2版

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 月 ２２ 日現在

機関番号： ３５４０４

研究種目： 基盤研究(C)（一般）

研究期間： 2015～2017

課題番号： １５Ｋ０１６４０

研究課題名（和文）絶食下での運動が骨格筋応答に与える影響

研究課題名（英文）Fasting-related response of skeletal muscles with exercise

研究代表者

緒方　知徳（Ogata, Tomonori）

広島修道大学・人間環境学部・教授

研究者番号：３０４３４３４３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では，24時間の絶食を行ったラットへのトレッドミルを用いた持久的運動および高強度運動時の足底筋とヒラメ筋内のオートファジーマーカー（LC3-II）やheat shock proteins（HSPs），mTORシグナルに関連したタンパク質の発現量を検討した。足底筋では絶食によって筋内のオートファジー（LC３-II）は増加がみられたが，持久的運動および長時間運動による顕著な変化はなかった。HSP72の発現は、運動時の絶食による発現量への影響は認められなかった。mTORシグナル経路においても運動時の絶食による影響はみられなかった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to determine the effects of fasting to exercise-related physical response and adaptation. This study designed two exercise models using treadmill running under fasting condition. One is low intensity endurance exercise (30 m/min, 50min), and the other is high intensity exercise after 24 hours fasting. We analyzed the expression of autophagy marker (LC3-II), heat shock proteins (HSPs) and mTOR signaling pathway in plantaris and soleus muscles. In plantaris muscle, LC3-II was increased by 24 hours fasting, but no additional change with both endurance and high intensity exercise. There was no effect on expression of HSP72 and mTOR signaling by fasting in both types of exercise model.

研究分野： 運動生理学

キーワード： 骨格筋　絶食　応答

１．研究開始当初の背景

極度の低栄養状態や絶食環境が続けば骨格筋に萎縮が生じることは周知のことであり，できる限り避けるべきであるが，体重制の競技スポーツや疾病時には極端な食事制限や絶食を強いられる場合もある。特に体重制競技スポーツの実施者は，低栄養状態に置かれながらも身体活動を強いられる状況がしばしば訪れる。しかしながら，このような低栄養状態での身体活動時に骨格筋内で生じる変化についての情報は少なく，安全で効率的な練習環境が提供されているかどうかは不明である。

運動に伴う生体の適応においてタンパク質（アミノ酸）の存在は不可欠であるが，食事による栄養が不足した環境下での運動では，（１）既存の生体内タンパク質を分解して補う，（２）タンパク質合成に関するシグナルを抑制するという応答が生じることが想定される。しかし，タンパク質合成の抑制に関しては，生命維持などの観点からすべてのタンパク質合成が抑制されるわけではないと考えられるが，絶食下においてどのような機能を持つタンパク質が優先して合成されるのかは不明であった。このことが明らかになれば，生理応答に関して学術的に重要な基礎情報を得るとともにスポーツの現場にも有益な情報をもたらすことを期待される。

２．研究の目的

本研究は，運動によって通常起こり得る細胞内応答が絶食によってどのような影響を受けるかを，ラットのトレッドミルランニングを用いた持久的運動，高強度運動モデルを用いて明らかにすることを目的とした。

３．研究の方法

運動時に起こる細胞内応答への絶食の影響を明らかにするために，①絶食時における骨格筋細胞内応答の基礎情報の確立（１年目），②低強度の持久的運動に伴う細胞内応答（２年目），③高強度運動に伴う細胞内応答（３年目）の実験モデルを作成した。これらの実験モデルにおいて，筋タンパク質の分解・合成経路，細胞保護機能に関連した分子シグナルのタンパク質発現量を検討し，運動時の絶食の影響を検討した。本研究では，ラットのヒラメ筋（遅筋）および足底筋（速筋）を用いて分析を行い，筋タイプの違いによる影響も検討した。

平成 27 年度：検討課題①

○絶食が骨格筋内の細胞内応答に与える影響

初年度は絶食によっておこるタンパク質レベルでの骨格筋内応答を分析し，次年度以降の運動実験の分析項目を決定した。先行研究の結果から，絶食の応答が筋タイプによって異なるため，遅筋および速筋を用いて絶食時の①筋タンパク質の分解／合成にかかわるシグナルの発現，②筋細胞保護にかかわる分子シャペロンタンパク質群の発現レベルを検討した。

◆実験動物および絶食介入

実験には，Fischer 系の雄ラット（3 ヶ月齢）を用い，コントロール群（6 匹）と絶食群（6 匹）に分け，絶食群は 24 時間の絶食を行った。

平成 28 年度：検討課題②

○絶食下における長時間低強度運動が骨格筋に与える影響

◆絶食および長時間持久的運動

実験には 27 年度と同様に Fischer 系の雄ラットを用い，コントロール群(6 匹)，絶食群（6 匹），絶食＋持久的運動群（6 匹）に分け，24 時間の絶食後に 50 分間のラットトレッドミルランニング（30m/min）を行った。なお，各群のラットは運動終了の 3 時間後に麻酔下でヒラメ筋と足底筋を摘出した。

分析項目：初年度の検討に基づきオーファジーマーカー（LC3-II），heat shock proteins（HSP72，HSP27,HSP40, GRP78），mTOR シグナル（mTOR，phospho-mTOR，p70S6K，phospho-p70S6K）の発現量をウエスタンブロッティングにより定量した。

平成 29 年度：検討課題③

○絶食下における短時間高強度運動が骨格筋に与える影響

◆絶食および短時間高強度運動

実験には 27 年度と同様に Fischer 系の雄ラットを用い，コントロール群(6 匹)，絶食群（6 匹），絶食＋高強度運動群（6 匹）に分け，24 時間の絶食後に 10 分間のラットトレッドミルランニング（40m/min）を行った。各群のラットは運動終了の 3 時間後に麻酔下でヒラメ筋と足底筋を摘出した。

