粉末状にし, ホモジナイズ用緩衝液 (10 mM Tris pH 7.8, 10 mM EDTA, 10 mM フッ化カリウム) を 1 mg 筋肉当たり 4 μ l 加え, 更に細かく粉碎した。次に水中で冷却したガラス製ホモジナイザーを使用して, 粉末状となった筋肉および緩衝液をホモジナイズした。4°C で 12,800 \times g 15 分の遠沈後, 上清を 15 分以内にキナーゼ活性の測定に供した。反応はヒストンを基質とし, 32 P-リン酸のヒストンへの取り込み量としてキナーゼ活性を測定した。102 μ l の反応液 (50 mM MES (2-[N-morpholino]ethane sulfonic acid), 8 mM MgCl₂, 0.3 mM [γ - 32 P]-ATP (約 25 μ Ci/ μ mole), 1.5 mM EDTA, 15 mM フッ化カリウム, 1 mg/ml ヒストン (type II-A) および各濃度の cAMP) に予め 30°C で 5 分間加温しておいた 18 μ l の筋上清を加え, 反応を開始した。反応停止は 50 μ l の反応液を 1.5 \times 4 cm の Whatman ET 31 濾紙上に吸収させ, 直ちに 1 mM ATP および 1 mM リン酸カリウムを含む 4°C に冷却した 10% TCA 溶液に浸すことにより行った。15 分間の同 TCA 溶液による洗浄の後, さらに 2 回の 5% TCA 溶液による洗浄を室温にて繰り返した後, エタノール:エーテル (1:1) および純エーテル中で洗浄を行った。濾紙に残った放射性活性をシンチレーションカウンターにて測定した。キナーゼ活性は, 毎分あたりヒストンに取り込まれた 32 P の picomole 数で表わした。なお非特異的なリン酸化反応の影響を排除するため, 筋上清を加えない場合のリン酸化を測定し, 各成績から減ずることにより特異的活性を測定した。また cAMP 依存性キナーゼ活性は, 全キナーゼ活性から cAMP 非依存性キナーゼ活性を差し引いて求めた。キナーゼ活性測定の際の CV (coefficient of variation) は $11.0 \pm 2.1\%$ (N=9) であった。

4. 統計学的検定

結果は全て平均値士標準誤差で表わし, 有意差検定は Student の t-test によって行った。

結 果

1. ヒト筋肉における GS ホスファターゼ活性について

まず GS ホスファターゼ活性の測定を, 精製ウサギ GS を加えた条件下で測定した。ホスファターゼ

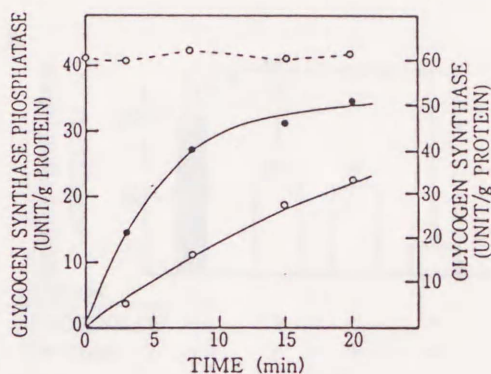


Fig. 3. Effects of G6P on GS phosphatase reaction with respect to time. Changes in phosphatase activity were measured with 0.17 mM G6P (—) in GS assay. Total synthase activity during phosphatase assay was measured with 7.2 mM G6P (.....). Aliquots of the supernatants from muscle homogenates were incubated for different times at 30°C with rabbit glycogen synthase in the presence (●, —) and absence (○, -) of 5 mM G6P. At indicated times, 25 μ l of the incubation mixture was diluted into KF buffer to stop the reaction and an aliquot was used without further treatment for determination of GS activity. Results are expressed as the mean of duplicate values from a single experiment.

Table 3. Stimulation of GS phosphatase activity by G6P. Aliquots of the supernatant from muscle homogenates were incubated at 30°C for 15 min with rabbit glycogen synthase and increasing concentration of G6P. Results are expressed as the % change above control from ten experiments performed in duplicate on nine subjects. Control activity (at 0 mM G6P) is 8.69 \pm 1.33 U/g protein.

Glucose-6-Phosphate (mmol/l)	Change in Phosphatase Activity (%)
1.0	29 \pm 8*
3.0	60 \pm 9**

* p<0.01, compared to control activity.

** p<0.05, compared to the activity at 1.0 mM G6P.

活性の経時的变化を、5 mM G6P の存在下・非存在下にて検討した (Fig. 3)。G6P 非存在下における GS ホスファターゼ活性は15分まではほぼ直線性を示し、

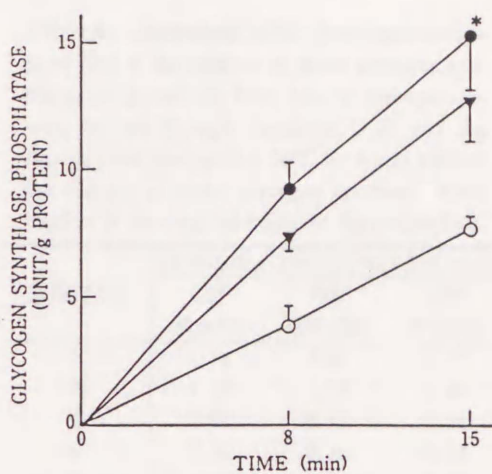


Fig. 4. Stimulation of GS phosphatase activity by G6P (●), 2-deoxyglucose-6-phosphate (▼) or control (○). Aliquots of the supernatants from muscle homogenates were incubated at 30°C for 8 and 15 min with rabbit glycogen synthase and in the presence and absence of hexose monophosphate. Results are expressed as the mean \pm SE from three experiments performed in duplicate on three subjects.

* p<0.05, compared to the activity with 2-deoxyglucose-6-phosphate.

