

原著

高強度・間欠的および持久的な走行トレーニングに対するマウス骨格筋の糖・脂質代謝機能の適応に及ぼす中程度脂肪食摂取の影響

小池 温子、柄澤 拓也、筒井 桃子、近藤 早希、深澤 歩、寺田 新

東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系

【目的】

超高脂肪食を長期間摂取することは、骨格筋における脂質代謝を高める一方で、糖代謝を抑制することが知られている。本研究では、中程度の脂肪食を摂取することが走行トレーニングに対するマウス骨格筋の糖・脂質代謝機能の適応に及ぼす影響について検討することを目的とした。

【方法】

8週齢の雄性ICRマウスに対し、走行トレーニングを行わせながら通常食（PFC比 = 19 : 17 : 64、Con-Tr群）、中程度脂肪食（PFC比 = 27 : 54 : 19、Mod-Tr群）、超高脂肪食（PFC比 = 11 : 88 : 1、High-Tr群）のいずれかを摂取させた。また、比較対照群として安静状態で通常食を摂取する群（Con-Sed群）を設けた。8週間の介入終了後に前脛骨筋を摘出し、代謝系酵素の発現量を測定した。

【結果】

脂肪酸酸化に関わる重要な酵素である β HADタンパク質発現量は、High-Tr群で他の3群と比較し有意に高値を示した。また、Mod-Tr群においてもCon-Sed群と比較し有意に高値を示した。一方、糖代謝を抑制する作用を持つPDK4のタンパク質発現量は、High-Tr群で他の3群と比較し有意に高い値を示したものの、Mod-Tr群では有意な増加は認められなかった。

【結論】

走行トレーニングを伴いながら中程度の脂肪食を摂取することは、骨格筋における糖代謝を抑制することなく、脂質代謝機能を向上させる可能性が示唆された。

キーワード：高脂肪食 β -hydroxyacyl CoA dehydrogenase Pyruvate dehydrogenase kinase 4
骨格筋 マウス

I 緒言

運動時の脂質酸化能力を高めるための食事として、超高脂肪・低糖質食（ケトン食）が近年注目を集めている^{1)~3)}。このような食事を長期間摂取することにより、骨格筋のミトコンドリアにおける脂質酸化系酵素の発現量および活性が増加し、運動時の脂質酸化能力が顕著に高まることが知られている^{4), 5)}。骨格筋の脂質酸化能力の向上は、体内貯蔵量が少ない糖質の利用量の減少につながることから、このような栄養学的手法は、長時間運動時のパフォーマンスを向上させるうえで有効な手法であると考えられている⁶⁾。一方、超

高脂肪食を摂取した場合には、脂質酸化能力が向上するものの、糖代謝機能が大きく抑制されることが知られている^{7), 8)}。このことは、特に糖質が主要なエネルギー源となる高強度運動を伴う競技においては、超高脂肪食がパフォーマンスをむしろ悪化させてしまうという可能性を示唆している。

一方、最近では、糖質の制限量および脂質の摂取量を緩和した中程度の脂肪食も新たな手法として考案されている。実際、そのような中程度の脂肪食を摂取することで、コンディションが良好に保たれ、サッカーの試合でも90分間を通して走ることができているというトップアスリートによる経験談も広く知られるよう

になっている⁹⁾。サッカーでは、歩行やジョギングのような比較的強度の運動と、ダッシュのような高強度の運動が間欠的に行われる。先行研究において、サッカーの試合中に高強度走行が占める距離および時間の割合は、全体の10%未満であり、大部分を低強度の走行・歩行運動が占めていることが報告されている^{10),11)}。低強度運動時には脂質が主なエネルギー源として利用されることから、サッカー選手は試合時に、主に脂質を利用しながら、必要に応じて糖質を利用していることになる。したがって、サッカー選手にとっては、糖代謝能力を低下させることなく、脂質の利用能力を高めることが重要になると考えられる。糖質の制限および脂質の摂取量を緩和した中程度の脂肪食を継続的に摂取した場合には、超高脂肪食ほどではないものの、脂質代謝能力をある程度高めることができ、その一方で、糖代謝に対しても強い抑制効果を生じさせることがない（糖質の利用能力を維持できる）と考えられるため、サッカーのような代謝特性を持つ競技のパフォーマンスを向上させるうえでは効果的な栄養学的手法であるという可能性が考えられる。しかしながら、中程度の脂肪食と超高脂肪食を比較検討した研究報告はまだなく、また、実際に中程度の脂肪食の摂取に対して骨格筋の代謝機能がどのような適応を示すのかは必ずしも明らかとなっていない。そこで本研究では、サッカー選手が普段実施しているような高強度・間欠的走行トレーニングと持久的走行トレーニングを行いながら中程度の脂肪食を摂取することが、骨格筋の糖質および脂質代謝機能の適応に及ぼす影響について、普通食および超高脂肪食を摂取した場合の効果と比較検討することを目的とした。

II 方法

1. 実験動物および飼育環境

実験動物として6週齢の雄性ICRマウス（体重30～38 g）36匹を日本クレア株式会社より購入した。マウスは室温23±2℃、7～19時を暗期に設定した飼育室において、専用ケージで1匹ずつ飼育した。新たな環境に慣れさせるために、11日間の馴化飼育期間を設定した。馴化飼育期間には、飼料として市販の粉末飼料（CE-2、日本クレア株式会社）と、飲料として水道水を自由摂取させた。なお、本研究は、東京大学大学院総合文化研究科・教養学部動物実験委員会の承認を得て行われた（承認番号：29-10）。

