

博士（人間科学）学位論文

効果的な筋グリコーゲン超回復法の検討

An Effective Method for Glycogen Supercompensation
in Skeletal Muscle

2009年1月

早稲田大学大学院 人間科学研究科

園生 智広

Sonou, Tomohiro

研究指導教員： 樋口 満 教授

目次

概要書

第1章. 序論	・ ・ ・ ・ ・ 1
第2章. 文献考証	・ ・ ・ ・ ・ 5
第3章. 研究課題 1 : 「糖質の種類の違いが運動後の筋グリコーゲン超回復におよぼす影響」	・ ・ ・ ・ ・ 19
第4章. 研究課題 2 : 「グリコーゲン枯渇運動の運動強度が運動後の筋グリコーゲン超回復におよぼす影響」	・ ・ ・ ・ ・ 36
第5章. 研究課題 3 : 「運動後の筋グリコーゲン超回復の規定因子の検証」	・ ・ ・ ・ ・ 51
3-1 : 超生理学的な濃度のグルコースおよびインスリンが運動後の筋グリコーゲン超回復に及ぼす影響	
3-2 : グリコーゲン合成酵素の活性化が運動後の筋グリコーゲン超回復に及ぼす影響	
3-3 : タンパク合成の阻害が運動後の筋グリコーゲン超回復に及ぼす影響	
第6章. 総合討論	・ ・ ・ ・ ・ 76
第7章. 結論	・ ・ ・ ・ ・ 81
謝辞	
参考文献	・ ・ ・ ・ ・ 83

1 概要書

2 運動時にはエネルギー源として主に糖質と脂質が利用されるが、生体内に貯蔵されている糖
3 質は脂質に比べて著しく少ない。先行研究(Ahlborg et al. 1967, Bergström et al. 1967)によって、
4 運動前に骨格筋のグリコーゲン濃度を高めておくことが、持久性パフォーマンスを向上させる上で
5 重要であることが明らかにされている。Bergström & Hultman(1966)は、運動(グリコーゲン枯
6 渇運動)後に十分な糖質を摂取することで、運動 24~48 時間後には“グリコーゲン超回復”と呼ば
7 れる現象が生じることを報告した。

8 実際のスポーツの現場では、この現象を利用した“グリコーゲン・ローディング”が、主に持久
9 的な運動パフォーマンスの向上を目的として利用されている。しかしながら、筋グリコーゲンの超
10 回復に関しては、その現象面はよく知られているものの、筋グリコーゲンレベルを最大限に高める
11 方法については、必ずしも明らかでない。

12 筋グリコーゲン超回復には、1)トレーニング状態、2)グリコーゲン枯渇運動の形態、さらに 3)
13 回復期に摂取する糖質、という 3 つの要因が影響を及ぼすと考えられる。先行研究により、1)のト
14 レーニング状態に関しては、骨格筋での糖輸送体 GLUT-4 がより多い状態が、筋グリコーゲン超
15 回復のレベルを増加させることが明らかにされている(Greiwe et al.1999,Hickner et al.
16 1997,Nakatani et al. 1997)。

17 そこで本研究では、実験動物を用いて、1)、2)に関してそれぞれの研究課題 1 および 2 で検
18 討し、筋グリコーゲン超回復を高める方法を明らかにした。さらに、上記以外に運動後の筋グリコ
19 ーゲン再合成に影響を及ぼす可能性が考えられる因子に関して研究課題 3 で検討し、より高い筋
20 グリコーゲン超回復を得る方法を示した。

21 研究課題 1 では、回復期に摂取する糖質について、実際に摂取する糖質の主たる形態であ
22 るグルコースとスクロースを補助的摂取した場合の筋グリコーゲン超回復レベルを比較検討した。
23 全てのラットには、先行研究(Ren et al. 1994, Terada et al. 2001)により GLUT-4 を最大限に増
24 加させることが報告されている 6 時間の水泳運動トレーニングを 1 週間行わせた。その翌日、ラッ
25 トに体重の 3%に相当する錘をつけ、4 時間の持続的な水泳運動により筋グリコーゲンを枯渇させ

1 た。運動後のラットには、通常の固形飼料 CE-2に加え、5%のグルコースおよびスクロース溶液を
2 飲料として自由摂取させた。その結果、グリコーゲン枯渇運動後に補助的に摂取する糖質として
3 は、スクロースと比較して、グルコースがより高い筋グリコーゲン超回復を引き起こすことが明らか
4 になった。

5 研究課題2では、グリコーゲン枯渇運動の形態に関して検討を行った。研究課題1と同様のト
6 レーニングをラットに行わせた。その翌日、高強度・間欠的短時間運動群には、体重の18%に相
7 当する錘をつけ、30秒間の水泳運動を30秒インターバルで20セット行わせた。低強度・長時間
8 運動群には、研究課題1と同様のグリコーゲン枯渇運動を行わせた。運動後の回復期には、研究
9 課題1で効果的に筋グリコーゲン超回復を引き起こすことが明らかとなった“固形飼料(CE-2)+5%
10 グルコース溶液”を自由摂取させた。その結果、高強度・短時間運動でも、低強度・長時間運動と
11 同程度に筋グリコーゲン超回復を生じさせることが明らかになった。

12 研究課題3では、上記の研究課題で明らかとなった、より高い筋グリコーゲン超回復を生じさ
13 せる方法をさらに高める可能性が考えられる因子に関して検討した。研究課題1と同様のトレーニ
14ングを行わせたラットを、体重の2%に相当する錘を負荷し、4時間水泳運動させることで、筋グリ
15コーゲンを枯渇させた。運動直後、ラットの前肢骨格筋である滑車上筋(epitrochlearis)を摘出し、
16 グリコーゲン合成酵素を活性化させる GF-109203x(GF)という薬剤を添加した培養液内で、筋グ
17 リコーゲンを回復させた。その結果、添加しない場合と比較して、GFを添加した場合において、約
18 25%高い筋グリコーゲン超回復が生じた。したがって、筋グリコーゲン超回復をより高めるために
19 は、グリコーゲン合成酵素の活性化状態を長時間維持することが重要である可能性が示唆され
20 た。

21 以上、本研究をまとめると、筋グリコーゲン超回復を高めるためには、GLUT-4が最大限に
22 高められた状態に至るまでトレーニングし、高強度・短時間か低強度・長時間のいずれかの運動
23 で筋グリコーゲンを枯渇させた後に、グルコースを補助的に摂取することが効果的であることが明
24 らかとなった。また、グリコーゲン合成酵素の活性化状態を維持することができれば、さらに高い
25 レベルの筋グリコーゲン超回復を生じさせる可能性が示唆された。

1 章 序論

糖質は、脂肪と並び、運動中の主なエネルギー源である。食事によって摂取された糖質は、グリコーゲンという形態で骨格筋や肝臓に貯蔵されているが、その貯蔵量は脂肪に比べて非常に少ないことが知られている。Bergström et al.

(1967) や Ahlborg et al. (1967) の先行研究により、持久性運動前の筋グリコーゲン濃度が高いほど運動継続時間が長くなることが報告されており、運動前に骨格筋のグリコーゲン濃度をできるだけ高めておくことが持久性パフォーマンス向上のうえで重要であると考えられる。

Bergström & Hultman (1966) は、運動後に高糖質食を摂取することで、運動の 24~48 時間後において、筋グリコーゲンが運動前のレベルを超えるまで回復することを報告している。この現象は、筋グリコーゲン超回復もしくは過補償 (glycogen supercompensation) と呼ばれ、今日のスポーツの現場においても“グリコーゲン・ローディング”としてマラソンに代表される持久的な運動パフォーマンスの向上を目的として利用されている。しかしながら、筋グリコーゲンの超回復に関しては、多くの研究が行われてきたものの、そのレベルを最大限に高める方法は必ずしも明らかでないと言える。

筋グリコーゲン超回復には、大きく影響を及ぼす3つの要因が考えられる。すなわち、1) トレーニング状態、2) グリコーゲン枯渇運動の形態、さらに 3)

回復期に摂取すべき糖質の種類である。

1) のトレーニング状態に関しては、Nakatani et al. (1997) によるラットを用いた研究によって、持久的な運動トレーニングにより筋グリコーゲン超回復のレベルが飛躍的に高められることが初めて報告されている。このことは、ヒトにおいても同様に報告されている (Greiwe et al. 1999, Hickner et al. 1997)。これらの先行研究において、持久的トレーニングにより筋グリコーゲン超回復のレベルがより高められた要因は、骨格筋で糖輸送体 GLUT-4 の発現量が増加したためであると考察されている。Nakatani et al. (1997) は 5 週間のトレーニングを行わせているが、ラットでの研究では、6 時間の水泳運動を 2 日間行うことで、GLUT-4 の発現量が最大限に増加することが報告されている (Ren et al. 1994)。これらのことから、骨格筋の GLUT-4 発現量、さらにはグリコーゲン超回復のレベルを高めるためには、数日間のトレーニングで十分であると言える。

一方、2) のグリコーゲン枯渇運動の形態に関しては、これまでに行われた実験動物およびヒトを対象とした多くの研究 (Adamo et al. 1998, Bruce et al. 2001, James et al. 2001, Nakatani et al. 1997) では、主に低～中強度の長時間にわたって行われる持久的運動、もしくは、低～中強度の持久的な運動の後にスプリント運動を行わせるといった方法 (Bowtell et al. 2000, Goforth et

al. 1997, 2003) が用いられている。しかしながら、実験動物を用いた研究で、高強度で短時間の運動によって、筋グリコーゲンを迅速に減少させられること、および筋グリコーゲン再合成に大きな影響を及ぼす糖取り込み速度も、低強度運動と同程度に高められることが報告されている (Kawanaka et al. 1998)。

したがって、高強度・短時間運動でも、筋グリコーゲン超回復が生じる可能性が考えられるが、未だ明らかとなっていない。

さらに、3) の回復期に摂取する糖質の種類に関する検討は、いくつかのヒトを対象とした先行研究でなされているが (Blom et al. 1987, Bowtell et al. 2000, Casey et al. 2000)、これら多くの研究は、筋グリコーゲン超回復を十分に生じていないレベルでの検討にとどまっている。したがって、筋グリコーゲンを超回復といえるレベルにまで回復させる場合、摂取する糖質の種類の違いによってどのような影響が生じるのか明らかでない。

そこで、本論文では、十分にトレーニングを行なったラットを用いて、摂取する糖質の種類の違い (研究課題 1)、および、グリコーゲン枯渇運動の運動形態の違い (研究課題 2) が、筋グリコーゲン超回復のレベルにどのように影響しているのか検討し、筋グリコーゲン超回復のレベルを高める方法を明らかにすることを第一の目的とする。

また、安静時におけるインスリン刺激による筋グリコーゲン合成を規定す

る因子が，先行研究（Fisher et al. 2002b, Kawanaka et al. 2001）によって報告されているが，運動後の骨格筋においても，これらが同様に規定因子となっているか明らかでない．そこで，研究課題 3 として，これらの因子が運動後の筋グリコーゲン超回復に対しても影響を及ぼすのかを検討することで，研究課題 1・2 より明らかとなった方法に加え，筋グリコーゲン超回復をさらに高める方法を考案することを目的とする．

2章 文献考証

本章では、まず、運動後の筋グリコーゲン再合成の基礎的なメカニズム、および筋グリコーゲンの回復を効果的に生じさせる方法の探索を目的とした先行研究の結果についてまとめることとする。

1. 筋グリコーゲン超回復という現象の発見および運動前の筋グリコーゲン量と運動継続時間との関係について

持久性能に及ぼす食事組成については、Christensen & Hansen (1939) のヒトを対象とした研究に遡ることができる。その研究によれば、持久性運動の持続時間が、高炭水化物食（炭水化物 83%、脂肪 3%）では 210 分であったのに対し、高脂肪食（炭水化物 4%、脂肪 93%）では 88 分と、高炭水化物食が高脂肪食の 2 倍以上であった。また、Bergström et al. (1967) や Ahlborg et al. (1967) は、被験者に高糖質食および高脂肪食といった異なる組成の食事処方を行い、運動前の筋グリコーゲン濃度が違う状態を生じさせ、その後の運動の継続時間を評価した。その結果、運動前の筋グリコーゲン濃度が高いほど疲労困憊までの運動継続時間が長くなることを報告している。これらの研究結果は、運動前に骨格筋のグリコーゲン濃度をできるだけ高めておくことが、持久性パフォーマンスを向上させる上で重要であることを示唆するものである。

Bergström & Hultman (1966) は、自分たちをそれぞれ被験者として、片脚のみの自転車ペダリング運動を行った後に高糖質食を摂取し、筋グリコーゲンの回復動態を観察した。その結果、運動の 24～48 時間後において、非運動脚と比較して、運動脚では高い筋グリコーゲン濃度に回復することを報告した。この適応的応答現象は、グリコーゲンの超回復もしくは過補償 (glycogen supercompensation) と呼ばれている。この現象の発見は、著者 2 人のみを被験者とした実験データで証明されたものであるが、今日までの筋グリコーゲンに関する研究の基礎となる非常に重要な研究として位置づけられている。また、彼らの研究において、筋グリコーゲン超回復が、非運動脚では観察されず運動脚のみで観察されたことにより、この現象は、運動 (筋収縮) によって一旦筋グリコーゲンを減少させることが必要であることを示している。

2. 運動後の筋グリコーゲン再合成の機序

i) 骨格筋での糖取り込み

運動後のグリコーゲン再合成には、まず細胞内にグルコースを取り込む必要がある。グルコースは親水性であり、リン脂質の二重膜からなる細胞膜をそのままでは通過することができない。したがって、糖の取り込みは、筋形質膜上の糖輸送体 (glucose transporter ; GLUT) の働きによって行われるが、骨

格筋では主に GLUT-1 と GLUT-4 と呼ばれるサブタイプの糖輸送体が存在している。GLUT-1 は常時、細胞膜上に存在しているが、その発現量は非常に少なく、主に安静状態（非刺激状態）における糖取り込み活動を担っていると考えられている (Douen et al. 1990, Klip & Marette 1992, Mueckler et al. 1994, Rodnick et al. 1992)。一方、GLUT-4 は細胞内部の小胞に存在しているが、インスリンあるいは運動（筋収縮）刺激により細胞膜上へと移動（トランスロケーション）し、グルコースを取り込む通路として働いている。

ii) 運動後の糖取り込み速度の亢進①—インスリン非依存性—

Holloszy & Narahara (1965) は、摘出したカエルの縫工筋を、インスリンを含まない培養液中で電気刺激によって収縮させ、筋収縮そのものが、インスリンとは無関係に糖を取り込むことを最初に報告した。その後、非常に筋層が薄く、*in vitro* の実験に適しているラットの前肢骨格筋滑車筋 (epitrochlearis ; Epi) が発見され、その摘出・培養方法が確立され、哺乳類の骨格筋における糖取り込みの機序が明らかとされてきた。Nesher et al. (1985) は、この Epi を用いて、インスリンと筋収縮の両刺激が加算的に糖取り込み速度を増加させることを報告した。さらに、Lee et al. (1995) は、筋収縮刺激による Epi の糖取り込み速度の亢進がインスリンシグナル経路の

Phosphoinositide 3-kinase (PI3-K) の阻害剤である Wortmannin によって抑制されないことを報告している。これらの先行研究により、骨格筋での糖取り込み速度の亢進を引き起こすシグナル伝達刺激には、筋収縮とインスリンの 2 つの独立した経路が存在することが明らかとなっている。

筋収縮によって細胞内の AMP : ATP 比および CP : PCr 比の増加によって AMP 依存性プロテインキナーゼ (AMPK) と呼ばれる酵素が活性化される (Winder et al. 1996)。この AMPK を活性化させる作用を持つ 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) により、インスリン非存在下においても、骨格筋の糖取り込み速度が亢進することから、筋収縮による糖取り込み速度の亢進に AMPK の活性化が関与している可能性が示唆されている (Hayashi et al. 1998)。しかしながら、Mu et al. (2001) は、kinase-dead AMPK のトランスジェニックマウスを作製し、このマウスの骨格筋を電気刺激によって収縮させると、AMPK 活性は増加しなかったにも関わらず、糖取り込み速度が通常マウスの 60~70%程度亢進することを報告した。このことは、インスリン非依存的な糖取り込み速度の亢進には、AMPK 以外の機序も存在することを示唆するものである。

Holloszy & Narahara (1967) は、単離したカエルの縫工筋に、細胞内の Ca^{2+} 濃度を上昇させるカフェインを負荷することで、糖取り込み速度が亢進す

ることを報告している。その後、Youn et al. (1991) の研究により、W-7 という薬物を用いて、筋収縮および高エネルギーリン酸化合物の減少を伴わない状態で細胞内Ca²⁺を上昇させても、ラット骨格筋の糖取り込み速度の亢進が生じることが示された。これらの研究は、筋収縮に伴うCa²⁺濃度の上昇が、インスリン非依存的な糖取り込み速度の亢進に関与している可能性を示唆するものである。最近では、その上昇したCa²⁺によって活性化されるCa²⁺/calmodulin依存性プロテインキナーゼ群 (CaMKs) とよばれる酵素が関与していることも報告されている (Brozinick et al. 1999, Wright et al. 2004, 2005)。

以上の主として実験動物を用いた先行研究から、運動 (筋収縮) は、インスリンに依存しない経路 (AMPK and/or CaMKs) によって GLUT-4 を細胞膜上へとトランスロケーションさせ、骨格筋へ糖を迅速に取り込んでいることが明らかにされている。また、この運動/筋収縮による糖取り込み速度の亢進は、運動終了後約 3 時間まで安静レベル以上に維持されていることが報告されており (Wallberg-Henriksson et al. 1988)、運動後の筋グリコーゲン再合成の初期段階に関与していると考えられている (Price et al. 1994)。

iii) 運動後の糖取り込み速度の亢進②—インスリン依存性—

運動後に、栄養素 (糖質) が摂取されると、骨格筋での糖取り込み活動に

重要なインスリンが膵臓ランゲルハンス島 β 細胞から分泌される。インスリンが骨格筋の細胞膜上の受容体に結合すると、インスリンシグナル経路が活性化される。その時、インスリン受容体基質-1 (Insulin Receptor Substrate-1; IRS-1) の自己リン酸化 \rightarrow PI3-キナーゼの活性化 \rightarrow Protein Kinase B (PKB もしくは Akt と呼ばれる) のリン酸化 (活性化) などを通して、最終的に GLUT-4 を細胞膜上へトランスロケーションさせる。

Gulve et al. (1990) は、ラットに水泳運動を行わせた後に骨格筋を摘出し、様々な濃度のインスリン刺激による糖取り込み速度を観察した。その結果、運動を行わせていない場合と比較して、運動を行ったラットの骨格筋では、最大下のインスリン刺激 ($30\sim 60\ \mu\text{U/mL}$) による糖取り込み速度が亢進することを報告している。この現象は、“インスリン感受性”の亢進と定義されている。栄養素 (糖質) の摂取により上昇した血中インスリン濃度は、2 時間程度で安静レベルへと回復してしまうが、運動後では“インスリン感受性”が亢進することによって、より低い血中インスリン濃度でも、骨格筋は糖を取り込み続けることができる。このインスリン感受性の亢進による糖取り込み活動によって、筋収縮刺激による糖取り込みの増強効果が消失した後 (運動終了 3 時間後) から運動の十数時間後まで、骨格筋はグリコーゲンを緩やかに再合成させることができ、最終的には超回復へと至ると考えられている (Price et al. 1994)。

運動によるインスリン感受性の亢進には、筋グリコーゲンの減少 (Richter et al. 1984) および血清由来の何らかの因子が必須であることが報告されている (Gao et al. 1994). また、上述した AMPK の活性化剤である AICAR とのインキュベーションにより、骨格筋のインスリン感受性が亢進することも報告されている (Fisher et al. 2002a). これらの結果から、インスリン感受性の亢進には、血清由来因子、筋グリコーゲンの枯渇に加え、AMPK の活性化が重要な因子であると考えられる.

