

運動後の摂取飼料の違いが  
ラットの糖質代謝に及ぼす影響

所属学科目	スポーツ医学
著者	勝目 忠幹
指導教員	山口 正弘

合格年月日 平成 4 年 3 月 2 日

論文審査員

南谷 和利  
青木 純一郎  
沢木 啓祐

## 目次

第 1 章 緒言	1
第 2 章 関連文献の考証	5
第 1 節 持久性運動とそのエネルギー源	5
(1) 糖質の重要性	6
(2) 筋貯蔵グリコーゲン量と運動能力	8
(3) glycogen loading法	9
第 2 節 運動後のグリコーゲン合成メカニズム	12
第 3 節 glycogen phosphorylaseの働きと活性調節	16
第 3 章 実験方法	19
第 1 節 被験動物と飼育方法	19
第 2 節 被験動物のグループ分け	19
第 3 節 走運動とその後 1 週間の飼料	20
第 4 節 屠殺方法と被験筋の採取	21
第 5 節 グリコーゲンの定量	21
(1) 試薬の調製	21
(2) 定量手順	22

第6節	phosphorylase活性の測定	24
(1)	phosphorylase反应用試薬の調製	24
(2)	phosphorylase反応手順	25
(3)	リン酸定量用試薬の調製	26
(4)	リン酸の定量	26
(5)	BIURET試薬の調製と検量線の作成	27
(6)	抽出液中タンパク質の定量	28
(7)	phosphorylase活性の算出	28
第4章	実験結果	29
第1節	運動時間と体重変動	29
第2節	運動後1週間の食餌量	29
第3節	筋グリコーゲン含量	30
第4節	phosphorylase活性	31
第5節	筋グリコーゲン含量とphosphorylase活性	32
第5章	考察	33
第1節	phosphorylase活性とその活性化に対する運動の影響	34
第2節	phosphorylase活性と筋グリコーゲン含量	36

第3節 食餌組成がphosphorylase活性に及ぼす影響	37
第6章 結論	39
第7章 要約	40
謝辞	42
参考文献	43
欧文要約	49
表 1 ~ 3	
図 1 ~ 11	

## 第1章 緒言

身体運動は、筋収縮によってもたらされる運動エネルギーが仕事として身体外部に働きかけた結果であり、それを直接的に引き起こすのは、アデノシン3リン酸（ATP）の持つ化学エネルギーである<sup>11)</sup>。この高エネルギーリン酸化合物は加水分解によってエネルギーを発生し、それと引き換えに残されたアデノシン2リン酸（ADP）とリン酸は、特に、長い時間の運動が必要とされる時、筋肉や肝臓に貯蔵されたグリコーゲン、および細胞内のトリグリセライドを出発点とする種々の代謝系によって再びATPに再生され、持続的運動を可能にする。グリコーゲン、およびトリグリセライドは間接的な筋収縮のためのエネルギー源であり、それぞれ食事により摂取した糖質、脂質に由来するものである。

長距離走をはじめとして長時間運動が要求される時、その主要エネルギー源が糖質であるということは、長距離走者の競技前後における血中グルコースの測定研究より、1920年代には明確に示されるようになった<sup>41)</sup>。1960年代になり、筋生検法が確立されると、人においても実際に運動を行った筋内の代謝状況を直接的に測定することが可能となり、この方法を用いた多くの研究により、持久的運動における筋の貯蔵グリコーゲンの重要性がはっきりと認識される

ようになった<sup>2)5)8)26)29)</sup>。今や、筋肉及び肝臓のグリコーゲン量が持続的運動能力の制限因子の一つである、ということは一般化している。この様なことから、いかにその貯蔵量を運動前に高めておくかということは、持久性競技に関わる選手・指導者にとって、重要な関心事である。

いわゆるこのグリコーゲンローディング(glycogen loading)法と呼ばれるグリコーゲン貯蔵のためのトレーニングと食事の組合せによる負荷方法の起こりは、1966年、BergströmとHultman<sup>6)</sup>が筋生検法によって測定した片脚の持久性ペダリング運動による運動脚筋中のグリコーゲン量の減少と、その後の回復期間に起こるグリコーゲン再補充にみられる過補償(supercompensation)現象という観察に始まった。これは運動後3日間、高炭水化物食を摂取すると、運動した脚筋内に運動前の2倍近いグリコーゲン再補充がみられた、という現象である。このように、グリコーゲン枯渇時に高炭水化物食を摂取すると、筋グリコーゲンの過補償が出現する<sup>5)6)26)</sup>こと、並びに運動前の筋グリコーゲン量が疲労困憊までの運動時間と比例関係にあること<sup>2)5)</sup>が知られている。こうしたことから、競技の約一週間前よりトレーニングと食事法の組合せによって、効率の良い過補償を実現させようとする方法論的研究の開発が進み、競技者に負担が少なく、かつ効率的で実用的な方法が確立されてきている<sup>15)16)</sup>

18)30)。

こうした研究と並行して、持久的運動のもう一つの重要なエネルギー源である脂肪と関連させて、運動中に脂肪のエネルギー代謝を活発化させることは体組織のグリコーゲンの燃焼を節約するという報告<sup>17)27)37)51)</sup>がある。また、食事組成あるいは食後の経過時間と運動時の代謝に関する研究<sup>61)</sup>や、食事の頻度<sup>19)62)</sup>および多糖や少糖類のような種類別の過補償の優劣<sup>7)10)19)50)63)</sup>、更には摂取タイミング<sup>34)</sup>といった研究などから、一步踏み込んだ栄養処方の開発と、その研究領域は広がりつつある。

さて、前述のBergströmとHultman<sup>6)</sup>の初期の研究を筆頭に、運動を行なわなかった脚に過補償が起きなかったという興味深い観察がある<sup>8)35)</sup>。一方、これに関連して、グリコーゲン合成酵素の低グリコーゲン時における活性促進を示唆する報告<sup>1)9)20)55)56)</sup>もある。しかしながら、方法論的な進展とは対照的に、過補償の発生機序については、運動種目や強度によってはグリコーゲンの再補充すらなかなか進まない<sup>55)56)57)</sup>といったものや、これらの方法が必ずしも過補償を起こすものではないといった報告<sup>23)42)</sup>もあり、生理学的、生化学的根拠において極めて不明瞭である。

これまで行われてきた多くの研究は、こうした現象に対し、グリコーゲン合成に中心的な役割を持つグリコーゲン合成酵素、あるいは

はその活性を調節しているインスリンの効果から検討を重ねてきた。

そこで本研究では、枯渇後の筋グリコーゲンが再補充される際、合成とは逆の立場であるグリコーゲン異化の過程が、それに対しどの様に関与しているのかを確かめようとした。実験は成長ラットにトレッドミルによる疲労困憊走運動を負荷し、筋グリコーゲンを枯渇させ、その後の筋グリコーゲン量の変化と、今回はglycogen phosphorylaseに焦点を絞り、その活性と性状について調べることにした。phosphorylaseは、貯蔵グリコーゲンの加リン酸分解を触媒する酵素で、この反応は解糖系への出発点となる。本酵素が完全欠損しているため、グリコーゲンが筋に貯蔵されてはいるが利用されないという病気もあり<sup>43)59)60)</sup>、筋のグリコーゲン貯蔵量に対し、phosphorylaseが大きく関与しているものと考えられるからである。更に、運動後の回復期間に、それぞれの栄養素（糖質、脂質、タンパク質といった）の含有比は等しく調製されてはいるが、質的に異なる種々の飼料（ミルク、蔗糖、および脱脂粉乳を主体とした3種）をラットに与えることによって、運動後の食事組成の違いが、以上の過程にどのような影響をもたらすのか、ということについても検討を加えることにした。

## 第2章 関連文献の考証

持続的運動のエネルギー源としての糖質の重要性については、疑う余地はない。そのため、そうした競技を行う前に体内にできる限り多くの糖質を補充しておくことは、競技成績の向上のために有利に作用すると考えられ、そのための手段が研究、改善されてきた。体内での糖質の貯蔵形態となるものがグリコーゲンであるため、過去の研究は専ら、その合成に関与する酵素およびホルモンを研究の対象としてきたが、こうした多くの研究から、グリコーゲン再補充の過程にみられる現象面の全てを説明するだけの確証が得られたとは言いがたい。

### 第1節 持久性運動とそのエネルギー源

長い時間運動を持続させる能力を規定する生理的因子、いわゆる有酸素的資質の善し悪しとして、酸素やエネルギー源の運搬と利用に関係する種々の器官・組織・物質の形態や機能の適応と、運動によって身体内部に起こる生理的アンバランスに対する耐性などが挙げられる<sup>15)</sup>。なかでも根本的なものとして、筋収縮の直接のエネルギー源であるアデノシン三リン酸 (ATP)<sup>11)</sup>をいかに安定して、しかも効率的に運動筋において合成できるかということを大きく取

り上げることが出来るであろう。しかしながら、筋に予め貯えられているATP量、並びにエネルギー供給と引き換えに加水分解されたそれを再び合成するクレアチンリン酸量は少なく、したがって、長距離走のような長時間に及ぶ持久性運動時における安定したATPの合成は、その他の方法に頼らなければならない。それは、食事によって体内に貯えられた糖質、脂質、およびタンパク質といった二次的なエネルギー源が運動中に動員されて、分解されることによって得られる。

#### (1) 糖質の重要性

身体運動のエネルギー源としての栄養素別の効果や、栄養の摂取状況が運動パフォーマンス上に及ぼす影響、といった研究は百年以上も前より数多くなされている<sup>30)</sup>。

1920年、KroghとLindhard<sup>38)</sup>は、呼吸交換比の測定から代謝状態を算出する方法を詳しく述べる中で、筋運動中における糖質と脂質のエネルギー源としての重要性を指摘している。1924年、Levineら<sup>41)</sup>は、アメリカのマラソン・オリンピック代表最終選考会において、11名の選手のレース直後の血糖濃度等を測定し、血糖値と疲労度の関係を報告している。それによると、レース後、ぜんそく様症状、顔面蒼白などの症状をともなった選手2名の血糖濃度は65mg/dl、

完全な疲労困憊状態に陥った4名については、50mg/dlかそれよりもかなり低い値であった。一方、世界記録を破った優勝者をはじめ、ゴール後多少の身体的疲労しか感じなかった3名の選手の血糖値は、82-89mg/dlと正常範囲内にあった。同時に、レースを途中で棄権し、採血前に多量の食事を摂った選手と、ゴールしてから採血前に食事を摂ってしまった選手2名の濃度がそれぞれ178、123mg/dlと高かったことから、運動前の糖質摂取の重要性についても触れている。

CristensenとHansen<sup>12)</sup>もまた、呼吸交換比の測定から運動中の糖質と脂質のエネルギー源としての動員について評価し、持久性の運動中、糖質の酸化によってエネルギー供給が増すことを報告している。また、糖質を多く含む食事がこうした運動において、運動者の持久性を大いに高めることから、代謝過程や持久能力に及ぼす栄養素とその摂取の効果を説いている。更に、疲労困憊に至った時、低血糖症を伴い、その時に糖質を摂取することが、血糖を速やかに正常状態に戻し、運動を継続することを可能にするとしている<sup>13)</sup>。

以上のように、持久運動中のエネルギー源として、糖質が大きく貢献しているということが、糖質を多く含んだ食事を摂取した被験者の運動中の呼吸交換比、あるいは血中グルコース濃度の測定結果などにより明らかにされ、長時間に及ぶ有酸素運動の際の疲労の発現が、血中グルコース濃度の低下、すなわちその供給源である肝臓

のグリコーゲン貯蔵量の減少によるものと考えられるに至った。

## (2) 筋貯蔵グリコーゲン量と運動能力

その後、Grollman<sup>25)</sup>はトレーニングされたラットに、筋のグリコーゲン量と有酸素的な持久力との間で、対照群に比し有意な関係があったと報告している。そして1960年代に入ると、筋生検法 (biopsy) 技術の発展に伴って、人を被験者として、筋グリコーゲン量と持久運動との関係に関する研究が盛んに行われるようになり、次第に、筋に貯蔵されるグリコーゲン量が持久的運動において重要であるということが認識されるようになった<sup>2) 5) 8) 26) 29)</sup>。

例えば、Ahlborgら<sup>2)</sup>は9人の被験者を使い、60%  $W_{170}$  (56-67%) のペダリングによる疲労困憊運動によって、運動前の筋グリコーゲン貯蔵量と運動時間との間に有意な相関関係 ( $r=0.68$ ,  $p<0.05$ ) を観察し、Bergströmら<sup>5)</sup>も75%  $\dot{V}O_{2max}$ でのペダリング運動で、同様の相関を認めている ( $r=0.92$ ,  $p<0.001$ )。Hermansenら<sup>26)</sup>は、呼吸交換比から算出される全身の糖質燃焼率とbiopsyによって直接的に測定される筋グリコーゲン消費量との関係を調べる研究の中で、77%相当の $\dot{V}O_{2max}$ でのペダリング運動 (20分間運動/15分間休憩のサイクル) を被験者達に行わせたところ、運動時間とともに筋のグリコーゲンが減少することを観察し、運動前に多くのグリコーゲン

が筋にあった被験者のほうが、疲労困憊に至るまでの時間が長かったとしている。

### (3) glycogen loading法

先のCristensenとHansen<sup>12)</sup>による初期の研究においては、摂取カロリーの約90%が糖質という食事を摂った時、通常食や脂質の多い食事の時よりも長い時間運動（ペダリング運動、1080kgm/min）が持続できたということから、運動に対する食事の、特に糖質摂取の重要性が示唆されたが、BergströmとHultman<sup>6)</sup>は、高糖質食が筋グリコーゲン量に及ぼす興味深い現象を報告した。同研究者ら<sup>8)</sup>はそれより以前に、片脚ペダリング運動による疲労困憊と、運動筋に限って起こる局所的なグリコーゲン量の減少との関係を明らかにしていたが、更に、その後の回復期間中に高糖質食を摂取するとどうなるのか、食事の効果について検討を加えたのであった。同研究によれば、同様の片脚ペダリング運動後3日間、その殆どが糖質で占められた食事を摂取したところ、1日後には既に運動をしていない脚筋よりも運動脚筋中のグリコーゲン量が上回り、3日後にはおよそ2倍にまで達したとしている。

