

## 高強度運動は骨格筋脂肪分解関連タンパク質を増加させるか？

東田 一彦

早稲田大学 スポーツ科学学術院

### 1 緒言

平成 24 年度の国民健康・栄養調査で、2 型糖尿病が強く疑われる者と糖尿病の可能性を否定できない者の総数は約 2050 万人と推計されている。2 型糖尿病患者およびその前段階であるインスリン抵抗性を発症した人では、骨格筋が血糖を細胞内に取り込む機能が他の臓器に比べ顕著に低下している。したがって、骨格筋の血糖取り込み機能を向上させることは、効果的な 2 型糖尿病の予防につながると考えられる。

骨格筋に脂肪（脂肪滴）が蓄積することは、インスリン抵抗性を引き起こす原因の一つと考えられている。これまでインスリン抵抗性を改善する運動様式として、ウォーキングやジョギングなどの低強度・長時間運動が広く用いられてきた。これは低強度・長時間運動中に脂肪がエネルギー源として利用されることから、脂肪を効果的に燃焼することができる、という知見に基づいていると考えられる。しかしながら、クエン酸合成酵素やヒドロキシアシル CoA 脱水素酵素などの脂肪を燃焼するために必要なミトコンドリアのタンパク質は、非常に強度の高い運動トレーニングでも低強度運動トレーニングと同程度に増加することが報告されている (Terada et al. 2004)。この研究結果は、十分な運動の刺激が引き起こされれば、運動強度や時間に関わらず、ミトコンドリア内の脂肪分解に関わる酵素活性を増加させることができることを示している。

近年、骨格筋の脂肪滴の形成・分解に関与するタンパク質として、Adipose Triglyceride lipase (ATGL) や Myocardial lipid droplet protein (MLDP) などが同定され、その機能が明らかとなってきた。ATGL や MLDP などは、骨格筋細胞質内で脂肪滴の分解に関わるタンパク質であり、低強度運動トレーニングによりタンパク含量が増加することが報告されている (Alsted et al. 2009)。しかしながら、高強度運動トレーニングが骨格筋の脂肪滴分解に関わるこれらのタンパク質に及ぼす影響は明らかにされていない。

そこで、高強度運動トレーニングが脂肪滴分解関連タンパク質発現量に及ぼす影響を明らかにすることを目的として研究を行った。

### 2 方法

#### 2-1. 被験動物および飼育条件

実験には 4 週齢の Sprague-Dawley ラット（体重 80~95g）を用いた。ラットは室温 25°C、湿度 30%、午後 7 - 午前 7 時に暗期を設定した飼育室において飼育した。飼料は固形 CE-2

(日本クレア株式会社)を、また飲水として水道水を用い、ともに自由摂取とした。入荷後、1週間ほどケージに慣れさせるための予備飼育期間を設け、その後の2日間、1日10分間の軽い水泳運動を全てのラットに行わせ、予備水泳運動を行った。本実験は全て、早稲田大学の動物実験審査委員会の承認の下、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議、文部科学省)を遵守し行われた。

## 2-2. 運動プロトコール

1週間の予備飼育の後、ラットを1) 安静群 (SED)、2) 低強度運動トレーニング (LIT) 群、3) 高強度運動トレーニング (HIT) 群に、無作為に分けた。LIT 群は、水温 34~36°C に調節した水を 70ℓ のポリバケツに水深 40 cm になるまで注ぎ、7匹同時に、3時間無負荷で泳がせた。トレーニング期間は8日間とし、1日1回午後1時から午後4時まで行った。HIT 群においては、水温 34~36°C に調節した水を直径 36cm のポリバケツに水深 25 cm になるまで注ぎ、1匹ずつ泳がせた。運動時間は、20秒の運動と10秒の休憩を1セットとして、14セット行わせた。合計運動時間は280秒であった。この高強度運動プロトコールは、骨格筋のミトコンドリア酸化系酵素活性を向上させることが報告されている(Terada et al. 2004)。計8日間のトレーニング期間の最初の3日間は体重の14%の錘を装着し、次の3日間は体重の15%の錘を装着して泳がせた。最後の2日間は体重の16%の錘をつけて水泳運動を行わせた。トレーニングは1日1回午後1時から午後4時の間に行った。