また、インスリン感受性が亢進した状態の骨格筋においては、IRS-1 のリン酸化、PI3-キナーゼ、および PKB (Akt) リン酸化には影響が認められないものの (Fisher et al. 2002a, Hansen et al. 1998), インスリン刺激により、より多くの GLUT-4 が細胞膜へとトランスロケーションできるようになっていることが報告されている (Hansen et al. 1998). したがって、インスリン感受性の亢進には、上述した因子群が、インスリンシグナル経路ではなく、GLUT-4 をトランスロケーションさせる段階を増強させることで生じていると考えられる.

iv) グリコーゲン合成酵素の活性化

上述したような機序で骨格筋内へと取り込まれたグルコースは、その後、

ヘキソキナーゼによってリン酸化され、グルコース-6-リン酸 (G-6-P) となり、その後、UDP-グルコースに変換された後、グリコーゲン合成酵素 (GS) の働きによってグリコーゲンとして貯蔵される。

GS は、非刺激下においては、その上流に存在する Glycogen synthase Kinase 3 (GSK3) によってリン酸化され、不活性型に維持されている。インスリン刺激に伴う PKB の活性化は、GSK3 のリン酸化、すなわち不活性化を引き起こし、その結果、GS は脱リン酸化され活性型となる (Cohen 1999)。

さらに、細胞内に取り込まれたグルコースの中間代謝物である G-6-P は、GS とアロステリックに結合し、GS の分子構造を変化させることで、Phosphatase (脱リン酸化酵素) による GS の脱リン酸化 (活性化) を受けやすい状態にさせる (Figure 1 ; Ferrer et al. 2003)。以上のことから、GS 活性は GSK3 の不活性化および G-6-P 濃度の上昇という 2 つの経路により調節されていると考えられている。

3. 運動後の筋グリコーゲン超回復に関連した先行研究

序論でも述べたように、Bergström & Hultman (1966) の先行研究、そして、それから考えられたグリコーゲン・ローディングの方法より、筋グリコーゲン超回復に影響を及ぼすものとして 3 つの因子が考えられる。すなわち、1)

トレーニング状態, 2) グリコーゲン枯渇運動の運動様式, および 3) 回復期に摂取する糖質の種類である.

i) トレーニング状態

Henriksen et al. (1990) は, 骨格筋に存在する GLUT-4 濃度は, 筋の糖取り込み最大速度と比例的関係にあることを報告している. さらに, 運動トレーニングによって骨格筋の GLUT-4 が増加し, それにともない骨格筋の糖取り込み能力が向上することが, 数多くの研究により報告されている (Friedman et al. 1990, Goodyear et al. 1992, Ploug et al. 1990, Ren et al. 1994, Rodnick et al. 1990). したがって, 運動トレーニングにより GLUT-4 を増やすことは, 骨格筋の糖取り込み速度の亢進, さらにはグリコーゲン超回復のレベルを高めるために重要であると考えられる.

Nakatani et al. (1997) は, ラットに 6 時間の水泳運動トレーニングを 5 週間行わせ, 筋グリコーゲン超回復のレベルを検討している. その結果, 非トレーニング群と比較して, トレーニング群で筋グリコーゲン超回復のレベルが顕著に高められたことを報告している. ヒトにおいても同様に持続的トレーニングにより筋グリコーゲンの超回復のレベルが高められることが示されている (Greiwe et al. 1999, Hickner et al. 1997). これらの研究において, GLUT-4 濃度とグリコーゲン濃度の間に相関関係が認められたことから (Greiwe et al.

1999, Hickner et al. 1997), トレーニングに伴うグリコーゲン超回復の亢進が GLUT-4 の増加によるものだと考察されている。GLUT-4 は迅速に運動 (筋収縮) に適応的な応答をするタンパク質であり, ラットを用いた先行研究では, 6 時間の水泳運動を 2 日間行わせることで, その発現量が最大限 (約 2 倍) に増加することが報告されている (Ren et al. 1994)。したがって, 筋グリコーゲン超回復のレベルを高めるためには, 数日間のトレーニングで十分であると考えられる。

ii) グリコーゲン枯渇運動

Table 1 に, ヒトおよびラットを用いた先行研究において使用されたグリコーゲン枯渇運動をまとめた。これまでに行われた多くの研究では, 主に低～中強度で長時間にわたって行われる持久的運動, もしくは低～中強度の長時間運動と比較的高強度のスプリント運動を組み合わせる運動様式が用いられている。ヒトを対象とした高強度・短時間運動のみを用いた先行研究では, Fairchild et al. (2002) によって初めて, $130\% \dot{V}O_{2peak}$ の強度での 150 秒の自転車運動とそれに続く 30 秒の疲労困憊全力ペダリングという短時間の運動後においても, 筋グリコーゲンの超回復が生じることが報告されている。しかしながら, 多くの先行研究で用いられている低強度・長時間運動と高強度・短時間運動を直接

比較した研究はなく、どのような様式の運動が筋グリコーゲン超回復のレベルをより高めるのか明らかでない。

iii) 摂取する糖質の種類

Blom et al. (1987) は、液体のみの摂取で、運動 6 時間後までのグリコーゲン再合成には、グルコースとスクロースが、フルクトースよりも効果的であることを報告している。フルクトースは、小腸で吸収され、門脈を通過して肝臓に輸送され、そこでグルコースに変換された後に代謝されることが知られており (Zakin et al. 1969)、筋グリコーゲン再合成速度に及ぼす影響は、グルコースよりも弱いことが報告されている (Van Den Bergh et al. 1996)。しかしながら、グルコース (もしくはグルコースポリマー) とスクロースの 2 種類による比較では同程度であるとする研究 (Blom et al. 1987, Casey et al. 2000) が存在する一方で、グルコースポリマーの方が筋グリコーゲンの回復速度が速いとする報告 (Bowtell et al. 2000) もあり、一致した見解が得られていない。この相違に関しては、スクロースがグルコースとフルクトースとが結合した二糖類であることから、スクロースを多量に摂取し、そこに含まれるグルコースの量が一定の値を超えるような場合には、グルコースとスクロースで同程度の筋グリコーゲン合成速度となる可能性が示唆されている (Jentjens &

Jeukendrup 2003).

運動後の筋グリコーゲン再合成に関しては、これらの先行研究を筆頭に数多くなされているが、これらの研究は、筋グリコーゲン超回復が生じていない状態の回復過程を検討したものであり、筋グリコーゲンが超回復といえるレベルにまで回復した場合、摂取する糖質の種類の違いがどのような影響をおよぼすのか明らかでない。先述した Nakatani et al. (1997) の研究では、ラットに対して、通常飼料に加え 5%のスクロース溶液を自由摂取にて補助的に摂取させて筋グリコーゲン超回復を検討したものであるが、他の糖質との比較は行っていない。したがって、特にトレーニングを行なった場合において、筋グリコーゲン超回復を効果的に引き起こす糖質の種類は未だ明らかでない。

Table 1. Summary of glycogen-depleting exercise in previous studies.

<i>Human</i>				
Reference	mode	intensity	duration	additional exercise
Costill et al.(1990)	cycle ergometer	70% VO2max	60min	none
Adamo et al.(1998)	cycle ergometer	70% VO2max	to exhaustion	none
James et al.(2001)	cycle ergometer	64%(male), 62%(female) VO2peak	98min(male), 92(female)min	none
Zawadzki et al.(1992)	cycle ergometer	60–85% VO2max	120min	none
Greiwe et al.(1999)	cycle ergometer	75% VO2peak	30min × 4 bouts (4min rest)	100% VO2peak 1min × 5 sprints (3min rest)
Hickner et al.(1997)	cycle ergometer	75% VO2peak	30min × 4 bouts (4min rest)	100% VO2peak 1min × 5 sprints (3min rest)
Burke et al.(1993)	bicycle on a wind trainer	75% VO2peak	120min	30s × 4 all-out sprints (2min rest)
Burke et al.(1995)	bicycle on a wind trainer	75% VO2peak	120min	30s × 4 all-out sprints (2min rest)
Burke et al.(1996)	bicycle on a wind trainer	75% VO2peak	120min	30s × 4 all-out sprints (2min rest)
Ivy et al.(2002)	cycle ergometer	65–75% VO2max	120min	1min sprint (1min rest) until plasma glucose levels <3.89mmol/L
Goforth et al.(1997)	cycle ergometer	75% VO2peak (70rpm)	115min	1min × 3 sprints (80rpm) (1min rest)
Goforth et al.(2003)	cycle ergometer	65% VO2peak (70rpm)	120min	120% VO2peak sprints (90rpm) 1min interval to exhaustion
Bowtell et al.(2000)	cycle ergometer	70% VO2max	30min	140% VO2max 1min × 6 sprints (2min rest) + 70% VO2max 45min
<i>Fairchild et al.(2002)</i>	<i>cycle ergometer</i>	<i>130% VO2peak</i>	<i>150s</i>	<i>30-s all-out sprint</i>
<i>Rat</i>				
Gaesser & Brooks(1980)	run	27m/min (15% grade)	to exhaustion	none
Garetto et al.(1984)	run	18m/min	43min	36m/min × 2min
Bruce et al.(2001)	swim	with a weight equal to 2.5% BM (during 2–8 bouts)	30min × 8 bouts(5min rest)	none
Conlee et al.(1987)	swim	with a weight equal to 1–2% BM	90min	none
Hespel & Richter(1990)	swim	with a weight equal to 2.5% BM	120min	none
Derave et al.(2000)	swim	with a weight equal to 5% BM	120min	none
Nielsen et al.(2001)	swim	with a weight equal to 5% BM	120min	none
Nakatani et al.(1997)	swim	with a weight equal to 2% BM (during 2–4 bouts)	30min × 4 bouts (5min rest)	none
Kuo et al.(2004)	swim	non-load	360min × 2bouts(45min rest)	none

BM; body mass

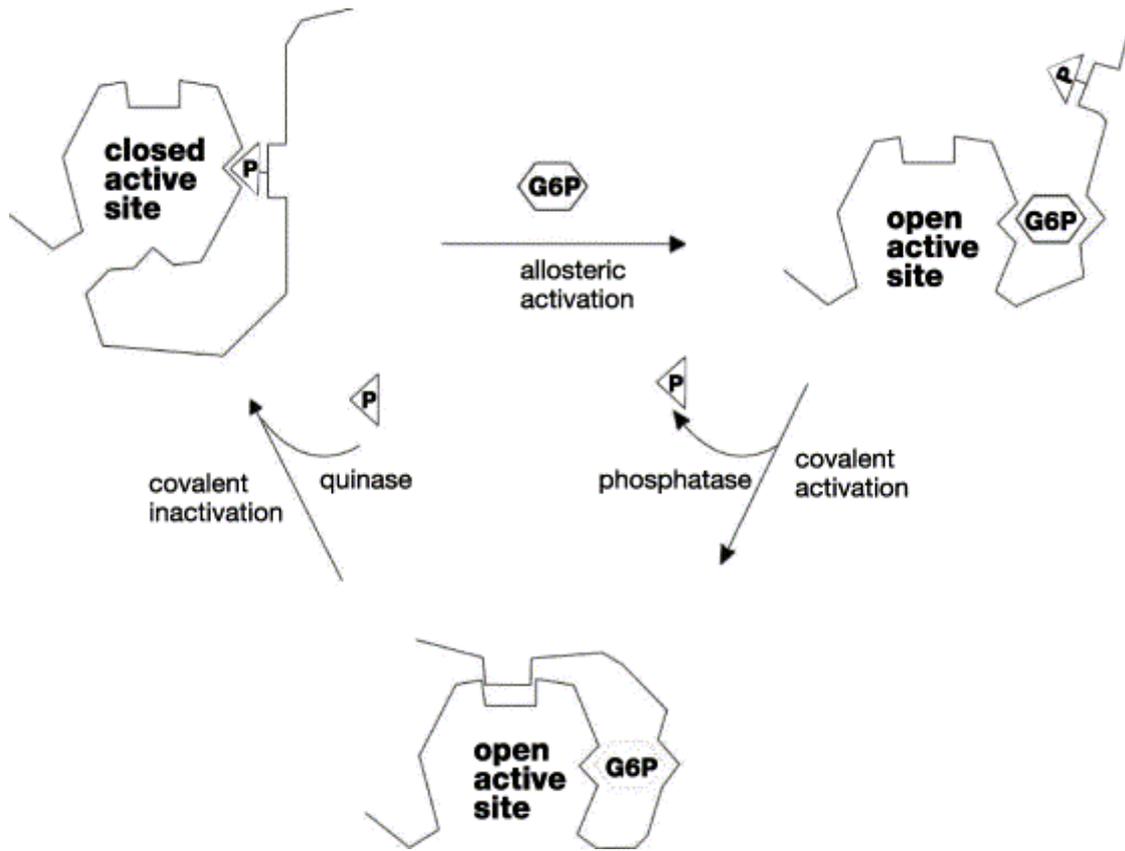


Figure 1. Schematic representation of the allosteric and covalent activation of GS. Binding of Glc-6-P to phosphorylated inactive GS causes a conformational rearrangement that allosterically activates the enzyme and simultaneously exposes the phosphorylated residues of the protein. Dephosphorylation of these residues produces an active enzyme, which does not need the presence of Glc-6-P to maintain its active conformation.