Bergströmら<sup>5)</sup>は更に、運動とdiet法、あるいはその組合せの違いによってどの様に筋の貯蔵グリコーゲン量に違いが現われるかを

検討した。ここでは、6名の体育学生に自転車エルゴメーターによる疲労困憊運動 ( $75\% \dot{V}O_{2max}$ ) を課し、3日後の同じ運動までタンパク質と脂質主体の食事 (P diet=タンパク質1500、脂質1300 kcal/day) を摂らせ、更に3日後の同運動まで高糖質食 (C diet=糖質2300、タンパク質500kcal/day) を摂取させた。C diet後の筋グリコーゲン量は、最初の運動前すなわち正常時のおよそ1.9 (1.3-2.6) 倍にまで増加し、運動時間も1回目に比べC diet後の3回目には1.5倍長くなった。一方、P dietとC dietを入れ替えた別の3名の被験者については、C diet後の増加が前の6名の被験者よりも少なく、C diet中の筋グリコーゲンの過補償をより効果的に実現させるためには、それ以前の運動と食事の組合せによる筋グリコーゲンの最大限の枯渇が必要であることを示唆した。

こうした研究から初期の glycogen loading法は、①競技の約一週間前に運動によって筋グリコーゲンを枯渇させること、②続く3日間は低糖質食を摂取し、競技の3-4日前に運動によって筋グリコーゲンを最大限枯渇に追い込み、③競技前まで高糖質食を摂取する、というものであった<sup>4)5)</sup>。

イギリスのマラソンランナー Ron Hillはこの古典的方法にしたがって、1969年ヨーロッパ選手権を獲得している<sup>48)</sup>。Karlssonと Saltin<sup>36)</sup>は、10名の体育学生を2グループに分け、実際の試合 (30

km走)前とその3週間後に設定した30km走前のどちらかにこれに準じた処方を行い、もう一方に何等の束縛もしないという実践的な研究を行っている。その結果、実際の試合ではなく研究用に設定したタイムトライアルの前に本diet法を処方した被験者でさえも記録を短縮したのをはじめ、diet後の筋グリコーゲン量も普通食後に平均17.1(±7.0) g/kg wet muscleであったのに対し、本法後では平均35.2(±12.3) g/kg wet muscleと、よい結果を得ている。

しかし、3日間の低糖食は選手に精神的、肉体的慢性疲労や苦痛をもたらし、競技前の激しい運動は故障の原因になり得るとして、いわゆる試合前の“テーパリング”という最終調整期間において実用的ではないということが指摘されるようになった<sup>16)18)32)</sup>。

Shermanら<sup>57)</sup>は、20.9km走前の一週間前よりトレーニング時間を漸減させ(強度は73%  $\dot{V}O_{2max}$ に固定)、その間の食事処方を3種類設定したところ、3日間の低糖食(15%)に続く3日間の高糖質食(70%)の場合と、低糖食に変えて混合食(糖質50%)にした場合の二つの処方は、6日間を通じて混合食を摂取した場合に比べ、トライアル前の筋グリコーゲン量は有意に多く、しかも、他の研究に比べても劣るものではなかった。また堀田ら<sup>28)</sup>は、日本人を対象として3週間にわたる実験スケジュールを組み、混合食(糖質50%)、低糖質食(同30%)、高糖質食(同70%)の順で各一週間の

食事処方をし、各週の終わりにそれぞれ自転車エルゴメータによる疲労困憊運動を実施、その効果を確かめている。その結果、高糖質食摂取後4日目ではいわゆる過補償現象を認めている。

CostillとMiller<sup>18)</sup>は、古典的方法の低糖質食部分を混合食に変えても、約2.5倍の過補償が観察されたとしている。したがって、Costill<sup>15)16)</sup>あるいはその共同研究者達<sup>18)</sup>は、競技の3日程前まではトレーニング強度を減らしてゆき、その間を通常食、競技2-3日前から高糖質食にするという簡略化した方法を推奨している。Ivy<sup>32)</sup>やHultman<sup>30)</sup>も低糖質部分を省略したものでも十分であるとするなど、選手・現場サイドにたった提言は、ほぼ同様の見解を示している<sup>31)42)54)</sup>。

## 第2節 運動後のグリコーゲン合成メカニズム

グリコーゲンは、動物細胞における糖質の貯蔵形態であるが、基本単位となるグルコースが $\alpha$ -1,4-グリコシド結合で長鎖をつくり、これが1,6結合によって枝分かれしたものである。この長鎖を次々と伸ばす、すなわち $\alpha$ -1,4-グリコシド結合を形成する際必要となるのがglycogen synthetaseで、グルコース→グルコース-6-リン酸(G-6-P)→グルコース-1-リン酸→UDPグルコースとして運ばれたグルコース分子がグリコーゲン鎖末端グルコースの遊離の4位のヒ

ドロキシル基に結合する反応を触媒している<sup>45)49)58)</sup>。

このsynthetaseには、G-6-Pの存在下で活性化するD型（依存型；D form）とG-6-Pに対して非依存的であるI型（I form）があり、両型は酵素触媒によって相互に変換可能で、I型はD型に比べその活性ははるかに高い<sup>49)</sup>。

Danforth<sup>20)</sup>は、麻酔したマウスを使った実験で、脚筋に5分間電気刺激による負荷をかけたところ、グリコーゲンの減少と全活性に占めるI form活性率が増加したと報告している。また、Bergströmら<sup>9)</sup>は、片脚ペダリング運動後3-4日間90-95%の高糖質食を摂取させた被験者から得られた筋で、運動後の全活性に占めるI form活性が運動前の12%から75%にまで達するが、運動筋のグリコーゲンが、運動していない筋よりも既に上回った1日後には平常レベルに戻ったとしている。更に、運動を行わなかったもう一方の筋においては、その4日間を通じてグリコーゲン量、I form活性とも平常レベルのままであった。そして、筋グリコーゲン量とI form活性との間に $r=-0.88$ という高い逆相関を報告している。Adolfson<sup>1)</sup>もラットを用いたin vitroでの実験で、筋グリコーゲン量の低いときによりglycogen synthetaseの活性化が促進されるという同様の関係を報告している。Shermanら<sup>55)56)</sup>は、マラソン直後のこの酵素の高い活性率、またその後1週間の筋グリコーゲンの緩やかな回復とこの酵素活

性率の漸減の過程とが類似していることを観察している。

こうした事実が運動（刺激）直後における急速なグリコーゲンの再補充（例えばBergströmとHultman<sup>6)</sup>が運動によって筋グリコーゲンを枯渇させた後24時間で既にグリコーゲンが平常レベルに戻ったという観察に見られたような）を説明するものと考えられている。

IvyとHolloszy<sup>33)</sup>はラットを泳がせた後、Richterら<sup>53)</sup>はラットより採取した筋を電気刺激によって収縮させた後、グルコースを含む灌流液にてインキュベートさせ、その筋によるグルコースの取り込みを測定したところ、灌流液にインスリンを添加しなくともその能力が大きくなることを観察し、またこれが比較的長い時間続くとしている<sup>33)</sup>。これは、筋運動そのものが筋のグルコース取り込み能を向上させると解される。同研究もそうであるが、これらに加えRichterら<sup>52)</sup>は、ラットに走運動を課し、Fellら<sup>21)</sup>はラットを泳がせた後、同様の実験（灌流液にインスリンを添加）を行い、一過性の運動により筋のインスリン感受性が向上することを示した。これらの研究は運動後の筋グリコーゲン再補充の過程についても調査しているが、筋グリコーゲンが低下しているときにグルコースの取り込み率が向上し、そのグルコースをグリコーゲンに結合する能力が高まるとしている。

また、Danforth<sup>20)</sup>はインスリンの効果として、筋グリコーゲン

量とは無関係な synthetase の活性化促進を早い時期より報告しており、最近では、Nesher ら<sup>47)</sup> が血中グルコース濃度が上昇するにしたがって、筋によるグルコースの取り込みが多くなることを報告している。

一方、Wahren ら<sup>65)</sup> は40分のペダリング運動 (800kpm) 前、中、並びに後の血中インスリン濃度を測定しているが、運動直後にその濃度は2.5倍にまで達し、測定された40分の回復時間中にこれが徐々に減少したとしている。また、Conlee ら<sup>14)</sup> は約3時間泳がせ、疲労困憊させたラットで、運動後の血中インスリンが低く、反対にグルカゴンとアドレナリンの両レベルが高かったにもかかわらず、4時間後に筋グリコーゲン量の再補充を観察している。Golbo ら<sup>24)</sup> は7名の男性に対して疲労困憊走運動後にグルコースを投与し、再び可能な限り走運動を課した。そして、1回目の運動中およびそれぞれの運動後における種々の血中ホルモンの変動を測定したが、運動後30分間でインスリン濃度の上昇は認められなかった。更に Ivy ら<sup>34)</sup> は、70分のペダリング運動 (68%  $\dot{V}O_{2max}$  8分/同88% 2分のサイクルで最後の10分は同68%) の直後か、あるいは2時間後に糖質溶液を与えた被験者の血中インスリン濃度について、直後に摂取したグループは180分でその濃度は平常レベルまで戻ったと報告している。最近の Nagasawa ら<sup>46)</sup> のラットを用いた研究では、こうしたインス

リン効果の出現は遅れるが、走運動後6時間以降に認められた筋の高いグルコース取り込み能が比較的長く続くと指摘している。

以上のように、運動後の血中インスリン濃度の変動や筋のインスリン感受性の経時変化については相反する報告があり、矛盾点が多く、運動後、筋のグリコーゲンが再補充あるいは過補償される過程を説明する上で、その根拠を単にインスリン効果のみに求めるわけにはいかないようである。

### 第3節 glycogen phosphorylaseの働きと活性調節

glycogen phosphorylaseによる代謝段階は、グリコーゲンの1,4-グリコシド結合の加リン酸分解を触媒し、グルコース-1-リン酸を生成する、いわばグリコーゲン異化の出発点となる反応である。

glycogen phosphorylaseはアロステリック酵素で、活性の高いリン酸型（a型）と活性の低い脱リン酸型（b型）の二つの型が存在し、両型の変換は、①筋収縮によって生じたATP、AMP、Pi、G-6-Pなどの代謝産物、②ホルモン、③神経系（神経インパルスにしたがって筋小胞体から放出されるカルシウムイオンによるphosphorylase b kinaseの活性促進）によって制御されている<sup>39)49)58)</sup>（Fig.1-1参照）。

筋における②の制御はアドレナリンに始まるカスケード連鎖反応

(Fig.1-2参照)を踏んでいる。そこではまず、細胞膜に存在する受容体が膜外のアドレナリンを感知することから始まる。この信号に応答して膜内面に結合しているアデニル酸シクラーゼが活性化され、細胞内では以下の一連の流れによって反応が増幅される。活性化されたこのシクラーゼはATPをcyclicAMPに変換し、これがプロテインキナーゼの調節サブユニット (Fig.1-2中のR) に結合して、触媒部分を遊離の活性型にする (同C)。更に活性化されたこのキナーゼはATPを消費しながら、phosphorylase b kinaseをリン酸化し、活性の高いphosphorylase b kinaseを生じる。そしてこれが活性の低いphosphorylase bのリン酸化を触媒、活性の高いa型となるわけである<sup>39)49)58)</sup>。また、①による制御は筋収縮によって生じたAMPのphosphorylase bのアロステリック部位への結合が、b型を活性の高いものにし、ATPとAMPの濃度差がこの活性を調節している (Fig.1-1参照)。

筋性グリコーゲン症の一つ (V型、McArdle病) にphosphorylaseの欠損により、グリコーゲンの分解が進まずに、筋肉内にグリコーゲンが蓄積されたままの状態にあるという病気がある。この患者はこのようにグリコーゲンからのエネルギー供給が断ち切られており、高い強度の運動を持続する事ができず、筋に多量のアデノシン-2-リン酸が蓄積されてしまう<sup>43)59)60)</sup>。

このように糖質代謝上、glycogen phosphorylaseは重要な位置を占めている。McArdle病はこの酵素の欠損によるものであるが、グリコーゲンの蓄積という意味では、運動後にグリコーゲンが再補充される過程においてもこの酵素がそうした過程に対し何らかの役割を持ってると考えても不思議はない。しかしながら、phosphorylaseの量的な、あるいはb型からa型への変換率やb型のAMPによる活性化という質的な変化といったものから、枯渇後のグリコーゲン合成を検討している研究報告はみられない。

## 第3章 実験方法

### 第1節 被験動物と飼育方法

3週齢Sprague Dawley系雄ラット21匹を被験動物とし、順天堂大学体育学部生物環境調節装置内（気温 $23.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50.0 \pm 5.0\%$ 、12時間の明暗サイクルに設定）にて、被験動物を1匹ずつ幅18cm×奥行28cm×高さ15cmのゲージ内で1991年5月28日より飼育した。

飼料は、本実験開始までは全て、船橋農場製のMM-1とし、飼料と水は自由摂取とした。MM-1の成分構成は、100g中、総エネルギー420kcal、代謝エネルギー376kcal、粗タンパク質21.1%、粗脂肪6.1%、可溶性無窒素物（糖質に相当）55.3%、および水分7.0%である。

動物の体重および飼料摂取量を、基本的に毎週火・金曜日の2回、島津製作所製電子上ざら天びん（EB-3200S、精度 $\pm 0.06\text{g}$ ）にて測定した。同時に、本実験に備え、夏目製作所製トレッドミルKN-73で傾斜を7.5度に固定し、8m/minから15m/minの走スピードで、3分から5分間程度の学習運動を行わせた。