G6P 存在下では、明らかに活性の上昇が認められた。G6P によるホスファターゼ活性増加の特異性を調べる目的で、ホスファターゼの抑制物質として知られているフッ化カリウム (130 mM) を反応液に加えて15分間反応させた。その結果 G6P 存在下および非存在下の活性はそれぞれ 9.9 \pm 0.7 および 15.4 \pm 0.5 U/g protein であったのに比べ、フッ化カリウムの存在下ではそれぞれ 0.9 \pm 0.6, 0.9 \pm 0.5 U/g protein へと明らかに抑制された。

次に G6P の GS ホスファターゼ活性におよぼす効果について、精製ウサギ GS を含む測定系で検討した (Table 3)。1 mM および 3 mM の G6P 存在下で、それぞれ対照に比し29 \pm 8%および60 \pm 9%と有意の活性上昇をみた (N=10, p<0.01)。また 3 mM におけるホスファターゼ活性は、1 mM の時の活性と比べて有意に上昇していた (p<0.05)。

2-デオキシグルコース-6-リン酸は、G6P と同様に GS ホスファターゼ活性を上昇されることが動物実験で報告されている。そこで3症例について、それぞれ 1 mM の G6P および 2-デオキシグルコース-6-リン酸の存在下でのホスファターゼ活性を測定した (Fig.

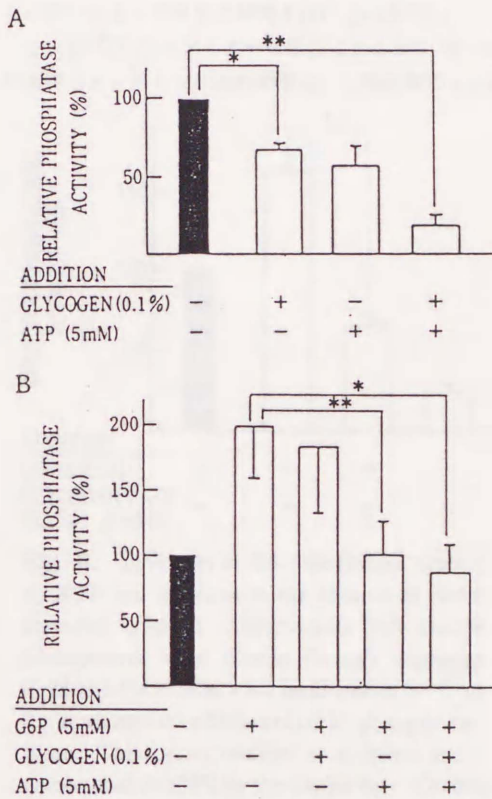


Fig. 5. Inhibition of GS phosphatase activity by ATP and glycogen using rabbit glycogen synthase. Supernatants from muscle homogenates were filtered through Sephadex G-25, and the eluates were incubated at 30°C for 15 min with rabbit glycogen synthase. The controls received no additions and are represented as 100% by the single shaded bar. Control activity is 10.47 ± 2.10 U/g protein. Final concentrations were 0.1% glycogen and/or 5 mM ATP. Enzyme activity is expressed as the percent of control activity from three experiments on three subjects in the absence of G6P (A), and five experiments on three subjects in the presence of 5 mM G6P (B). Each experiment was performed in duplicate.

* $p < 0.05$. ** $p < 0.01$.

4). その結果, G6P のほうがよりホスファターゼ活性を上昇させるという従来の報告^{23, 24)}と同様の成績であった ($p < 0.05$).

次に動物実験において GS ホスファターゼ活性を抑制することが知られている ATP とグリコーゲンの

Table 4. Stimulation of GS phosphatase activity by G6P in the absence of rabbit glycogen synthase. Supernatants from muscle homogenates were filtered through Sephadex G-25 and the eluates were incubated at 30°C for 8 min without the addition of rabbit glycogen synthase. Each number is the mean of duplicate determinations.

SUBJECT	GS PHOSPHATASE ACTIVITY (U/g protein)		
	G6P (0 mM)	G6P (0.2 mM)	G6P (0.5 mM)
1	1.78	2.84	3.13
2	1.10	1.10	1.49
3	0.86	0.89	1.26
4	2.26	3.44	4.21
5	1.08	3.00	2.55
Mean \pm SE	1.42 ± 0.26	2.25 ± 0.52	2.53 ± 0.54 *

* $p < 0.05$, compared to the activity at 0 mM G6P.

影響について, G6P の存在下および非存在下で検討を行った。ATPは 5 mM, グリコーゲンは0.1%で使用し, 対照のホスファターゼ活性を100%として表現した。G6P の非存在下 (Fig. 5A) ではグリコーゲンは単独でホスファターゼ活性を有意に抑制し ($p < 0.05$), 一方 ATP 単独の効果は有意ではなかった。ここで G6P を反応液中に添加した場合には対照のホスファターゼ活性に比し99%の活性の増加がみられ (Fig. 5B), 5 mM ATP はこの G6P のホスファターゼ活性化作用を有意に抑制した ($p < 0.01$)。しかしグリコーゲンと ATP を同時に加えても, ATP 単独による抑制以上の効果はみられなかった。

Tan ら²⁵⁾はウサギ筋肉より精製した GS を反応液に加えてホスファターゼ活性を測定すると, 酵素の精製方法により GS の性質やホスファターゼとの反応に影響をおよぼす可能性のあることを報告している。そこで以下の二つの実験ではウサギ GS を反応液に加えないで, 内因性 GS とホスファターゼのみの測定系を用いて検討を試みた (Fig. 2, Procedure 2)。Table 4 は 5 症例について, 生理的濃度の G6P がホスファターゼ活性におよぼす効果を調べたものである。0.2 mM の G6P はホスファターゼ活性を対照に比し58%上昇させ, 0.5 mM において78%と有意の増加を示した ($p < 0.05$)。次にウサギ GS を測定系に加えない状態でホスファターゼ活性におよぼす ATP とグリコーゲンの影響について検討した (Fig. 6)。0.5 mM の G6P で刺激されたホスファターゼ活性は, 同時に加えられた 5 mM ATP および0.1%グリ