(Ferrer et al. *FEBS Letters* 2002)

研究課題 1

『摂取する糖質の違いが運動後の筋グリコーゲン超回復に及ぼす影響』

1. 緒言

筋グリコーゲンは、高強度や持久的な運動中の主要なエネルギー源である。ヒトの筋グリコーゲン濃度の減少と、疲労の発現に正の相関関係があることが示されており、その点から、運動前の筋グリコーゲン貯蔵量は持久運動パフォーマンスに関係していることが示されている (Ahlborg et al. 1967, Bergström et al. 1967)。Bergström & Hultman (1966) の研究において、グリコーゲンを減少させるような運動後に、高炭水化物食を摂取することで、筋グリコーゲンは安静レベルを超えるまでに超過回復することが示されている。この筋グリコーゲンの過度の蓄積は、グリコーゲン超回復とも呼ばれ、今日では、持久性アスリートの競技前の準備期に利用されている。

先行研究では、筋グリコーゲン超回復をより高めるための運動・栄養アプローチが検討されている。Nakatani et al. (1997) は、ラットを用いた研究で、運動トレーニングにより、糖輸送体 GLUT-4 含量を増加させることで、グリコーゲン枯渇運動後の筋グリコーゲン超回復のレベルが高まることを報告してい

る。彼らの研究において、グリコーゲン枯渇運動後のラットには、通常の飼料に加えて、5%のスクロース水を摂取させている。しかしながら、摂取する糖質の違いが、筋グリコーゲン超回復のレベルに及ぼす影響は必ずしも明らかではない。グリセミック・インデックス (Glycemic Index: GI) は、スクロースよりもグルコースの方が高いことが知られており (Foster-Powell & Miller 1995), これは、グルコースの方が、糖取り込みとグリコーゲン合成酵素を活性化するインスリンの分泌作用がより強い可能性を示唆している。

それゆえ、グルコースの補助的な摂取がスクロースと比較してより高い筋グリコーゲン超回復を引き起こすと仮説し、グルコースとスクロースの補助的摂取の影響を比較検討することを本研究課題の目的とした。

2. 方法

A. 実験動物と飼育条件

本実験では 5 週齢（体重 90~110g）の Sprague-Dawley (SD) 系雄ラットを日本クレア株式会社から購入した。室温 25°C，湿度 30%，23-11 時を暗期に設定した飼育室において，ステンレス製ワイヤーケージに 2 匹ずつ入れて飼育した。飼料はラット用固形飼料（CE-2，日本クレア株式会社）を，飲水として水道水を用い，ともに自由摂取とした。

入荷翌日から 2 日間，1 日 10~15 分間の無負荷での水泳運動を全てのラットに行わせ，水泳運動に慣れさせた。水泳運動は水深 45cm，水温 34~36°C に調節したポリバケツに 8 匹ずつ泳がせた。ラット 1 匹当りの水表面積は 180cm²であった。

尚，本実験は，早稲田大学スポーツ科学部動物実験委員会の承認を得て行った。

B. 水泳運動トレーニング

ラットのトレーニングには Ren et al. (1994) の水泳運動モデルを用いた。水泳運動は，上記の方法で無負荷で 3 時間の水泳運動を 45 分間の休憩をはさみ 2 セット行わせるトレーニングを 1 日 1 回，7 日間連続して行わせた。この

トレーニングにより、ラット骨格筋の GLUT-4 発現量が最大限に高められることが報告されている (Ren et al. 1994, Terada et al. 2001)。

最終日のトレーニング終了後、固形飼料および水を 1 時間自由摂取させた後、固形飼料をラット 1 匹当たり 8g に制限した。

C. グリコーゲン枯渇運動

最終トレーニングの翌日 (最終トレーニング後 17~19 時間) にグリコーゲン枯渇運動を行わせた。水温 34~36°C に調節した水を 70L のポリバケツに水深 45cm になるまで入れ、体重の 3% に相当する錘をつけ、8 匹同時に 4 時間の水泳運動を行わせた。ラット 1 匹当りの水表面積は 180cm²であった。

D. 群分け

グリコーゲン枯渇運動終了後から回復期間中は、通常の固形飼料 (CE-2) に加え、5% グルコース溶液 (GLU 群)、及び 5% スクロース溶液 (SUC 群) のいずれかを自由摂取させた。また、コントロールとして、固形飼料に加えて蒸留水を摂取させる群 (CON 群) を設けた。CE-2 の組成は、エネルギー比でタンパク質 29% (ホワイトフィッシュミール, 大豆粕, 酵母)、脂肪 12% (大豆油, 胚芽)、糖質 59% (小麦, トウモロコシ, マイロ) である。また、CE-2

には、繊維（アルファルファミール）、ビタミン類（ビタミンA, D3, E, B₂, B₆, B₁₂, パンテトン酸カルシウム, ナイアシン, 葉酸, 塩化コリン), およびミネラル類（炭酸カルシウム, 塩化ナトリウム, 硫酸第一鉄, 炭酸マンガン, 硫酸コバルト）が添加されていた。

尚, 回復期間中の食餌量および飲水量を計測した。

E. サンプル採取

6 時間および 24 時間の回復期間後に解剖を行った。解剖に際し, ペントバルビタールナトリウム (5mg/100g) を腹腔内注射した。数分後, 尾部圧迫の際の反射が見られないことを確認した後, 心臓からシリンジにて採血した。その後, 速やかに前肢骨格筋滑車上筋 (epitrochlearis ; Epi) を摘出した。本研究ではラットに水泳運動を負荷しており, この運動に主に動員される Epi を骨格筋サンプルとして用いた。血液は遠心して血漿を分離した後に冷凍庫 (-50°C) にて保存した。骨格筋は結合組織などをトリミングした後, 液体窒素中で十分に冷却したトンダ (圧縮用鋏) で凍結し, 測定の時まで-70°Cで保存した。

F. 血漿グルコース・インスリン濃度の測定

血漿グルコース濃度は, ムタロターゼ・GOD 法に基づき, グルコース C II

-テストワコー（和光純薬工業株式会社）を用いて測定した。血漿インスリン濃度は、Rat用ELISA-kit（Mercodia AB）を用いて測定した。

G. および筋グリコーゲン濃度の測定

筋グリコーゲン濃度の測定は、Lowry and Passonneau (1972) の方法に基づき、以下の手順で測定した。

1) ホモジネートの調整

ホモジナイズバッファーとして 0.3M に調整した過塩素酸（PCA）を用いた。PCA 1mL に骨格筋約 20~50mg を入れ氷中にてホモジナイズした。このホモジネート（50 μ l）に 0.5mL の塩酸を加え、100°C で 2 時間インキュベートした。これにより、グリコーゲンの α -1,4-グルコシド結合を酸加水分解し、全てのグリコーゲンからグルコース分子へと分解した。また、インキュベート中では、サンプルを 1 時間毎に震盪して混和した。加熱終了後のホモジネートは室温で冷却した後、1M の水酸化ナトリウム 0.5mL を加え中和した。

2) 試薬の調整

溶液 I は 0.2mM のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADP）、5mM のアデノシン三リン酸（ATP）、0.1M の Tris HCl を蒸留水に順次溶解させ、pH を 7.6 に調整した。また、溶液 II は酵素液としてヘキソキ

ナーゼ (hexokinase) 320 単位, グルコース 6 リン酸脱水素酵素 (G6P-DH) 160 単位を準備した.

また, グルコース標準液 (500mg/l) を $10\ \mu\text{l}$, $25\ \mu\text{l}$, $50\ \mu\text{l}$ ずつ使い, $0\ \mu\text{g}$, $5\ \mu\text{g}$, $12.5\ \mu\text{g}$, および $25\ \mu\text{g}$ の 4 点より検量線を求めた.

3) 蛍光強度測定

測定原理を Figure 1 に示した. 対象となる測定物は還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) であり, 340nm の吸光度を測定した. 本研究においてはマイクロプレートリーダー (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter, Inc.) を用いた. まず, マイクロプレートの各ウェルに溶液 I を $100\ \mu\text{L}$, 中和したホモジネートを $200\ \mu\text{L}$ 注入した. これをパラフィルムで蓋をして 3~4 回震盪した後, マイクロプレートリーダーにセットし, ベースラインとなる吸光度を測定した. 次に, 溶液 II を $2\ \mu\text{L}$ ずつ注入し, 再びパラフィルムで蓋をして震盪し, 10 分後の吸光度を測定し, ベースラインからの変化量 (Δ) を求めた. 予め作成した検量線より, 筋湿重量あたりのグリコーゲン濃度 ($\mu\text{mol/g wet tissue}$) を求めた.

H. 統計処理

本実験で得られたデータはすべて平均値±標準誤差で表した. 糖質の種類

と回復時間の 2 要因の二元配置分散分析を行った。分散分析の結果、有意差が認められた場合、Post hoc test には Holm-Sidak の方法を用い、危険率が 5% 未満を以って有意とした。

3. 結果

1) 体重

Table 1 にグリコーゲン枯渇運動 6 時間及び 24 時間後の体重を示した。運動 24 時間後の体重は、6 時間後と比較して有意に高値を示した ($P < 0.01$)。糖質の種類の違い 3 群間の体重に有意差は認められなかった。また、糖質の種類と回復時間の交互要因も認められなかった。

2) 血漿グルコースおよびインスリン濃度

24 時間のグリコーゲン回復後の血漿グルコース濃度は、6 時間の回復後の値と比較して、有意に低値を示した ($P < 0.001$)。血漿のグルコースおよびインスリン濃度に、群間の違いは認められなかった (Table 1)。また、糖質の種類と回復時間の交互要因も認められなかった。

3) 食餌量、飲水量および総糖質摂取量 (Table 2)

CON 群の食餌量と飲水量は GLU 群および SUC 群と比較して有意に高値を示した ($P < 0.001$; food, $P < 0.01$; fluid)。食餌量および飲水量に関して、SUC 群と GLU 群の間に有意差は認められなかった。摂取した餌および糖質飲料から計算した総炭水化物摂取量には、3 群間に違いは認められなかった。これら

の測定項目に関して、糖質の種類と回復時間の交互要因も認められなかった。

4) 筋グリコーゲン濃度

4 時間のグリコーゲン枯渇運動後のラット前肢骨格筋 *epitrochlearis* のグリコーゲン濃度は $5 \pm 1 \mu\text{mol/g wet tissue}$ (n=6) であり、運動前の値 ($46 \pm 4 \mu\text{mol/g wet tissue}$, n=8) より顕著に減少していた。

GLU 群(P<0.001)およびSUC 群(P<0.05)の筋グリコーゲン濃度は、CON 群と比較して有意に高いレベルに回復していた (Figure 2)。さらに、SUC 群と比較して GLU 群の筋グリコーゲン濃度は、有意に高値を示した (P<0.01)。回復 6 時間後と 24 時間後のグリコーゲンレベルに違いは認められなかった。また、糖質の種類と回復時間の交互要因も認められなかった。

4. 考察

本研究の主な知見は、グルコースの補助的な摂取が、ラット骨格筋において、筋グリコーゲン超回復をより効果的に引き起こしたことである。

食餌由来の炭水化物の吸収は、胃を経由して小腸で行われる。いくつかの研究では、ラットにおいて、小腸での糖質の吸収に日内変動が存在する可能性が示唆されている (Fisher & Gardner 1976, Furuya & Yugari 1974)。それゆえ、本研究課題では、ラットに対してゾンデによる強制摂取でなく自由摂取させた。その結果、CON 群の食餌および飲水量は、いずれも他の 2 群と比較して多かった (Table 2)。しかしながら、24 時間の総炭水化物摂取量は、3 群とも同程度であった (CON $17.2 \pm 0.5\text{g}$, CLU $18.2 \pm 0.3\text{g}$, SUC $18.2 \pm 0.2\text{g}$)。これらの結果から、本研究のグリコーゲン回復量の違いは、炭水化物摂取量以外の要因に起因すると考えられる。

ヒトを対象にした先行研究では、運動後比較的短時間 (2- to 6-h) のグリコーゲン再合成に、グルコースおよびスクロースの溶液摂取がどのように影響を及ぼすかを検討している (Blom et al. 1987, Bowtell et al. 2000)。しかしながら、それらの研究の回復後のグリコーゲン濃度は、運動前のレベルにも回復しておらず、摂取する糖質の違いが筋グリコーゲン超回復に及ぼす効果は未だ不明であった。本研究では、回復期の総糖質摂取量には 3 群間に違いが認めら

れなかったにもかかわらず，GLU 群の筋グリコーゲン濃度は，他の 2 群と比較して有意に高値を示した (Figure 1)．したがって，本研究課題は，ラットを用いたものであるが，運動後の筋グリコーゲン超回復のレベルをより高めるためには，グルコースの補助的摂取がスクロースと比較してより効果的であることを初めて示したものである．

グリセミック・インデックス (GI 値) がスクロース (approx. 65, as described by Foster-Powell & Miller 1995) と比較してグルコース (GI:100) で高値であるために，膵臓からのインスリン分泌量は，SUC 群よりも GLU 群で高かったことが推察できる．インスリンは骨格筋での糖取り込みを促進しグリコーゲン合成酵素を活性化する．したがって，グルコース摂取によって，膵臓でのインスリン分泌がより多かったために，より高い筋グリコーゲンの回復量がもたらされたものと推察される．しかしながら，3 群間の血漿インスリン濃度に違いは認められなかった (Table 2)．この理由としては，本研究においては，ラットに自由摂取を行わせたために，インスリン濃度に大きなばらつきが生じたことに起因する方法論上の問題があるのかもしれない．

本研究で用いたラットの通常固形飼料 (CE-2) の炭水化物源は主にスターチであった．本研究での総炭水化物摂取量は，3 群ともに同程度であったが，その中で，グルコースおよびスクロースの占める割合は 20%程度であった．今

後、より高濃度のグルコース食およびスクロース食がグリコーゲン超回復に及ぼす影響を検討する必要があるかもしれない。

結論として、ラット骨格筋において、運動後に補助的に摂取する糖質としては、スクロースと比較してグルコースの方がより効果的にグリコーゲン超回復を引き起こすことが明らかになった。

Table 1. Body weight, plasma glucose and plasma insulin concentrations at 6-h and 24-h after a glycogen-depleting exercise.

	<i>Recovery</i>	<i>Group</i>		
	<i>Time</i>	CON	GLU	SUC
<i>Body weight (g)</i>	<i>6 h</i>	183± 2	182± 3	181± 3
	<i>24 h[†]</i>	193±5	192± 2	191± 2
<i>Plasma glucose (mg/100mL)</i>	<i>6 h</i>	205± 6	211± 5	245±26
	<i>24 h[‡]</i>	170± 4	185±13	173± 5
<i>Plasma insulin (μ U/mL)</i>	<i>6 h</i>	81±30	86±22	93±30
	<i>24 h</i>	64±11	97±31	64±13

Values are means±SE. CON; distilled water. SUC; 5% sucrose solution. GLU; 5% glucose solution. Significant effect of recovery time, [†]; $p<0.01$, [‡]; $p<0.001$, vs. 6 h

Table 2. Food, fluid, and total carbohydrate consumption during 6 h and 24 h recovery period.

	<i>Recovery</i>	<i>Group</i>		
	<i>time</i>	CON	GLU	SUC
<i>Food intake (g)</i>	<i>6 h</i>	18.8±0.9 **	15.9±0.4	16.4±0.3
	<i>24 h[†]</i>	34.0±1.0 **	28.8±0.8	29.4±0.5
<i>Fluid intake (mL)</i>	<i>6 h</i>	34.5±2.1 *	31.8±1.0	32.4±1.7
	<i>24 h[†]</i>	75.5±2.1 *	65.5±2.3	64.9±1.9
<i>Total CHO intake (g)</i>	<i>6 h</i>	9.5±0.5	9.6±0.3	9.9±0.2
	<i>24 h[†]</i>	17.2±0.5	18.2±0.3	18.2±0.2

Values are means±SE. CON; distilled water. SUC; 5% sucrose solution. GLU; 5% glucose solution. Significant effect of recovery time, [†]; $p < 0.001$, vs. 6 h. Significant effect of supplementation, *; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$, vs. GLU and SUC.