### 第2節 被験動物のグループ分け

350g後半に成長した段階で、被験動物21匹中19匹（他に比べ体重

が極端に軽かった2匹を除外した。)を平均体重がほぼ一定になるように、5群に分けた。

1群をコントロール群(C群、n=4)とし、残る4群に関しては次節の走運動及びdietsのプログラムのなかで詳しく説明する。

### 第3節 走運動とその後1週間の飼料

運動前に体重を測定し、走運動は上述のトレッドミルを使用し、Fig.2に示すように、10m/minのスピードより始め、10分毎に2m/minずつの割合で漸増した。なお、トレッドミル走路の傾斜は7.5度に固定した。そして、ラットが、完全に走ることを拒絶した時点をもって、all-outと判断して運動時間とし、運動直後の体重を測定した。

4群のうち1群(all-out群:A群、n=4)はall-out直後、後述するように屠殺し、筋試料を採取した。

残る3群については、all-out後1週間、それぞれ異なる飼料(船橋農場製、特注)を与え飼育した。与えた試料の違いによって、ミルク群(M群、n=4)、蔗糖群(S群、n=4)、並びに脱脂群(D群、n=3)とした。

各試料は、含有エネルギー量、および各栄養素の相対構成量が一定に調整されたものであるが、タンパク質・脂質・糖質に関して、それぞれの「質」、すなわちそれらが由来する原料を変えたもので

ある (Fig.3)。それぞれ、M群はカゼイン・乳脂・乳糖、S群は魚肉・大豆油・蔗糖、D群はカゼイン・大豆油・乳糖である。

#### 第4節 屠殺方法と被験筋の採取

C群は1991年7月11日に、A群は同18日にall-out直後順次、M、S、Dの各群はそれぞれ運動の1週間後である同26日、同27日、8月1日に、吉富製薬製amerizol (3mg/ml) を尾部静脈より0.2ml静注し、屠殺した。屠殺後、両脚筋より腓腹筋 (Gastrocnemius、以下Gasと略記) およびヒラメ筋 (Soleus、同Sol) を採取し、被験筋とした。

#### 第5節 グリコーゲンの定量

被験筋のグリコーゲンの定量は、わずかな組織片においても信頼性の高い、Loらの方法<sup>44)</sup>により行った。

##### (1) 試薬の調製

###### [ I ] 30% KOH

KOH (関東科学) 300gを蒸留水に溶かし、1ℓとし、

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (和光純薬) にて飽和させた。

###### [ II ] 95% エタノール (関東科学)

[Ⅲ] 5% フェノール

フェノール（関東科学）250gを蒸留水に溶かし、5gとした。

[Ⅳ] 96-98%Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>（和光純薬）

[Ⅴ] 5mg/ml標準グリコーゲン溶液

グリコーゲン（from Rabbit Liver、SIGMA）25mgを蒸留水に溶かし、5mlとした。

（2） 定量手順

- ①脂肪や結合組織を除去した被験筋35-50mg（エーアンドデイ社製高精度分析用上皿電子天秤ER-120A、精度±0.1mgにて測定：Wg；手順⑧参照）をふた付試験管に素早くとり、水中にて0.5mlの試薬Ⅰを加え、試験管にふたをした。
- ②筋組織が完全に溶解し、均一溶液が出来るまで、20-30分間沸騰水浴中に置いた。
- ③得られた溶液に、1.1-1.2容量の試薬Ⅱを加え、水中に30分間静置した。
- ④その後、840×gで20-30分間遠心し、上澄みを注意深く取り除き、沈澱物のグリコーゲンを得た。
- ⑤得られたグリコーゲンを3.0mlの蒸留水に溶かし、その溶液

500 $\mu$ lを別の試験管に取り、試薬Ⅲ 500 $\mu$ l、Ⅳ 2.5mlを続けて素早く添加し、よく混和させ、10分間放置した。blankは、グリコーゲン溶液にかえ蒸留水500 $\mu$ lとした。

⑥再びよく混和した後、25-30 $^{\circ}$ Cの恒温槽中に10-20分間静置し、島津製作所製紫外可視分光光度計UV-160によって360-600nmにおける吸光スペクトル (Fig.4) を測定し、グリコーゲンであることを同定した。そして同時に490nmにおける吸光度を測定した。

⑦また、試薬Ⅴを蒸留水にて希釈、25、30、40、50、60、70、80、90、および100 $\mu$ g/0.5mlの溶液を調製し、手順⑤、⑥に従って検量線を作成、その傾きを算出した  
(含有量  $\mu$ g = 47.36  $\times$  Abs.490) (Fig.5)。

⑧得られた吸光度より、次式により、各グリコーゲン含量を算出した。

$\mu$ g of glycogen/g muscle =

$$(\text{Abs.490}/47.36) \times (3.0/0.5) \times (1/W)$$

Abs.490 : blank値を差し引いた値

W : g (手順①)

## 第6節 phosphorylase活性の測定

生体内での glycogen phosphorylase の働きは、グリコーゲンの  $\alpha$ -1,4結合を加リン酸分解し、 $\alpha$ -D-グルコース-1-リン酸 (G-1-P) を生ずる過程を触媒するものであるが、本活性測定法<sup>3)64)</sup>はその逆反応を利用し、G-1-Pのグルコースがグリコーゲンに結合したときに遊離するPi量をFiske-SabbaRow法<sup>22)</sup>にて定量するものである。

### (1) phosphorylase反应用試薬の調製

#### [ I ] 900mM NaF

NaF (関東科学) 1.89gを蒸留水に溶かし、50mlとした。

#### [ II ] 300 mMクエン酸buffer

クエン酸 (関東科学) 12.6gを蒸留水に溶かし、100mlとし、KOH (関東科学) にてpH6.1に調整した。

#### [ III ] 1M EDTA (エチレンジアミン四酢酸、同仁薬化学)

EDTA29.2gを蒸留水に溶かし、100mlとした。

#### [ IV ] 抽出用溶液 (50mM NaF、5mM EDTA、30%グリセロール)

試薬 I 5.56ml、試薬 III 0.5ml、グリセロール (和光純薬) 30ml、および蒸留水 63.94mlをよく混和し、冷凍保存した。

#### [ V ] 反応混液 (30mM NaF、2.5mMEDTA、0.4%グリコーゲン、30mMクエン酸buffer)

試薬Ⅰ 1.665ml、試薬Ⅱ 5.0ml、試薬Ⅲ 0.125ml、グリコーゲン (SIGMA) 0.2g、および蒸留水 43.01mlをよく混和し、冷凍保存した。

[Ⅵ] 10mM G-1-P

使用直前にG-1-P (SIGMA) 6mgを蒸留水2mlに溶かした。

[Ⅶ] 500mM AMP(adenosine monophosphate)

AMP (MERCK) 250mgを蒸留水1mlに溶かし冷凍保存した。

(2) phosphorylase反応手順

①脂肪や結合組織を除去した被験筋200mgを試験管に取り、試薬Ⅳを2ml加え、水中にてPOLYTORONを用いて5分間ホモジェネートした。それを佐久間製作所製遠心分離機M-150で0℃、16000rpmで10分間遠心し、得られた上澄みをphosphorylase抽出液とした。

②試験管に抽出液25 $\mu$ lを取り、試薬Ⅴ 100 $\mu$ l、蒸留水170 $\mu$ lを加えた。そこに試薬Ⅵを添加し、30℃で10分間インキュベートした後、60%過塩素酸(関東科学)を35 $\mu$ lを加え、反応を停止させた。また、G-1-Pを添加しない0分反応、および抽出液を加えないG-1-P10分間反応の二種類のblankを設定した。更に、試薬Ⅶを1.25 $\mu$ l(最終濃度1.5mM)加え

ることによる、全活性の測定も同時に行った。

### (3) リン酸定量用試薬の調製

#### [ I ] 0.25g/dl ANS (1-アミノ-2-ナフトール-4-スルホン酸)

ANS (和光純薬) 0.25g、NaHSO<sub>3</sub> (和光純薬) 7.325g、  
およびNa<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (和光純薬) 0.25gを蒸留水に溶かし、  
50mlとし、遮光し冷蔵保存した。

#### [ II ] 5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (和光純薬) 27.5mlと蒸留水をよく混和し、  
200mlとした。

#### [ III ] 2.5g/dl トリブテン酸アンモニウム

トリブテン酸アンモニウム (和光純薬) 十数グラムを乳鉢でよ  
く砕き、5gを試薬IIに溶き200mlとし、もう5gを蒸留水  
に溶き200mlとし、それぞれ30mlと蒸留水180mlとをよ  
く混和し、遮光の上冷蔵保存した。

### (4) リン酸の定量

①2)-②で得られた反応試料に5%過塩素酸 (60%過塩素酸、  
関東科学を蒸留水にて希釈) 1.165mlを加え、佐久間製作  
所製遠心機B10-Aで3000rpm、5分間遠心した。

②その上澄み液1mlを別の試験管に取り、試薬Ⅲ1ml、蒸留水0.4mlを加えた後、試薬Ⅰ0.1mlを添加、よく混和し、25℃水浴中に15分以上置き、660nmにおける吸光度を島津製作所製紫外可視分光光度計UV-160によって測定した。

#### (5) BIURET試薬の調製と検量線の作成

抽出液中のタンパク質の定量をYamaguchiとSekine<sup>66)</sup>のBIURET法により行った。

##### ① ロッセル塩（酒石酸カリウムナトリウム、小宗化学）

4.5g、硫酸銅（和光純薬）1.5g、よう化カリウム（和光純薬）0.5g、および水酸化ナトリウム（関東科学）7gを蒸留水に溶かし、500mlとしたBIURET試薬を調製した。

②牛血清アルブミン（和光純薬）より調製した、0、1、2、4、および8mg/mlの各濃度溶液0.3mlに対して、蒸留水1.2ml、BIURET試薬1.5mlをそれぞれ加え、37℃恒温槽に15分間放置し、540nmで吸光度を測定（島津製作所製紫外可視分光光度計UV-160）、

$$\text{濃度 (mg/ml)} = 47.5 \times \text{Abs.540}$$

の検量線を得た（Fig.6）。

(6) 抽出液中タンパク質の定量

抽出液0.3mlを用いて、5)-②に示した手順にしたがって吸光度を測定し、同手順により得た検量線から各抽出液中のタンパク濃度を算出した。

(7) phosphorylase活性の算出

次式により phosphorylase活性を算出した。各試料が少量で、かつホモジェネートの際のエラーも考慮し、抽出液中に含まれるタンパク量当りとした。

phosphorylase activity (Pi mol/mg protein/min) =

$$(5/31) \times (\text{Abs.660}/0.145) \times [1/(\text{タンパク濃度} \times 0.025)] \times (1/10)$$

Abs.660 : 2つのblank値を差し引いた値

タンパク濃度 : mg/ml (手順6)

## 第4章 実験結果

### 第1節 運動時間と体重変動

各群の疲労困憊までの運動時間と運動後の体重減少率およびdiet 1週間後の体重増加率をTable 1に示した。

A群に100'33"、M群に91'00"、D群に80'55"という比較的長時間走行したラットが含まれているため、群内および群間に多少のばらつきがあったものの、各群間に有意な差は認められなかった。

運動により各群とも有意な体重減少が認められ、各群間に差はなかった。

### 第2節 運動後1週間の食餌量

M、S、並びにD群に関し、all-out後1週間の総食餌量はそれぞれ平均、171.3±6.9 g、189.5±13.4 g、145.5±20.8 gでS群はM群に比べやや多く、D群に比べ有意に多かった ( $p<0.05$ )。

all-out後1週間の自由摂取による食餌量と次に示すグリコーゲン量に相関は認められなかった。

### 第3節 筋グリコーゲン含量

各群の筋グリコーゲン含量はGas、SolともFig.7に示した通りである。

Gasにおけるグリコーゲン量は、C群で平均 $648.8 \pm 185.4 \mu\text{g/g}$  muscle、A群で $467.5 \pm 211.7 \mu\text{g/g}$  muscleとA群が少ない傾向にあった。C群のうち1匹が $345.5 \mu\text{g/g}$  muscleと他の3匹に比べかなり少なく、2回にわたり各3本の試験管にて吸光度測定を行ってみたが同じ傾向であった。ただし、体重及び飼育中の食餌量とも他の3匹に比べ劣るものではなかった。

all-out後1週間、異なる飼料を与えた食餌群では、M群でC群と同レベルに回復し、A群に比し有意に多かった ( $p < 0.05$ )。一方、SおよびD群は他群に比べ有意に少なかった。

Solにおけるグリコーゲン量は、C群で平均 $1126.0 \pm 313.2 \mu\text{g/g}$  muscleであった。A群の中には1匹、他の3匹に比べ $791.2 \mu\text{g/g}$  muscleとかなり多いものが含まれていたが、平均 $456.9 \pm 194.1 \mu\text{g/g}$  muscleでC群よりも有意に少ないものであった ( $p < 0.05$ )。MおよびS群はA群よりも多く ( $p < 0.05$ )、C群と同じレベルにあった。D群のうち1匹は他の全てのラットに比べ極端に多いものが含まれていたが、A群よりも多い傾向であった。

#### 第4節 phosphorylase活性

Table 2、3にそれぞれGas、Solのphosphorylase活性を示したが、AMPを添加した（最終濃度1.5mM）いわゆる全活性値（a+bに相当）は、GasがSolに比べ明らかに高いものであった。

Gasにおける全活性値は、CおよびA群に差はなかった。また、両群に比べM、S、並びにD群が有意に高かった（ $p < 0.01$ ）。一方、その食餌群の間では、D、S、M群の順に高く、D群がS、M両群に比し有意に高かった（ $p < 0.01$ ）。また、AMP無添加時における活性型（a型）の活性は、1匹を除きC群には殆ど活性はみられず、C群に比べA群は有意に高かった（ $p < 0.01$ ）。その両群に比し、S、D両群は有意に高く、M群には群内にばらつき（0.058-0.203  $\mu\text{mol/mg protein/min}$ ）があったがA群と同レベルで、S群より低く（ $p < 0.05$ ）、D群より低い傾向であった（Table 2）。