コーゲンによって有意に抑制された ($p < 0.05$)。

ヒト筋 GS ホスファターゼ活性におよぼす *in vivo* におけるインスリン注入の効果をも、一晚絶食にした4

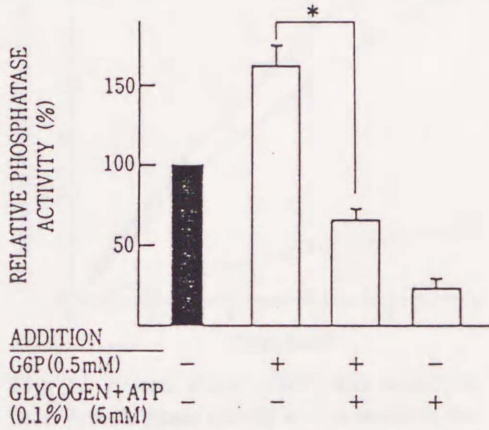


Fig. 6. Inhibition of GS phosphatase activity by ATP and glycogen in the absence of rabbit glycogen synthase. Supernatants from muscle homogenates were filtered through Sephadex G-25 and the eluates were incubated at 30°C for 8 min without the addition of rabbit glycogen synthase. The control received no additions and is represented as 100% by the shaded bar. Control activity is 2.38 ± 0.23 U/g protein. Final concentrations were 0.1% glycogen, 5 mM ATP and/or 0.5 mM G6P. Enzyme activity is expressed as the percent of control activity from three experiments performed in duplicate on three subjects.

* $p < 0.05$.

Table 5. Effects of insulin infusion on muscle GS and GS phosphatase activities.

Glycogen synthase and phosphatase activities were measured on muscle biopsies obtained before and after a euglycemic hyperinsulinemic clamp. GS phosphatase activity was measured in the presence of rabbit glycogen synthase with and without 1 mM G6P. Each number is the mean of duplicate determinations.

Subject	Before Insulin Infusion			After Insulin Infusion		
	Phosphatase (U/g prot)		Synthase (fractional activity)	Phosphatase (U/g prot)		Synthase (fractional activity)
	G6P (0 mM)	G6P (1 mM)		G6P (0 mM)	G6P (1 mM)	
1	4.51	6.51	0.56	4.77	5.38	0.81
2	7.69	11.63	0.46	6.78	9.17	0.70
3	5.91	8.31	0.42	5.30	7.07	0.64
4	5.28	7.63	0.41	7.43	10.02	0.76
Mean \pm SE	5.85 ± 0.68	8.52* ± 1.10	0.46 ± 0.03	6.07 ± 0.62	7.91** ± 1.05	0.73*** ± 0.04

* $p < 0.01$, compared to the activity at 0 mM G6P.

** $p < 0.05$, compared to the activity at 0 mM G6P.

*** $p < 0.01$, compared to the activity before insulin infusion.

症例につき G6P の存在・非存在下において、精製ウサギ GS を加えた測定系で検討した (Table 5)。4 症例の内訳は男性 3 例、女性 1 例 (Table 2) で、定常状態における平均血漿インスリン濃度およびグルコース注入速度は、低濃度インスリン注入時でそれぞれ 119 ± 20 μ U/ml, 4.5 ± 0.8 mg/kg·fat free mass/min, 高濃度インスリン注入時でそれぞれ 2041 ± 202 μ U/ml, 13.4 ± 0.3 mg/kg·fat free mass/min であった。Table 5 に示すごとく、200 分間のインスリン注入によって GS フラクション活性 (活性型 GS/全 GS 活性) は全ての対象について増加した ($p < 0.01$)。しかしながら、これら対象より採取した筋肉のホスファターゼ活性は、G6P の有無にかかわらずインスリン注入後も有意の変化を認めなかった。

2. ヒト筋肉における蛋白キナーゼ活性について

はじめに *in vitro* における蛋白キナーゼ反応の経時の変化について、3 症例の筋肉片を用いて検討を行った。Fig. 7 のごとくこの反応は 3μ M の cAMP の有無によらず、インキュベーション後 5 分間までほぼ直線性を示した。 3μ M の cAMP を用いたこの実験成績から、全活性 (cAMP 依存性 + 非依存性) のほぼ 80% が cAMP 依存性であると考えられた。以後の実験では主として 3 分間のインキュベーション条件を用いた。次に反応の基質であるヒストンの濃度による蛋白キナーゼ活性の変化をみた (Fig. 8)。0.25 および 2.0 mg/dl までのヒストン濃度では濃度の上昇に伴い cAMP 依存性キナーゼ反応が増加していくことが示され、以後の検討ではヒストンは全て 1 mg/dl の濃度で使用する事とした。次の Fig. 9 は、蛋白キナー

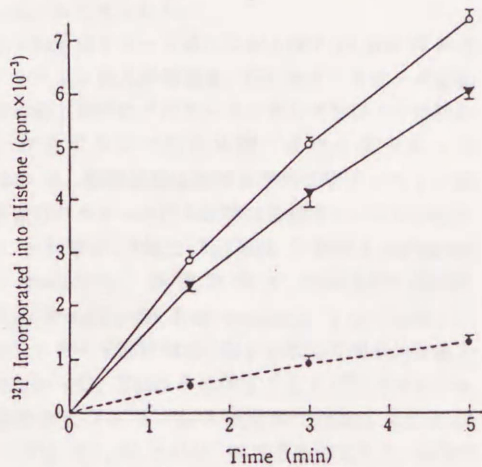


Fig. 7. Protein kinase activity with respect to time. Protein kinase activity was measured in the presence (total activity, ○) and absence (cAMP independent activity, ●) of $3 \mu\text{M}$ cAMP using histone (1 mg/dl) as a substrate. Thirty-six μl of muscle supernatant was added into reaction mixture and incubated for 1.5, 3 and 5 min at 30°C . Cyclic AMP-dependent activity (▼) was calculated by subtracting cAMP-independent activity from total activity. Results are expressed as the mean \pm SE from three experiments on three subjects.