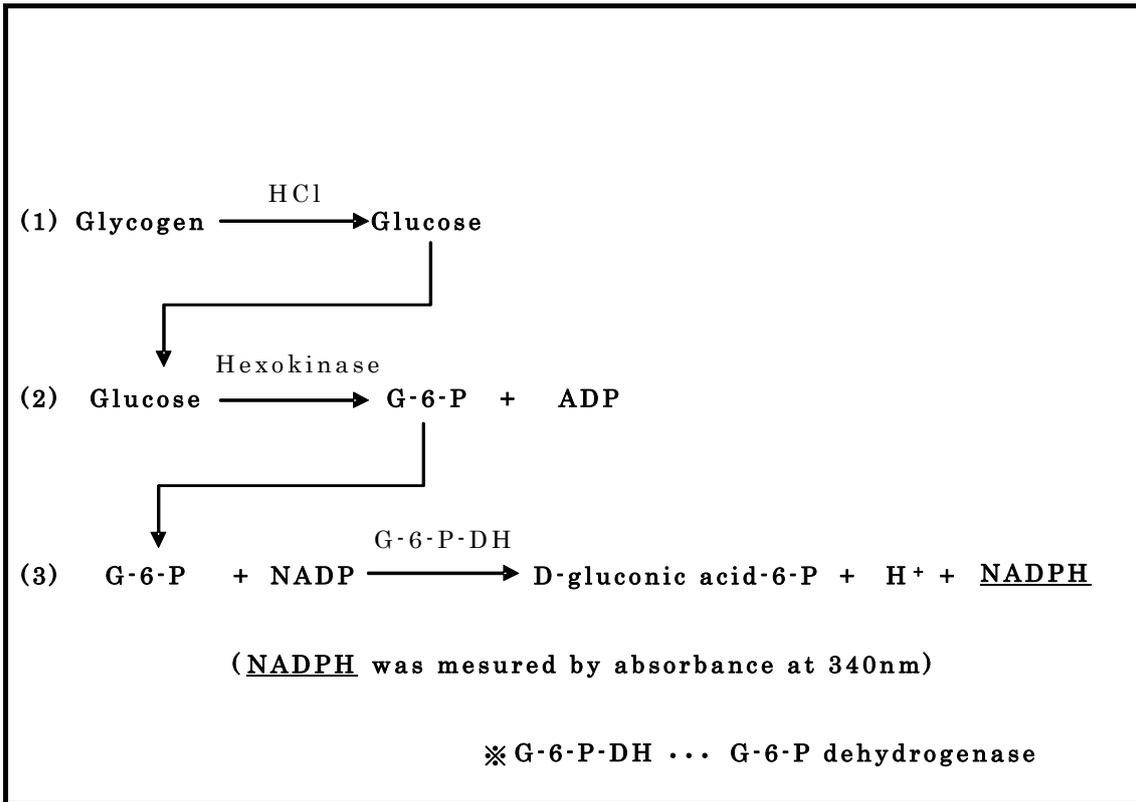


Figure 1. Principle of glycogen concentration measurement

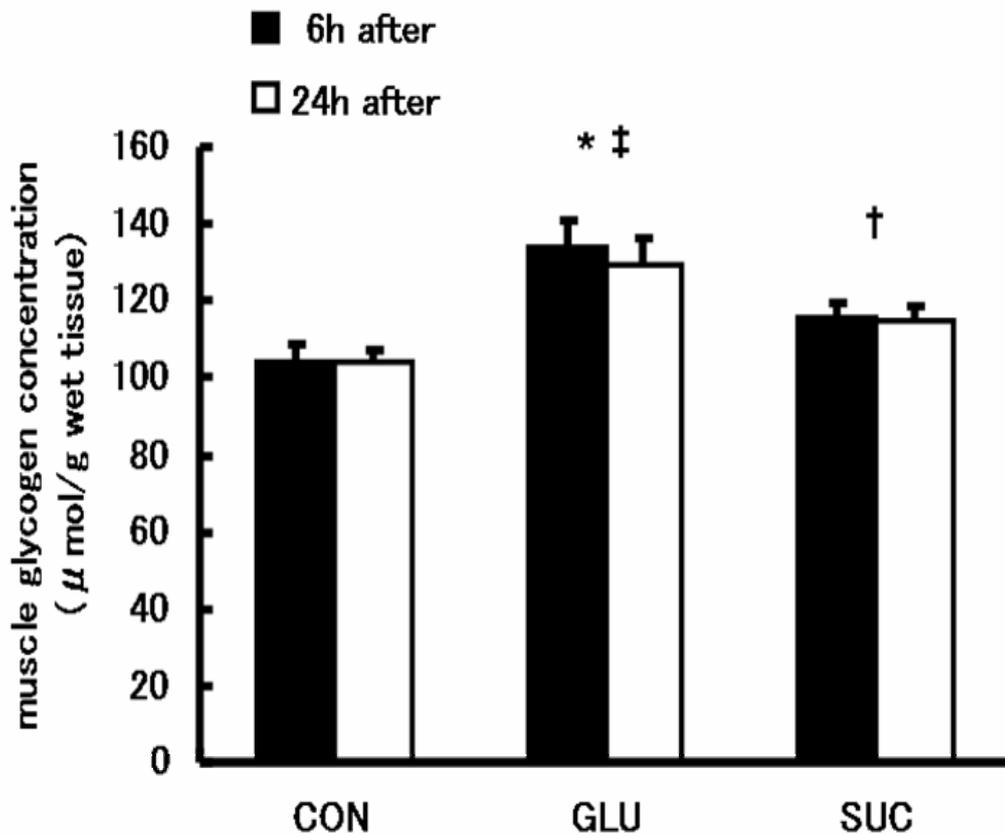


Figure 2. Effects of different carbohydrate supplements on muscle glycogen concentration in the rat epitrochlearis muscle at 6 h and 24 h after the depletion exercise. CON; distilled water. GLU; 5% glucose solution. SUC; 5% sucrose solution. Values are means \pm SE. There was significant effect of group ($p < 0.001$). † and ‡ indicate significant differences from the CON group at the level of $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively. * indicates a significant difference from the SUC group at a level of $p < 0.05$.

4章 研究課題 2

『グリコーゲン枯渇運動の運動強度の違いが運動後の 筋グリコーゲン超回復に及ぼす影響』

—高強度・短時間運動と低強度・長時間運動の比較—

1. 緒言

Bergström & Hultman (1966) は、グリコーゲン超回復が、運動に動員された筋においてのみ生じることを報告している。それゆえ、グリコーゲン超回復には、運動（筋収縮）によって、一旦筋グリコーゲンを減少させることが必要であると考えられている。多くの実験動物もしくはヒトを対象とした先行研究では、低～中強度の運動によって筋グリコーゲンを減少させている (Adamo et al. 1998, Bruce et al. 2001, James et al. 2001, Nakatani et al. 1997)。しかしながら、高強度の間欠的な短時間運動によっても、筋グリコーゲン超回復を生じさせることが可能かどうかは明らかではない。先行研究によって、骨格筋での糖取り込み速度が、グリコーゲンの蓄積の程度や速度に影響を及ぼすことが示唆されている (Greiwe et al. 1999, Hickner et al. 1997, Nakatani et al. 1997)。さらに、高強度・間欠的短時間水泳運動は、ラット骨格筋におけるグリコーゲン濃度を迅速に、また十分に減少させ、その後の骨格

筋糖取り込み速度を顕著に上昇させることが報告されている (Kawanaka et al. 1998). したがって、高強度・間欠的短時間運動後によるグリコーゲン枯渇運動は、低強度・長時間運動と同程度、もしくはそれ以上の筋グリコーゲン超回復を引き起こすことが可能であると考えられる.

そこで、本研究では、ラット骨格筋において、グリコーゲン枯渇運動としての高強度・間欠的短時間運動と低強度・長時間運動がグリコーゲン超回復に及ぼす影響を比較検討することを目的とした.

2. 方法

A. 実験動物と飼育条件

本実験では 5 週齢（体重 90～110g）の Sprague-Dawley (SD) 系雄ラットを日本クレア株式会社から購入した。室温 25°C，湿度 30%，23－11 時を暗期に設定した飼育室において，ステンレス製ワイヤーケージに 2 匹ずつ入れて飼育した。飼料はラット用固形飼料（CE-2，日本クレア株式会社）を，飲水として水道水を用い，ともに自由摂取とした。

入荷翌日から 2 日間，1 日 10～15 分間の無負荷での水泳運動を全てのラットに行わせ，水泳運動に慣れさせた。水泳運動は水深 45cm，水温 34～36°C に調節した 70L のポリバケツに 8 匹ずつ（水表面積 180cm²/rat）泳がせるものであった。

尚，本実験は，早稲田大学スポーツ科学部動物実験委員会の承認を得て行った。

B. 群分けおよびグリコーゲン枯渇運動

ラットのトレーニングには研究課題 1 と同様に，Ren et al. (1994) の水泳運動モデルを用い，上記の方法により泳がせた水泳運動は，無負荷で 3 時間の水泳運動を 45 分間の休憩をはさみ 2 セット行わせるトレーニングを 1 日 1 回

行わせた。トレーニング期間は7日間とした。最終日のトレーニング終了後、固形飼料および水を1時間自由摂取させた後、固形飼料をラット1匹当たり8gに制限した。

最終トレーニングの翌日（最終トレーニング後17～19時間）に、全てのラットを無作為に高強度運動群（HIGH）、低強度運動群（LOW）の2群に分け、それぞれグリコーゲン枯渇運動を行わせた。

HIGH群には、水温34～36℃に調節した水を、直径36cmのポリバケツに水深30cmになるまで入れ、体重の18%の錘をつけての高強度・間欠的短時間運動を1匹ずつ行わせた（水表面積1017cm²/rat）。運動時間は、30秒間の水泳運動を30秒の休憩をはさんで20セット行わせた。総運動時間は10分間であった。

LOW群には、研究課題1と同様に、水温34～36℃に調節した水を70Lのポリバケツに水深45cmになるまで入れ、体重の3%に相当する錘をつけ、8匹同時に（水表面積180cm²/rat）4時間の水泳運動を行わせた。

予備実験により、両群ともに、この水泳運動でほぼ疲労困憊になるような運動強度および時間に設定した。

各群それぞれ、グリコーゲン枯渇運動直後に解剖する群（0h）、運動終了後2、6、および24時間にわたってグリコーゲンを回復させた後に解剖を行う群

(2h, 6h, 24h)の4つのサブグループに分けた。回復期間中は、通常飼料(CE-2)に加えて、5%グルコース溶液を自由摂取させた。尚、回復期間中の食餌量および飲水量を計測した。

C. サンプル採取

上記したタイミングで解剖を行い筋サンプルを採取した。解剖に際し、ペントバルビタールナトリウム(5mg/100g)を腹腔内注射した。数分後、尾部圧迫の際の反射が見られないことを確認した後、速やかに前肢滑車上筋(Epi)を摘出した。筋は結合組織などをトリミングした後、液体窒素中で十分に冷却したトング(圧縮用鋏)で凍結し、測定の時まで-70°Cで保存した。

D. 筋グリコーゲン濃度の測定

筋グリコーゲン濃度の測定は、Lowry & Passonneau (1972)の方法に基づいて測定した。

E. 統計処理

本実験で得られたデータはすべて平均値±標準誤差で表した。運動強度と回復時間の2要因の二元配置分散分析を行った。分散分析の結果、有意差が認

められた場合、Post hoc test には Holm-Sidak の方法を用い、危険率が 5%未満を以って有意とした。

3. 結果

Table 1 に示したように、HIGH 群と LOW 群の体重に有意差は認められなかった。回復 6 時間後および 24 時間後の体重は、枯渇運動直後および回復 2 時間後と比較して有意に高値を示した ($P<0.001$)。枯渇運動直後と回復 2 時間後、もしくは回復 6 時間後と 24 時間後の体重には、それぞれ違いは認められなかった。また、体重に関して、運動強度と回復時間の交互要因は認められなかった。

Table 2 に示したように、いずれの回復期間中においても、食事量、飲水量およびそれらから算出された総炭水化物摂取量には、運動強度による違いは認められなかった。また、回復期間の延長に伴い、全ての項目が漸増していた ($P<0.001$)。いずれの項目に関しても、運動強度と回復時間の交互要因は認められなかった。

同週齢の 7 日間の水泳運動によってトレーニングされたラットにおける、安静状態の筋グリコーゲン濃度は $83.7 \pm 6.9 \mu\text{mol/g wet weight}$ ($n=4$) であった。Figure 1 に示したように、いずれのグリコーゲン枯渇運動においても、安静状態と比較してそれぞれ 77% (HIGH) および 76% (LOW) 筋グリコーゲン濃度が減少していた。回復 2 時間後において、筋グリコーゲンはほぼ安静レベルにまで回復していた。また、いずれの回復時間後 (2h, 6h, 24h) の筋

グリコーゲン濃度も、枯渇運動直後と比較して有意な高値を示した ($P<0.001$)。回復 6 時間後においては、両枯渇運動群ともに筋グリコーゲン超回復が得られ、安静レベルと比較してそれぞれ 47% (HIGH) および 62% (LOW) 高値を示した ($P<0.01$; HIGH, $P<0.001$; LOW)。回復 6 時間後および 24 時間後の筋グリコーゲン濃度は、回復 2 時間後と比較して有意に高いレベルにまで回復していた ($P<0.001$)。回復 6 時間後と 24 時間後の筋グリコーゲン濃度に違いは認められなかった。いずれの時間においても、筋グリコーゲン濃度に運動強度の違いは認められず、筋グリコーゲン濃度に関しては、運動強度と回復時間の交互要因は認められなかった。

4. 考察

本研究の主な知見は、実際の運動時間が 10 分間という非常に短時間の高強度・間欠的運動が、4 時間という長時間の低強度運動と同程度の筋グリコーゲン超回復を生じさせたことである。

Fairchild et al. (2002) は、高強度の短時間運動が骨格筋のグリコーゲン超回復に及ぼす影響をヒトを対象として検討している。彼らの研究において、被験者は $130\% \dot{V}O_{2peak}$ の強度での 150 秒の自転車運動とそれに続く 30 秒の疲労困憊全力ペダリングを行っている。彼らの研究では、筋グリコーゲンの超回復は認められたものの（運動前： 109.1 ± 8.2 ，回復後： 198.2 ± 13.1 mmol/kg wet weight），低強度運動との比較を行っていないため、どちらの運動形態がより効果的に筋グリコーゲンの超回復を生じさせるのかは明らかではなかった。本データは、高強度・間欠的短時間運動が、筋グリコーゲン超回復のための最大刺激とされてきた低強度・長時間運動と同程度の筋グリコーゲン超回復を生じさせることを初めて示したものである。

低強度運動は、筋グリコーゲンを減少させるために長時間を必要とするため、アスリートにとって、通常のトレーニングプログラムの消化を制限するものであるかもしれない。しかしながら、本研究ではラットを対象としているが、総所要時間 20 分の高強度・間欠的運動が、4 時間という長時間の低強度運動と

同程度にまで筋グリコーゲンを減少させた (Figure 1). MacDougall et al.

(1977) は、ヒトを対象にした研究で、総運動時間 6~16 分の高強度・間欠的自転車運動によって、筋グリコーゲン濃度を運動前から 72%減少させることを報告しており、ヒトにおいてもラットと同様に、高強度・間欠的運動が筋グリコーゲンを減少させる十分な刺激となることが考えられる。これらのことから、高強度運動を用いたグリコーゲン・ローディング手法は、アスリートにとっての新たな選択肢となる可能性があるだろう。

先行研究によって、骨格筋での糖取り込み速度がグリコーゲンの蓄積の程度や速度に大きく影響を及ぼすことが示唆されている (Greiwe et al. 1999, Hickner et al. 1997, Nakatani et al. 1997)。さらに、多くの先行研究によって、骨格筋のグリコーゲン濃度と糖取り込み速度の間に負の相関関係が報告されている (Derave et al. 1999, Hargreaves et al. 1992, Kawanaka et al. 1997)。

Figure 1 に示したように、いずれの強度の運動も、同程度に、そして十分に筋グリコーゲンを減少させていた。それゆえ、いずれの運動後においても、同程度に糖取り込み速度が亢進されたと推察でき、その結果として、同程度の筋グリコーゲン超回復が生じたと考えられる。本研究は、運動によって筋グリコーゲンを十分に減少させることが出来れば、グリコーゲン枯渇運動の運動強度や時間に関わらず、筋グリコーゲン超回復を生じさせる前提条件が整う可能性を

示唆している。

Van Beekvelt et al. (2001) は、ヒトでの研究で、運動後早期（～10分）の筋血流量が運動強度に依存する可能性を示唆している。それゆえ、本研究において、回復期の早期では、HIGH 群の方が LOW 群と比較して筋へのグルコース取り込み量が多かった可能性が考えられる。しかしながら、本研究課題では、回復 2 時間後の筋グリコーゲン濃度に、運動強度による違いが認められなかった (Figure 1)。さらに、Rhéaume et al. (2003) は、90 分の自転車運動後の下肢の血流量は、運動後のグリコーゲンの合成に影響を及ぼさない可能性を示唆している。以上のことから、骨格筋における運動後のグリコーゲン再合成に関して、血流量は強力な規定因子とはなりえないと考えられる。

本研究では、筋グリコーゲン超回復を生じさせた後の、運動パフォーマンスを評価していない。したがって、どちらのグリコーゲン枯渇運動が、より運動パフォーマンスを向上させるかは明らかでない。グリコーゲン枯渇運動の運動強度が、その後の運動パフォーマンスに及ぼす影響に関しては更なる研究が必要である。また、本研究では、HIGH 群および LOW 群ともに、運動強度・時間を疲労困憊に至るレベルに設定した。実際のスポーツの場面を想定した、より疲労やダメージが少ないグリコーゲン枯渇のための運動形態を検討することも必要であろう。

本研究課題をまとめると、高強度・間欠的短時間運動は、低強度・長時間運動と同程度のグリコーゲン超回復を生じさせることが明らかとなった。したがって、高強度・間欠的短時間運動が、筋グリコーゲン超回復のためのグリコーゲン枯渇運動としての新たなツールとなる可能性が示唆された。

Table 1. Body weight.

		Time				<i>p-values</i> ¹	
		0 h	2 h	6 h	24 h	Intensity	Intensity×Time
Body weight (g)	LOW	147±2	145±4	169±3	179±3		
	HIGH	153±4	156±5	168±2	177±6	* §	0.327
						* §	<0.001

Values are means±SE for 6-8 rats. LOW; low-intensity continuous exercise. HIGH; high-intensity intermittent exercise. 1 Significant main effects of Intensity and Time were determined by two-way ANOVA. * indicates a significant difference from 0 h at the level of P<0.001. § indicates a significant difference from 2 h at the level of P<0.001.

Table 2. Food, fluid, and total carbohydrate consumption.

		0-24 h			<i>p-values</i> ¹		
		0-2 h	0-6 h	0-24 h	Intensity	Time	Intensity×Time
Food intake (g)	LOW	4.1±0.7	12.9±2.1	30.8±1.4			
	HIGH	7.0±1.2	11.6±1.6	30.7±0.6	* §	<0.001	0.236
Fluid intake (g)	LOW	13.3±2.9	37.3±3.3	69.3±4.9			
	HIGH	12.5±2.3	35.3±7.5	62.1±3.1	* §	<0.001	0.713
Total CHO intake (g)	LOW	2.7±0.3	8.4±0.9	19.1±0.8			
	HIGH	4.2±0.7	7.6±0.6	18.7±0.4	* §	<0.001	0.171

Values are means±SE for 6-8 rats. LOW; low-intensity continuous exercise. HIGH; high-intensity intermittent exercise. BW; body weight. 1 Significant main effects of Intensity and Time were determined by two-way ANOVA. * indicates a significant difference from 0-2 h at the level of P<0.001. § indicates a significant difference from 0-6 h at the level of P<0.001.