Gasにおける全活性値に対するa型活性の割合は、C、A、M、S、並びにD群それぞれ23.0、84.0、48.1、77.1そして73.5%であった（Fig.8）。

Solにおけるa型活性は各群とも低く（Table 3）、全活性に対するその割合は、D群で10.8%以外は10%以下と低い活性率であった（Fig.8）。

## 第5節 筋グリコーゲン含量と phosphorylase活性

Gasにおいて、全ラット19匹のグリコーゲン貯蔵量と glycogen phosphorylase活性（AMP無添加）との間に、 $r=-0.76$ という高い逆相関が認められた（ $p<0.005$ 、Fig.9）。

一方、活性が低かったSolにおいて、両者間の相関は全く認められなかった（Fig.10）。

## 第5章 考察

グリコーゲンの再補充という現象を捉える側面として、これまでの研究は、その合成過程に着目したものが殆どであり、グリコーゲン合成酵素とその活性を調節するインスリンが主な研究対象となってきた。しかしながら、BergströmとHultman<sup>6)7)</sup>の初期の研究において報告されたのは、運動によって枯渇に追い込まれた片脚の筋のみにおいて合成が活発に行われる、ということであった。単にホルモンの働きだとすれば、運動をしていないもう一方の脚においても合成が促進されても不思議はない。そして、グリコーゲンの分解、利用という観点からこの現象を解明しようとする試みはなされていない。

本研究では、ラットに疲労困憊走運動を負荷し、その後1週間、糖質、脂質、およびタンパク質の質的組成のみが異なる飼料を与えると、その回復期間のグリコーゲン代謝にどのような変化がみられるのか、ということに同化過程とは正反対のグリコーゲン分解という裏側よりアプローチし、運動後のグリコーゲン代謝に関して検討を加えることが目的であった。

運動はトレッドミルを使った疲労困憊走運動であった。各群に運動時間に差はなく、また、運動によって各群ともに有意な体重減少

が認められたことから、十分な運動が行われたと推察できる。更に、運動グループ間で運動後の体重減少率に差がなかったことを加えれば、運動直後に筋試料を採取したA群にみる筋グリコーゲン含量や phosphorylase活性の変動が、運動を行った全ラットの運動直後においても同様に起こっているものと考えられる。

A群のグリコーゲン量は、運動を負荷しなかったC群と比べ、Gasにおいて減少傾向、Solにおいては有意に減少しており、運動中のエネルギー源としての筋のグリコーゲン利用が認められる。これは古くからの多くの研究報告<sup>2)5)6)8)25)26)</sup>により疑う余地はなく、本研究においてグリコーゲン再補充に際しての phosphorylaseの影響を評価する上でも、この運動が充分であったことが意味を持つ。

Solにおいては、運動後の有意なグリコーゲン含量の減少と、1週間後の十分な再補充が食餌群に観察され、Gasにおいては運動後の減少傾向とM群での再補充が観察されたのみであった。これは赤筋では減少後の回復が速やかに行われるが、白筋においてはそれが遅れるというように、赤筋と白筋での糖質代謝の差異を反映したものと受け取ることができる。

#### 第1節 phosphorylase活性とその活性化に対する運動の影響

AMP添加による phosphorylaseの全活性 (a+bに相当) 測定により、

GasとSolにおいてその活性に明らかな違いが示された。Gasではその活性が高く、Solにおいては低かった。このことは、速筋と遅筋の持つ生理学的特性を反映しており、この結果は、NewsholmeとStart<sup>48)</sup>がまとめたものと一致している。

更に運動直後、Solにおいては全活性に対する活性型（a型）の割合が低く、一方Gasでは、運動によってその活性が有意に高まったことから、白筋においてはリン酸化によるphosphorylaseの活性化（カスケード連鎖反応に由来するb型からa型への変換）がグリコーゲンの分解をコントロールしており、赤筋においてはその反応の出発点となるアドレナリンの効果がブロックされているものと考えられる。ただし、赤筋の細胞膜で、ホルモンによる信号が果して本当にブロックされているのかどうかに関しては、カスケード内の反応の流れを更に詳しく調べる必要がある。しかし、Solでは運動後にグリコーゲンの減少がみられたのにもかかわらず運動後のphosphorylase活性（AMP無添加）が低かったことから、ホルモンによる活性化よりはむしろ、運動による細胞内のAMP濃度の上昇が活性を調節している（アロステリック部位にAMPが結合することによってもともと不活性であるはずのb型を活性化している、そして測定段階でAMPが遊離した）と考えられる。

## 第2節 phosphorylase活性と筋グリコーゲン含量

更に、S、A群に1週間の3つの食餌群も加えたphosphorylase活性（a活性）と筋グリコーゲン含量との関係を調べたところ、Gasにおいて有意な逆相関が示されたことから、グリコーゲン代謝に対し白筋ではphosphorylaseのa型、b型の相互変換が多大な影響力を持っていることがわかる。活性率が低下した（a型からb型へ）M群ではグリコーゲンが運動前のレベル（C群のレベル）にまで回復されたが、運動によって高められた活性（a型）が維持されたままのS、D両群ではグリコーゲンの分解率も高い状態が持続されており、運動直後のA群よりも更に少ないグリコーゲンの含有量になってしまったということである。

一方、Solにおいては全くの無相関であったことから、赤筋ではその貢献度は小さいものと考えられる。

McArdleにおいてはphosphorylaseの欠損によりグリコーゲン分解が進まずに、筋にグリコーゲンが蓄積されたままの状態、それが利用できないというものであった。Gasでは、phosphorylaseの高い活性（全活性値）が認められ、しかも運動によってその活性率が高まるということがとがわかった。そして、phosphorylaseの活性とグリコーゲン含量との間に有意な逆相関が認められたことから、白筋においては、活性化されたa型がb型（不活性型）へいかにはやく

そして容易に変換をすることができるか、ということがグリコーゲン再補充において重要であると考えられる。

### 第3節 食餌組成がphosphorylase活性に及ぼす影響

Gasにおいては興味深い結果が得られた。1週間のdiet後、M群にグリコーゲンの再補充がみられたのに対してS、D群は低下したということである。飼料に占める糖質の相対含有量は全ての飼料において等しく調製されているために、こうした現象の差が、試料の「質」に由来するものと考えられるわけである。しかし、ただ単にグルコースとフルクトースの二糖類である蔗糖と、グルコースとラクトースの結合による乳糖という糖質の違いとは考えにくい。なぜなら、糖質として乳糖が成分であるM群とD群とでは、全く相反する結果であったからである。このように考えれば、この結果に沿った成分の組合せは脂質である。乳脂がその成分であるM群と、大豆油がそうであるS、D群の違いである（Fig.3参照）。Fig.11に示すように、乳脂ではその67.4%が飽和脂肪酸で構成されている一方、大豆油は84.3%が不飽和脂肪酸で占められている<sup>40)</sup>というように、飽和-不飽和の含有率が逆転している。

したがって、この脂質の大きな違いがグリコーゲン再補充の機構に対し影響を及ぼした可能性がある。例えば、白筋における

phosphorylaseの活性 - 不活性の相互変換が、先述のFig.1-2に示す通りのカスケード連鎖反応によるものと考えるのであれば、ホルモンに対する影響が挙げられる。それは、その分泌量そのものに対するもの、あるいはホルモンの信号を細胞内に伝えるために膜に存在するレセプター、またはその役を担うアデニル酸シクラーゼへの影響である。細胞膜における脂質の貢献度を考えるのであれば、あるいはレセプターに対する影響であるかも知れない。飽和脂肪酸がアドレナリンに対するそのレセプター部位を阻害するか、不飽和脂肪酸が、グリコーゲン合成を促進するインスリンに感知するレセプター部位をブロックしてしまうかということである。

このように、食事によって摂取された脂質が（あるいはその他の栄養素であっても）その性質の違いによって、細胞膜にある種々のレセプター部位に対し特異的に作用するとすれば、食事によって、筋に対するホルモンの効果を操作できる可能性があり、興味深い。今後、栄養素の成分と関連させて、膜の機能や性質について、あるいは前述したようにカスケード反応系の応答について、更に掘り下げる必要がある。

## 第6章 結論

運動回復期間のグリコーゲン再補充に際し、白筋ではglycogen phosphorylaseの影響を大いに受け、その活性調節がカスケード反応系によって行われると考えられた。一方赤筋においては、糖質代謝の上でphosphorylaseの果たす役割が抑制されており、また、その活性化がカスケード機構に依存しているのではなく、筋内のAMP濃度が変動することによって起こっているものと考えられた。

更に、白筋においては、摂取した飼料に含まれる飽和あるいは不飽和脂肪酸が、そのカスケード反応系に影響を及ぼした可能性があり、摂取栄養素の「質」の操作が、筋に対するホルモンの効果、あるいはその反応系内の流れをコントロールし得るであろうことが示唆された。

## 第7章 要約

1) 本研究の目的は、運動によって枯渇された筋グリコーゲンが再補充される時、グリコーゲン異化の過程が、それに対してどの様に関与しているのか、glycogen phosphorylaseにその焦点を絞り、その活性と性状をラット脚筋を用いて調べることであった。

2) 更に、運動後1週間の回復期間に与える飼料を3種類設定し、食餌組成がそうした過程に及ぼす影響についても検討を加えた。それらの飼料は、各栄養素の相対含有量を一定にし、糖質、脂質、並びにタンパク質について、その「質」を変えて調製されたものであった。それぞれ、M群は乳糖・乳脂・カゼイン、S群は蔗糖・大豆油・魚肉、D群は乳糖・大豆油・カゼインであった。

3) 運動はトレッドミルを用いた走運動とし、疲労困憊に至るまでそれを負荷した。

4) 運動群間で運動時間に差はなく、運動によりそれぞれ有意な体重減少が認められた。したがって、その運動が充分であり、運動直後の代謝状況が直後に屠殺したA群に代表されるとみなされた。

5) ヒラメ筋においては、1週間後で3つの食餌群ともに運動前のグリコーゲンレベルにまで回復したが、腓腹筋では、M群で回復がみられたのみで、SとD両群については運動前後のレベルよりもさら

に低下した。

6) 腓腹筋においては、グリコーゲン含量と phosphorylase 活性 (a 型活性) との間に、 $r = -0.76$  という高い負の相関が認められた ( $p < 0.005$ )。一方、ヒラメ筋においてはその相関がみられず、また、phosphorylase の全活性値が低い上に、運動直後にグリコーゲン含量の減少がみられたにもかかわらず、その時の活性率も低値を示した。

7) 以上の結果は、白筋と赤筋での運動回復期間における糖質代謝の違いを反映していると考えられた。特に白筋では、グリコーゲン合成の過程に対して、phosphorylase の活性率も強い影響力を持っており、その活性化がカスケード反応系に依存しているものと考えられた。

8) また、白筋でみられたグリコーゲン含量の食餌群間の違いは、飽和あるいは不飽和脂肪酸のこの反応系に対する影響と考えられ、食事によって、以上の過程を操作できる可能性があり、細胞膜やカスケード反応系内の流れに対し、摂取された栄養素がいかなる効果を発揮し得るのか、今後さらに研究を重ねる必要がある。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、実験計画当初より数々の御助言、御示唆  
および御校閲を賜りました本学栄養生化学研究室の山口正弘教授、  
被験動物の飼育、解剖等の際しお手伝い頂いた本学大学院生伴好彦  
君をはじめ同研究室のゼミ生のみなさんに深く感謝の意を表します。

## 参考文献

- 1) Adolfson, S.: Effect of contraction in vitro on glycogen content and glycogen synthetase activity in muscle. Acta Physiol. Scand. 88, 189-197, (1973)
- 2) Ahlborg, G., Bergström, J., Ekelund, L.G. and Hultman, E.: Muscle glycogen and muscle electrolytes during prolonged physical exercise. Acta Physiol. Scand. 70, 129-142, (1967)
- 3) Assaf, A. and Yunis, A.A.: Structural and kinetic properties of crystalline shark muscle glycogen phosphorylase. Biochemistry 12, 1423-1433, (1973)
- 4) Åstrand, P.O.: Diet and athletic performance. Fed. Proc. 26, 1772-1777, (1967)
- 5) Bergström, J., Hermansen, L., Hultman, E. and Saltin, B.: Diet, muscle glycogen and physical performance. Acta Physiol. Scand. 71, 140-150, (1967)
- 6) Bergström, J. and Hultman, E.: Muscle glycogen synthesis after exercise: an enhancing factor localized to the muscle cells in man. Nature 210, 309-310, (1966)
- 7) Bergström, J. and Hultman, E.: Synthesis of muscle glycogen in man after glucose and fructose infusion. Acta Med. Scand. 182, 93-107, (1967)
- 8) Bergström, J. and Hultman, E.: A study of the glycogen metabolism during exercise in man. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 19, 218-226, (1967)
- 9) Bergström, J., Hultman, E. and Roch-Norlund, A.E.: Muscle glycogen synthetase in normal subjects. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 29, 231-236, (1972)
- 10) Blom, P.C.S., Hostmark, A.T., Vaage, O., Kardel, K.R. and Maehlum, S.: Effect of different post-exercise sugar diets on the rate of muscle glycogen synthesis. Med. Sci. Sports Exerc. 19, 491-496, (1987)
- 11) Cain, D.F. and Davies, R.E.: Breakdown of adenosine triphosphate during a single contraction of working muscle. Biochim. Biophys. Res. Comm. 8, 361-366, (1962)
- 12) Christensen, E.H. and Hansen, O.: III. Arbeitsfähigkeit und Ernährung. Skand. Arch. Physiol. 81, 160-171, (1939)
- 13) Christensen, E.H. and Hansen, O.: IV. Hypoglykämie, Arbeitsfähigkeit und Ermüdung. Skand. Arch. Physiol. 81, 172-179, (1939)