2. 実験プロトコル

1) 群分け

馴化飼育終了後、マウスを体重および馴化飼育期間中の飼料効率（摂餌量100 g当たりの体重増加量）が同等となるように、以下の4群に分けた：1）実験動

物用精製飼料AIN93Gの組成を基準に作成した通常食を摂取する群（Con-Sed群：n = 9）、2）通常食を摂取しながら、トレーニングを実施する群（Con-Tr群：n = 9）、3）中程度の脂肪食を摂取しながらトレーニングを実施する群（Mod-Tr群：n = 9）、4）超高脂肪食を摂取しながらトレーニングを実施する群（High-Tr群：n = 9）。各飼料の栄養素組成を表1に示した。超高脂肪食は、ケトン食の効果を検証した先行研究における栄養素組成を参考に作成し¹²⁾、脂質エネルギー比を88%とした。中程度の脂肪食は、先述したサッカーのトップアスリートが実践している食事組成を参考に作成し⁹⁾、脂質エネルギー比を54%にまで減らす一方で、糖質エネルギー比率を1%から19%まで高めることで糖質制限を緩和した。飼育期間は8週間とし、飼料と水道水を自由摂取させた。飼育期間中は、2～3日置きに体重と摂餌量の測定を行った。

2) トレーニングプロトコル

Con-Tr群、Mod-Tr群、およびHigh-Tr群の3群には、8週間の飼育期間中に1日90分間、週5日の頻度でトレーニングを行わせた。トレーニングは、トレッドミル（MK-680、室町機械株式会社）を用いた走行トレーニングとし、週5日のうち、2日は高強度・間欠的走行運動を、3日は持久的走行運動を行わせた。高強度・間欠的走行運動は、2分30秒間の低強度（10 m/分）走行と30秒間の高強度（36～46 m/分）走行を1セットとし、それを30セット（合計90分間）繰り返し行わせた（図1A）。この高強度・間欠的走行運動は、プロサッカー選手の実際の試合中における走速度別の走行時間およびその割合¹⁰⁾に可能な限り近づけられるようにし、総走行時間のうち、低強度走行と高強度走行の割合をそれぞれ83%、17%（トレッドミルの速度調節時間を含むと実質11%程度）に設定した。また、この走行速度（運動強度）に関しては、予備実験において、すべてのマウスが遊ばずに走行できる最低速度およびベルトの回転についていける最高速度を検討し、それぞれ低強度走行、高強度走行と設定した。一方、持久的走行運動は、20～24 m/分の一定速度で90分間走行させた（図1B）。サッカー選手では、普段の練習において、持久的走行トレーニングを行うこともあるため、本研究では、高強度・間欠的走行トレーニングだけではなく、持久的走行トレーニングも行わせることとした。高強度走行と持久的走行における速度は、マウスの走行能力を確認しながら段階的に増加させた（表2）。なお、トレッドミル装置および走行運動に慣れさせるために、トレーニング開始前の4日間、全てのマウスに対して馴化走行運動を行わせた。

3. サンプルの採取および保存

8週間の飼育期間終了後（最終トレーニング後20～

表 1 食餌中の栄養素組成

材料	通常食	中程度脂肪食	超高脂肪食
	(g/kg)		
コーンスターチ	529.49	180.00	-
カゼイン	200.00	370.00	174.00
スクロース	100.00	50.00	-
キャノーラ油	70.00	280.00	539.00
ミネラルミックス (AIN-93G)	35.00	35.00	35.00
ビタミンミックス (AIN-93-VX)	10.00	10.00	10.00
セルロース	50.00	69.49	236.49
シスチン	3.00	3.00	3.00
コリン酒石酸	2.50	2.50	2.50
t-ブチルヒドロキノン	0.01	0.01	0.01
エネルギー (kcal/g)	3.62	4.70	5.53
P : F : C (% E)	19 : 17 : 64	27 : 54 : 19	11 : 88 : 1

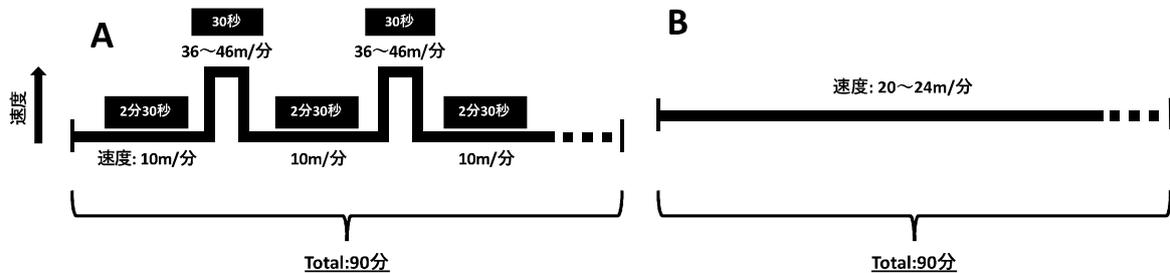


図 1 介入期間中における走行トレーニングプロトコル

A : 高強度・間欠的走行トレーニング、B : 持久的走行トレーニング

表 2 介入期間中における走行トレーニングの速度

		1 週目	2 週目	3 週目	4 週目	5 週目	6 週目	7 週目	8 週目
高強度・間欠的走行	低強度 (m/分)	10	10	10	10	10	10	10	10
	高強度 (m/分)	36	38	40	42	44	46	46	46
持久的走行 (m/分)		20	20	22	22	24	24	24	24