## 2-3. 分析方法

### タンパク質定量

ホモジナイズバッファは、Upstate 社の RIPA Lysis Buffer (50 mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.25% deoxycholic acid, 1% NP-40, 1mM EDTA, pH 7.4) にの Protease Inhibitor (Cell Signaling Technology) を添加したものを使用した。滑車上筋を、湿重量の19倍量のホモジナイズバッファに入れ、水中にてホモジナイズした後、タンパク質の可溶化を目的として1時間4°Cにて振盪した。ホモジネイトのタンパク質濃度は、タンパク質定量試薬 (PIERCE) を用いて測定した。タンパク質濃度を元に、RIPA Lysis Buffer と Laemmli Sampling Buffer をサンプルに加えてタンパク質濃度を 3 µg/µL に調整した溶液を用意した。タンパク質の分離は、厚さ 2mm の 10% resolving および 4% stacking ミニゲルを用いた SDS-PAGE により行い、サンプルがゲルの下端に達するまで 100V で通電した。電気泳動終了後、速やかにゲルを取り出し、ウェット式ブロッキング装置を用いて 200 mA の定電流で 1.5 時間の通電を行い、ゲル内のタンパク質をメンブレン (PVDF 膜) に転写した。転写終了後、メンブレンをブロッキング溶液 (10% スキムミルク/Tween-TBS, pH 7.4) に1時間浸した。ブロッキング溶液を捨てたのち Tween-TBS に換えて軽く洗浄し、1% スキムミルク/Tween-TBS (pH 7.4) 溶液で 1000 倍に希釈した 1 次抗体 ATGL (Cell Signaling Technology)、HSL (Abcam)、MGL (Cayman Chemical) および MLDP (Progen) と 4°C に

て一晩反応させた。再び Tween-TBS に換えて軽く洗浄し、1% スキムミルク/Tween-TBS (pH 7.4) 溶液で 5000 倍に希釈した 2 次抗体と室温で 1 時間反応させた。Tween-TBS で洗浄したメンブレンをサランラップの上に置き、マニュアルに従って調整した化学発光検出試薬 Luminata Forte (Millipore) をメンブレン上にまき、1 分間反応させた。余分な検出試薬を取り除いた後、メンブレンをラップで覆い、LAS-3000 (富士フイルム) でシグナルを検出した。その後 ImageJ を用いて定量し、その値を安静群の滑車筋に対する相対値(%)で表した。

#### 骨格筋酵素活性

氷水中に浸したカラス製ホモジナイザーに骨格筋サンプルと 9 倍量のホモジナイズバッファー (175 mM KCL、10 mM Tris、2 mM EDTA、pH7.4) を入れ、ホモジナイズした後、凍結 - 融解を 2 度繰り返した。このホモジネートをサンプルとして、クエン酸合成酵素活性を Sreere の方法 (Sreere PA. 1969) に従い測定した。

#### 2-4. 統計解析

3 群間の平均値の差の検定には、一元配置の分散分析を用いた。データは全て平均値±標準誤差で示し、統計的有意水準は 5%未満とした。

### 3 結果

#### 3.1 骨格筋ミトコンドリア酵素活性

滑車筋のクエン酸合成酵素活性は、SED 群と比較して、LIT トレーニング群と HIT 群において有意に高値を示した。LIT 群と HIT 群の間に有意な差は認められなかった (Figure 1)。

#### 3.2 脂肪滴関連タンパク質量

滑車筋における脂肪滴分解関連タンパク質のうち、ATGL、HSL および MLDP は、SED 群と比較して両トレーニング群において有意に高値を示した。しかしながら、MGL タンパク質量は、運動トレーニングにより変化しなかった (Figure 2)。

### 4 考察

本研究の主な知見は、高強度運動トレーニングを行うことで骨格筋の脂肪滴分解に関わるタンパク質量が、低強度運動トレーニングを行った場合と同程度増加することが明らかとなったことである。

高強度運動トレーニングを行うことで、骨格筋のミトコンドリア酵素活性が低強度運動トレーニングと同程度に増加することが先行研究により報告されている (Terada et al. 2004)。本研究でも、両トレーニングにより骨格筋のクエン酸合成酵素活性の上昇が認められた (Fig.