- 14) Conlee, R. K., Hickson, R. C., Winder, W. W., Hagberg, J. M. and Holloszy, J. O.: Regulation of glycogen resynthesis muscle rats following exercise. Am. J. Physiol. 4, R145-R150, (1978)
- 15) Costill, D. L.: Carbohydrates for exercise: dietary demands for optimal performance. Int. J. Sports. Med. 9, 1-18, (1988)
- 16) Costill, D. L.: Inside running: basis of sports physiology pp. 59-72, Benchmark Press: Indianapolis (1986)
- 17) Costill, D. L., Coyle, E., Dalsky, G., Evans, W., Fink, W. and Hoopes, D.: Effect of elevated plasma FFA and insulin on muscle glycogen usage during exercise. J. Appl. Physiol. 43, 690-695, (1977)
- 18) Costill, D. L. and Miller, J. M.: Nutrition for endurance sports: carbohydrate and fluid balance. Int. J. Sports. Med. 1, 2-14, (1980)
- 19) Costill, D. L., Sherman, M., Fink, W., Maresh, C., Witten, M. and Miller, J.: The role of dietary carbohydrates in muscle glycogen resynthesis after strenuous running. Am. J. Clin. Nutr. 34, 1831-1836, (1981)
- 20) Danforth, W. H.: Glycogen synthetase activity in skeletal muscle: interconversion of two forms and control of glycogen synthesis. J. Biol. Chem. 240, 588-593, (1965)
- 21) Fell, R. D., Terblanche, S. E., Ivy, J. L., Young, J. C. and Holloszy, J. O.: Effect of muscle glycogen content on glucose uptake following exercise. J. Appl. Physiol. 52, 434-437, (1982)
- 22) Fiske, C. H. and SabbaRaw, Y.: The isolation and function of phosphorus. J. Biol. Chem. 66, 375-400, (1925)
- 23) Fogelholm, G. M., Tikkanen, H. O., Näveri, H. K., Näveri, L. S. and Härkönen, M. H. A.: Carbohydrate loading in practice: high muscle glycogen concentration is not certain. Br. J. Sp. Med. 25, 41-44, (1991)
- 24) Golbo, H., Holst, J. J. and Christensen, M. J.: The effect of different diets and of insulin on the hormonal response to prolonged exercise. Acta Physiol. Scand. 107, 19-32, (1979)
- 25) Grollman, S. A.: A study of oxygen debt in the albino rat. J. Exp. Zool. 128, 511-523, (1955)
- 26) Hermansen, L., Hultman, E. and Saltin, B.: Muscle glycogen during prolonged

- severe exercise. Acta Physiol. Scand. 71, 129-139, (1967)
- 27) Hickson, R. C., Rinnie, M. J., Conlee, R. K., Winder, W. W. and Holloszy, J. O.: Effect of increased plasma fatty acid on glycogen utilization and endurance. J. Appl. Physiol. 43, 829-833, (1977)
- 28) 堀田 昇、堀田朋基、石河利寛:炭水化物ローディングが健康な日本青年男子の筋グリコーゲン量および自転車エルゴメータによる持続的能力に及ぼす影響, 体力科学 33, 184-191, (1984)
- 29) Hultman, E.: Studies on muscle metabolism of glycogen and active phosphate in man with special reference to exercise and diet. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 19(Suppl. 94), 1-63, (1967)
- 30) Hultman, E.: Nutritional effects on work performance. Am. J. Clin. Nutr. 49, 949-957, (1989)
- 31) 池田一文:炭水化物ローディングと栄養, 体育の科学 40, 344-348, (1990)
- 32) Ivy, J. L.: Muscle glycogen synthesis before and after exercise. Sports Medicine 11, 6-19, (1991)
- 33) Ivy, J. L. and Holloszy, J. O.: Persistent increase in glucose uptake by rat skeletal muscle following exercise. Am. J. Physiol. 241, C200-C203, (1981)
- 34) Ivy, J. L., Kats, A. L., Cutler, C. L., Sherman, W. M. and Coyle, E. F.: Muscle glycogen synthesis after exercise: effect of time of carbohydrate ingestion. J. Appl. Physiol. 64, 1480-1485, (1988)
- 35) Jansson, E. and Kaijser, L.: Effect of diet on the utilization of blood-borne and intermuscular substrates during exercise in man. Acta Physiol. Scand. 115, 19-30, (1982)
- 36) Karlsson, J. and Saltin, B.: Diet, muscle glycogen, and endurance performance. J. Appl. Physiol. 31, 203-206, (1971)
- 37) Kochan, R. G., Lamb, D. R. and Luts, S. A.: Glycogen synthase activation in human skeletal muscle: effect of diet and exercise. Am. J. Physiol. 236, E660-E666, (1979)
- 38) Krogh, A. and Linhardt, J.: The relative value of fat and carbohydrate as sources of muscular energy. With appendices on the correlation between standard metabolism and the respiratory quotient during rest and work. Biochem. J. 14, 290-363, (1920)

- 39) Lehninger, A.L.: Principles of Biochemistry (1982) - 小山次郎, 竹内敬人, 堀内忠郎, 山科郁男, 山羽 力訳: レーニンジャーの新生化学, 435-473, 廣川書店: 東京(1989)より引用
- 40) Lenthal, C. (ed.): Geigy scientific tables Vol.1 Units of measurement body fluids composition of the body nutrition p.264, CIB-GEIGY Limited: Basle, Switzerland (1981)
- 41) Levine, S.A., Gordon, B. and Derrick, C.L.: Some changes in the chemical constituents of the blood following a marathon race: with special reference to the development of hypoglycemia. Jour.A.M.A. 82, 1778-1779, (1924)
- 42) Lewis, S. and Grelin, S.: Nutrition and endurance. Am.J.Cli.Nutr. 26, 1011-1014, (1973)
- 43) Lewis, S.F. and Haller, R.G.: The pathophysiology of McArdle's disease: clues to regulation in exercise and fatigue. J.Appl.Physiol. 61, 391-401, (1986)
- 44) Lo, S., Russell, C. and Taylor, A.W.: Determination of glycogen in small tissue samples. J.Appl.Physiol. 28, 234-236, (1970)
- 45) McMurray, W.C.: Essential of Human metabolism: the relationship of biochemistry to human physiology and disease, 2nd ed. Harper & Row: New York (1983) - 斎藤正行, 矢島義忠訳: 人体の代謝-分子レベルでの考察 117-161. 東京化学同人: 東京(1987)より引用
- 46) Nagasawa, J., Sato, Y. and Ishiko, T.: Time course in vivo insulin sensitivity after a single bout of exercise in rats. Int.J.Sports.Med. 12, 399-402, (1991)
- 47) Neshler, R., Karl, I.E. and Kipnis, D.M.: Dissociation of effects of insulin and contraction on glucose transport in rat epitrochlearis muscle. Am.J.Physiol. 249, C226-C236, (1985)
- 48) Newsholme, E.A. and Leech, A.R.: Biochemistry for the medical sciences 370-371, John Wiley & Sons: Chichester (1983)
- 49) Newsholme, E.A. and Start, C.: Regulation in metabolism, John Wiley & Sons: London (1973) - 中沢淳, 森正敬訳: 動物の代謝調節, 改訂版. 156-206, 講談社 (1973)より引用
- 50) Reed, M.J., Brozinick, J.T., Lee, M.C. and Ivy, J.L.: Muscle glycogen post-exercise: effect of mode of carbohydrate administration. J.Appl.

Physiol. 66, 720-726, (1989)

- 51) Rennie, M. J., Winder, W. W. and Holloszy, J. O.: A spring effect of increased plasma fatty acid on muscle and liver glycogen content in the exercising rat. Biochem. J. 156, 647-655, (1982)
- 52) Richter, E. A., Garetto, L. P., Goodman, N. M. and Ruderman, N. B.: Muscle glycogen metabolism following exercise in the rat: increased sensitivity to insulin. J. Clin. Invest. 69, 785-793, (1982)
- 53) Richter, E. A., Garetto, L. P., Goodman, N. M. and Ruderman, N. B.: Enhanced muscle glycogen metabolism after exercise: modulation by local factors. Am. J. Physiol. 246, E476-E482, (1984)
- 54) 齊藤慎一, 鈴木正成: 糖質の摂取と運動—運動後と運動中の体組織グリコーゲン再補充のための栄養処方—, J. J. Sports Sci. 5, 168-174, (1986)
- 55) Sherman, W. H., Costill, D. L., Fink, W. J., Armstrong, L. E., Hagerman, F. C. and Murray, T. F.: The marathon: recovery from acute biochemical alteration. Biochem. Exer. 13, 312-317, (1983)
- 56) Sherman, W. H., Costill, D. L., Fink, W. J., Hagerman, F. C., Armstrong, L. E. and Murray, T. F.: Effect of a 42.2-km footrace and subsequent rest or exercise on muscle glycogen and enzymes. J. Appl. Physiol. 55, 1219-1224, (1983)
- 57) Sherman, W. H., Costill, D. L., Fink, W. J., and Miller, J. M.: Effect of exercise-diet manipulation on muscle glycogen and its subsequent utilization during performance. Int. J. Sports. Med. 2, 114-118, (1981)
- 58) Stryer, L.: Biochemistry, 3rd ed. 449-468, W. H. Freeman & Company: New York (1988)
- 59) Stryer, L.: Biochemistry, 3rd ed. 495-496, W. H. Freeman & Company: New York (1988)
- 60) Stanbury, J. B.: Dietary treatment of the inborn errors of metabolism. In Linder, M. C. ed. Nutritional biochemistry and metabolism. with clinical application, 2nd ed. 543-557, Elsevier: New York (1991)
- 61) 鈴木英樹, 辻本尚弥, 山本章: 運動前の食事組成が長時間運動中の肝臓及び筋グリコーゲンの枯渇と脂肪分解能に及ぼす影響—高炭水化物食と高脂肪食の比較—, 体育学研究 35, 341-348, (1991)
- 62) 鈴木正成, 千葉啓子: ラットの食事摂取量と体組成に及ぼす摂取様式の影響, 日

本栄養食糧学会誌 36,175-183,(1983)

- 63) Suzuki, M., Saitoh, S., Yashiro, M., Hariu, J.: Dietary effects on liver and muscle glycogen depletion in exhaustively exercised rats: energy composition and type of complex carbohydrate. J.Nutr.Sci.Vitaminol. 30,453-466,(1984)
- 64) 宇井理生: グリコーゲン代謝. (社)日本生化学会編 生化学実験講座10(糖質の代謝), 379-413,東京化学同人:東京(1975)
- 65) Wahren, J., Feling, P., Handler, R. and Ahlborg, G.: Glucose and amino acid metabolism during recovery after exercise. J.Appl.Physiol. 34,838-845,(1973)
- 66) Yamaguchi, M. and Sekine, T.: Sulfhydryl groups involved in the active site of myosin A adenosine triphosphate. J.Biochem. 59,24-33,(1966)

Effects of Diets  
after Exhaustive Running on  
Carbohydrate Metabolism in Leg Muscles of Rats

Tadamoto KATSUME

Summary

- 1)The purpose of this study was to investigate the effects of diets after exhaustive running on glycogen content and glycogen phosphorylase activity in soleus and gastrocnemius of young rats.
- 2)Nineteen male rats were divided into five groups; unexercised control(C,n=4), all-out control(A,n=4),and three different regimen groups(n=4 in each group).
- 3)Running exercise was performed on a motor driven treadmill.
- 4)Diets were provided during 1 week after that exhaustive running. These diets were milk(M),skimmed milk(D),and sugar(S)diets. Although these diet foods were prepared as metabolic energy and relative amount of each nutrient were equalized,these were made from different sources in carbohydrate,fat,and protein(M included lactose,milkfat,and casein/S included sucrose,soybean oil,and fish meals/D included lactose,soybean oil,and casein for carbohydrate,fat,and protein,respectively).
- 5)The running time were not significantly different among exercised groups,and the body weight decreased significantly in each rat group after running.
- 6)In gastrocnemius,all-out running caused low glycogen content. Only M diet returned the glycogen content to control level. Then,phosphorylase a activity in M rats showed lower than that in S and D rats. From these experimental results, a negative correlation was found between glycogen content and phosphorylase a activity in this muscle,significantly( $r=-0.76$ ). In contrast, this correlation was not obtained from the results in soleus.
- 7)It is suggested that the activation of phosphorylase is regulated by the cascade mechanism in white muscle,and that this reaction influences glycogen synthesis.
- 8)In addition,it seems that a difference of fat source in diets(saturated or unsaturated fatty acid)caused differences in glycogen level among diet groups (M vs. S and D),having an effect on the cascade reaction.