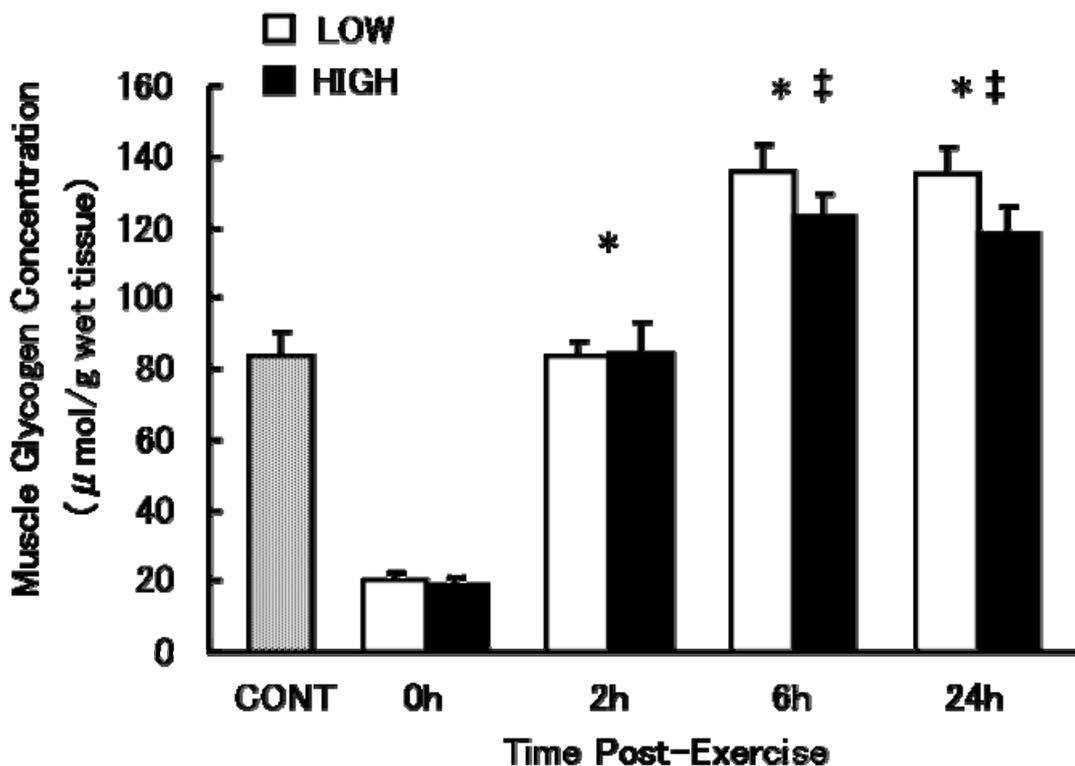


Figure 1. Time course of epitrochlearis glycogen accumulation in trained rats after high-intensity intermittent and low-intensity continuous swimming exercise. LOW; low-intensity continuous exercise. HIGH; high-intensity intermittent exercise. CONT; normal resting levels of age-matched rats trained by a 7-day swimming protocol. Values are means \pm SE for 4-8 muscles. There was a significant effect of recovery time ($P < 0.001$). * indicates a significant difference from 0 h at a level of $P < 0.001$. ‡ indicates a significant difference from 2 h at a level of $P < 0.001$.

5章 研究課題3

『運動後の筋グリコーゲン超回復の規定因子の検証』

1. 緒言

研究課題1・2により、トレーニングを十分に行ったラットでは、筋グリコーゲン超回復を高める上で、高強度もしくは低強度いずれかの運動で十分に筋グリコーゲンを減少させた後（研究課題2）、回復期にはグルコースを補助的に摂取すること（研究課題1）が最も効果的であることが明らかとなった。研究課題3では、さらに高いレベルのグリコーゲン超回復が得られる方法を模索することを目的として、グリコーゲン超回復の規定因子を探ることとした。

グリコーゲンの基質であるグルコースは勿論のこと、インスリンの濃度も運動後の筋グリコーゲン再合成の過程に重要であると考えられる。研究課題1によって、運動後に補助的に摂取する糖質としてグルコースが効果的であることが示されたが、この手法の筋グリコーゲンの再合成過程での生理学的な血中インスリン濃度は、筋グリコーゲン超回復に十分なものであるのかは明らかでない。そこで本研究課題では、まず、超生理学的な濃度のグルコースとインスリン下で得られた筋グリコーゲン超回復のレベルと、研究課題1で効果的であることが示されたグルコースの補助的摂取という手法によるものとを比較す

ることを第一の目的とした。

先行研究によって、インスリン刺激による筋グリコーゲン合成に影響をおよぼす因子がいくつか示されている。Fisher et al. (2002b) は、グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3β (GSK3 β) の阻害剤である GF-109203x (GF) により、GS の活性化状態を持続させた場合、インスリン刺激による筋グリコーゲン合成が高まることを報告している。また、Kawanaka et al. (2001) は、mRNA 合成阻害剤である Actinomycin D (AD) を培養液に添加することにより、インスリン刺激による骨格筋のグリコーゲン合成が高まることを報告している。したがって、インスリン刺激によるグリコーゲン合成において、GS の活性化および何らかのタンパク質の合成が、そのレベルを規定している可能性が示唆されている。しかしながら、これらの先行研究は、いずれも運動を行っていない安静状態でのラットの骨格筋を用いており、運動後の筋グリコーゲン再合成の過程においても、GS の活性化の維持および何らかのタンパク質という因子が関与しているのかを検討することを第二、第三の目的とした。

2. 方法

A. 実験動物と飼育条件

本実験では3週齢（体重40～60g）のSprague-Dawley（SD）系雄ラットを日本クレア株式会社から購入した。室温25℃，湿度30%，21-9時を暗期に設定した飼育室において，ステンレス製ワイヤーケージに2匹ずつ入れて飼育した。飼料はラット用固形飼料（CE-2，日本クレア株式会社）を，飲水として水道水を用い，ともに自由摂取とした。

入荷翌日から2日間，1日10～15分間の無負荷での水泳運動を全てのラットに行わせ，水泳運動に慣れさせた。水泳運動は水深45cm，水温34～36℃に調節したポリバケツに8匹ずつ（水表面積180cm²/rat）泳がせるものであった。

尚，本実験は，早稲田大学スポーツ科学部動物実験委員会の承認を得て行った。

B. 水泳運動トレーニング

本研究課題では，全てのラットにトレーニングを行わせた。トレーニングにはRen et al.（1994）の水泳運動モデルを用い，上記の方法により8匹同時に泳がせた（水表面積180cm²/rat）。トレーニングは，無負荷で3時間の水泳

運動を 45 分間の休憩をはさみ 2 セット, 1 日 1 回, 7 日間連続して行わせるものであった.

最終日のトレーニング終了後, 固形飼料および水を 1 時間自由摂取させた後, 固形飼料をラット 1 匹当たり 8 g に制限して与えた.

C. グリコーゲン枯渇運動

最終トレーニングの翌日 (最終トレーニング後 17~19 時間) に, 全てのラットにグリコーゲン枯渇運動を行わせた. グリコーゲン枯渇運動として, 水温 34~36°C に調節した水を 70L のポリバケツに水深 45cm になるまで入れ, 体重の 2% に相当する錘をつけ, 6-8 匹同時に (水表面積 180-240cm²/ rat) 連続 4 時間の水泳運動を行わせた.

D. 実験プロトコルとサンプル採取

研究課題 3-1 : 超生理学的な濃度のグルコースおよびインスリンが運動後の筋グリコーゲン超回復に及ぼす影響

研究課題 1 で効果的であることが示された, グリコーゲン枯渇運動後のグルコースの補助的摂取による筋グリコーゲン再合成の経時変化を再検証した. 運動後の回復期には, 研究課題 1 において運動後の筋グリコーゲン超回復によ

り効果であることが示された，通常の固形飼料（CE-2）に加えて 5%のグルコース溶液を補助的に摂取させる手法を用い，ラットに自由摂取させた．サンプル採取として，枯渇運動直後（0h），回復 1 時間後，2 時間後，および 5 時間後に，ペントバルビタールナトリウム（5mg/100g）の腹腔内注射による麻酔下で解剖し，心臓から採血した後，前肢骨格筋 *epitrochlearis*（Epi），および *Triceps*（研究課題 3-3 で使用）を摘出した．Epi はグリコーゲン濃度の測定に，血液は血清を分離した後にインスリン濃度の測定に用いた．その結果を Figure 1 に示した．筋グリコーゲン濃度は，回復 5 時間後で超回復のレベルにまで達していた．その回復期間中の血清インスリン濃度は，40-80 μ U/mL の範囲であり，これらの結果を参考とし，本研究課題 3-1 の目的を検証するための実験を行った．

上記のトレーニングおよびそれに続いたグリコーゲン枯渇運動を行わせたラットを無作為に 2 群に分けた．一方は，上述した通常の飼料（CE-2）に加えて 5%のグルコース溶液を補助的に自由摂取させる手法を用い，*in vivo*で筋グリコーゲンを 5 時間回復させた後，ペントバルビタールナトリウム（5mg/100g）の腹腔内注射による麻酔下でEpiを摘出した（5-h feeding）．もう一方は，運動直後に麻酔下でEpiを摘出し，超生理学的な濃度のグルコース（36 mM）とインスリン（10mU/mL）を含む緩衝液中で 5 時間培養し，筋グリコーゲンを回

復させた (5-h incubation). 緩衝液は, 調整されたガス (O_2 ; 95%, CO_2 ; 5%)
にて十分に酸素化された Krebs-Henseleit bicarbonate (KHB) buffer
(116mM NaCl, 4.6mM KCl, 1.16mM KH_2PO_4 , 25.3mM $NaHCO_3$, 1.89mM
 $CaCl_2$, 1.16mM $MgSO_4$) に 4mM の mannitol, 0.1% の radioimmunoassay 等
級の ウシ血清アルブミンを添加したものを 用い, 2.5 時間毎に交換した.

研究課題 3-2 : グリコーゲン合成酵素の活性化が運動後の筋グリコーゲン超回復に及ぼす影響

本研究課題 3-2 は Fisher et al. (2002b) の研究を参考に行った. 上記のトレーニングおよびそれに続いたグリコーゲン枯渇運動を行わせたラットの両前肢の Epi を, 運動直後に摘出し, 一方を研究課題 3-1 の 5-h incubation 群と同じ条件 (36mM グルコース+10mU/mL インスリンを含む緩衝液) で 5 時間培養した. もう一方には, 同緩衝液中に $10\mu M$ の GF-109203x (GF, ALEXIS 社製) を添加し, 5 時間筋グリコーゲンを回復させた. 5 時間の培養中, 緩衝液は 2.5 時間毎に交換した.

研究課題 3-3 : タンパク合成の阻害が運動後の筋グリコーゲン超回復に及ぼす影響

本研究課題 3-3 は Kawanaka et al. (2001) の研究を参考に行った。上記のトレーニングおよびそれに続いたグリコーゲン枯渇運動を行わせたラットの両前肢の Epi を運動直後に摘出し、次の 3 種類の緩衝液中で 5 時間筋グリコーゲンを回復させた。いずれの緩衝液も、研究課題 3-1 および 3-2 で用いた超生理学的な濃度のグルコースおよびインスリンを含む緩衝液に、1) 添加なし、2) mRNA 合成阻害剤である Actinomycin D, $2\mu\text{M}$ (AD, SIGMA 社製), および 3) AD, $2\mu\text{M}$ +GF, $10\mu\text{M}$, を添加したものを用意した。5 時間の培養中、緩衝液は 2.5 時間毎に交換した。

また、研究課題 3-1 の運動後の筋グリコーゲン再合成過程の経時変化の再検証で用いたラットの Triceps を用い、musclin という新規タンパク質の遺伝子発現量を下記の方法で測定した。

本研究課題 3 のいずれの実験においても、5 時間の培養終了後、Rinse buffer にて 15 分間インキュベートし、細胞外のグルコースを取り除いた。その後、液体窒素中で十分に冷却したトンダ (圧縮用鋏) で凍結し、それぞれ測定の時まで -80°C で保存した。

E. 血清インスリン濃度および筋グリコーゲン濃度の測定

血清インスリン濃度は、Rat 用 ELISA-kit (MercoDIA AB) を用いて測定した。筋グリコーゲン濃度の測定は、Lowry & Passonneau (1972) の方法に基づいて測定した。

F. musclin mRNA 発現量の測定

1) Total RNA の抽出

抽出した Triceps を、乳棒と乳鉢を用いて液体窒素下で粉砕した。粉砕した組織を 2mL の TRizol (Invitrogen 社製) 中にて、ポリトロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした後、1.5mL のホモジネートを MaXtract High Density チューブ (QIAGEN 社製) に分注した。5 分間室温で放置した後、0.3 mL のクロロホルムを加え混和した後に、 $12000\times g$ で 10 分間遠心分離した。得られた上清を別のチューブに移し、0.75mL のイソプロピルアルコールを加え、10 分間室温で放置した後に $12000\times g$ で 10 分間遠心分離した。得られた上清を捨て、チューブに 1mL の 75%エタノールを加え混和した後に、さらに $7500\times g$ で 5 分間遠心分離した。分離されたペレットを室温で乾燥させた後、RNA storage solution (Invitrogen 社製) で溶解し、DNA Free (Ambion 社製) を用いて混入した DNA の分解処理を行い、total RNA を抽出した。その後、Nano Drop (SCRUM 社製) を用いて、total RNA 濃度の測定を行った。total

RNA 濃度は 260nm の吸光度の値から算出した.

2) musclin mRNA 発現量の測定

musclin mRNA 発現量の測定は, Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法を用いて行った. 1) で抽出したtotal RNAをRNA 含量が $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ になるよう RNA storage solution で希釈し, その内の $2 \mu\text{L}$ と $18 \mu\text{L}$ の Reaction buffer ($4 \mu\text{L}$ 25mM MgCl_2 , $2 \mu\text{L}$ Reverse Transcription $10\times$ Buffer, $2 \mu\text{L}$ 10mM dNTP mixture, $0.5 \mu\text{L}$ Recombinant RNasin Ribonuclease inhibitor, 15U AMV Reverse transcriptase, $1 \mu\text{L}$ Random primers, $9.9 \mu\text{L}$ Nuclease free water ; Reverse Transcription System, Promega社製) を混和し, 25°C , 42°C , および 95°C でそれぞれ 10 分, 15 分, 5 分加熱することで逆転写を行い, cDNA を合成した. 合成した cDNA $2 \mu\text{L}$ に対し, PCR 用溶液 ($25 \mu\text{L}$ PCR Master Mix, Promega社製), $16.8 \mu\text{L}$ Nuclease free water, $2 \mu\text{L}$ forward primer, $2 \mu\text{L}$ reverse primer, $2.2 \mu\text{L}$ 18S Competitor/18S Primer (Ambion社製), をそれぞれ加え PCR を行った. PCR は Techne (Techgene社製) 上で行った. PCR の条件は, Denature を 94°C で 1 分間, Annealing を 57°C で 1 分間, Elongation を 72°C で 1 分間というサイクルを 40 セット繰り返すというものであった. PCR に用いたプライマーは

Banzet et al. (2006) の研究を参照し, Forward を
5'-GCATTCTCCGTGGACTTAGCATC-3' , Reverse を
5'-ATCAAGAAGCAGGAGCTTAGCTG-3'とし, Invitrogen社に作成依頼した.
PCR終了後, 合成されたPCR産物の内, 20 μ Lを染色液と 5対1の割合で混和
し, SYBR Safe (Invitrogen社製) を含んだ 2%アガロースゲルを用いて電気
泳動を行った. 電気泳動後, アガロースゲルをLAS-3000 (FUJI FILM社製)
で1秒間露光し, 発光の強度を定量した. 尚, 各サンプル内の 18rRNAを内部
コントロールとし, それぞれのmRNAと 18rRNAとの比率を算出し, 得られた
数値をmusclin mRNA発現量とした.

G. 統計処理

本実験で得られたデータはすべて平均値 \pm 標準誤差で表した. 2群間の比較には, 対応のないt検定(研究課題3-1), もしくは対応のあるt検定(研究課題3-2)を用いた. また, 研究課題3-3において, 3群間の検定には一元配置の分散分析を行い, Post hoc testとしてHolm-Sidakの方法を用いた. いずれの検定方法も, 危険率が5%未満を以って有意とした.

3. 結果

1) 研究課題 3-1 : 超生理学的な濃度のグルコースおよびインスリンが運動後の筋グリコーゲン超回復に及ぼす影響

研究課題 3-1 の結果を Figure 2 に示した. 5-h feeding 群と 5-h incubation 群で筋グリコーゲン濃度に有意な差は認められなかった.

2) 研究課題 3-2 : グリコーゲン合成酵素の活性化が運動後の筋グリコーゲン超回復に及ぼす影響

研究課題 3-2 の結果を Figure 3 に示した. GS を活性化させる GF-109203x (GF) の添加によって, 筋グリコーゲン濃度が約 25%有意に高値を示した ($P<0.05$).

3) 研究課題 3-3 : タンパク合成の阻害が運動後の筋グリコーゲン超回復に及ぼす影響

タンパク合成を阻害する actinomycin D (AD) を添加しても, 非添加群と比べて, 筋グリコーゲン濃度は有意な上昇を示さなかった (Figure 4). また, AD と GF の相乗効果も観察されず, AD と GF を同時に添加した場合でも, 研究課題 3-2 で示した GF による運動後の筋グリコーゲン再合成の促進効果と同

程度であった.

運動後 5 時間までの筋グリコーゲンの回復過程において (Figure 5 左),
musclin mRNA 発現量の変化は認められなかった (Figure 5 右).