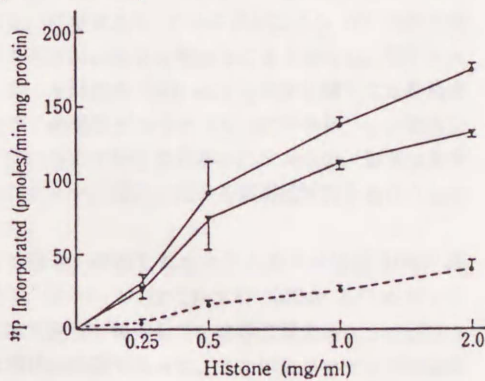


Fig. 8. Histone concentration dependence of protein kinase activity. Protein kinase activity was measured in the presence and absence of $3 \mu\text{M}$ cAMP using the indicated concentrations of histone. The incubation time was 3.5 min. The symbols are the same as Fig. 7. Results are expressed as the mean \pm SE from four experiments on four subjects. Each point is the mean \pm SE of three determinations.

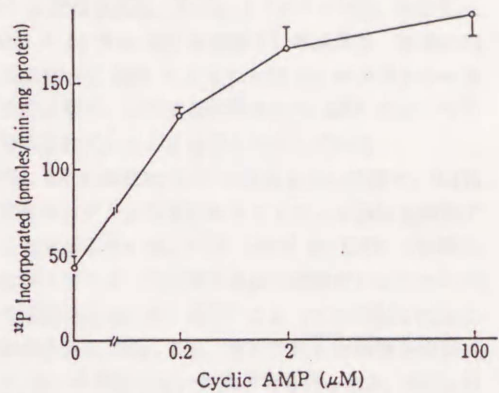


Fig. 9. Stimulation of protein kinase activity by cAMP. Results are expressed as the mean \pm SE from a total of four experiments on four subjects.

Table 6. Effects of insulin infusion on muscle GS and cAMP-dependent protein kinase activities.

Glycogen synthase and protein kinase activities were measured on muscle biopsies obtained before and after a euglycemic and hyperinsulinemic clamp. Results of protein kinase assays are expressed as percent change from the activity before insulin infusion.

Subject	Glycogen Synthase		Cyclic AMP-dependent Protein Kinase		
	(fractional activity)		(% change)		
	Before	After	cyclic AMP (μM)		
			0.2	2	100
1	0.28	0.54	-18	-1	+15
2	0.45	0.58	-21	-16	-3
3	0.26	0.48	-15	+6	-4
4	0.32	0.49	-7	+4	-8
5	0.45	0.72	-18	-10	-31
Mean \pm SE	0.35	0.56*	-16*	-3	-6
	± 0.04	± 0.04	± 2	± 4	± 7

* $p < 0.01$, compared to the activity before insulin.

ゼ活性におよぼす cAMP の効果を, 4 例の正常耐糖能者の筋肉片を用いて検討した成績であるが, $0.2 \mu\text{M}$ の cAMP 存在下で測定された cAMP 依存性蛋白キナーゼ活性は, $100 \mu\text{M}$ の cAMP 存在下で測定された活性の 61% を占めていた。この成績から, 今回筆者が用いた測定系における cAMP 依存性蛋白キナーゼの cAMP に対する ED_{50} は, $0.2 \mu\text{M}$ 以下に

あるものと考えられた。

ヒト筋蛋白キナーゼ活性におよぼす *in vivo* におけるインスリン注入の影響を、GS ホスファターゼ活性測定の時と同様にグルコースクランプを行って検討した。対象は5例で男性4例、女性1例であった (Table 2)。定常状態における平均血漿インスリン濃度およびグルコース注入速度は低濃度インスリン注入時でそれぞれ $141 \pm 17 \mu\text{U/ml}$, $3.8 \pm 0.8 \text{ mg/kg} \cdot \text{fat free mass/min}$, 高濃度時で $2234 \pm 167 \mu\text{U/ml}$, $14.3 \pm 0.8 \text{ mg/kg} \cdot \text{fat free mass/min}$ となっており、ホスファターゼ活性測定の際と比較して明らかな差を認めなかった。Table 6 に示すごとく GS フラクシオン活性はインスリン注入後全例で増加していたが ($p < 0.01$), $0.2 \mu\text{M}$ cAMP 存在下で測定した cAMP 依存性キナーゼ活性は有意に減少していた ($p < 0.01$)。一方、2および $100 \mu\text{M}$ の cAMP 存在下では、インスリン注入後の蛋白キナーゼ活性に明らかな変化はみられなかった。また cAMP 非依存性蛋白キナーゼ活性には、グルコースクランプ前後で明らかな変化を認めなかった ($23.5 \rightarrow 23.9 \text{ picomoles/min} \cdot \text{mg protein}$)。

考 察

1. ヒト筋 GS ホスファターゼ活性に関する基礎的検討

近年インスリン抵抗性を示す症例においてインスリン刺激後の筋 GS が正常対照と比較して低下していることが報告され²⁾、インスリンによる GS の活性調節メカニズムが注目を集めることとなった。GS ホスファターゼ活性の G6P による調節に関しては動物実験で多くの報告がなされているが^{15, 23, 32)}、ヒト筋肉においては未だ十分な検討がされておらず、著者はまずホスファターゼ活性に関する基礎的検討から行うこととした。