Table 1 Weight and Running Time

Group	Weight g	Running Time	Weight	
			at Exhaustion % of Decrease	after 1 week % of Increase
C(n=4)	376.5±30.53			
A(n=4)	382.0±28.68	72'53"±16'35"	4.5±1.08	
M(n=4)	381.4±19.48	68'55"±13'35"	3.2±0.26	10.3±3.39
S(n=4)	375.5±16.04	58'21"±3'46"	3.4±0.12	12.1±1.75
D(n=3)	380.0±9.52	69'35"±10'28"	3.7±0.66	6.7±4.80

Table 2 Phosphorylase Activity  
in Gastrocnemius

Group	-AMP( a )	+AMP(a+b)
C	0.084±0.0296	0.208±0.0049
A	0.179±0.0074**	0.213±0.0251
M	0.139±0.0608*	0.289±0.0051
S	0.226±0.0201**	0.293±0.0067
D	0.236±0.0331**	0.321±0.0102

(Pi mol/mg protein/min)

\* p<0.05(vs. C)

\*\* p<0.01(vs. C)

Table 3 Phosphorylase Activity  
in Soleus

Group	-AMP( a )	+AMP(a+b)
C	0.004±0.0015	0.051±0.0218
A	0.005±0.0015	0.084±0.0094
M	0.003±0.0018	0.050±0.0100
S	0.003±0.0041	0.064±0.0157
D	0.007±0.0011	0.065±0.0013

(Pi mol/mg protein/min)

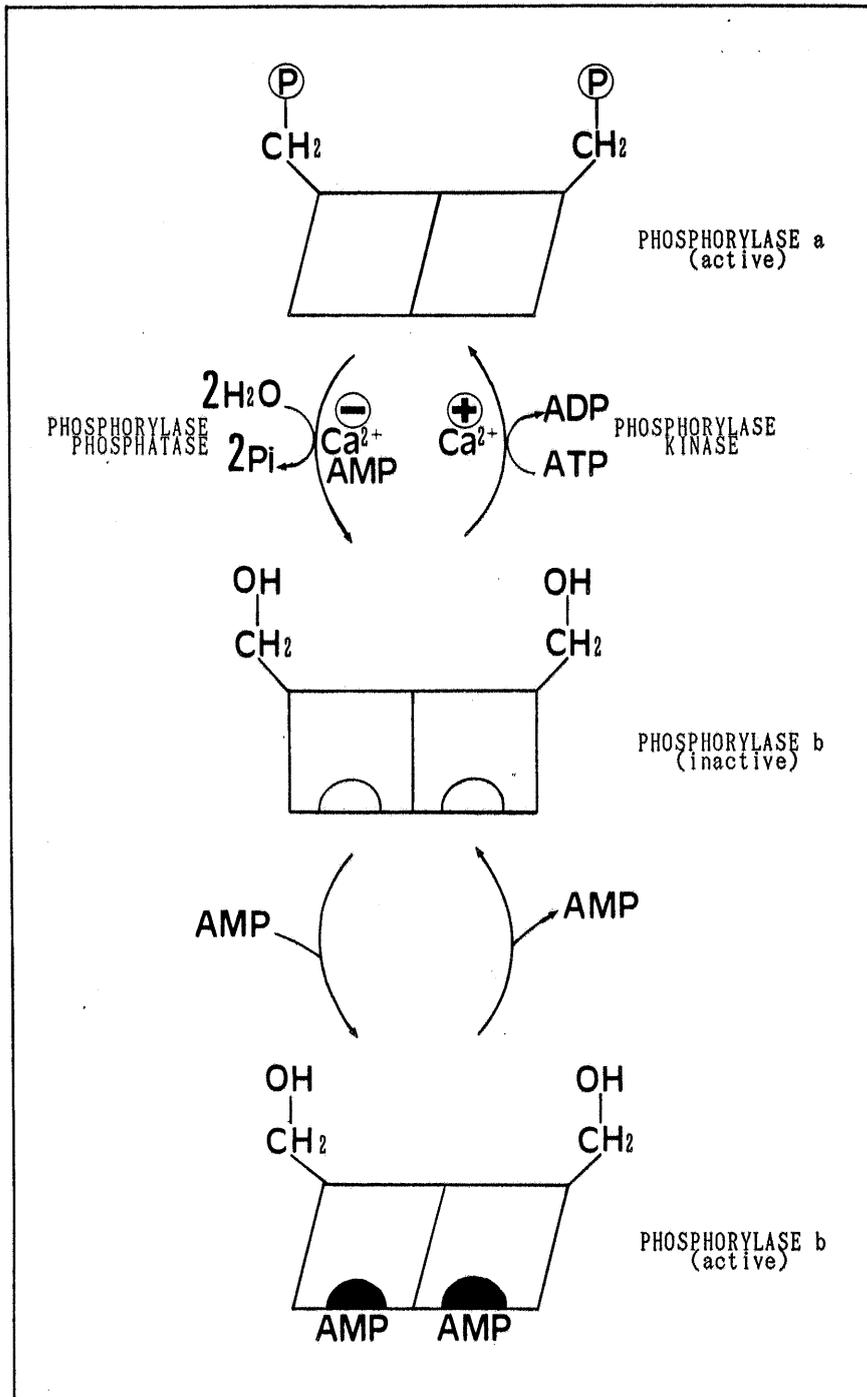
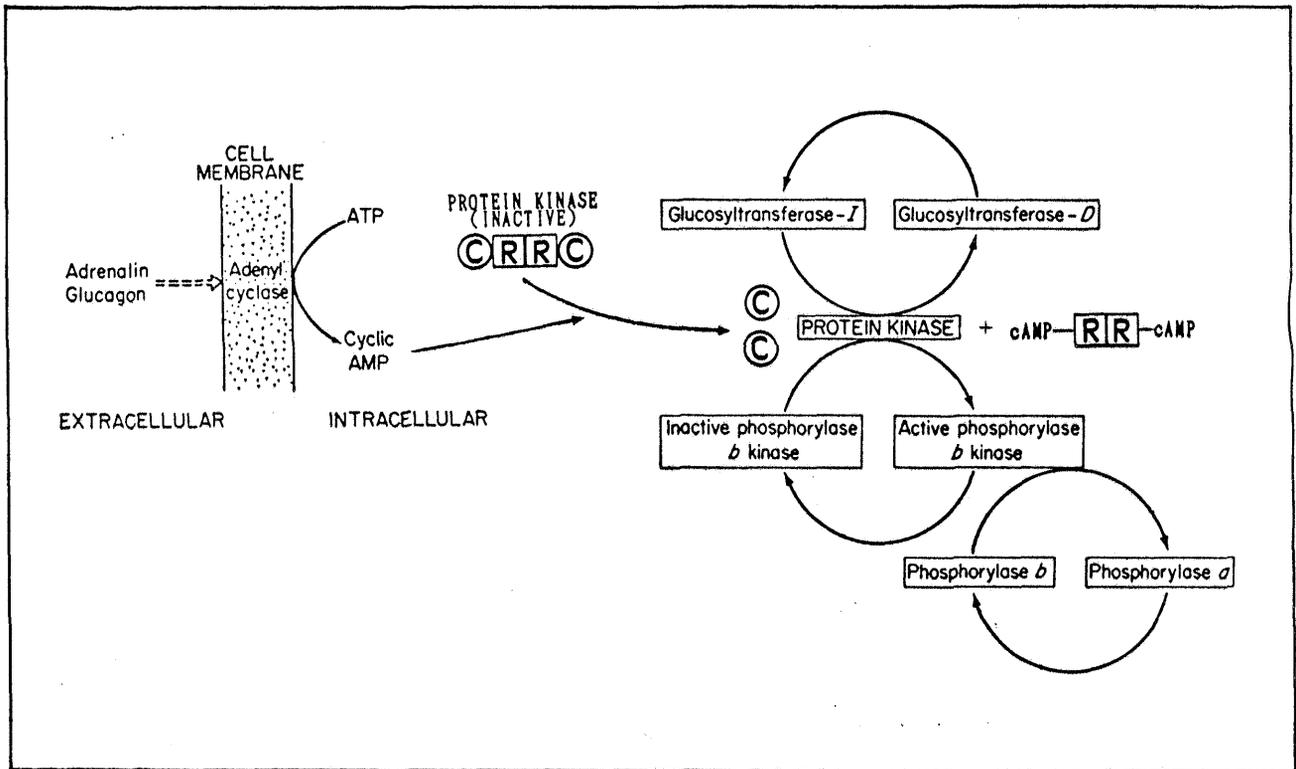


Fig.1-1 The Regulation of Phosphorylase Activation<sup>39)</sup>

Phosphorylase exists in two interconvertible forms;

- 1) Phosphorylase b is converted into phosphorylase a by the phosphorylation of a single serine residue in each subunit. This reaction is stimulated by calcium ion.
- 2) Phosphorylase b also is activated by binding AMP to allosteric site.



**Fig.1-2 The Regulation of Phosphorylase Activation by an Enzyme Cascade<sup>49)</sup>**

- 1) In muscle, adrenalin binds to receptors in the cell membrane and triggers the activation of adenylate cyclase.
- 2) Adenylate cyclase in the cell membrane catalyzes the formation of cyclic AMP (cAMP) from ATP.
- 3) The increased intracellular level of cAMP activates a protein kinase that is inactive in the absence of cAMP. The binding of cAMP allosterically stimulates the protein kinase (  $\text{C} + \text{C} + \text{cAMP-RIR-cAMP}$  ).
- 4) This protein kinase phosphorylates both phosphorylase kinase and glucosyltransferase (glycogen synthetase).
- 5) Active phosphorylase kinase activates phosphorylase by catalyzing the phosphorylation.

