



持久的トレーニングがラット骨格筋のカルニチンアシル基転移酵素（CPT）活性に及ぼす影響

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 北海道教育大学冬季スポーツ教育研究センター 公開日: 2012-11-22 キーワード: 作成者: 鈴木, 淳一/香西 雅之/東浦 拓郎 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.32150/00010482

持久的トレーニングがラット骨格筋のカルニチンアシル基転移酵素 (CPT) 活性に及ぼす影響

鈴木淳一¹⁾²⁾, 香西雅之³⁾, 東浦拓郎⁴⁾

1)北海道教育大学教育学部岩見沢校スポーツ教育課程健康・スポーツ科学専攻, 2)北海道教育大学冬季スポーツ教育研究センター, 3)北海道教育大学教育学部札幌校スポーツ科学専攻, 4)筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

Effects of Endurance Training on Carnitine Palmitoyl Transferase (CPT) Activity in Rat Skeletal Muscles

Junichi SUZUKI¹⁾, Masayuki KOUZAI²⁾ and Takurou HIGASHIURA³⁾

Laboratory of Exercise Physiology, Course of Health and Sport Science, Department of Sports Education, Faculty of Education, Hokkaido University of Education, Iwamizawa Campus, Iwamizawa 068-8642, Japan¹⁾, Research and Education Center for Winter Sports²⁾, School of Education³⁾, Hokkaido University of Education, 5-3, Ainosato, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 002-8502, Japan. Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Tennodai, Ibaraki 305-8577, Japan⁴⁾

Abstract

This study was designed to examine the effects of endurance training on carnitine palmitoyl transferase (CPT) activity in young female Wistar rats. Exercise training by running started at the age of 12 weeks and lasted for 6 weeks at 20 m/min on a 15% grade, 15-60 min/day. Enzyme activities were observed in the soleus (SOL) and plantaris (PL) muscles. Training increased the CPT activity by 40% and 29%, respectively, in the SOL and PL, but significant difference was observed only in the SOL ($P < 0.05$). The activities of 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HAD) and citrate synthase (CS) were significantly increased after training in both the SOL and PL ($P < 0.05$). Significant positive correlations were observed between CPT and HAD activities, and CPT and CS activities only in the SOL of training group. These results suggest that endurance training improves fatty acid transport to mitochondria by enhancing CPT activity.

[Keywords] 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, carnitine palmitoyl transferase, citrate synthase, endurance training, skeletal muscle

緒言

近年、肥満によって生活習慣病の発症リスクが高まることは広く知られている事実である。また、肥満予防には持久的な運動が効果的であることも周知の通りである。安静時において、骨格筋は脂肪組織から放出される血中の遊離脂肪酸 (FFA) を主たるエネルギー源としている

[1]。しかし、ここで軽度から中等度の運動が開始されると、一般に初期 (5~10分) には筋中に貯蔵されているグリコーゲンが消費され、続いて肝臓に由来する血中グルコースが動員される。運動が長時間 (30分以上) に及ぶと筋活動に伴うエネルギー源の大部分 (40~60

%)は血中FFAの利用へと移行し、体脂肪量の減少を助長するといわれている。また、長時間の持続的な運動を長期間行った後の効果に関しては、基礎代謝の増加や脂肪合成の抑制、インスリン感受性の向上、心肺機能の増強などのほか[2,3]、脂肪酸 β 酸化能つまり脂肪酸分解・利用能力の向上が骨格筋で認められている[4]。骨格筋のミトコンドリアで脂肪酸の β 酸化が亢進されれば、安静時でも血中FFAの利用が促進され、内臓脂肪の蓄積が抑制されることが報告されている[5-7]。

脂肪組織や筋内貯蔵脂肪からの遊離脂肪酸は、ミトコンドリア内に入るが、その際、まず外膜上で脂肪酸アシルCoAリガーゼによって脂肪酸アシルCoAが形成される。しかし、ミトコンドリア内膜は脂肪酸アシルCoAを通さないため、外膜に存在するカルニチンアシル基転移酵素(CPT)-Iによって脂肪酸アシルカルニチンが形成され、内膜を通過し、ミトコンドリアマトリックスへ入る。その後、内膜上のマトリックス側に存在するCPT-IIによって再び脂肪酸アシルCoAとなり、 β 酸化系を経てアセチルCoAが生成され、クエン酸回路に入る[8]。