4. 考察

研究課題 3-1：超生理学的な濃度のグルコースおよびインスリンが運動後の筋グリコーゲン超回復に及ぼす影響

インスリンは、骨格筋の糖取り込み速度および GS を活性化する。研究課題 1 で示したように、インスリン分泌能を表している GI 値の高いグルコースの補助的摂取が、低 GI 値であるスクロースと比較して、運動後の筋グリコーゲン超回復に効果的であることを示しており、筋グリコーゲンの再合成過程においてインスリンやグルコースの濃度が重要な因子であることが考えられる。

しかしながら、本研究課題 3-1 では、超生理学的な濃度のグルコースおよびインスリン下で筋グリコーゲンを回復させたとしても、*in vivo* での通常飼料および 5%グルコース溶液の自由摂取による回復と同程度にしか回復しなかった (Figure 2)。したがって、5%グルコース溶液の自由摂取という試行による、グルコース濃度 (約 150~200mg/100mL)、およびインスリン濃度 (約 40~80 μ U/mL) は、運動後の筋グリコーゲン超回復を既に最大限に刺激している可能性が示唆された。

研究課題 1 では、グルコース摂取とスクロース摂取で血清インスリン濃度に有意差が認められなかった。これは、自由摂取という条件下であったためにばらつきが大きく、解剖のタイミングにおいては観察されなかったと考えられ

る。したがって、グルコースおよびスクロース試行で、回復過程中、経時的に血液を採取して、インスリン濃度の和を比較した場合、GI 値の違いからグルコース試行の方が血糖値の上昇が著しく、その結果としてインスリン分泌量が高くなっていた可能性がある。それゆえ、グルコース試行以下のインスリン分泌量であるような場合においては、インスリン分泌量が筋グリコーゲン超回復のレベルを規定しているのかもしれない。

研究課題 3-2：グリコーゲン合成酵素の活性化が運動後の筋グリコーゲン超回復に及ぼす影響

骨格筋において、GSK3 β は常に活性化状態であり、GS をリン酸化し不活性化型に止めているが、GF によって GSK3 β が阻害された結果、GS は活性化される。Fisher et al. (2002b) は、運動を行わせていない安静状態の骨格筋を、GF を添加した緩衝液中で 5 時間インキュベーションした場合に、添加しない場合と比較して、インスリン刺激による筋グリコーゲン合成が約 20%有意に高まったことを報告している。そこで、運動後の骨格筋においても、GF による同様の効果が得られるかを研究課題 3-2 で検証した。その結果、GF を添加することによって、筋グリコーゲン超回復のレベルが約 25%有意に上昇した (Figure 3)。

GS の触媒部位はグリコーゲンに結合した状態で存在していると考えられており (Smythe & Cohen 1991), GS の活性はグリコーゲンの回復に伴い低下することが示されている (Richter et al. 1988). したがって, 本研究では, GS の活性を測定していないが, 先行研究 (Fisher et al. 2002b) と同濃度であり, GSK3 β を 100%阻害すると考えられている濃度の GF を添加しており, 5 時間のインキュベーション中, GS が常に活性化されていたと考えられる. これらのことから, 運動後に GS の活性化状態をより長く維持することが, 筋グリコーゲンの超回復のレベルをより上昇させる上で効果的であると考えられる.

アルカリ金属の一つであるリチウムは, GSK3 のN末端側 9 番目のセリンをリン酸化することによる直接的な阻害剤と考えられている (Zhang et al. 2003). リチウムによるGSK3 の阻害効果はGFによるものよりも低い (~40% inhibition with 2mM Li⁺; Klein & Melton 1996) が, 実際にはリチウムは, 炭酸リチウムやクエン酸リチウムの形で躁うつ病, うつ病に処方されており, ヒトへの利用がGFよりも比較的实现可能であると考えられる. 今後は, リチウムを筆頭に, よりGSを活性化させる, もしくは活性化状態を維持する実現可能な方法の検討が必要であるだろう.

研究課題 3-3 : タンパク合成の阻害剤が運動後の筋グリコーゲン超回復に及ぼ

す影響

Kawanaka et al. (2001) の先行研究において、mRNA 合成阻害剤である AD および、タンパク合成阻害剤である Cycloheximide を添加した緩衝液で、運動していないラット骨格筋を 5 時間インキュベーションした結果、何も添加していない場合と比較して、インスリン刺激による糖取り込み、およびグリコーゲン合成が高められることが報告されている。彼らの報告は、何らかのインスリン抵抗性作用を有するタンパク質が、筋グリコーゲンの合成に伴い発現し、インスリン刺激による糖取り込み速度、さらには、筋グリコーゲン合成に、負のフィードバックをかけている可能性を示唆している。

そこで、本研究課題 3-3 で、運動後の骨格筋のグリコーゲン再合成の過程においても、AD による何らかのタンパク質の発現の抑制が、筋グリコーゲン回復量を増加させるか否かを検証した。その結果、運動後の筋グリコーゲン超回復のレベルに関しては、AD の添加による亢進作用が認められなかった (Figure 4)。先行研究と本研究の骨格筋の生理的条件の相違より、インスリン抵抗性作用を有する何らかのタンパク質の発現は、運動後の骨格筋では生じない可能性が考えられる。また、本研究では、ラットに 1 週間の運動トレーニングを行わせている。よって、ある程度の期間の運動トレーニングを行うことで、推察される何らかのタンパク質の発現が抑制された可能性も考えられる。

マウスの骨格筋において、新規の **muscle-derived secretory peptide** である **musclin** の mRNA 発現量が、絶食により減少し、再摂食によって増加すること、さらに *in vitro* で、マウスの培養筋細胞におけるインスリン刺激時のグリコーゲン合成が **musclin** の添加によって抑制されることが報告されている (Nishizawa et al. 2004). そこで、この **musclin** を上述したインスリン抵抗性作用を有するタンパク質の候補の一つと考え、運動後の筋グリコーゲン再合成の過程における、**musclin** mRNA 発現量の変化を検証した。その結果、筋グリコーゲンは漸増的に回復しているにもかかわらず、**musclin** mRNA 発現量は変化しなかった (Figure 5). したがって、ラット骨格筋の運動後のグリコーゲン再合成の調節機序には **musclin** が関与していない可能性が示唆された。しかしながら、上述したように、AD による運動後の筋グリコーゲン超回復のレベルの亢進作用が認められなかったため、一過性の運動(グリコーゲン枯渇運動)、もしくはトレーニングによってすでに **musclin** のタンパク発現が抑制されていた可能性が考えられる。したがって、グリコーゲン枯渇運動前、またはトレーニングをしていない骨格筋での比較など、さらなる研究が必要である。

以上本研究結果をまとめると、運動後の筋グリコーゲン再合成の過程において、グリコーゲン合成酵素の活性が、そのレベルを規定している可能性が示唆された。

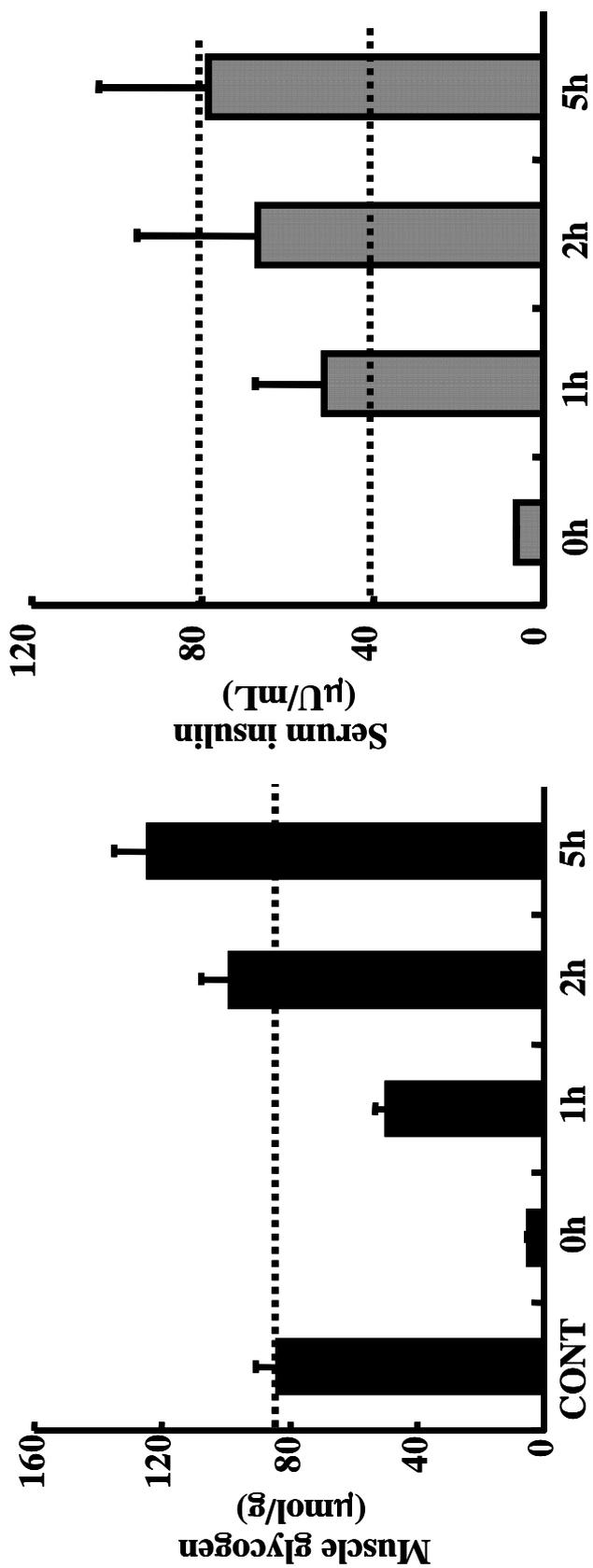


Figure 1. Time courses of epitrochlearis glycogen accumulation and serum insulin concentration in trained rats after 4-h swimming exercise. CONT; normal resting levels in 7-day-trained rats. Values are means \pm SE for 7-8 muscles.

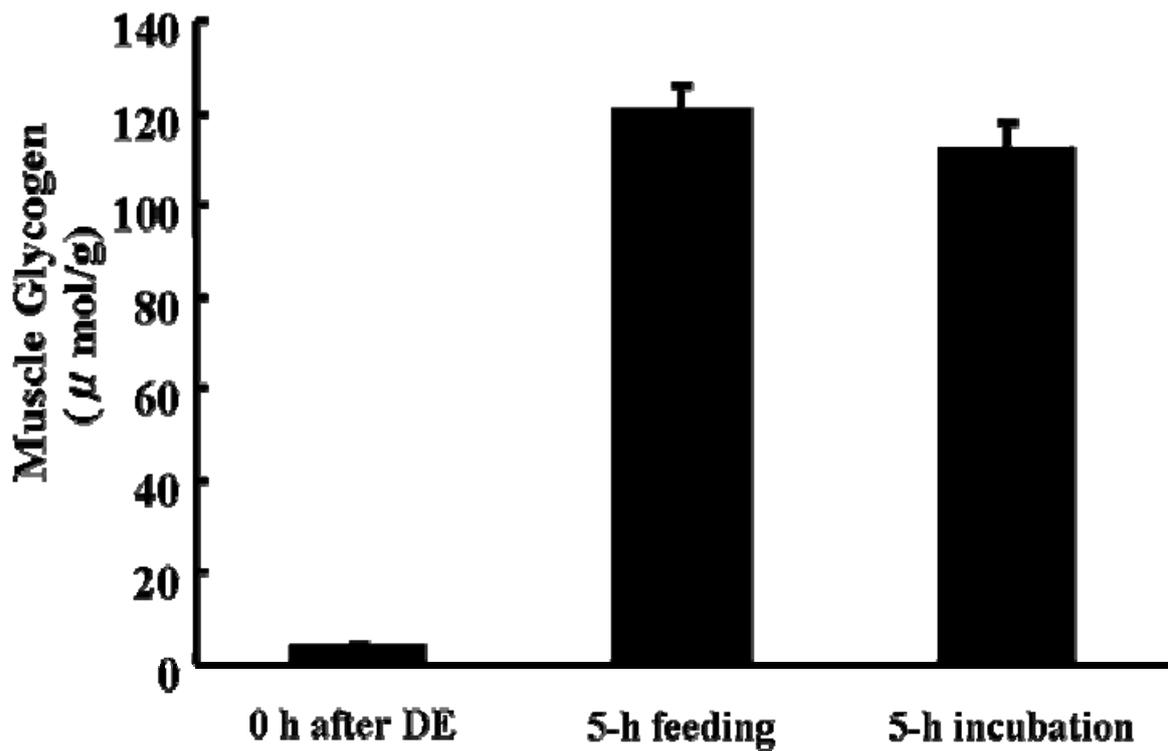


Figure 2. Glycogen accumulation is not higher in epitrochlearis muscles from exercised rats incubated with supraphysiological concentrations of insulin and glucose for 5 h compared with that after 5-h feeding. Muscles were incubated with 10mU/mL insulin and 36mM glucose. During feeding, rats fed ad libitum normal rodent chow + 5% glucose solution. DE; glycogen-depleting exercise. Values are means \pm SE for 7-8 muscles.

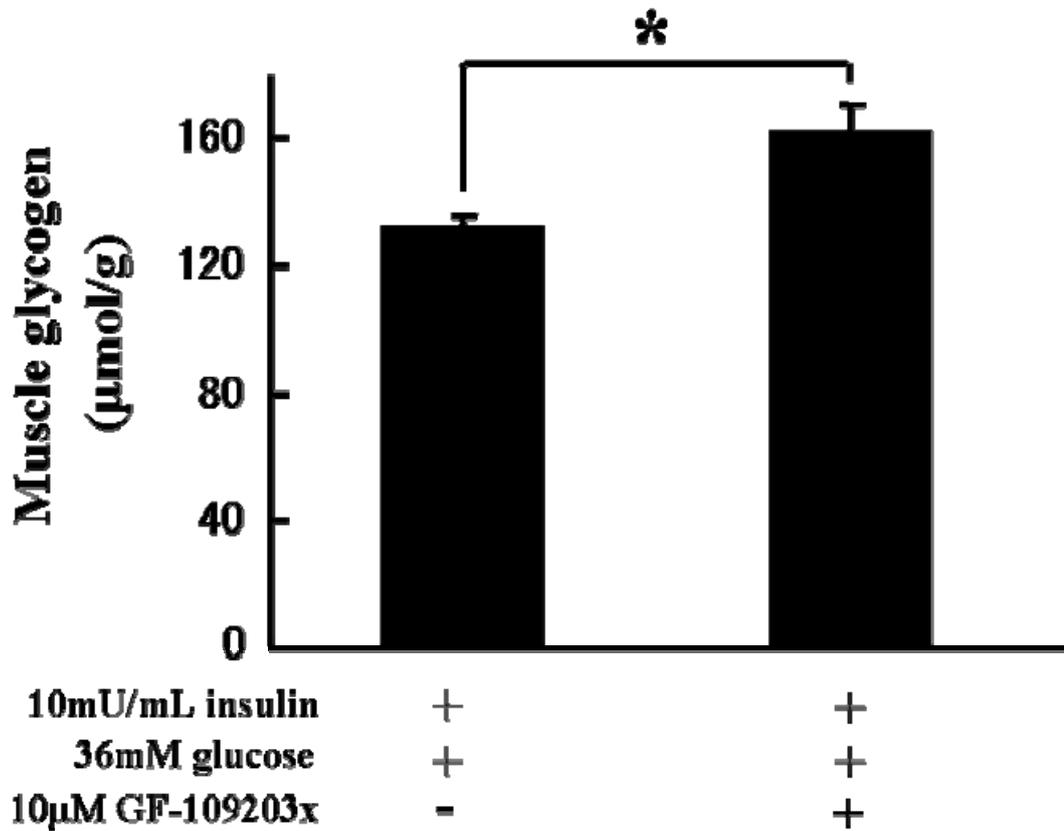


Figure 3. Glycogen accumulation is increased in epitrochlearis muscles from exercised rats incubated with GF-109203x. Muscles were incubated with or without 10 μ M GF-109203x (GF) , 10mU/mL insulin, and 36mM glucose. Values are means \pm SE for 8 muscles. * indicates a significant difference at a level of $P < 0.05$.