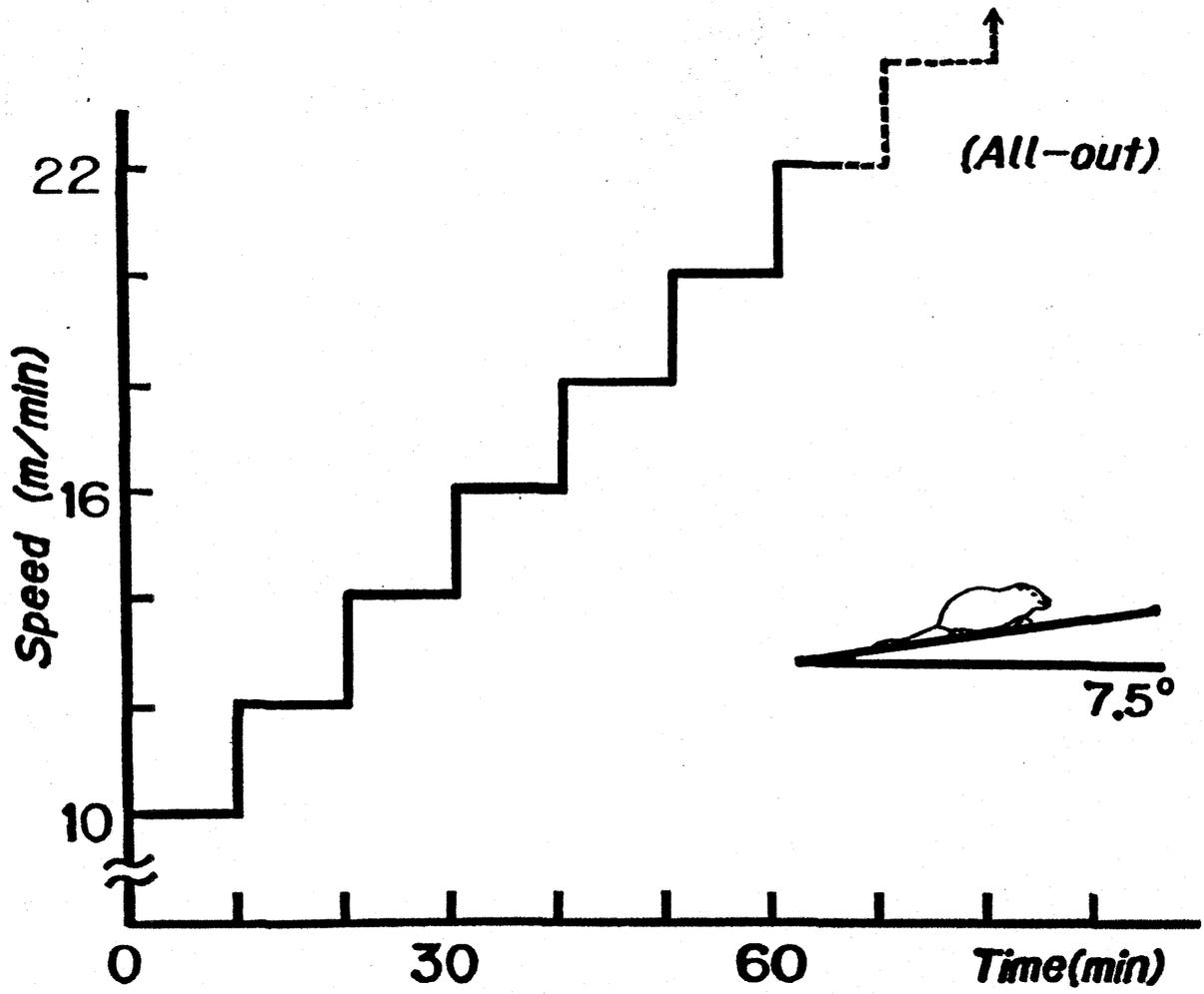


Fig.2 Running Protocol

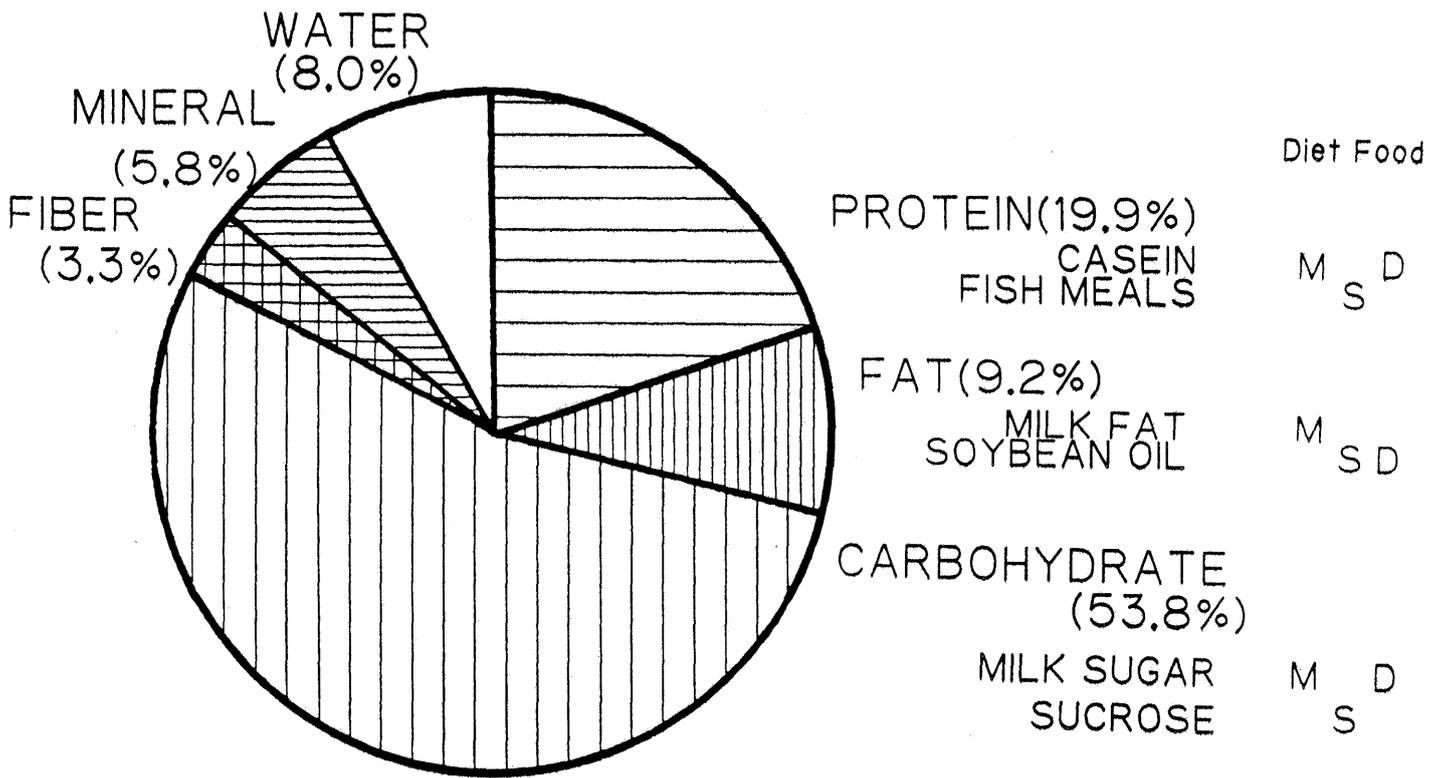


Fig.3 Composition of the Elements  
in Each Diet Food

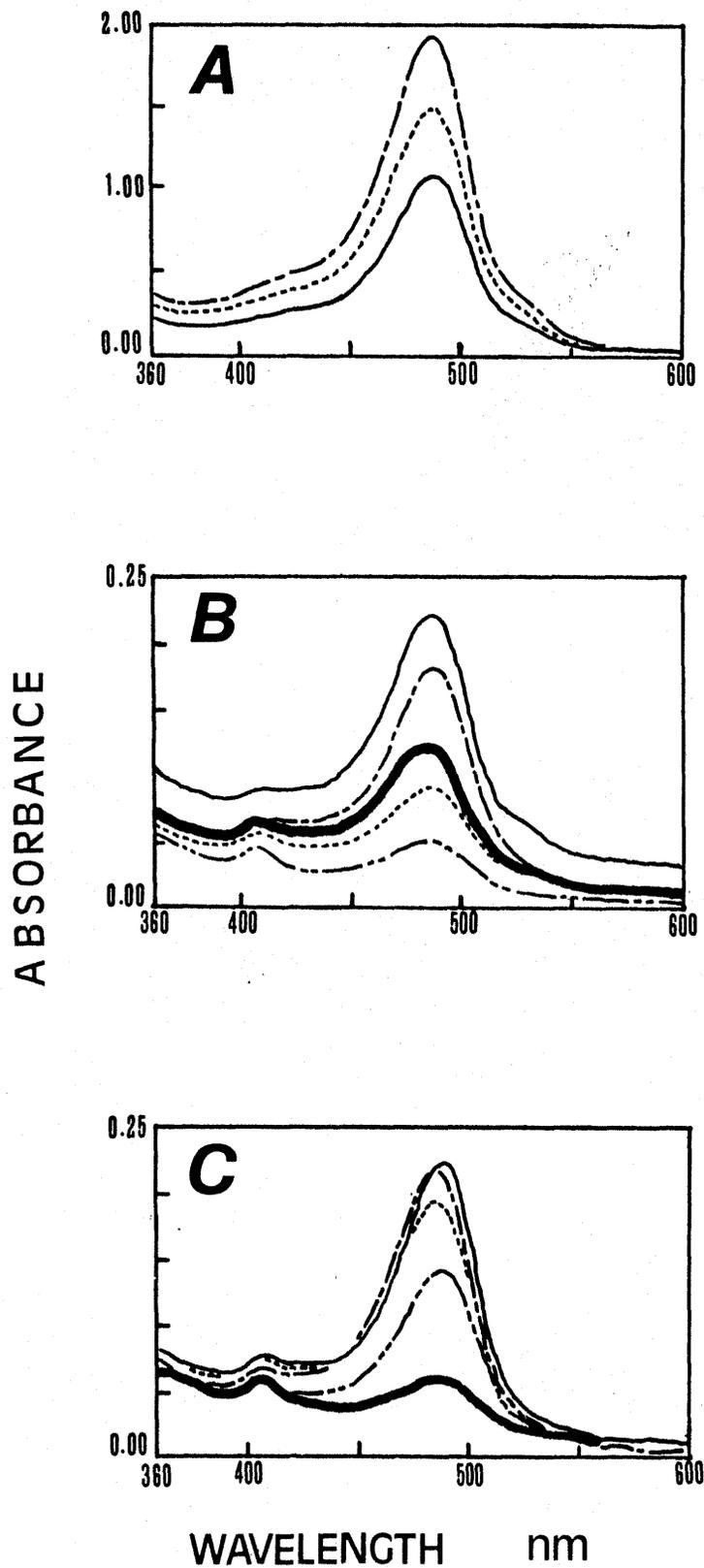


Fig. 4 Absorption Spectra of Colored Complex from Phenol-Sulfuric Acid Reaction with Glycogen

A : Standard Solutions

———— : 50  $\mu$ g/0.5ml

----- : 70  $\mu$ g/0.5ml

- · - · - · : 90  $\mu$ g/0.5ml

B : Gastrocnemius

C : Soleus

B and C represent typical absorption spectra in each group.