1)。さらに、骨格筋内の脂肪滴（中性脂肪）の分解に関わる ATGL、Hormone Sensitive Lipase (HSL) および MLDP のタンパク量が、両トレーニング群において SED 群と比較して有意に増加した (Fig. 2)。これらの結果は、骨格筋のミトコンドリア酵素のみならず、脂肪滴分解に関わるタンパク質も、十分な運動刺激によって運動強度や時間に関わらず増加する可能性を示唆している。

近年、ミトコンドリアタンパク質の遺伝子発現調節に関する研究が進み、peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1  $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ )が重要な役割を果たしていることが明らかとなってきている(Fink and Kelly, 2006)。また、一過性の低強度および高強度運動により骨格筋の PGC-1 $\alpha$ が増加することが報告されており、運動によるミトコンドリア新生のメカニズムにも PGC-1 $\alpha$ が関与していると考えられている (Terada et al.2005、Wende et al. 2007)。脂肪滴分解酵素と関連して、近年、PGC-1 $\alpha$  過剰発現マウスの骨格筋において、ATGL、HSL や MLDP 発現量が野生型マウスと比較して亢進していることが報告された (Koves et al. 2013)。したがって、本研究で観察された、両トレーニング群の骨格筋における脂肪滴分解タンパク質の増加にも、PGC-1 $\alpha$ が関与しているかもしれない。

一方、モノアシルグリセロールの分解に関わる Mono-glyceride Lipase (MGL)タンパク質量は、3 群間で有意な差は認められなかった。先行研究で運動トレーニングが骨格筋の MGL タンパク量に及ぼす影響を検討したものは無いが、両運動トレーニング群で MGL の変化が認められなかったことから、MGL は ATGL や HSL と異なり、運動トレーニングに応答して変化しない可能性が考えられる。その理由として、MGL の発現量が十分に存在している、もしくは、モノアシルグリセロールを脂肪酸とグリセロールまで分解しない方が、運動で利用された脂肪滴を再合成するために効率が良いといった可能性が考えられる。MGL の生理学的な意義については今後更なる検討が必要である。

## 5 結論

高強度運動トレーニングは、低強度運動トレーニングと同程度に骨格筋の脂肪滴分解タンパク質量を増加させる可能性が明らかとなった。

## 6 謝辞

本研究を支援してくださった財団法人ミズノスポーツ財団に深く感謝いたします。

## 7 参考文献

Alsted TJ, Nybo L, Schweiger M, Fledelius C, Jacobsen P, Zimmermann R, Zechner R, Kiens B. Adipose triglyceride lipase in human skeletal muscle is upregulated by exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 296(3):E445-53, 2009.

**Finck BN and Kelly DP.** PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest.* 116 : 615-622, 2006.

**Koves TR, Sparks LM, Kovalik JP, Mosedale M, Arumugam R, DeBalsi KL, Everingham K, Thorne L, Phielix E, Meex RC, Kien CL, Hesselink MK, Schrauwen P, Muoio DM.** PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  contributes to exercise-induced regulation of intramuscular lipid droplet programming in mice and humans. *J Lipid Res.* 54(2):522-34, 2013.

**Srere PA.** Citrate synthase. *Methods Enzymol* 13: 3-5, 1969

**Terada S, Tabata I, Higuchi M.** Effect of high-intensity intermittent swimming training on fatty acid oxidation enzyme activity in rat skeletal muscle. *Jpn J Physiol.* 54(1):47-52, 2004.

**Terada S, Kawanaka K, Goto M, Shimokawa T, Tabata I.** Effects of high-intensity intermittent swimming on PGC-1 $\alpha$  protein expression in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 184(1):59-65, 2005.

**Wende AR, Schaeffer PJ, Parker GJ, Zechner C, Han DH, Chen MM, Hancock CR, Lehman JJ, Huss JM, McClain DA, Holloszy JO, Kelly DP.** A role for the transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  in muscle refueling. *J Biol Chem.* 282(50):36642-51, 2007.

平成 24 年 「国民健康・栄養調査結果」

<http://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-10904750-Kenkoukyoku-Gantaisakukenkouzoushinka/000032813.pdf>