分析項目：初年度の検討に基づきオーファジーマーカー（LC3-II），heat shock proteins（HSP72，HSP27，GRP78），mTOR シグナル（mTOR，phospho-mTOR，P70S6K，phospho-P70S6K）の発現量をウエスタンブロッティングにより定量した。

４．研究成果

検討課題①

<u>分子シャペロンタンパク質の発現量</u>

HSP72，HSP90，GRP78，HSP40，HSP27 の発現レベルは，絶食群とコントロール群間に差は認められなかった。これは，ヒラメ筋，足底筋とも同様であった。先行研究で運動による影響が認められる HSP72,HSP40 ，GRP78 を

次年度の検討項目とした。
<u>オートファジーのマーカー</u>
　LC3-II の発現量を検討した結果，絶食群で有意な増加が認められた。次年度以降の検討項目とした。
<u>mTOR シグナル経路</u>
　phospho-mTOR の発現量の低下が絶食により認められた。mTOR の調節因子である p70S6K の発現量の変化も次年度以降の項目とした。
検討課題②
　持久的運動により，足底筋内の HSP72 は 145%の増加がみられたが，絶食による発現量への影響は確認されなかった。このことは，運動に伴う HSP72 の発現増加は，低栄養下でも維持されることを示唆している（図 1）。HSP40 ，GRP78 の発現量の変化はどの群においてもみられなかった。

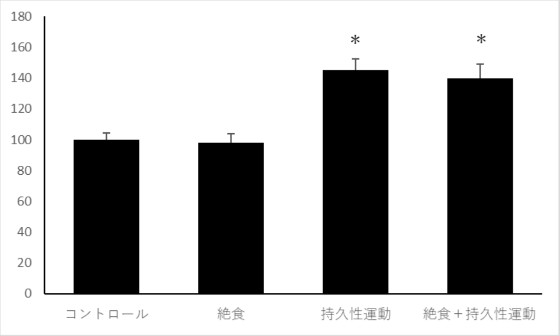

図１　24 時間の絶食下での持久性運動後の足底筋の HSP72 の発現量。＊vs コントロール群 P<0.05

　ヒラメ筋の発現量については，本研究で用いた運動では，HSP72 を含む度の分子シャペロンタンパク質においても発現量の変化は見られず，運動+絶食群でも有意な変化は見られなかった。
　足底筋における LC3-II の発現量(図2)は，コントロール群と比較して絶食群で 120%の増加がみられた。持久的運動群では増加傾向にあったが統計的な有意差ではなかった。絶食+持久的運動群では 131%の増加であったが，絶食群および運動群との差は認められなかった。このような結果は，絶食がオートファジーの増加を促進する一方で運動も影響を与える可能性を示唆するものであった。

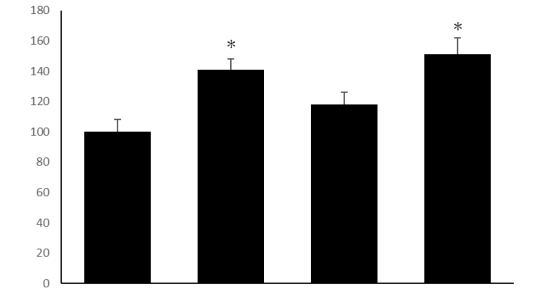

図２　24 時間の絶食下での短時間の高強度運動後の足底筋の LC3-II の発現量　＊vs コントロール群 P<0.05

足底筋の mTOR シグナルについては，検討した phospho-mTOR(Ser244), phospho-p70S6K ともに絶食時群よび持久的運動群におけるコントロール群との差は認められなかった。これはヒラメ筋でも同様であった。

検討課題③
　分子シャペロンタンパク質の発現は，ヒラメ筋と足底筋ともに絶食群，高強度運動群，絶食＋高強度運動群のすべてでコントロール群との差は見られなかった。
　LC3-II の発現量は，足底筋において絶食群と絶食＋高強度運動群で発現量が増加した。ヒラメ筋では各群における発現量の差は認められなかった。
　mTOR シグナルに関して，足底筋の高強度運動群においてのみ phospho-mTOR が 126%の発現量増加を示した。ヒラメ筋においては発現量の変化は認められなかった。

　本研究では，絶食下での運動による筋内の分子応答を明らかにすることを目的として検討を行った。本研究に用いた持久的運動と高強度運動のモデルでは，絶食の影響が明確にみられなかった。しかしながら，本研究の結果のみで低栄養状態が運動時に与える影響を判断することは出来ない。今後の課題として，絶食の期間や運動の強度を変えて検討を加える必要性があるだろう。

５．主な発表論文等
（研究代表者，研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　2　件）
①Yasuharu Oishi, Roland R. Roy, <u>Tomonori Ogata</u>, Yoshinobu Ohira. Heat stress effects on the myosin heavy chain phenotype of rat soleus fibers during the early stages of regeneration, Muscle Nurve, Vol.52, 2015, 1047-1056.
②<u>緒方 知徳</u>，脊髄損傷に伴う下肢筋萎縮に対する電気刺激の抑制効果，人間環境学研究，15 巻，145-154.

〔学会発表〕（計　0　件）

〔図書〕（計　0　件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計０　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計０　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
　緒方　知徳（OGATA, Tomonori）

　研究者番号：30434343

(2)研究分担者
　大石　康晴（OISHI, Yasuharu）

　研究者番号： 10203704

(3)連携研究者
　（　　）

　研究者番号：

(4)研究協力者
　（　　）