———— : C rat    ——— : A rat

----- : M rat    - · - · - · : S rat    - · - · - · : D rat

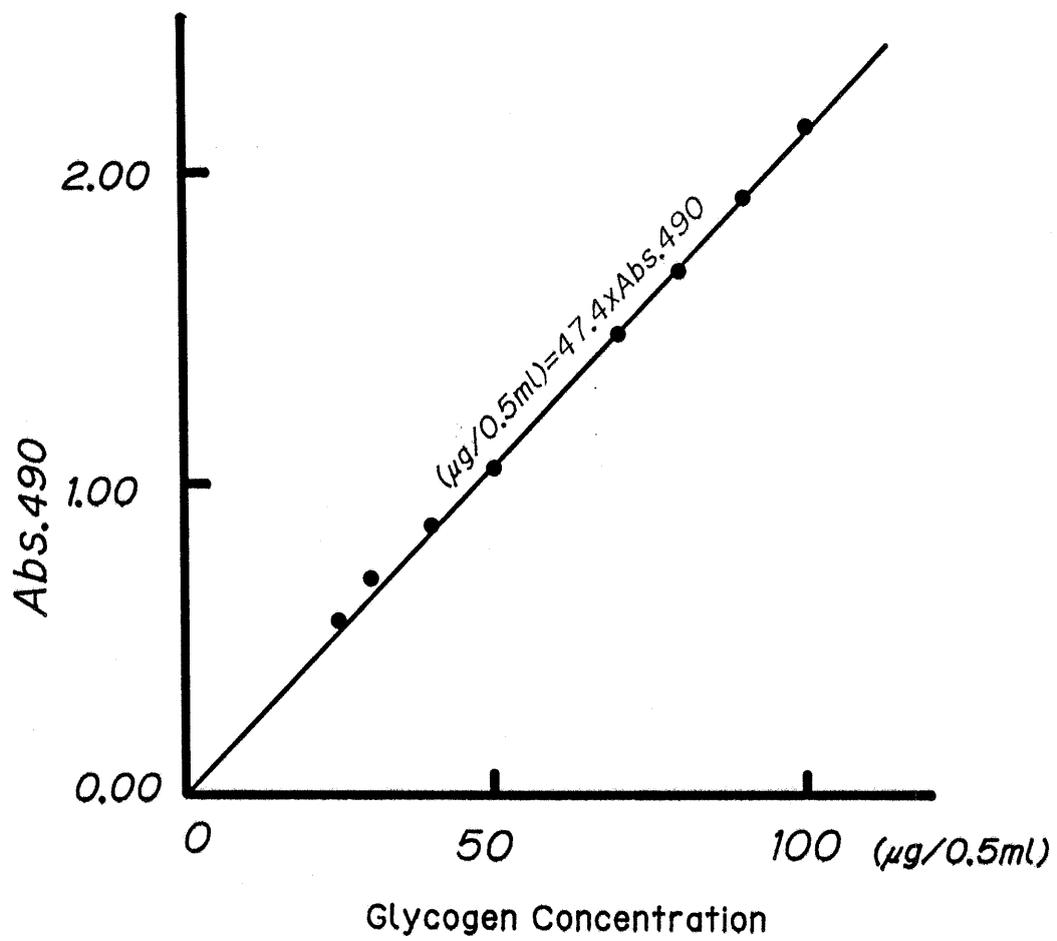


Fig. 5 Standard Curve for Phenol-Sulfuric Acid and Glycogen Reaction

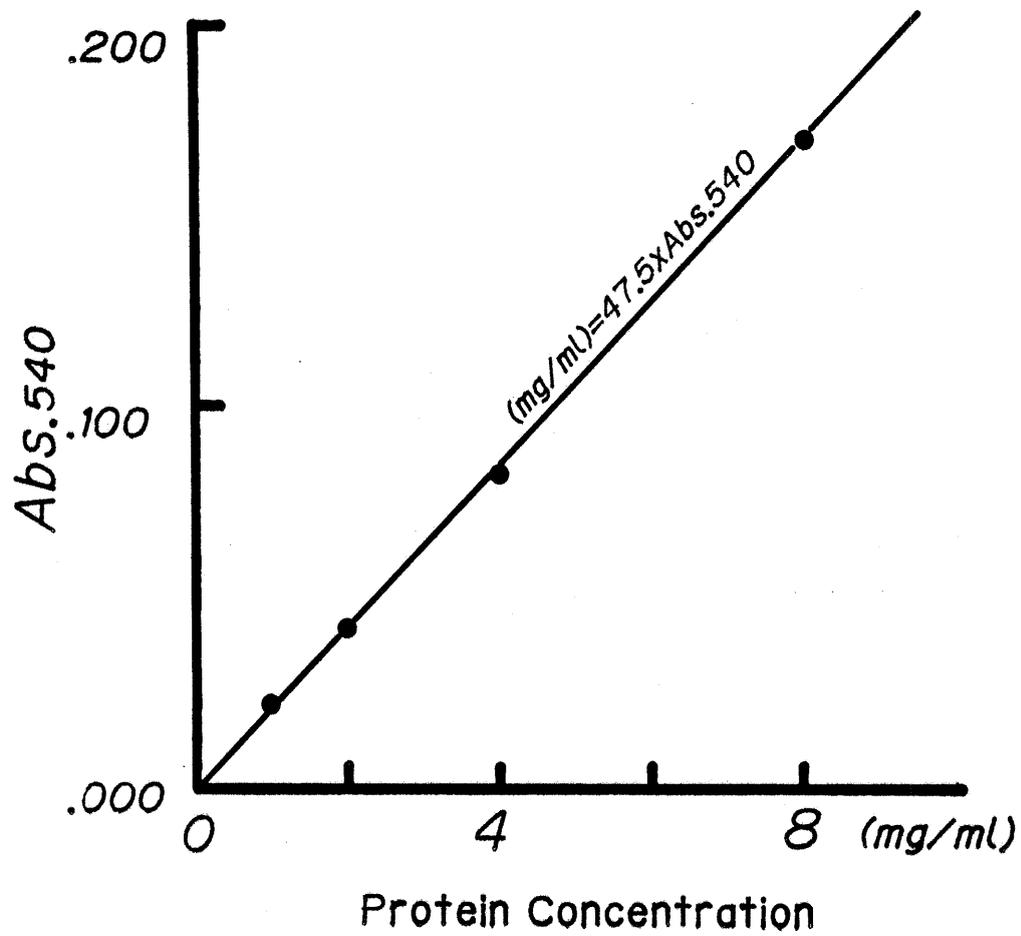


Fig. 6 Standard Curve for Biuret Reaction

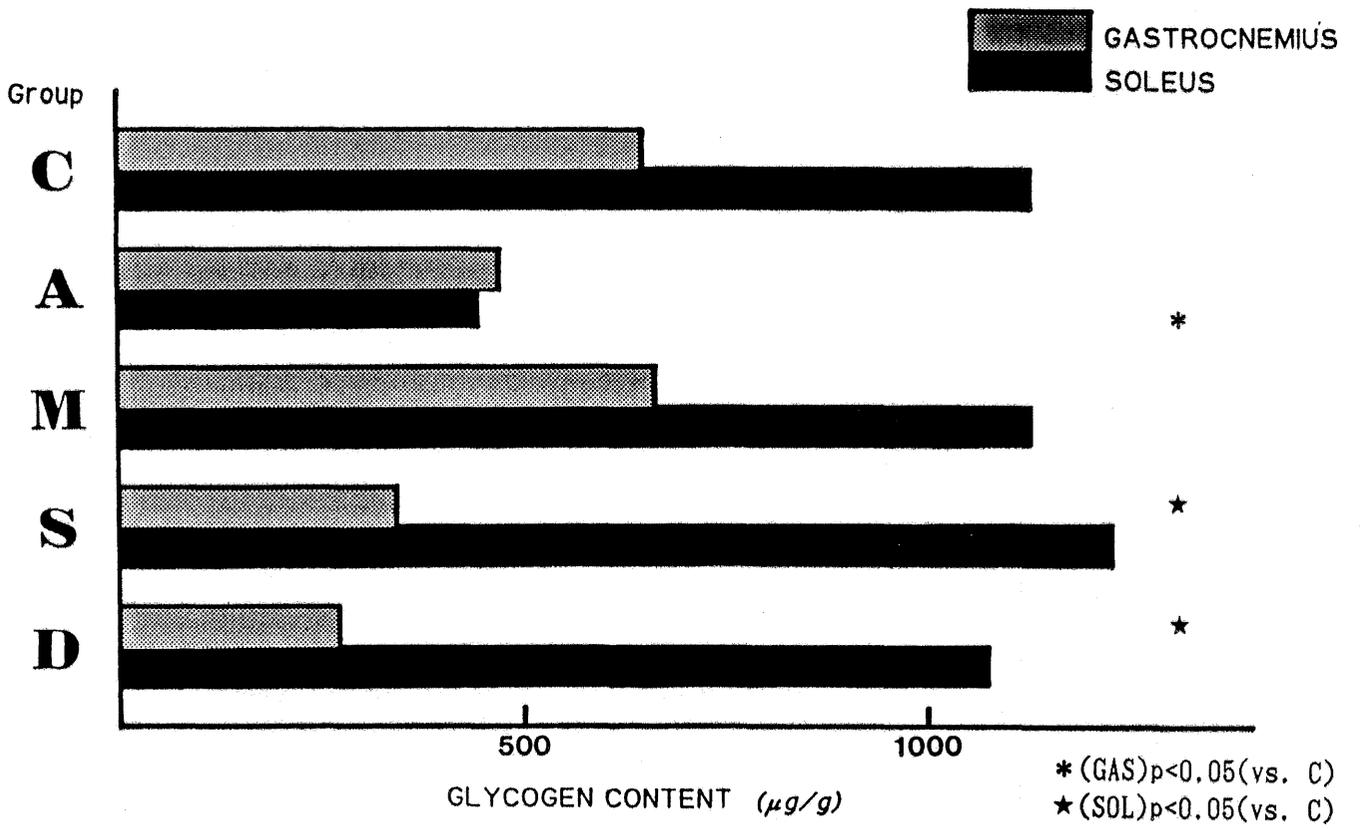


Fig. 7 Glycogen Content of Muscles

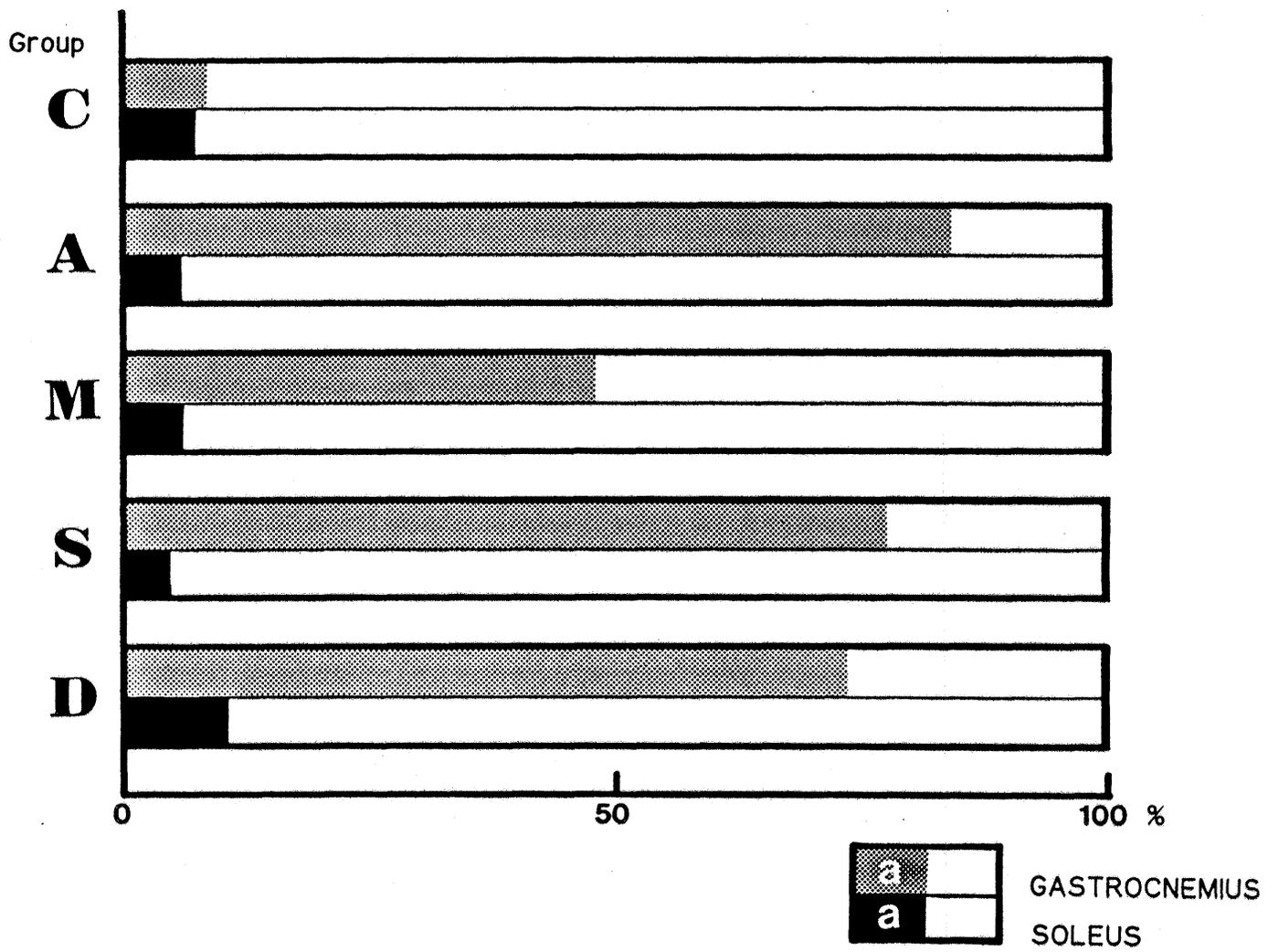


Fig. 8 Percentage of Phosphorylase a

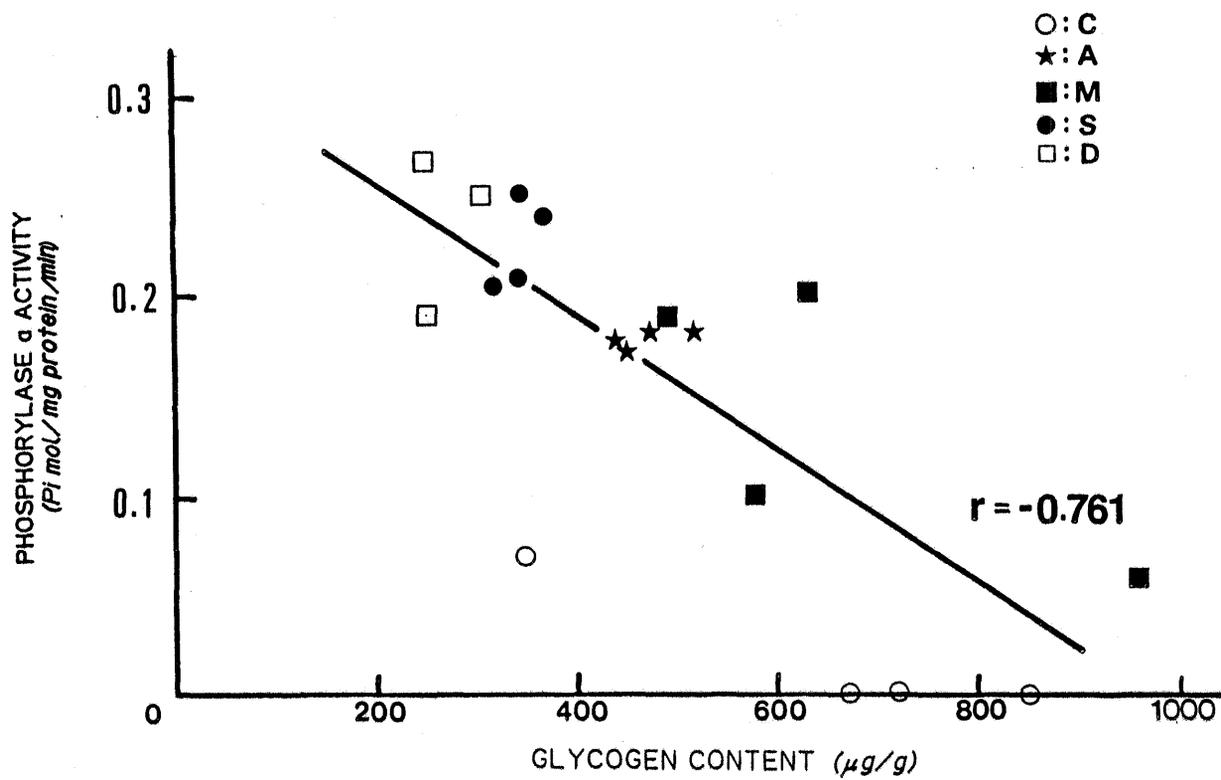


Fig. 9 Correlation between Phosphorylase a Activity and Glycogen Content in Gastrocnemius

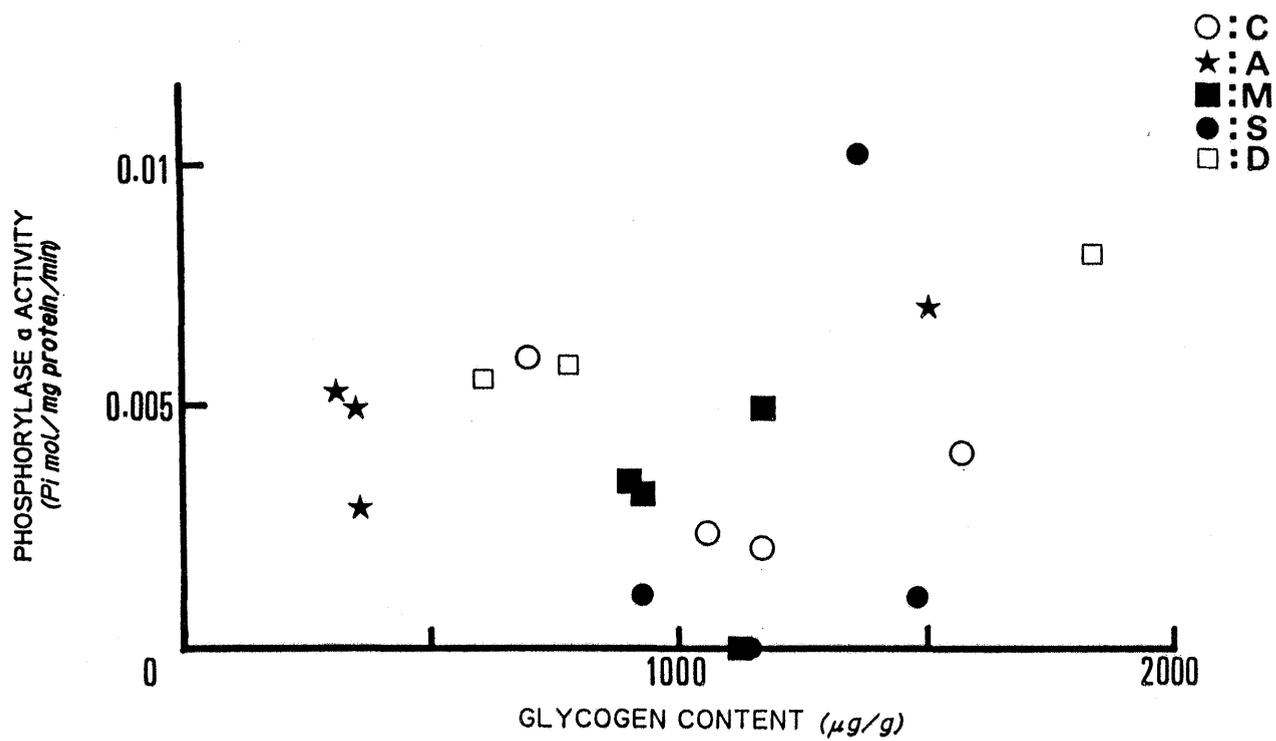
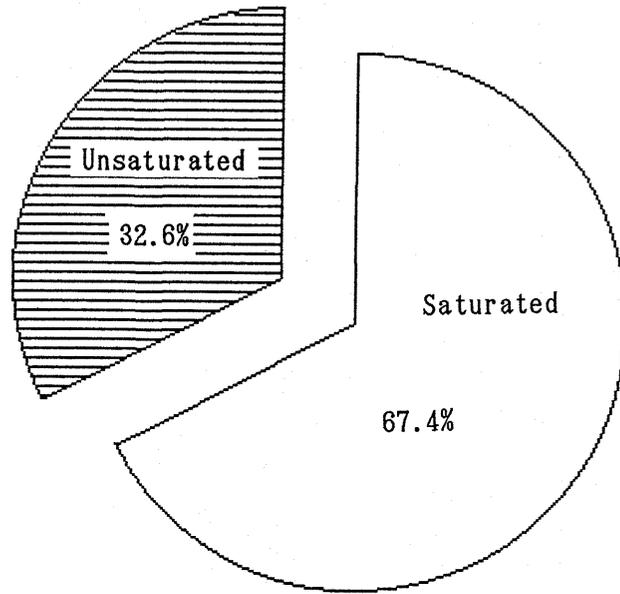
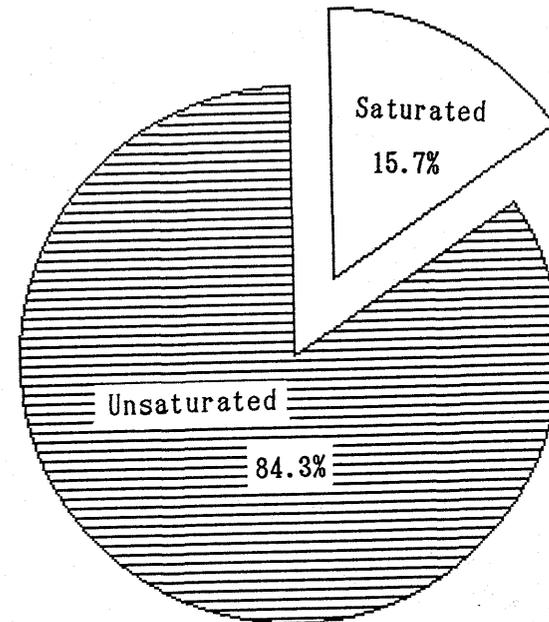


Fig.10 Correlation between Phosphorylase a Activity and Glycogen Content in Soleus



A: Milk Fat



B: Soybean Oil

**Fig.11 Percentage of Saturated and Unsaturated Fatty Acid in Milk Fat(A) and Soybean Oil(B)<sup>4a)</sup>**