今回著者が測定したホスファターゼ活性 (G6P 非存在下, Table 4) はこれまで Gilboe ら¹²⁾ がラット大腿筋で測定し報告している単位蛋白あたりの活性とほぼ同様の成績であった。またホスファターゼの阻害物質として知られているフッ化カリウムを加えた実験でホスファターゼ活性がほぼ完全に抑制されたことは、著者が使用した酵素の抽出、測定方法が適当なものであったことを示している。

次にヒト筋肉の G6P 濃度は、安静時の 0.94 mmol/kg から、isometric contraction 後の 13.72 mmol/kg 乾燥重量まで変化するとされている¹⁶⁾。筋肉には 1 kg の乾燥重量当たり 3 liters の細胞内水分が存在すると仮定すれば¹⁾、これらの数値は $0.28\text{--}4.2$

mM と変換される。Table 3 (ウサギ GS 存在下) と Table 4 (ウサギ GS 非存在下) の成績は、著者の測定系において G6P によるヒト筋 GS ホスファターゼ活性の上昇が、この生理的濃度内の G6P によって引き起こされていることを明らかにしている。

Fig. 5A の成績は G6P の存在しない状態で、 0.1% のグリコーゲンが有意にホスファターゼ活性を抑制することを示している。一方 5 mM の G6P で刺激されたホスファターゼ活性はもはや低濃度のグリコーゲンで抑制されないが、ATP によっては抑制されることが示された (Fig. 5B)。またこれらの実験を精製ウサギ GS の存在しない条件下でも行ったが、G6P の有無にかかわらず、ATP とグリコーゲンを同時に加えることにより筋 GS ホスファターゼ活性は有意に抑制された (Fig. 6)。このように G6P とともに、ATP、グリコーゲンあるいは両者によって、ヒト筋 GS ホスファターゼ活性が調節を受けることが明らかとなった。高インスリン血性グルコースクランプ中に、グルコース濃度を増加させても GS 活性の上昇がみられなかったという Yki-Jarvinen らの成績⁴⁰⁾ は、彼女らの実験条件では、ホスファターゼ活性を上昇させるに必要な十分量の筋肉内 G6P 濃度の上昇が起こっていなかった可能性もあるが、ATP や増加したグリコーゲンによってホスファターゼ活性が抑制されたためとも考えられる。

Gilboe らは精製ウサギ GS を加えない測定系で、GS ホスファターゼ活性の生理的濃度の ATP (5 mM) による抑制が G6P の有無によらずみられることを、ラット大腿筋を用いて報告している¹²⁾。また 0.15% までのグリコーゲンはホスファターゼ活性を上昇させるが、それ以上の濃度では逆に抑制的に作用することがラット骨格筋を用いた実験で報告されている¹⁵⁾。今回の検討において G6P の存在しない条件下では、ホスファターゼ活性の ATP による抑制がみられなかったがその機序については明らかでない。

これらの基礎的検討において、一部のホスファターゼ活性測定実験は、ウサギ GS を反応液中加入して行った (Fig. 3-5, Table 3)。ここで Table 4 (ウサギ GS 非存在性下) と Table 5 (ウサギ GS 存在下) の成績を比較してみると、ホスファターゼ活性測定値の変動係数は前者で 47% 、後者で 24% となっており、精製ウサギ GS をホスファターゼ活性測定に加えることにより、実験の変動係数が小さくなることが明らかであった。また精製ウサギ GS を用いるホスファターゼ活性測定系では、同じ濃度、同じ活性の GS を用いることにより、異なった対象のホスファターゼ活性

を同一の条件で測定することができるという利点も挙げられる。

Tan ら³⁸⁾はホスファターゼ測定系に加えられる精製ウサギ GS の精製方法により、ホスファターゼ活性の測定が影響を受ける可能性のあることを報告している。そこでウサギ GS 非存在下においても、G6P, ATP およびグリコーゲンの影響について実験を行った。その結果 0.5 mM の G6P でホスファターゼ活性は76%上昇し (Table 4), 5 mM ATP と 0.1% グリコーゲンの影響については、前述のごとくウサギ GS 存在下での成績と比較して明らかな差を認めなかった。

2. ヒト筋蛋白キナーゼ活性に関する基礎的検討

蛋白質のリン酸化は、いくつかの酵素の活性調節を含む細胞内情報伝達の重要な調節機構として、近年注目を集めている⁵⁾。特に GS は以前よりリン酸化/脱リン酸化によって活性の調節を受ける酵素として知られ¹⁰⁾、そのリン酸化を調節する cAMP 依存性蛋白キナーゼの重要性が強調されてきた。多くの哺乳類の組織において cAMP 依存性蛋白キナーゼが存在することが示されている¹⁹⁾が、ヒト筋肉 cAMP 依存性蛋白キナーゼはこれまで詳細に検討されていなかった。今回著者は、この酵素に関するいくつかの基本的な検討に加え、グルコース・クランプを使用してインスリンの本酵素におよぼす影響についても若干の検討を行った。

Fig. 7-9 において、今回の報告に際して採用した本酵素の抽出および測定方法が、ヒトの筋肉の cAMP 依存性蛋白キナーゼ活性の測定に有用かどうかを検討した。3 μ M の cAMP 存在下では、全活性のおよそ80%が cAMP 依存性であると考えられた (Fig. 7)。この成績は、動物実験から得られたこれまでの成績³⁹⁾と近似している。次にラット筋肉における cAMP 濃度は、120から 580 pmoles/g 湿重量に分布していると報告されている³⁷⁾。これらの値は、前述のごとく 1 kg 乾燥重量当たり 3 liters の細胞内水分を仮定すると、0.17から 0.83 μ M と変換される。Fig. 9 に示されるごとく、この範囲の cAMP は *in vitro* において有意のキナーゼ活性の上昇をもたらしている。今回の検討では、酵素活性の測定前に筋肉からの抽出液を33倍に希釈しているため、あえて内因性の cAMP をゲル濾過によって除去する操作は行っていない。