持続的トレーニングによって β 酸化系の酵素である3-ヒドロキシアシル-CoA脱水素酵素(HAD)やクエン酸回路の律速酵素であるクエン酸合成酵素(CS)の活性が増大することはこれまで数多くの研究で報告されている[9,10]。しかしながら、脂肪酸をミトコンドリア内に輸送する系において重要な働きを担うCPT活性が、トレーニングによって変化するかどうかは報告されていない。

そこで本研究では、ラットに持続的トレーニングを負荷し、CPT活性の変化及び他の関連酵素の変化との関わりを明らかにすることを目的とした。

実験方法

実験動物 実験には12週令のWistar系雌ラット15匹を用いた。トレーニング開始1週間前にすべてのラットに対し、トレッドミルに慣らすための練習走行を2日間負荷した(10 m/min, 0% grade, 10 min/day)。その後、ラットを任意に安静対照群(Cnt)7匹、トレーニング群(TR)8匹に分けた。すべてのラットは室温 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度約50%、12時間の明暗周期(7:00-19:00)の環境下で飼育し、飼料(CE-2, 日本クレア)と飲料水を自由摂取させた。

運動負荷 持続的運動トレーニングはラット用トレッドミル(KN-73, 夏目製作所)を用いて負荷した。トレーニングは20 m/min, 勾配15%, 15分間の条件から開始し, 3 min/dayの割合で運動時間を漸増し, 週5日の頻度で6週間負荷した。4週目に60分に達した後はその時間を維持した。

筋標本 最終トレーニングの48時間後に, α クロラロース(0.06 g/Kg)とウレタン(0.7 g/Kg)の混合麻酔下で, ヒラメ筋と足底筋を摘出し, 湿重量を秤量後, 液体窒素で凍結処理した。筋サンプルは分析まで -80°C で凍結保存した。

酵素溶液の調製 筋サンプルは -25°C 下で微粉状にし, 11.5% sucrose, 0.1% Triton-X100, 1 mM DTT, 5% protease inhibitor cocktail (P2714, SIGMA)を含む10 mM HEPES buffer (pH 7.3)を用い, 氷冷下にてポリトロン型ホモジナイザーでホモジネート(15,000 rpm, 15 sec \times 3)した。そし

て、4 °C、1,500 xgで10分間遠心分離した後、その上澄み液を酵素溶液として酵素活性の測定まで-80 °Cで冷凍保存した。

酵素活性の測定

・カルニチンアシル基転移酵素 (CPT) 活性

CPT活性の測定にはAbelの方法を用いた [11]。酵素溶液に1 mM EGTA, 220 mM sucrose, 40 mM KCl, 0.1 mM 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB)を含むHEPES buffer (pH 7.4) を加え、25 °Cの温水中に10分間静置し温度平衡に達した後、40 μM palmitoyl-CoA を添加して反応を開始させた。反応開始後5分間にわたり分光光度計を用いて412nmにて吸光度の変化を測定した。

・3-ヒドロキシアシル-CoA脱水素酵素 (HAD) 活性

HAD活性の測定にはBassらの方法を用いた [12]。酵素溶液に、5 mM EDTA, 0.45 mM NADHを含む100 mM triethanolamine-HCl buffer (pH 7.0) を加え、25 °Cの温水中に10分間静置し温度平衡に達した後、0.1 mM acetoacetyl-CoAを添加して反応を開始させた。反応開始後5分間にわたり分光光度計を用いて340 nmにて吸光度の変化を測定した。

・クエン酸合成酵素 (CS) 活性

CS活性の測定にはSrereの方法を用いた [13]。酵素溶液に1 mM DTNB, 10 mM acetyl-CoAを含む0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.1) を加え、25 °Cの温水中に10分間静置し温度平衡に達した後、10 mM oxaloacetateを添加して反応を開始させた。反応開始後5分間にわたり分光光度計を用いて412nmにて吸光度の変化を測定した。