23時間以内) に解剖を行った。なお、解剖直前までは食餌を制限することなく、自由摂取とした。解剖は、イソフルランによる完全麻酔下で行った。尾部圧迫による反射が見られないことを確認した後に開腹し、心臓から採血を行った。採血した血液を室温で静置した後、8,000 rpmで10分間遠心分離することで血清を得た。続けて、両脚から前脛骨筋を速やかに摘出し、直ちに液体窒素で凍結した。左脚の前脛骨筋はグリコーゲン濃度の分析に、右脚の前脛骨筋は脂質および糖質代謝系酵素発現量の分析にそれぞれ供した。腹腔内脂肪(副睾丸脂肪、後腹膜脂肪、腸間膜脂肪)を摘出し、

電子天秤で重量を測定した。全てのサンプルは分析まで-80℃の超低温フリーザーにて保存した。

4. 分析方法

1) 血清遊離脂肪酸濃度

血清遊離脂肪酸濃度は、NEFA C-テストワコー(富士フィルム和光純薬株式会社)を用いて測定した。

2) 骨格筋中の脂質および糖質代謝系酵素発現量

脂質および糖質代謝系酵素の発現量をウエスタンブロットティング法により測定した。まず、骨格筋サンプル

ル（右前脛骨筋）を氷上にて冷却したガラス製のホモジナイザーに入れ、十分に冷却したRadio-immunoprecipitation Assay (RIPA) lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.25% Deoxycholic acid, 1% NP-40, 1 mM Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)、Merck Millipore社) とともにホモジナイズした。RIPA lysis bufferには、Protease inhibitor (SIGMA-Aldrich社) を10 μ L/mlの割合で添加した。骨格筋ホモジネートは、凍結・溶解を2回繰り返すことで細胞内小器官を破碎し、さらにマイクロチューブローテーターで回転させながら4 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートすることでタンパク質を可溶化した。その後、700 \times gで5分間遠心し、上清を得た。回収した上清サンプルは、BCA protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific K.K.) を用いてタンパク質濃度 (μ g/ μ L) を測定した。タンパク質濃度が2.0 μ g/ μ LになるようにRIPA lysis bufferとSample buffer (277.8 mM Tris-HCl, 0.02% (w/v) Bromophenol blue (BPB), 4.4% (w/v) Lithium dodecyl sulfate (LDS), 44.4% (w/v) Glycerol, 31 mg/mL Dithiothreitol, Bio-Rad社) を混合し、95 $^{\circ}$ Cで5分間加熱したものを電気泳動用のサンプルとした。サンプルは、Laemmli¹³⁾の方法に基づき、電気泳動装置（ミニプロティアン Tetraセル、Bio-Rad社）を用いて、Sodium dodecyl sulfate-Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) 法 (10% Resolving gel および4% Stacking gel) により分離した。1レーンあたり20 μ gのタンパク質サンプルをアプライし、サンプルがゲルの下端に達するまで100 Vで通電した。電気泳動終了後、速やかにゲルを取り出し、ウエット式ブロッティング装置 (Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad社) を用いて、200 mA/Tankで90分間通電し、Polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (Merck Millipore社) にタンパク質を転写した。転写したメンブレンは5% (w/v) スキムミルク/Tris buffer saline, 0.1% Tween20 (TBS-T) を用いてブロッキング処理を室温で1時間行った。その後、5% bovine serum albumin (BSA) /TBS-T溶液で抗体 (β -hydroxyacyl CoA dehydrogenase ; β HAD, Pyruvate dehydrogenase kinase 4 ; PDK 4) をそれぞれ500倍、1,000倍で希釈した溶液を用い、4 $^{\circ}$ Cで一晩、シェーカーで揺らしながら一次抗体反応を行った。翌日、メンブレンをTBS-Tで洗浄し、二次抗体反応 (horseradish peroxidase (HRP) -conjugated anti rabbit IgG, Jackson Immuno Research社, 5,000倍希釈) を室温で1時間行った。TBS-TおよびTBSで十分に洗浄した後、化学発光検出試薬 (ECL, GE Healthcare Life Sciences社) で1分間反応させた。反応終了後、抗原検出装置 (C-DiGit, LI-COR社) を用いて、抗原の検出を行った。検出されたバンドは定量解析ソフトウェア (Image

Studio Lite Ver.33.1, LI-COR社) を用いて定量し、その値をCon-Sed群の平均値に対する相対値で示した。

3) 筋グリコーゲン濃度

筋グリコーゲン濃度は、Lowry & Passonneauの方法¹⁴⁾に基づいて分析した。

5. 統計処理

統計処理はエクセル統計 (株式会社 社会情報サービス) を用いて解析した。データはすべて平均値 \pm 標準誤差で表した。有意差検定には、一元配置分散分析および多重比較としてTukey-Kramer法を用い、危険率5%未満をもって有意とした。

III 結果

1. 介入終了時体重、体重増加量、総エネルギー摂取量、エネルギー摂取量あたりの体重増加量、腹腔内脂肪量

介入終了時体重、体重増加量、総エネルギー摂取量、エネルギー摂取量あたりの体重増加量、腹腔内脂肪量の結果を表3に示した。なお、Con-Tr群において、走行トレーニング中に負傷し、トレーニングを完遂できなかったマウスが2匹いたため、Con-Tr群の結果に関しては、これらのデータを除外した値 ($n = 7$) を示した。8週間の介入終了時の体重は、Mod-Tr群において、Con-Sed群と比較して有意に低い値を示した ($p < 0.05$, 表3)。一方、統計的に有意ではないものの、Con-Tr群およびHigh-Tr群でもCon-Sed群と比較して低値を示す傾向にあった (vs. Con-Tr群 $p = 0.054$, vs. High-Tr群 $p = 0.056$, 表3)。