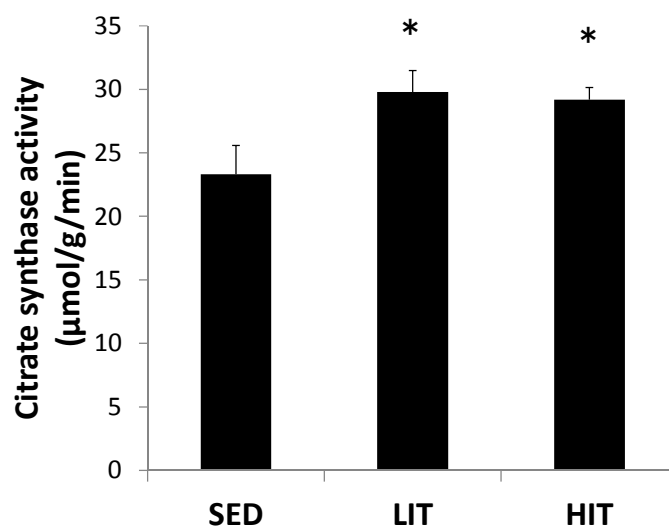


Figure 1. Effects of different intensity levels of swimming training on citrate synthase activity in epitrochlearis muscle. Values are means $\pm$ SEM. \*indicates a significant difference at a level of  $p < 0.05$ . SED, sedentary; LIT, low-intensity training; HIT, high-intensity training.

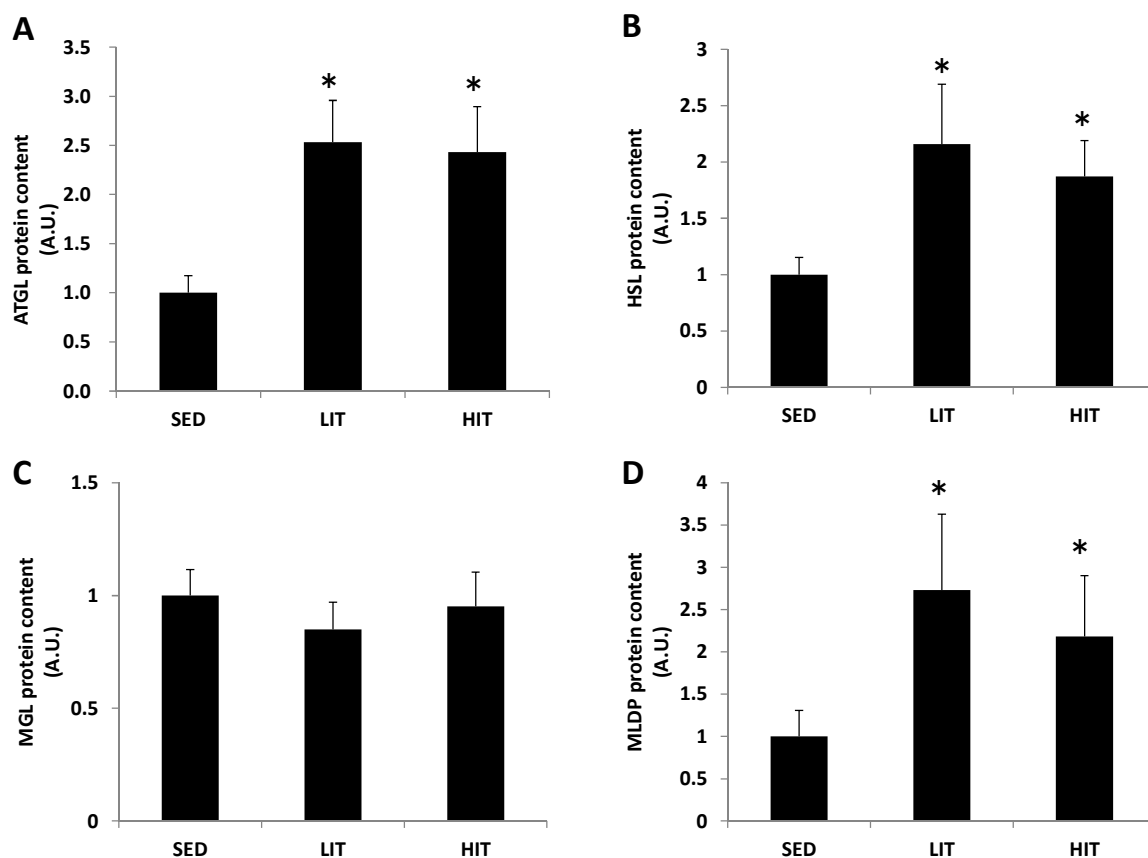


Figure 2. Effects of different intensity levels of swimming training on ATGL (A), HSL (B), MGL (C) and MLDP (D) in epitrochlearis muscle. Values are means $\pm$ SEM. \*indicates a significant difference at a level of  $p < 0.05$ . SED, sedentary; LIT, low-intensity training; HIT, high-intensity training.