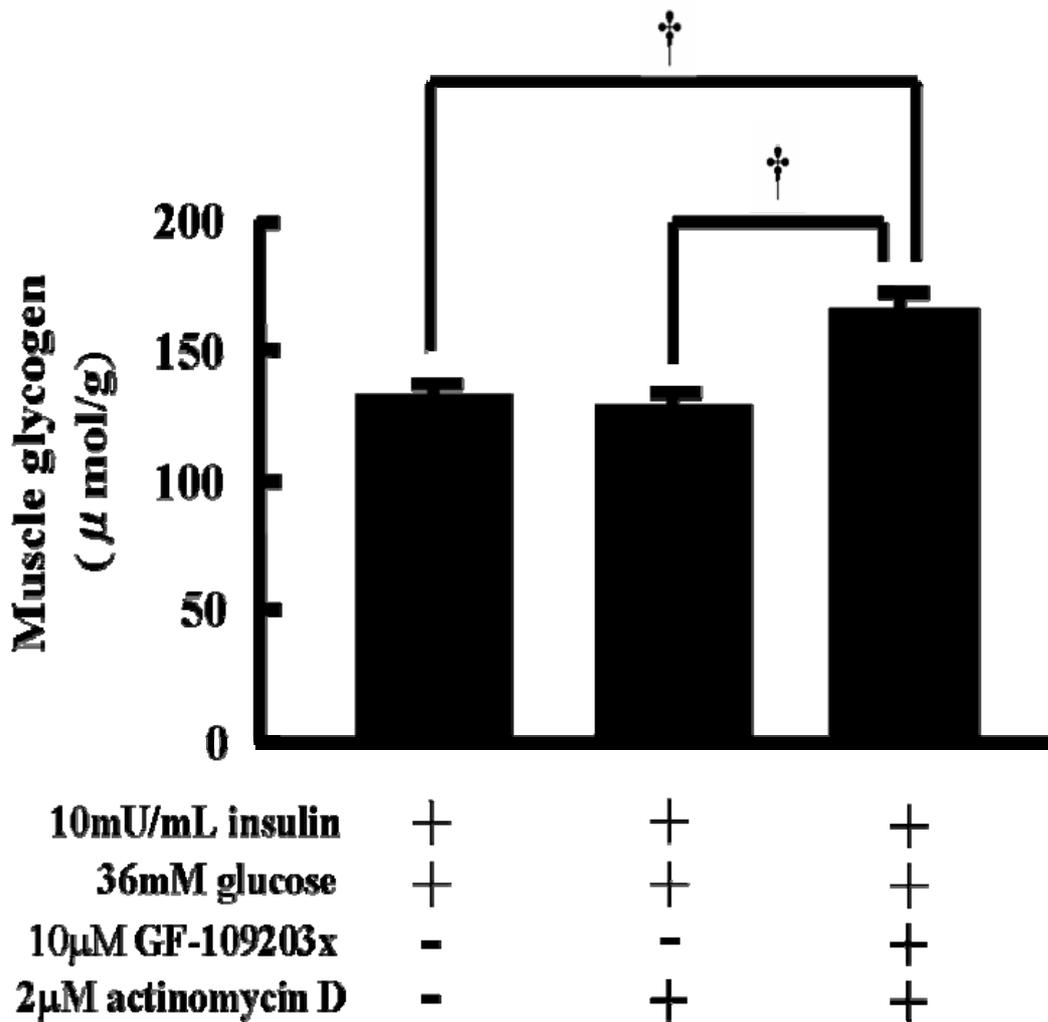


Figure 4. Effect of 5-h incubation with actinomycin D or actinomycin D + GF-109203x on glycogen resynthesis after exercise in rat epitrochlearis muscle. Muscles were incubated with or without 2 μ M actinomycin D (AD) or 2 μ M AD + 10 μ M GF-109203x (GF), 10mU/mL insulin, and 36mM glucose. Values are means \pm SE for 7-8 muscles. † indicates a significant difference at the level of $P < 0.01$.

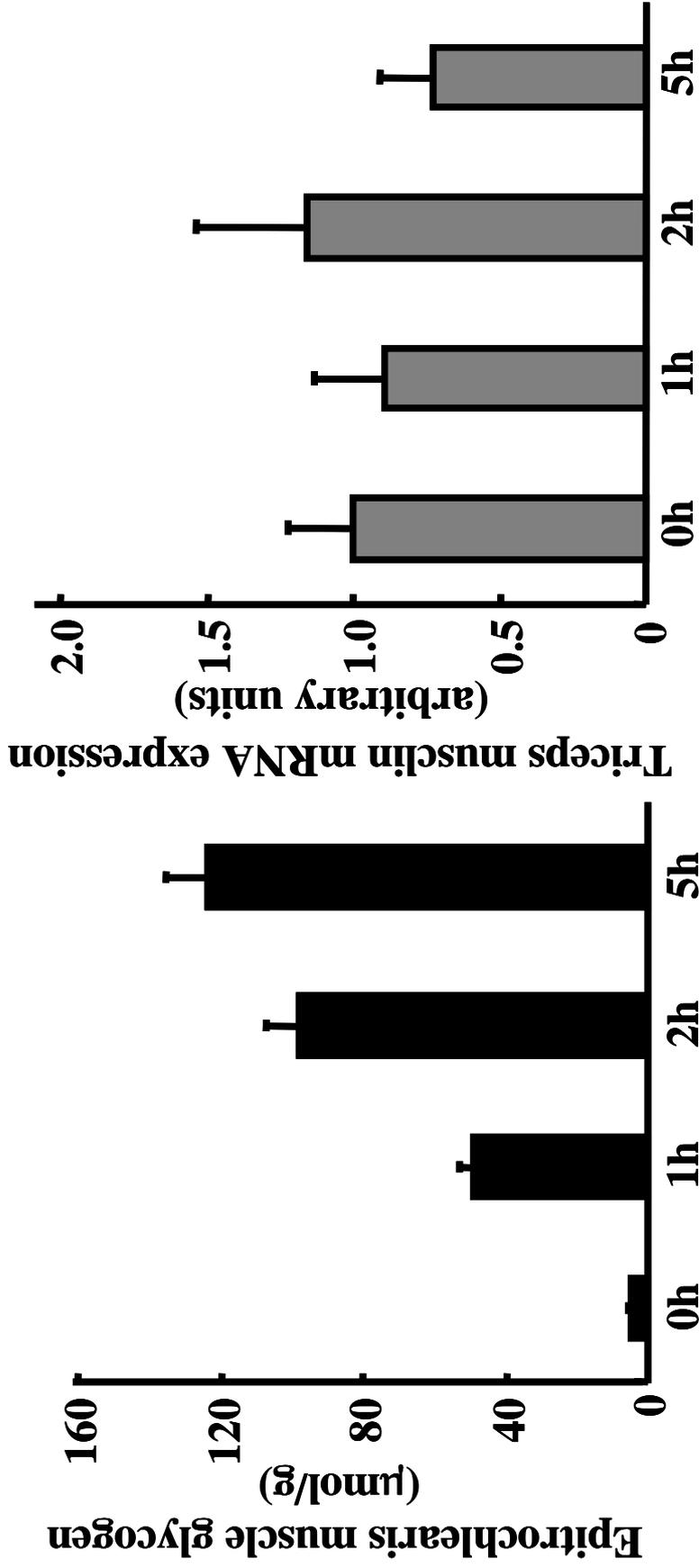


Figure 5. Time course of musclin mRNA expression during recovery period after exercise in triceps muscles from exercised rats. Values are means \pm SE for 5-6 muscles.

本研究課題は 2008 年のアメリカスポーツ医学会第 55 回国際会議(ACSM's Annual Meeting)で口頭発表した研究である。以下に Abstract を添付する。

Possible role of protein synthesis in the regulation of glycogen supercompensation in rat skeletal muscle

Tomohiro SONOU¹⁾, Mitsuru HIGUCHI²⁾, FACSM, Kazuhiko HIGASHIDA³⁾,

and Shin TERADA⁴⁾

1) Graduate School of Human Sciences, Waseda University, 2-579-15, Mikajima Tokorozawa, Saitama, 359-1192, Japan

2) Faculty of Sport Sciences, Waseda University, 2-579-15, Mikajima Tokorozawa, Saitama, 359-1192, Japan

3) Graduate School of Sport Sciences, Waseda University, 2-579-15, Mikajima Tokorozawa, Saitama, 359-1192, Japan

4) Consolidated Research Institute for Advanced Science and Medical Care, Waseda University, 135-1, Horinouchi, Tokorozawa, Saitama, 359-1165, Japan

Mechanisms limiting the level of glycogen supercompensation in skeletal muscle have not been fully understood. Previous study demonstrated that the mRNA synthesis inhibitor actinomycin D (AD) protected insulin

resistance in the rat skeletal muscle exposed to high glucose and insulin *in vitro*, suggesting that synthesis of a protein with short half-life mediates glucose-induced insulin resistance (Kawanaka *et al.*, J Biol Chem., 2001).

These results led us to hypothesize that the magnitude of muscle glycogen supercompensation may be regulated by protein synthesis. **PURPOSE:**

The purpose of this study was to examine the effect of protein synthesis inhibition on glycogen supercompensation in rat skeletal muscle.

METHODS: Three- to four-week-old male Sprague-Dawley rats were trained by using a 7-day-long swimming exercise program, during which rats swam 6 h/day in two 3-h bouts separated by 45 min of rest. Seventeen to nineteen hours after last bout of exercise, the rats performed 4 h of swimming exercise with a weight equivalent to 2 % of their body weight to deplete muscle glycogen. After glycogen-depleting exercise, rats were divided into three groups, one group were given a *ad libitum* diet plus 5 % glucose water for 5 h (Feeding). In the other two groups, epitrochlearis (Epi) muscles were dissected out immediately after glycogen-depleting exercise, then incubated in oxygenated Krebs-Henseleit buffer containing supraphysiological concentrations of glucose (36mM) and insulin

(10mU/mL) with or without $2\ \mu\text{M}$ AD (with; AD, without; INC) for 5 h.

After feeding or incubation, glycogen concentration in Epi muscles was

measured. **RESULTS:** No significant differences in glycogen

concentration were observed between Feeding and INC groups (Feeding:

121 ± 16 , Incubation: $112\pm 15\ \mu\text{mol/g}$). Muscle glycogen concentration in

AD group ($158\pm 18\ \mu\text{mol/g}$) was significantly higher than that in INC

group ($p<0.05$). **CONCLUSION:** The present investigation may suggest

that 1) neither insulin nor glucose concentrations is limiting factor for

glycogen supercompensation and 2) the increased expression of a protein

with a short half-life regulates glycogen supercompensation in rat skeletal

muscle.

6章 総合討論

本研究では、持久性パフォーマンスの向上のための筋グリコーゲン超回復のレベルを最大限に高めるための方法の確立を目標とし、グリコーゲン超回復を生じさせるための2要因について研究課題1および2で検討を行った。そして、さらなる可能性を探索すべく、薬理的な手法を用いて、筋グリコーゲン超回復の規定因子を研究課題3で検討した。

研究課題1ではグルコースとスクロースを比較した。この2つの糖質は、実際に摂取する糖質の主たる形態である。スクロースはグルコース分子とフルクトース分子からなる二糖類であり、小腸での吸収の前に、スクラーゼという消化酵素によってグルコースとフルクトースに分解されなければ利用できない。また、Glycemic Index (GI) 値の観点から、グリコーゲン合成に主に影響をおよぼすインスリン分泌能はグルコースが基準である100で、その他の糖質はそれ以下となっている。したがって、本研究では、2つの糖質しか比較していないが、糖質の種類においては、グルコースがグリコーゲン再合成に最も適しているだろう。また、研究課題3-1において、このグルコースの補助的摂取は、超生理学的な濃度のグルコースとインスリンによって *in vitro* で回復を促した場合と同程度のグリコーゲン再合成を引き起こし、その結果から、*in vivo* でのグリコーゲン再合成の最大刺激となっている可能性が示唆された。研究課

題 1 の実験限界として考察に述べたが、このグルコースはスクロースの補助的摂取による異なる糖質の実質的な割合は、総炭水化物摂取量の 20%程度であった。しかしながら、この割合をさらに高め、グルコースとスクロースの GI 値の違いから導かれる差がさらに顕著になったとしても、グルコース試行の筋グリコーゲン超回復のレベルは本研究で示された濃度程度にとどまるかもしれない。

また、近年では、タンパク質の種類の違いに関する研究が増えており、乳タンパク質であるホエイプロテインが、肝臓や骨格筋のグリコーゲン濃度を高める可能性も報告されている (Morifuji et al. 2005)。糖質とタンパク質の同時摂取は、インスリン分泌を亢進させる可能性が示唆されている (van Loon et al. 2000, Zawadzki et al. 1992)。しかしながら、本研究により、インスリン濃度は運動後の筋グリコーゲン超回復のレベルの重要な規定因子となりえない可能性が示唆されたため、タンパク質の種類の違いによる影響の検討は、筋グリコーゲン超回復のレベルをより高める方法の考案に貢献しないかもしれない。

研究課題 2 では、グリコーゲン枯渇運動の形態について検討を行ったが、グリコーゲン超回復への最大限の効果をねらい、両運動形態とも疲労困憊となる負荷に設定した。しかしながら、実際のスポーツの現場において、競技数日前に疲労困憊に追い込むことは非現実的である。今後は、筋グリコーゲンの超

回復のレベルは維持できる疲労困憊まで至らないよりダメージの少ない負荷の運動形態を探索する必要があるだろう。

ところで、骨格筋での安静時の糖取り込みを行っていると考えられている糖輸送体 GLUT-1 と、ヘキソキナーゼを過剰発現させたトランスジェニックマウスにおいては、筋グリコーゲン濃度が、湿重量 1g 当り約 $400 \mu \text{mol}$ にも達することが示されている (Hansen et al. 2000)。本研究での回復後の筋グリコーゲン濃度は、GF-109203x によって GS の活性化を維持した場合においても、湿重量 1g 当り約 $160 \mu \text{mol}$ 程度であった。この値は、 $400 \mu \text{mol}$ を筋グリコーゲン濃度の限界量とすると、3 分の 1 程度の量でしかない。したがって、GS の活性化以外にも、筋グリコーゲン超回復のレベルを抑制しているいくつかの因子がまだ残されていると考えられる。

本研究課題 3-3 で、Kawanaka et al. (2001) の先行研究で可能性が示唆されたインスリン抵抗性作用を有する何らかのタンパク質 (インスリンレジスタンスプロテイン) の関与を、運動後の骨格筋を用いて検討した。この何らかのタンパク質は、インスリン刺激による糖取り込み速度を抑制することで、インスリン刺激によるグリコーゲン合成を抑制すると考えられている。しかしながら、糖取り込み速度に関する検討は行っていないが、本研究課題 3-3 により、運動後の骨格筋においては、AD によって何らかのタンパク質の発現を抑制し

でも、筋グリコーゲン超回復のレベルには影響が見られなかった。すなわち、インスリンレジスタンスプロテインが糖取り込み速度の抑制を介してグリコーゲン合成を抑制するとは、本論文の結果からは考えにくい。

一方、Coderre et al. (1995) は、グリコーゲンが回復し、高濃度で存在している状態では、グリコーゲン顆粒が物理的に直接 GLUT-4 をトラップしてトランスロケーションを阻害しているという仮説を唱えている。したがって、上述したようなインスリンレジスタンスプロテインの合成を伴わない経路で糖取り込み、さらにはグリコーゲン合成を抑制しているという可能性も考えられる。また、Garcia Roves et al. (2003) は、運動後に糖質の摂取を制限した場合、トレーニングにより増加した GLUT-4 タンパク発現量が維持されるものの、その後のグリコーゲン回復に伴い、GLUT-4 のタンパク分解が亢進し、速やかにトレーニング前のレベルにまで低下することを報告している。これらの研究結果から、筋グリコーゲン超回復状態に伴って生じる GLUT-4 タンパクの分解促進ならびに、グリコーゲン顆粒と GLUT-4 の物理的な結合が、筋グリコーゲン超回復のレベルを一部制限しているという可能性が示唆される。したがって、これらの因子を抑制することが出来れば、さらなる筋グリコーゲン超回復のレベルを獲得できるだろう。

このように、グリコーゲン超回復の程度を規定している機序は未だ不明な

点も多く、本論文をさらに発展させ、これらの機序を少しでも明らかにし、グリコーゲン超回復をさらに高める方法を、スポーツの現場に対して提案することが今後の目標である。

7章 結論

筋グリコーゲン超回復のレベルをより高めるグリコーゲン・ローディング手法として、グリコーゲン枯渇運動としては、低強度長時間もしくは高強度短時間のいずれかの運動によって、十分に筋グリコーゲンを枯渇させた後に、摂取する糖質としては、グルコースを摂取することが効果的であることが明らかとなった。また、筋グリコーゲン超回復のレベルをさらに高めるためには、筋グリコーゲン合成酵素の活性化状態を維持することが必要である可能性が示唆された。

謝辞

本論文の作成にあたり、終始御懇篤な御指導ならびに激励を賜りました本学スポーツ科学大学院の樋口満教授に深甚なる謝意を表します。

本学スポーツ科学大学院の村岡功教授、坂本静男教授、中村好男教授には、本論文を終えるにあたり暖かい激励ならびにご指導を賜りましたことを心から御礼申し上げます。

また、本論文のための研究に協力してくれた本学大学院スポーツ科学研究科博士後期課程の東田一彦君に感謝します。

そして、寺田新先生には、ご自身の本学人間科学研究科在学中に始まり、その後の所属先から現在の本学先端科学・健康医療融合研究機構に至るまで、常にご懇意なるご指導ならびに御校閲を賜りました。ここに心から感謝の意を表します。

最後に、長年にわたり、私の学術探求に理解を示してくれ、援助をしてくれた両親に最大限の感謝の意を示し、本論文を締めさせていただきたいと思えます。

参考文献

- Adamo KB, Tarnopolsky MA, & Graham TE. Dietary carbohydrate and postexercise synthesis of proglycogen and macroglycogen in human skeletal muscle. *Am J Physiol.* 275:E229-34, 1998.
- Ahlborg B, Bergstrom J, Brohult J, Ekelund LG, Hultman E, & Maschio G. Human muscle glycogen content and capacity for prolonged exercise after different diets. *Forsvarsmedicin.* 3:85-99, 1967.
- Banzet S, Koulmann N, Sanchez H, Serrurier B, Peinnequin A, & Bigard AX. Musclin gene expression is strongly related to fast-glycolytic phenotype. *Biochem Biophys Res Commun.* 353:713-8, 2007.
- Bergstrom J, Hermansen L, Hultman E, & Saltin B. Diet, muscle glycogen and physical performance. *Acta Physiol Scand.* 71:140-50, 1967.
- Bergstrom J, & Hultman E. Muscle glycogen synthesis after exercise: an enhancing factor localized to the muscle cells in man. *Nature.* 210:309-10, 1966.
- Blom PC, Hostmark AT, Vaage O, Kardel KR, & Maehlum S. Effect of different post-exercise sugar diets on the rate of muscle glycogen synthesis. *Med Sci Sports Exerc.* 19:491-6, 1987.
- Bowtell JL, Gelly K, Jackman ML, Patel A, Simeoni M, & Rennie MJ. Effect of different carbohydrate drinks on whole body carbohydrate storage after

exhaustive exercise. *J Appl Physiol.* 88:1529-36, 2000.