介入期間中の体重増加量は、Con-Sed群が他の3群と比較して有意に高い値を示し (vs. Con-Tr群, vs. Mod-Tr群, vs. High-Tr群 $p < 0.01$, 表3)、その他の群間では有意な差は認められなかった。

介入期間中の総エネルギー摂取量は、High-Tr群が他の3群と比較して有意に高い値を示した ($p < 0.01$, 表3)。一方、その他の群間では有意な差は認められなかった。

エネルギー摂取量あたりの体重増加量は、Con-Sed群が他の3群と比較して有意に高い値を示し (vs. Con-Tr群, vs. Mod-Tr群, vs. High-Tr群 $p < 0.01$, 表3)、その他の群間では有意な差は認められなかった。

腹腔内脂肪量は、High-Tr群がCon-Sed群と比較して有意に低い値を示した ($p < 0.01$, 表3)。一方、その他の群間では有意な差は認められなかった。

表3 8週間の介入開始時および終了時の体重、体重増加量、総エネルギー摂取量、エネルギー摂取量あたりの体重増加量、腹腔内脂肪量

	Con-Sed	Con-Tr	Mod-Tr	High-Tr
介入開始時体重 (g)	32.2 ± 0.4	32.1 ± 0.5	32.2 ± 0.5	32.7 ± 0.8
介入終了時体重 (g)	40.5 ± 1.3	36.4 ± 1.3	35.9 ± 0.5*	36.7 ± 0.9
体重増加量 (g)	8.3 ± 1.0	4.3 ± 0.8**	3.7 ± 0.4**	4.0 ± 0.6**
総エネルギー摂取量 (kcal)	1,025 ± 35 †	1,047 ± 37 †	1,015 ± 18 †	1,285 ± 32
エネルギー摂取量あたりの体重増加量 (Δ g/100 kcal)	0.79 ± 0.07	0.41 ± 0.07**	0.37 ± 0.03**	0.31 ± 0.04**
腹腔内脂肪量 (g)	1.47 ± 0.20	1.29 ± 0.25	1.02 ± 0.14	0.66 ± 0.08**

Con-Sed: 通常食・安静群、Con-Tr: 通常食・トレーニング群、Mod-Tr: 中程度脂肪食・トレーニング群、High-Tr: 超高脂肪食・トレーニング群

エネルギー摂取量あたりの体重増加量 = (介入終了時体重 - 介入開始時体重) ÷ 総エネルギー摂取量 × 100

数値は全て平均 ± 標準誤差で表した。n = 7 ~ 9

* p < 0.05、** p < 0.01 vs. Con-Sed、† p < 0.01 vs. High-Tr

2. 血清遊離脂肪酸濃度

解剖時における血清遊離脂肪酸濃度は、High-Tr群が他の3群と比較して有意に高い値を示した (vs. Con-Sed群、vs. Con-Tr群、vs. Mod-Tr群 p < 0.005、図2)。

3. 骨格筋 β HADタンパク質発現量

β HADは、脂肪酸の β 酸化に関わる重要な酵素の1つである。骨格筋における β HADの活性と運動時の筋における脂質酸化量の間が高い正の相関関係が認められていることから¹⁵⁾、 β HADは骨格筋の脂質代謝能力の指標として多くの先行研究で用いられている^{16), 17)}。さらに、長期的な高脂肪食摂取によって骨格筋の β HAD活性が高まることが報告されていることから^{4), 18)}、本研究においても中程度の脂肪食および超高脂肪食を摂取した群では β HADの発現量が高まり、脂質代謝能力が向上している可能性が考えられる。そこで、前脛骨筋における β HADタンパク質発現量の測定を行なった。その結果、High-Tr群が他の3群と比較して有意に高い値を示した (vs. Con-Sed群、vs. Con-Tr群 p < 0.001、vs. Mod-Tr群 p < 0.005、図3)。また、Mod-Tr群もCon-Sed群と比較して有意に高い値を示した (vs. Con-Sed群 p < 0.01、図3)。

4. 骨格筋PDK4タンパク質発現量

PDK4は、解糖系の重要な酵素であるPyruvate dehydrogenase (PDH)を不活性化させ、糖代謝を抑制的に調節する作用を有している¹⁹⁾。PDK4も、長期的な高脂肪食の摂取により、骨格筋においてその発現量が高まることが報告されていることから^{20), 21)}、本研究においても、超高脂肪食を摂取した群では、骨格筋においてPDK4の発現量が高まり、解糖系が抑制され

ることで糖質を利用しにくい状態へと変化している可能性が考えられる。そこで、前脛骨筋におけるPDK4タンパク質発現量の測定を行なった。その結果、High-Tr群で顕著に高い値を示し、他の3群との間に有意な差が認められた (vs. Con-Sed群 p < 0.001、vs. Con-Tr群、vs. Mod-Tr群 p < 0.005、図4)。一方、その他の群間では有意な差は認められなかった。

5. 骨格筋グリコーゲン濃度

前脛骨筋におけるグリコーゲン濃度は、Con-Tr群がCon-Sed群と比較し、統計的に有意ではないものの、高い値を示す傾向にあった (p = 0.091、図5)。一方で、High-Tr群がCon-Tr群と比較して有意に低い値を示した (p < 0.05、図5)。その他の群間では有意な差は認められなかった。