最近、cAMP 依存性蛋白キナーゼは直接 GS をリン酸化するだけでなく、インヒビター-1 (Protein Phosphatase Inhibitor-1) をリン酸化することにより、GS の活性に影響を与えることが知られるようになって

た¹⁴⁾。すなわち活性化されたこのインヒビターが GS ホスファターゼ活性を抑制し、その結果として GS のリン酸化を促進し活性を抑えると考えられている。今回は、インヒビター-1については検討を行っていないが、今後検討されるべきテーマであろう。またこのキナーゼはウサギ筋肉 GS において site 1 と 2 をリン酸化するが、高濃度では site 3 と 4 をもリン酸化すると報告されている³⁶⁾。これらの報告も cAMP 依存性蛋白キナーゼがヒト筋肉のグリコーゲン代謝の調節に重要な役割を果たしている可能性を示唆する成績と理解される。なお Site 3 のリン酸化が GS の活性調節に重要な役割を持っており、この部位が Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) によってリン酸化されることが報告されている。GSK-3 はまたインスリンによって活性調節を受けることが示唆されており¹⁴⁾、今後は cAMP 依存性蛋白キナーゼのみならず、筋肉における GSK-3 のインスリン投与前後での活性の変化を検討する必要がある。

なお今回著者が採用したヒストンを基質として蛋白キナーゼによる ³²P の取り組みを測定するという方法は、既に動物実験では有用性が報告されているものである。しかし同時に GS とキナーゼ活性を測定していないことから、著者の測定したキナーゼ活性がそのまま GS を磷酸化しているものかどうか明らかでないという問題点が残ると考えられる。

3. インスリンによる GS の活性調節機序について

著者は今回ヒト筋ホスファターゼ活性および cAMP 依存性蛋白キナーゼ活性について、グルコースクランプによって200分間のインスリン注入を行い、両酵素活性の変化を検討した。まずホスファターゼ活性については、インスリン注入後4症例全てにおいて GS は活性化されたが、ホスファターゼ活性には有意の変化がみられなかった (Table 5)。これに対してグルコースクランプによるインスリン注入後、cAMP 依存性蛋白キナーゼ活性は有意に抑制されていた (Table 6)。したがってヒト筋肉においては、インスリンによる GS 活性上昇はホスファターゼ活性の刺激より、むしろキナーゼ活性の抑制によってもたらされているという機序が考えられた。

動物実験において、インスリンの GS ホスファターゼ活性におよぼす影響について様々な報告がなされている。Chang ら⁴¹⁾は、ラット骨格筋でインスリン注射後8分から10分でホスファターゼ活性の上昇がみられた報告した。同様に Nuttall らのグループは48時間の飢餓¹¹⁾あるいは20時間の絶食後³⁰⁾に、ラット心筋

のホスファターゼ活性の上昇を観察している。これにたいして Miller は、ラットの心筋の還流実験においてインスリンによる GS 活性の上昇があったにもかかわらず、ホスファターゼ活性は影響を受けなかったと述べている²⁶⁾。著者は今回200分間のグルコースクランプによってインスリン刺激を行った後に筋肉片を採取し、ホスファターゼ活性を測定したが、むしろより早期にインスリンのホスファターゼに対する効果が出現していた可能性は否定できない。この点が今後研究されるべき重要な研究課題と考えられる。

一方 cAMP 依存性蛋白キナーゼ活性に対する影響について、Walkenbach ら³⁹⁾は空腹時のラット横隔膜において30分間のインスリンと摘出横隔膜のインキュベーションを行い、³H で標識した cAMP の結合と cAMP 依存性活性の両者の抑制を報告した。彼らは酵素活性の低下の原因として、インスリンのセカンドメッセンジャーにより蛋白キナーゼと cAMP の結合が起こりにくくなり、その結果 cAMP 依存性キナーゼ活性の低下が起こるといふ仮説を考えた²²⁾。著者の成績では、低濃度の cAMP 存在下で cAMP 依存性キナーゼ活性はインスリン刺激後有意に低下し、高濃度の cAMP 存在下ではインスリンの効果は認められなかった。Larner らの仮説に従えば、高濃度の cAMP 存在下ではセカンドメッセンジャーの効果は打ち消されるため、今回の著者の検討のごとくキナーゼ活性に変化を認めないという可能性が考えられよう。

以上のごとく、インスリンの両酵素におよぼす影響について様々な報告がなされているが、同時に両方の酵素活性を測定した報告は少ない。今後の課題として、グルコースクランプの際に、同時期に行った筋生検で得られた筋肉片を用いて、ホスファターゼとキナーゼ活性を同時に測定してみる必要があると考える。Nuttall はインスリンによる GS の活性化には、ホスファターゼとキナーゼの活性の比を変化させるメカニズムが存在するであろうと述べている³⁰⁾が、両酵素を同時に測定することによってはじめて実証することが可能となろう。

以上ヒト筋 GS 活性の調節機序について、著者が今回検討を行った成績を報告した。最近になり Young ら⁴¹⁾は、インスリン抵抗性を示す症例の大股筋肉中の G6P 濃度が上昇しているにもかかわらず、インスリン刺激後の GS 活性が上昇していなかったという成績を得た。このことは、これらの症例にホスファターゼあるいは GS の酵素自体の異常、G6P とホスファターゼの反応の異常などの可能性が存在することを示している。この成績に引き続き Freymond