Brozinick JT Jr, Reynolds TH, Dean D, Cartee G, & Cushman SW. 1-[N, O-bis-(5-isoquinolinesulphonyl) -N-methyl-L-tyrosyl]-4- phenylpiperazine (KN-62) , an inhibitor of calcium-dependent camodulin protein kinase II, inhibits both insulin- and hypoxia-stimulated glucose transport in skeletal muscle. *Biochem J.* 339:533-40, 1999.

Bruce CR, Lee JS, & Hawley JA. Postexercise muscle glycogen resynthesis in obese insulin-resistant Zucker rats. *J Appl Physiol.* 91:1512-9, 2001.

Burke LM, Collier GR, Beasley SK, Davis PG, Fricker PA, Heeley P, Walder K, & Hargreaves M. Effect of coingestion of fat and protein with carbohydrate feedings on muscle glycogen storage. *J Appl Physiol.* 78:2187-92, 1995.

Burke LM, Collier GR, Davis PG, Fricker PA, Sanigorski AJ, & Hargreaves M. Muscle glycogen storage after prolonged exercise: effect of the frequency of carbohydrate feedings. *Am J Clin Nutr.* 64:115-9, 1996.

Burke LM, Collier GR, & Hargreaves M. Muscle glycogen storage after prolonged exercise: effect of the glycemic index of carbohydrate feedings. *J Appl Physiol.* 75:1019-23,1993.

Casey A, Mann R, Banister K, Fox J, Morris PG, Macdonald IA, & Greenhaff PL. Effect of carbohydrate ingestion on glycogen resynthesis in human liver and skeletal muscle, measured by ^{13}C MRS. *Am J Physiol.* 278:E65-75, 2000.

Christensen E.H. & Hansen O. :III. Arbeitsfähigkeit und Ernährung. *Skand. Arch. Physiol.* 81:160-171, 1939

Coderre L, Kandror KV, Vallega G, & Pilch PF. Identification and characterization of an exercise-sensitive pool of glucose transporters in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 270:27584-8, 1995.

Cohen P. The Croonian Lecture 1998. Identification of a protein kinase cascade of major importance in insulin signal transduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 354:485-95, 1999.

Conlee RK, Lawler RM, & Ross PE. Effects of glucose or fructose feeding on glycogen repletion in muscle and liver after exercise or fasting. *Ann Nutr Metab.* 31:126-32, 1987.

Costill DL, Pascoe DD, Fink WJ, Robergs RA, Barr SI, & Pearson D. Impaired muscle glycogen resynthesis after eccentric exercise. *J Appl Physiol.* 69:46-50, 1990.

Derave W, Hansen BF, Lund S, Kristiansen S, & Richter EA. Muscle glycogen content affects insulin-stimulated glucose transport and protein kinase B activity. *Am J Physiol.* 279:E947-55, 2000.

Derave W, Lund S, Holman GD, Wojtaszewski J, Pedersen O, & Richter EA. Contraction-stimulated muscle glucose transport and GLUT-4 surface content are dependent on glycogen content. *Am J Physiol.* 277:E1103-10, 1999.

Douen AG, Ramlal T, Rastogi S, Bilan PJ, Cartee GD, Vranic M, Holloszy JO, & Klip A. Exercise induces recruitment of the "insulin-responsive glucose transporter". Evidence for distinct intracellular insulin- and exercise-recruitable transporter pools in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 265:13427-30, 1990.

Fairchild TJ, Fletcher S, Steele P, Goodman C, Dawson B, & Fournier PA. Rapid carbohydrate loading after a short bout of near maximal-intensity exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 34:980-6, 2002.

Ferrer JC, Favre C, Gomis RR, Fernández-Novell JM, García-Rocha M, de la Iglesia N, Cid E, & Guinovart JJ. Control of glycogen deposition. *FEBS Lett.* 546:127-32, 2003.

Fisher JS, Gao J, Han DH, Holloszy JO, & Nolte LA. Activation of AMP kinase enhances sensitivity of muscle glucose transport to insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 282:E18-23, 2002a.

Fisher JS, Nolte LA, Kawanaka K, Han DH, Jones TE, & Holloszy JO. Glucose transport rate and glycogen synthase activity both limit skeletal muscle glycogen accumulation. *Am J Physiol.* 282:E1214-21, 2002b.

Fisher RB, & Gardner ML. A diurnal rhythm in the absorption of glucose and water by isolated rat small intestine. *J Physiol.* 254:821-5, 1976.

Foster-Powell K, & Miller JB. International tables of glycemic index. *Am J Clin*

Nutr. 62:871S-890S, 1995.

Friedman JE, Sherman WM, Reed MJ, Elton CW, & Dohm GL. Exercise training increases glucose transporter protein GLUT-4 in skeletal muscle of obese Zucker (fa/fa) rats. *FEBS Lett.* 268:13-6, 1990.

Furuya S, & Yugari Y. Daily rhythmic change of L-histidine and glucose absorptions in rat small intestine in vivo. *Biochim Biophys Acta.* 343:558-64, 1974.

Gaesser GA, & Brooks GA. Glycogen repletion following continuous and intermittent exercise to exhaustion. *J Appl Physiol.* 49:722-8, 1980.

Gao J, Gulve EA, & Holloszy JO. Contraction-induced increase in muscle insulin sensitivity: requirement for a serum factor. *Am J Physiol.* 266:E186-92, 1994.

Garcia-Roves PM, Han DH, Song Z, Jones TE, Hucker KA, & Holloszy JO. Prevention of glycogen supercompensation prolongs the increase in muscle GLUT4 after exercise. *Am J Physiol.* 285:E729-36, 2003.

Garetto LP, Richter EA, Goodman MN, & Ruderman NB. Enhanced muscle glucose metabolism after exercise in the rat: the two phases. *Am J Physiol.* 246:E471-5, 1984.

Goforth HW Jr, Arnall DA, Bennett BL, & Law PG. Persistence of supercompensated muscle glycogen in trained subjects after carbohydrate

loading. *J Appl Physiol.* 82:342-7, 1997.

Goforth HW Jr, Laurent D, Prusaczyk WK, Schneider KE, Petersen KF, & Shulman GI. Effects of depletion exercise and light training on muscle glycogen supercompensation in men. *Am J Physiol.* 285:E1304-11, 2003

Goodyear LJ, Hirshman MF, Valyou PM, & Horton ES. Glucose transporter number, function, and subcellular distribution in rat skeletal muscle after exercise training. *Diabetes.* 41:1091-9, 1992.

Greiwe JS, Hickner RC, Hansen PA, Racette SB, Chen MM, & Holloszy JO. Effects of endurance exercise training on muscle glycogen accumulation in humans. *J Appl Physiol.* 87:222-6, 1999.

Gulve EA, Cartee GD, Zierath JR, Corpus VM, & Holloszy JO. Reversal of enhanced muscle glucose transport after exercise: roles of insulin and glucose. *Am J Physiol.* 259:E685-91, 1990.

Hansen PA, Marshall BA, Chen M, Holloszy JO, & Mueckler M. Transgenic overexpression of hexokinase II in skeletal muscle does not increase glucose disposal in wild-type or Glut1-overexpressing mice. *J Biol Chem.* 275:22381-6, 2000.

Hansen PA, Nolte LA, Chen MM, & Holloszy JO. Increased GLUT-4 translocation mediates enhanced insulin sensitivity of muscle glucose transport after exercise. *J Appl Physiol.* 85:1218-22, 1998.

- Hargreaves M, Meredith I, & Jennings GL.** Muscle glycogen and glucose uptake during exercise in humans. *Exp Physiol.* 77:641-4, 1992.
- Hayashi T, Hirshman MF, Kurth EJ, Winder WW, & Goodyear LJ.** Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. *Diabetes.* 47:1369-73, 1998.
- Henriksen EJ, Bourey RE, Rodnick KJ, Koranyi L, Permutt MA, & Holloszy JO.** Glucose transporter protein content and glucose transport capacity in rat skeletal muscles. *Am J Physiol.* 259:E593-8, 1990.
- Hespe P, & Richter EA.** Glucose uptake and transport in contracting, perfused rat muscle with different pre-contraction glycogen concentrations. *J Physiol.* 427:347-59, 1990.
- Hickner RC, Fisher JS, Hansen PA, Racette SB, Mier CM, Turner MJ, & Holloszy JO.** Muscle glycogen accumulation after endurance exercise in trained and untrained individuals. *J Appl Physiol.* 83:897-903, 1997.
- Holloszy JO, & Narahara HT.** Enhanced permeability to sugar associated with muscle contraction. Studies of the role of Ca⁺⁺. *J Gen Physiol.* 50:551-62, 1967.
- Holloszy JO, & Narahara HT.** Studies of tissue permeability. X. Changes in permeability to 3-methylglucose associated with contraction of isolated frog muscle. *J Biol Chem.* 240:3493-500, 1965.

Ivy JL, Goforth HW Jr, Damon BM, McCauley TR, Parsons EC, & Price TB. Early postexercise muscle glycogen recovery is enhanced with a carbohydrate-protein supplement. *J Appl Physiol.* 93:1337-44, 2002.

James AP, Lorraine M, Cullen D, Goodman C, Dawson B, Palmer TN, & Fournier PA. Muscle glycogen supercompensation: absence of a gender-related difference. *Eur J Appl Physiol.* 85:533-8, 2001.

Jentjens R, & Jeukendrup A. Determinants of post-exercise glycogen synthesis during short-term recovery. *Sports Med.* 33:117-44, 2003.

Kawanaka K, Han DH, Gao J, Nolte LA, & Holloszy JO. Development of glucose-induced insulin resistance in muscle requires protein synthesis. *J Biol Chem.* 276:20101-7, 2001.

Kawanaka K, Tabata I, & Higuchi M. More tetanic contractions are required for activating glucose transport maximally in trained muscle. *J Appl Physiol.* 83:429-33, 1997.

Kawanaka K, Tabata I, Tanaka A, & Higuchi M. Effects of high-intensity intermittent swimming on glucose transport in rat epitrochlearis muscle. *J Appl Physiol.* 84:1852-7, 1998.

Klein PS, & Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:8455-9, 1996.

- Klip A, & Marette A.** Acute and chronic signals controlling glucose transport in skeletal muscle. *J Cell Biochem.* 48:51-60, 1992.
- Kuo CH, Hwang H, Lee MC, Castle AL, Ivy JL.** Role of insulin on exercise-induced GLUT-4 protein expression and glycogen supercompensation in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 96:621-7, 2004.
- Lee AD, Hansen PA, & Holloszy JO.** Wortmannin inhibits insulin-stimulated but not contraction-stimulated glucose transport activity in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 361:51-4, 1995.
- Lowry OH & Passoneau JV.** A Flexible System of Enzymatic Analysis. New York: Academic, 1972.
- MacDougall JD, Ward GR, & Sutton JR.** Muscle glycogen repletion after high-intensity intermittent exercise. *J Appl Physiol.* 42:129-132, 1977.
- Morifuji M, Sakai K, Sanbongi C, Sugiura K.** Dietary whey protein increases liver and skeletal muscle glycogen levels in exercise-trained rats. *Br J Nutr.* 93:439-45, 2005.
- Mu J, Brozinick JT Jr, Valladares O, Bucan M, & Birnbaum MJ.** A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell.* 7:1085-94, 2001.
- Mueckler M.** Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem.* 219:713-25, 1994.

Nakatani A, Han DH, Hansen PA, Nolte LA, Host HH, Hickner RC, & Holloszy JO.

Effect of endurance exercise training on muscle glycogen supercompensation in rats. *J Appl Physiol.* 82:711-5, 1997.

Nesher R, Karl IE, & Kipnis DM. Dissociation of effects of insulin and contraction

on glucose transport in rat epitrochlearis muscle. *Am J Physiol.* 249:C226-32, 1985.

Nielsen JN, Derave W, Kristiansen S, Ralston E, Ploug T, & Richter EA. Glycogen

synthase localization and activity in rat skeletal muscle is strongly dependent on glycogen content. *J Physiol.* 531:757-69, 2001.

Nishizawa H, Matsuda M, Yamada Y, Kawai K, Suzuki E, Makishima M, Kitamura

T, & Shimomura I. Musclin, a novel skeletal muscle-derived secretory factor. *J Biol Chem.* 279:19391-5, 2004.

Ploug T, Stallknecht BM, Pedersen O, Kahn BB, Ohkuwa T, Vinten J, & Galbo H.

Effect of endurance training on glucose transport capacity and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. *Am J Physiol.* 259:E778-86, 1990.

Price TB, Rothman DL, Taylor R, Avison MJ, Shulman GI, & Shulman RG. Human

muscle glycogen resynthesis after exercise: insulin-dependent and -independent phases. *J Appl Physiol.* 76:104-11, 1994.

Ren JM, Semenkovich CF, Gulve EA, Gao J, & Holloszy JO. Exercise induces rapid

increases in GLUT4 expression, glucose transport capacity, and insulin-stimulated glycogen storage in muscle. *J Biol Chem.* 269:14396-401, 1994.

Rhéaume C, Waib PH, Kouamé N, Nadeau A, Lacourcière Y, Joanisse DR, Simoneau JA, & Cléroux J. Effects of intense and prolonged exercise on insulin sensitivity and glycogen metabolism in hypertensive subjects. *Circulation.* 108:2653-2659, 2003.

Richter EA, Garetto LP, Goodman MN, & Ruderman NB. Enhanced muscle glucose metabolism after exercise: modulation by local factors. *Am J Physiol.* 246:E476-82, 1984.

Richter EA, Hansen SA, & Hansen BF. Mechanisms limiting glycogen storage in muscle during prolonged insulin stimulation. *Am J Physiol.* 255:E621-8, 1988.

Rodnick KJ, Henriksen EJ, James DE, & Holloszy JO. Exercise training, glucose transporters, and glucose transport in rat skeletal muscles. *Am J Physiol.* 262:C9-14, 1992.

Rodnick KJ, Holloszy JO, Mondon CE, & James DE. Effects of exercise training on insulin-regulatable glucose-transporter protein levels in rat skeletal muscle. *Diabetes.* 39:1425-9, 1990.

Smythe C, & Cohen P. The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis. *Eur J Biochem.* 200:625-31, 1991.

Terada S, Yokozeki T, Kawanaka K, Ogawa K, Higuchi M, Ezaki O, and Tabata I.

Effects of high-intensity swimming training on GLUT-4 and glucose transport activity in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 90:2019-24, 2001.

Van Beekvelt MC, Shoemaker JK, Tschakovsky ME, Hopman MT, & Hughson RL.

Blood flow and muscle oxygen uptake at the onset and end of moderate and heavy dynamic forearm exercise. *Am J Physiol.* 280:R1741-1747, 2001.

Van Den Bergh AJ, Houtman S, Heerschap A, Rehrer NJ, Van Den Boogert HJ,

Oeseburg B, & Hopman MT. Muscle glycogen recovery after exercise during glucose and fructose intake monitored by ¹³C-NMR. *J Appl Physiol.* 81:1495-500, 1996.

van Loon LJ, Saris WH, Kruijshoop M, & Wagenmakers AJ. Maximizing

postexercise muscle glycogen synthesis: carbohydrate supplementation and the application of amino acid or protein hydrolysate mixtures. *Am J Clin Nutr.* 72:106-11, 2000.

Wallberg-Henriksson H, Constable SH, Young DA, & Holloszy JO. Glucose

transport into rat skeletal muscle: interaction between exercise and insulin. *J Appl Physiol.* 65:909-13, 1988.

Winder WW, & Hardie DG. Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of

AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *Am J Physiol.* 270:E299-304, 1996.

Wright DC, Geiger PC, Holloszy JO, & Han DH. Contraction- and hypoxia-stimulated glucose transport is mediated by a Ca²⁺-dependent mechanism in slow-twitch rat soleus muscle. *Am J Physiol.* 288:E1062-6, 2005.

Wright DC, Hucker KA, Holloszy JO, & Han DH. Ca²⁺ and AMPK both mediate stimulation of glucose transport by muscle contractions. *Diabetes.* 53:330-5, 2004.

Youn JH, Gulve EA, & Holloszy JO. Calcium stimulates glucose transport in skeletal muscle by a pathway independent of contraction. *Am J Physiol.* 260:C555-61, 1991.

Zakim D, Herman RH, & Gordon WC. The conversion of glucose and fructose to fatty acids in the human liver. *Biochem Med.* 2:427-437, 1969.

Zawadzki KM, Yaspelkis BB 3rd, & Ivy JL. Carbohydrate-protein complex increases the rate of muscle glycogen storage after exercise. *J Appl Physiol.* 72:1854-9, 1992.

Zhang F, Phiel CJ, Spece L, Gurvich N, & Klein PS. Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in response to lithium. Evidence for autoregulation of GSK-3. *J Biol Chem.* 278:33067-77, 2003.