IV 考察

本研究で得られた主な知見は、走行トレーニングを伴う中程度の脂肪食の継続摂取は、1) 超高脂肪食ほどではないものの、骨格筋の脂質代謝能力を高めること、2) 超高脂肪食を摂取した際に見られた糖代謝の抑制効果は生じさせないこと、という2点である。

先行研究では、持久的トレーニングにより、骨格筋の β HADタンパク質発現量や酵素活性が増加することが報告されている。一方、本研究では、Con-Sed群とCon-Tr群間で β HADタンパク質発現量に有意な差が見られなかった。このような結果の違いの原因は必ずしも明らかではないが、骨格筋の筋線維タイプの違いによる影響が考えられる。先行研究では、6週間の走行トレーニングによる β HAD活性の増加は、速筋線維が有意な足底筋では認められたものの、遅筋線維

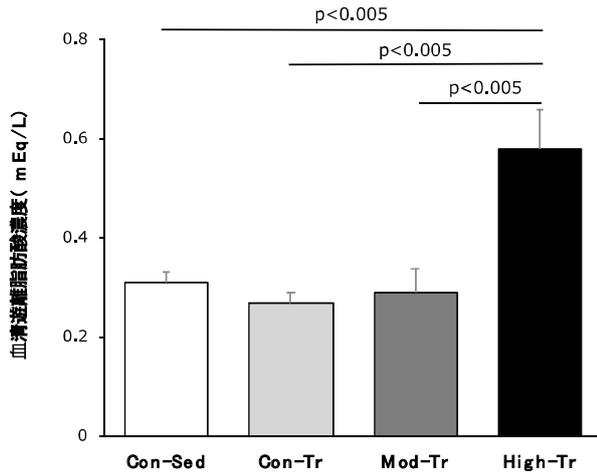


図2 解剖時における血清遊離脂肪酸濃度

Con-Sed: 通常食・安静群、Con-Tr: 通常食・トレーニング群、Mod-Tr: 中程度脂肪食・トレーニング群、High-Tr: 超高脂肪食・トレーニング群
 数値は全て平均±標準誤差で表した。n = 7~9

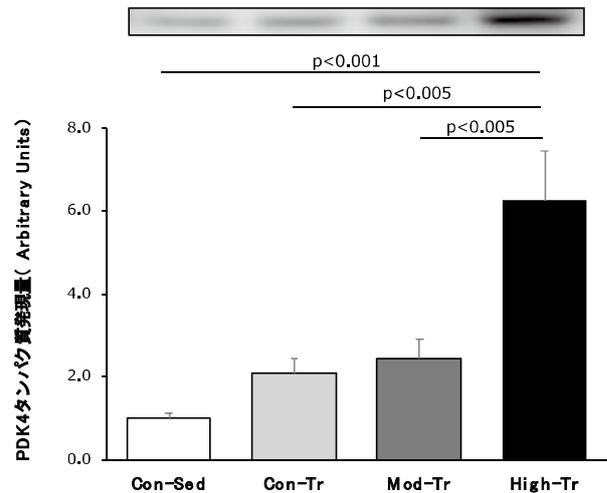


図4 前脛骨筋におけるPDK4タンパク質発現量

Con-Sed: 通常食・安静群、Con-Tr: 通常食・トレーニング群、Mod-Tr: 中程度脂肪食・トレーニング群、High-Tr: 超高脂肪食・トレーニング群
 数値は全て平均±標準誤差で表した。n = 7~9

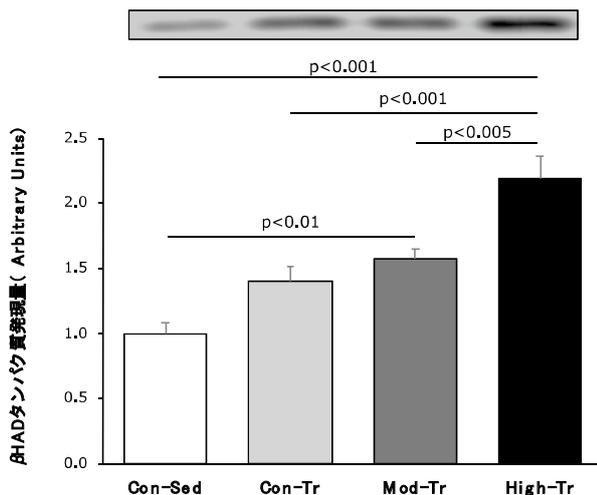


図3 前脛骨筋におけるβHADタンパク質発現量

Con-Sed: 通常食・安静群、Con-Tr: 通常食・トレーニング群、Mod-Tr: 中程度脂肪食・トレーニング群、High-Tr: 超高脂肪食・トレーニング群
 数値は全て平均±標準誤差で表した。n = 7~9

が有意なヒラメ筋では認められなかったことが報告されている²²⁾。本研究では速筋線維が有意な前脛骨筋を分析に用いたが、マウスの前脛骨筋では、遅筋型のType I線維が足底筋よりも多いことが報告されていることから²³⁾、前脛骨筋では運動によるβHADの適応が比較的生じにくく、Con-Sed群とCon-Tr群間で有意な差が認められなかったという可能性が考えられる。