ら⁹⁾は、インスリン抵抗性を示すピマインディアンにおいて筋 GS および GS ホスファターゼ活性を測定した成績を発表した。彼らはインスリン刺激前の GS ホスファターゼ活性と、インスリン刺激後の GS 活性との間に有意の相関がみられたことから、GS ホスファターゼの活性低下がこれらの対象にみられるインスリン刺激後のグルコース取り込みの減少と、GS 活性の低下に何らかの関係を持つのではないかと推察している。彼らはホスファターゼ活性測定の際に精製ウサギ GS を使用しているのだから、彼らの成績が筋 GS 酵素自体の異常に基づく現象であるかどうかは不明であるが、少なくともホスファターゼに何らかの異常が存在することを示唆する成績であるといえよう。このように、インスリン抵抗性と GS 活性の調節との関係や、筋肉の他の酵素活性^{18, 25)}についても少しづつ検討が進められており、今後のこの分野の進歩が期待される。

謝 辞

稿を終るにあたり、ご指導、ご校閲を賜った広島大学内科学第二講座・山木戸道郎教授に心から感謝の意をささげる。また終始変わらぬご指導、ご鞭撻を頂いた教室・原 均助教授に、深甚なる感謝の意を表す。実験の基礎を丁寧にご教示下さった阿品土谷病院・山本真一博士に、この場を借りて深謝する。最後に米国留学中に貴重な指導と助言を頂いた C. Bogardus, D. M. Mott の両博士にも、心よりの謝意をささげる。

本研究の一部は、日本糖尿病学会中国四国地方会第26回総会（1988年11月、広島市）、第32回日本糖尿病学会総会（1989年4月、金沢市）および第26回日本臨床代謝学会総会シンポジウム「代謝病における酵素・DNA 異常」（1989年6月、大阪市）において発表した。

参 考 文 献

1. Bergstrom, J., Guarnieri, G. and Hultmann, E. 1971. Carbohydrate metabolism and electrolyte changes in human muscle tissue during heavy work. *J. Appl. Physiol.* 30:122-125.
2. Bogardus, C., Lillioja, S., Stone, K. and Mott, D. M. 1984. Correlation between muscle glycogen synthase activity and in vivo insulin action in man. *J. clin Invest.* 73: 1185-1190.
3. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of

- microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
4. Chang, L. Y. and Huang, L. C. 1980. Effects of insulin treatment in the activities of phosphoprotein phosphatase and its inhibitors. *Acta Endocrinol.* 95:427-432.
 5. Cohen, P. 1982. The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity. *Nature* 296:613-620.
 6. DeFronzo, R. A., Tobin, J. D. and Andres, R. 1979. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am. J. Physiol.* 237:E214-E223.
 7. DeFronzo, R. A., Jacot, E., Jequier, E., Maeder, E., Wahren, J. and Felber, J. P. 1981. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose: results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes* 30:1000-1007.
 8. Foulkes, J. G., Jefferson, L. S. and Cohen, P. 1980. The hormonal control of glycogen metabolism: dephosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 in vivo in response to insulin. *FEBS Lett.* 112:21-24.
 9. Freymond, D., Bogardus, C., Okubo, M., Stone, K. and Mott, D. 1988. Impaired insulin-stimulated muscle glycogen synthase activation in vivo in man is related to low fasting glycogen synthase phosphatase activity. *J. Clin. Invest.* 82:1503-1509.
 10. Friedman, D. L. and Larner, J. 1963. Studies on UDPG- α -glucan transglucosylase. III. Interconversion of two forms of muscle UDPG- α -glucan transglucosylase by a phosphorylation-dephosphorylation mechanism. *Biochemistry* 2:669-675.
 11. Gannon, M. C. and Nuttall, F. Q. 1984. Effect of prolonged starvation on glycogen synthase and glycogen synthase phosphatase activity in rat heart. *J. Nutr.* 114: 2147-2154.
 12. Gilboe, D. P. and Nuttall, F. Q. 1972. The role of ATP and glucose-6-phosphate in the regulation of glycogen synthase D phosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48:898-906.
 13. Guinovart, J. J., Salavert, A., Massague, J., Ciudad, C. J., Salsas, E. and Itarte, E. 1979. Glycogen synthase. A new activity ratio assay expressing a high sensitivity to the phosphorylation state. *FEBS Lett.* 106: 284-288.
 14. Ingebristen, T. S. and Cohen, P. 1983. Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* 221:331-338.
 15. Kato, K. and Bishop, J. S. 1972. Glycogen synthase-D phosphatase. I. Some new properties of the partially purified enzyme from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 247:7420-7429.
 16. Katz, A., Sahlin, K. and Henriksson, J. 1986. Muscle ammonia metabolism during isometric contraction in humans. *Am. J. Physiol.* 250:C834-C840.
 17. Knowler, W. C., Pettitt, D. J., Savage, P. J. and Bennett, P. H. 1981. Diabetes incidence in Pima Indians: contributions of obesity and parental diabetes. *Am. J. Epidemiol.* 113:144-156.
 18. Kruszynska, Y. T., Petronyi, G., Taylor, R. and Alberti, K. G. M. M. 1981. Muscle enzyme activity and insulin sensitivity in Type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia* 29:699-705.
 19. Kuo, J. F. and Greengard, P. 1969. Cyclic nucleotide dependent protein kinases, IV. Wide-spread occurrence of adenosine 3'-5'-monophosphate-dependent protein kinase in various tissues and phyla of animal kingdom. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 64:1349-1355.
 20. Kuret, J., Woodgett, J. R. and Cohen, P. 1985. Multisite phosphorylation of glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Identification of the sites phosphorylated by casein kinase-I. *Eur. J. Biochem.* 151:39-48.
 21. Larner, J., Villar-Palasi, C. and Brown, N. E. 1969. Uridine diphosphate glucose: α -1-glucan α -4 glucosyl-transferase in rat heart. Two forms of enzyme, interconversion reactions and properties. *Biochem. Biophys. Acta* 178:470-479.
 22. Larner, J. 1988. Insulin signaling mechanisms: lessons from old testament of glycogen metabolism and the new testament of molecular biology. *Diabetes* 37:262-272.
 23. Lawrence, J. C. and Larner, J. 1978. Activation of glycogen synthase in rat adipocytes by insulin and glucose involves increased glucose transport and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 253:2104-2113.
 24. Lee, F-T., Ahmad, Z., DePaoli-Roach, A. A. and Roach, P. J. 1987. Multisite phosphorylation of mouse muscle glycogen synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* 258:615-620.
 25. Mandarino, L. J., Wright, K. S., Verity, L. S., Nichols, J., Bell, J. M., Kolterman, O. G. and Beck-Nielsen, H. 1987. Effect of insulin infusion on human skeletal