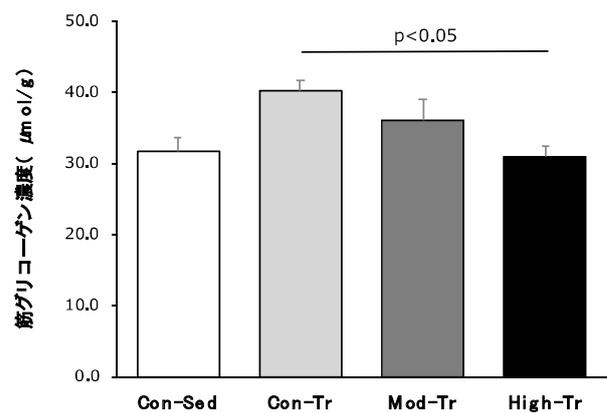


図5 前脛骨筋におけるグリコーゲン濃度

Con-Sed: 通常食・安静群、Con-Tr: 通常食・トレーニング群、Mod-Tr: 中程度脂肪食・トレーニング群、High-Tr: 超高脂肪食・トレーニング群
 数値は全て平均±標準誤差で表した。n = 7~9

持久的トレーニングに加えて高脂肪食の摂取を組み合わせることで、骨格筋において、β酸化に関わる酵素であるβHADの活性が増加することが報告されている⁵⁾。本研究においても、前脛骨筋におけるβHADのタンパク質発現量がトレーニングと超高脂肪食を組み合わせさせたHigh-Tr群において他の3群と比較し有意に高い値であった(図3)。先行研究では、骨格筋において、βHADの活性と運動時の脂肪酸酸化量との間には有意な正の相関関係が認められている

ことから¹⁵⁾、 β HADタンパク質発現量が顕著に増加していたHigh-Tr群では、骨格筋の脂質酸化能力が大きく向上していたと考えられる。 β HADなどの脂肪酸代謝に関わる酵素の多くは、核内受容体Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR) β による発現調節を受けることが知られている^{24), 25)}。Garcia-Roves et al. (2007)は、高脂肪食摂取に伴う骨格筋脂質酸化系酵素の発現量増加においても、血中遊離脂肪酸濃度の上昇と、それに伴うPPAR β の活性化という機序が関与していることを報告している²⁶⁾。本研究においても、解剖時の血清遊離脂肪酸濃度がHigh-Tr群において他の群と比較して有意に高値であった(図2)。したがって、High-Tr群で認められた β HADタンパク質発現量の増加は、遊離脂肪酸濃度の上昇に伴うPPAR β の活性化によって引き起こされた可能性が高いと考えられる。

長期的な超高脂肪食の摂取により、骨格筋の脂質酸化能力が向上するものの、糖代謝機能が大きく抑制されることが知られている^{7), 8)}。これは、長期間の高脂肪食摂取により、解糖系を抑制的に調節するPDK 4の発現が高まることによるものであると考えられている^{12), 20)}。本研究においても、High-Tr群で前脛骨筋におけるPDK 4のタンパク質発現量が他の3群と比較し顕著に高い値を示していた(図4)。したがって、超高脂肪食を摂取していたHigh-Tr群では、骨格筋の脂質酸化能力が亢進するものの、糖代謝能力は大きく低下していた可能性が高いと考えられる。PDK 4も、 β HADと同様にPPAR β による発現調節を受けることが知られている²⁷⁾。したがって、High-Tr群における骨格筋PDK 4発現量の増加にも、血中の遊離脂肪酸濃度の増加によるPPAR β の活性化というメカニズムが関与していると考えられる。

一方、Mod-Tr群においては、High-Tr群に比べるとその増加量は少ないものであったが、骨格筋において β HADタンパク質発現量の増加が認められた(図3)。さらに、興味深いことに、PDK 4タンパク質発現量は、High-Tr群で見られたような顕著な増加は認められなかった(図4)。これらの結果から、走行トレーニングを伴う中程度の脂肪食の継続摂取は、超高脂肪食ほどではないものの骨格筋の脂質代謝能力を高め、かつ、糖代謝に対する抑制作用をほとんど生じさせない可能性が考えられる。

先行研究において、試合前の筋グリコーゲン濃度が低いサッカー選手では、通常のグリコーゲン濃度の選手と比較して、試合後半における走行距離が大幅に減少したことが報告されている²⁸⁾。この結果は、筋グリコーゲン濃度が、サッカーのパフォーマンスを規定する重要な因子の1つであるという可能性を示唆している。本研究における筋グリコーゲン濃度は、High-Tr群がCon-Tr群と比較して低い値を示した一方で、

Mod-Tr群においては、そのような低下は認められなかった(図5)。このことから、走行トレーニングを伴う中程度の脂肪食の継続摂取は、1) 糖質の体内貯蔵量を悪化させない、および2) 上述したように、解糖系に対する抑制効果も少ないため、エネルギー基質としての脂質利用能力を向上させるだけでなく、糖質利用能力を保持できる、という2つの作用を有している可能性が高いと考えられる。先述したように、サッカーは、脂質を中心に利用しながら必要に応じて糖質を利用するという代謝特性を有している。したがって、中程度の脂肪食を継続的に摂取することで得られる上記のような代謝適応は、サッカーのような代謝特性を持つ競技におけるパフォーマンスの向上に寄与する可能性が高いと考えられる。ただし、本研究では、中程度の脂肪食摂取が実際にサッカーのような運動を行った際のエネルギー利用動態にどのような影響を及ぼすかは明らかにできていない。今後の研究では、運動中や運動前後のエネルギー基質の変化に着目し、検討する必要があるだろう。

運動トレーニングは、エネルギー消費量高め、体重減少をもたらすことがよく知られている²⁹⁾。本研究においても、トレーニングを行ったCon-Tr群でCon-Sed群と比較して体重増加量が低値を示した(表3)。一方、先行研究において、高脂肪食の摂取により体重が大きく増加することが報告されているものの³⁰⁾、トレーニングを行いながら中程度の脂肪食を摂取していたMod-Tr群の体重増加量は、Con-Tr群との間に有意な差は認められなかった(表3)。このことから、走行トレーニングの実施と併せて中程度の脂肪食を継続的に摂取しても、体重が顕著に増加する可能性は低いと考えられる。

一方、High-Tr群においては、総エネルギー摂取量がCon-Sed群と比較し高値を示したにもかかわらず、腹腔内脂肪量は有意に低値を示した(表3)。先行研究では、高脂肪食であっても、糖質をほとんど含まず、脂肪の含有量をさらに増やした超高脂肪食を摂取した場合には、体重および体脂肪量の増加が抑制されることが報告されている^{31), 32)}。高脂肪食と超高脂肪食で体重に対する影響が異なる要因の1つとして、安静時のエネルギー消費量の増加が挙げられている。これは、褐色脂肪細胞におけるUCP-1発現量が増加することで安静時のエネルギー消費量が増加することによるものであると考えられている³³⁾。したがって、本研究においても超低糖質・超高脂肪食を摂取したHigh-Tr群では同様のメカニズムで安静時のエネルギー消費量が高まり、腹腔内脂肪量の増加が抑制されたという可能性が考えられる。また、その他の要因として、実験飼料の形状および給餌方法に関する問題が挙げられる。本研究で作成した超高脂肪食は、他の飼料と比較して油を多く含むことから、より液状に近く、身体にまと

わりつきやすい状態となっていた。そのため、High-Tr群で測定された摂餌量が、実際に摂餌していた量よりも多く見積もられていた可能性が考えられる。今後の研究では、エネルギー摂取量を過大評価しないような飼料の形状および給餌方法を検討し、実験を行う必要があるだろう。

V 結論

高強度・間欠的および持久的な走行トレーニングを伴いながら中程度の脂肪食を継続的に摂取することは、骨格筋における糖代謝を抑制することなく、脂質代謝機能を向上させる可能性が示唆された。

利益相反

以下の申告すべき利益相反状態がある。

寺田 新：共同研究費（日清オイリオグループ株式会社）

文 献

- 1) McSwiney, F.T., Doyle, L., Plews, D.J., et al.: Impact Of Ketogenic Diet On Athletes: Current Insights, *J. Sports Med.*, 171-183 (2019)
- 2) Durkalec-Michalski, K., Nowaczyk, P.M., Siedzik, K.: Effect of a four-week ketogenic diet on exercise metabolism in CrossFit-trained athletes, *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, 16 (2019)
- 3) McSwiney, F.T., Wardrop, B., Hyde, P.N., et al.: Keto-adaptation Enhances Exercise Performance and Body Composition Responses to Training in Endurance Athletes, *Metabolism*, 25-34 (2018)
- 4) Miller, W.C., Bryce, G.R., Conlee, R.K.: Adaptations to a high-fat diet that increase exercise endurance in male rats, *J. Appl. Physiol.*, 78-83 (1984)
- 5) Simi, B., Sempore, B., Mayet, M.H., et al.: Additive effects of training and high-fat diet on energy metabolism during exercise, *J. Appl. Physiol.*, 197-203 (1991)
- 6) Chang, C.K., Borer, K., Lin, P.J.: Low-Carbohydrate-High-Fat Diet: Can it Help Exercise Performance?, *J. Hum. Kinet.*, 81-92 (2017)
- 7) Webster, C.C., Noakes, T.D., Chacko, S.K., et al.: Gluconeogenesis during endurance exercise in cyclists habituated to a long-term low carbohydrate high-fat diet, *J. Physiol.*, 4389-4405 (2016)
- 8) Volek, J.S., Freidenreich, D.J., Saenz, C., et al.: Metabolic Characteristics of Keto-Adapted Ultra-Endurance Runners, *Metabolism*, 100-110 (2016)
- 9) 長友佑都 (著), 山田 悟 (監修): 長友佑都のファットアダプト食事法 カラダを劇的に変える、28日間プログラム (2019), 幻冬舎, 東京
- 10) Mohr, M., Krusturup, P., Bangsbo, J.: Match performance of high standard soccer players with special reference to development of fatigue, *J. Sports Sci.*, 519-528 (2003)
- 11) Rampinini, E., Coutts, A.J., Castagna, C., et al.: Variation in top level soccer match performance, *Int. J. Sports Med.*, 1018-1024 (2007)
- 12) Fukazawa, A., Koike, A., Karasawa, T., et al.: Effects of a Ketogenic Diet Containing Medium-Chain Triglycerides and Endurance Training on Metabolic Enzyme Adaptations in Rat Skeletal Muscle, *Nutrients*, 1269 (2020)
- 13) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 680-685 (1970)
- 14) Lowry, O.H., Passonneau, J.V.: A Flexible System of Enzymatic Analysis, 189-193 (1972), Academic Press, New York
- 15) Kiens, B.: Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance, *Physiol. Rev.*, 205-243 (2006)
- 16) Burgomaster, K.A., Howarth, K.R., Phillips, S.M., et al.: Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans, *J. Physiol.*, 151-160 (2008)
- 17) Helge, J.W., Kiens, B.: Muscle enzyme activity in humans: role of substrate availability and training, *Am. J. Physiol.*, 1620-1624 (1997)
- 18) Turner, N., Bruce, C.R., Beale, S.M., et al.: Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents, *Diabetes*, 2085-2092 (2007)
- 19) Chokkalingam, K., Jewell, K., Norton, L., et al.: High-fat/low-carbohydrate diet reduces insulin-stimulated carbohydrate oxidation but stimulates nonoxidative glucose disposal in humans: An important role for skeletal muscle pyruvate dehydrogenase kinase 4, *J. Clin. Endocrinol Metab.*, 284-292 (2007)
- 20) Rinnankoski-Tuikka, R., Silvennoinen, M., Torvinen, S., et al.: Effects of high-fat diet and physical activity on pyruvate dehydrogenase kinase-4 in mouse skeletal muscle, *Nutrition and Metabolism*, 53 (2012)
- 21) Holness, M.J., Kraus, A., Harris, R.A., et al.: Targeted upregulation of pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) -4 in slow-twitch skeletal muscle underlies the stable modification of the regulatory characteristics of PDK induced by high-fat feeding, *Diabetes*, 775-781 (2000)
- 22) Matsunaga, Y., Tamura, Y., Takahashi, Y., et al.: Pre-exercise casein peptide supplementation enhances endurance training-induced mitochondrial enzyme