- muscle pyruvate dehydrogenase, phosphofructokinase, and glycogen synthase. *J. Clin. Invest.* 80:655-663.
26. Miller, T. B. 1978. A dual role for insulin in the regulation of cardiac glycogen synthase. *J. Biol. Chem.* 253:5389-5394.
27. Miller, T. B. 1979. Glucose activation of liver glycogen synthase. Insulin-mediated restoration of glucose effect in diabetic rats is blocked by protein synthesis inhibitor. *Biochem. Biophys. Acta* 583:36-46.
28. Miller, T. B., Garnache, A. K., Cruz, J., McPherson, R. K. and Wolleben, C. 1986. Regulation of glycogen metabolism in primary cultures of hepatocytes. Restoration of acute effect of insulin and glucose in cells from diabetic rats. *J. Biol. Chem.* 261:785-790.
29. National Diabetes Data Group. 1979. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose tolerance. *Diabetes* 28:1039-1057.
30. Nuttall, F. Q., Gannon, M. C., Corbett, V. A. and Wheeler, M. P. 1976. Insulin stimulation of heart glycogen synthase D phosphatase. *J. Biol. Chem.* 251:6724-6729.
31. Okubo, M., Bogardus, C., Lillioja, S. and Mott, D. M. 1988. Glucose-6-phosphate stimulation of human muscle glycogen synthase phosphatase. *Metabolism* 37:1171-1176.
32. Oron, Y. and Larner, J. 1980. Insulin action in intact mouse diaphragm. I. Activation of glycogen synthase through stimulation of sugar transport and phosphorylation. *Mol. Cell. Biochem.* 32:153-160.
33. Roach, P. J. and Larner, J. 1976. Rabbit skeletal muscle glycogen synthase. II. Enzyme phosphorylation state and effector concentration as interacting control parameters. *J. Biol. Chem.* 251:1920-1925.
34. Roach, P. J. and Larner, J. 1977. Covalent phosphorylation in the regulation of glycogen synthase activity. *Mol. Cell. Biochem.* 15:179-200.
35. Shen, L. C., Villar-Palasi, C. and Larner, J. 1970. Hormonal alteration of protein kinase sensitivity to 3', 5'-cyclic AMP. *Physiol. Chem. & Physics* 2:536-544.
36. Sheorain, V. S., Corbin, J. D. and Soderling, T. R. 1985. Phosphorylation of sites 3 and 4 in rabbit skeletal muscle glycogen synthase by cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 260:1567-1572.
37. Steiner, A. L., Pagliara, A. S., Chase, L. R. and Kipnis, D. M. 1972. Radioimmunoassay of cyclic nucleotides II. Adenosine 3', 5'-monophosphate in mammalian tissues and body fluids. *J. Biol. Chem.* 247:1114-1120.
38. Tan, A. W. H., Tan, A. H. S. and Nuttall, F. Q. 1980. Characterization of the glycogen synthase D found in liver of the adrenalectomized fasted rats. *Biochem. Biophys. Acta* 614:328-338.
39. Walkenbach, R. J., Hazen, R. and Larner, J. 1978. Reversible inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by insulin. *Mol. Cell. Biochem.* 19:31-41.
40. Yki-Jarvinen, H., Mott, D. M., Young, A. A., Stone, K. and Bogardus, C. 1987. Regulation of glycogen synthase and phosphorylase activity by glucose and insulin. *J. Clin. Invest.* 80:85-100.
41. Young, A. A. and Mott, D. M. 1986. 私信.
42. Young, A. A., Bogardus, C., Wolfe-Lopez, D. and Mott, D. M. 1988. Muscle glycogen synthesis and disposition of infused glucose in human subjects with reduced rate of insulin mediated carbohydrate storage. *Diabetes* 37:303-308.

A Study on the Control Mechanism of Human Muscle Glycogen Synthase Activity

Masamichi OKUBO

The Second Department of Internal Medicine,
Hiroshima University School of Medicine
(Director: Prof. Michio YAMAKIDO)

- 1) The influence of glucose-6-phosphate (G6P) on skeletal muscle glycogen synthase (GS) phosphatase was examined in normal glucose tolerant Southwest American Indians. GS phosphatase activity increased with physiological concentrations of G6P and inhibited by ATP (5 mM) and glycogen (0.1%).
- 2) GS phosphatase and GS activity was measured before and after insulin infusion using the euglycemic clamp technique. Although glycogen synthase fractional activity increased in all subjects, this increase was not associated with a change in GS phosphatase activity in the absence or presence of G6P.
- 3) Cyclic AMP-dependent protein kinase activity was measured before and after insulin infusion along with GS activity. Insulin infusion resulted in a decreased cAMP-dependent protein kinase activity assayed at physiological cAMP concentration with an increased GS activity in all subjects (N=5, $p < 0.01$). No significant change was observed in cAMP-independent activity.
- 4) These results suggest that insulin administration during a euglycemic clamp may regulate human muscle GS activity by decreasing the activity of cAMP-dependent protein kinase activity rather than stimulating GS phosphatase activity.