- activity in slow twitch muscle, but not fast twitch muscle of high fat diet-fed mice, *J. Phys. Fitness Sports Med.*, 377-384 (2015)
- 23) Allen, D., Harrison, B., Sartorius, C., et al.: Mutation of the IIB myosin heavy chain gene results in muscle fiber loss and compensatory hypertrophy, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 637-645 (2001)
- 24) Marcus, S.L., Miyata, K.S., Zhang, B., et al.: Diverse Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Bind to the Peroxisome Proliferator-Responsive Elements of the Rat Hydratase/Dehydrogenase and Fatty acyl-CoA Oxidase Genes but Differentially Induce Expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 5723-5727 (1993)
- 25) Grimaldi, P.A.: Peroxisome Proliferator-Activated Receptors as Sensors of Fatty Acids and Derivatives, *Cell Mol. Life Sci.*, 2459-2464 (2007)
- 26) Garcia-Roves, P., Huss, J.M., Han, D.H., et al.: Raising plasma fatty acid concentration induces increased biogenesis of mitochondria in skeletal muscle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 10709-10713 (2007)
- 27) Tanaka, T., Yamamoto, J., Iwasaki, S., et al.: Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 15924-15929 (2003)
- 28) Saltin, B.: Metabolic Fundamentals in exercise, *Medicine and Science in Sports*, 137-146 (1973)
- 29) Swift, D.L., Johannsen, N.M., Lavie, C.J., et al.: The Role of Exercise and Physical Activity in Weight Loss and Maintenance, *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 441-447 (2014)
- 30) Hu, S., Wang, L., Yang, D., et al.: Dietary Fat, but Not Protein or Carbohydrate, Regulates Energy Intake and Causes Adiposity in Mice, *Cell Metab.*, 415-431 (2018)
- 31) Holland, A.M., Kephart, W.C., Mumford, P.W., et al.: Effects of a Ketogenic Diet on Adipose Tissue, Liver, and Serum Biomarkers in Sedentary Rats and Rats That Exercised via Resisted Voluntary Wheel Running, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 337-351 (2016)
- 32) Zajac, A., Poprzecki, S., Maszczyk, A., et al.: The Effects of a Ketogenic Diet on Exercise Metabolism and Physical Performance in Off-Road Cyclists, *Nutrients*, 2493-2508 (2014)
- 33) Srivastava, S., Baxa, U., Niu, G., et al.: A Ketogenic Diet Increases Brown Adipose Tissue Mitochondrial Proteins and UCP1 Levels in Mice, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 58-66 (2013)

(受付日：2020年6月8日)
(採択日：2020年8月16日)

Original Article

Effects of a moderate-fat diet on high-intensity intermittent and endurance training-induced metabolic adaptations in mouse skeletal muscle

Atsuko KOIKE, Takuya KARASAWA, Momoko TSUTSUI, Saki KONDO,
Ayumi FUKAZAWA, Shin TERADA

Department of Life Science, Graduate School of Arts and Science, The University of Tokyo

ABSTRACT

【Aim】

The long-term intake of a very high-fat diet enhances the fat oxidation capacity in skeletal muscle, while exerting an inhibitory effect on carbohydrate metabolism. The purpose of this study was to evaluate the effect of a moderate-fat diet on exercise training-induced metabolic adaptations in mouse skeletal muscle.

【Method】

Male 8-week-old ICR mice were subjected to an 8-week exercise training program (high-intensity intermittent or endurance running, 90 min/day, 5 days/week) and were fed either a control diet (PFC ratio = 19:17:64, Con-Tr group), a moderate-fat diet (PFC ratio = 27:54:19, Mod-Tr group), or a high-fat diet (PFC ratio = 11:88:1, High-Tr group). Sedentary mice fed the control diet were used as a control group (Con-Sed group). After the 8-week intervention, the tibialis anterior muscles were dissected and the enzyme protein contents were measured.

【Result】

Both the Mod-Tr and High-Tr groups had a significantly higher muscle β HAD protein content, which is a key enzyme in fatty acid β -oxidation, compared with the Con-Sed group, with the High-Tr group having the highest value. In addition, the PDK4 protein content, which is a negative regulator of glycolytic flux, was substantially higher in the High-Tr group than in the other three groups. However, an increase in PDK4 was not observed in the Mod-Tr group.

【Conclusion】

The present results suggest that the long-term intake of a moderate-fat diet in combination with training may enhance fat oxidation capacity without inhibiting carbohydrate metabolism.

Keywords: high-fat diet, β -hydroxyacyl CoA dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase kinase 4, skeletal muscle, mice