統計処理 すべてのデータは平均値±標準誤差で示した。各群間の平均値の差の検定にはMann-WhitneyのU-test を用い、検定結果は危険率5%未満を有意水準とした。

実験結果

Table 1に実験終了時の体重、筋重量および筋重量と体重の比を示した。実験終了時の体重は両群間に有意差はみられなかった。筋重量はヒラメ筋、足底筋ともにトレーニングによって増加傾向を示したが、有意な差はみられなかった。

CPT活性の変化をFig.1に示した。トレーニングによってヒラメ筋では約40%有意に増加した (P<0.05)。しかし、足底筋では相加傾向は認められたが、有意な差はみられなかった。HAD活性は、トレーニングによってヒラメ筋で約36%、足底筋で約53%有意に増加した (P<0.05, Fig. 2)。CS活性もトレーニングによって顕著に増加し、TR群ではCnt群よりもヒラメ筋 (約48%)、足底筋 (44%) 両者で

Table 1 Body and organ mass values

	Cnt (n=7)	TR (n=8)
Body mass (g)	310.9±7.0	321.5±9.5
Organ mass (mg)		
Soleus	163.4±5.2	178.6±8.7
Plantaris	334.6±14.4	349.5±9.1
Organ mass-to-body mass ratio (mg / g)		
Soleus	0.53±0.01	0.56±0.03
Plantaris	1.09±0.03	1.10±0.02

Values are means ± SE.

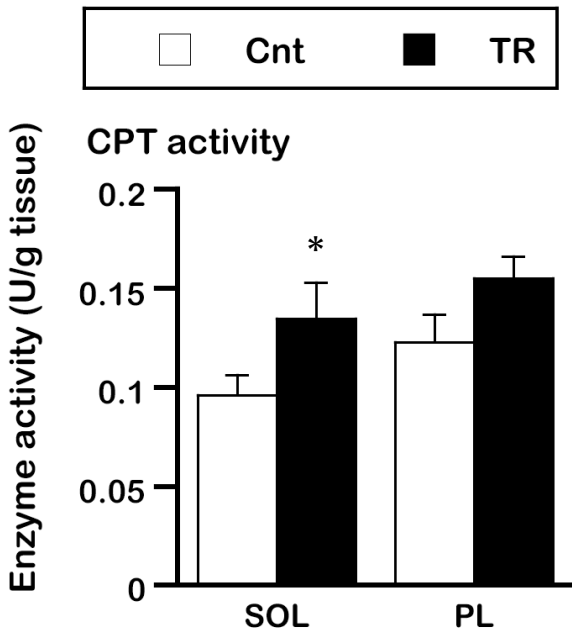


Fig. 1 CPT activity in the soleus and plantaris muscles. *, significantly different from the control (Cnt) group at $P < 0.05$.

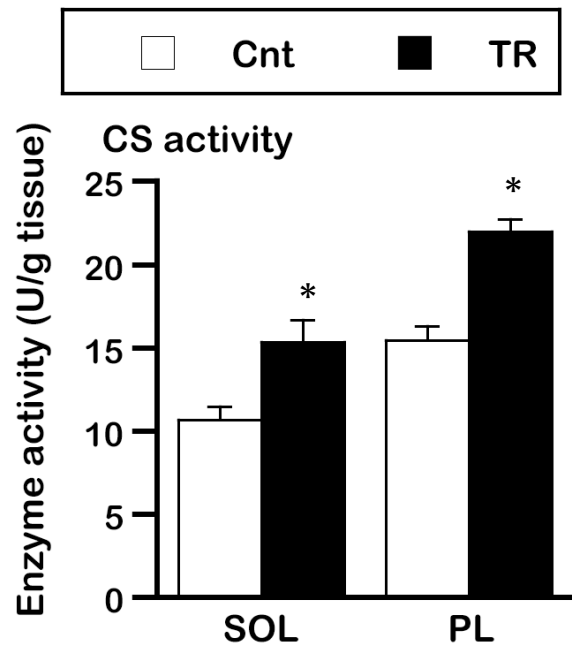


Fig. 3 CS activity in the soleus and plantaris muscles. *, significantly different from the control

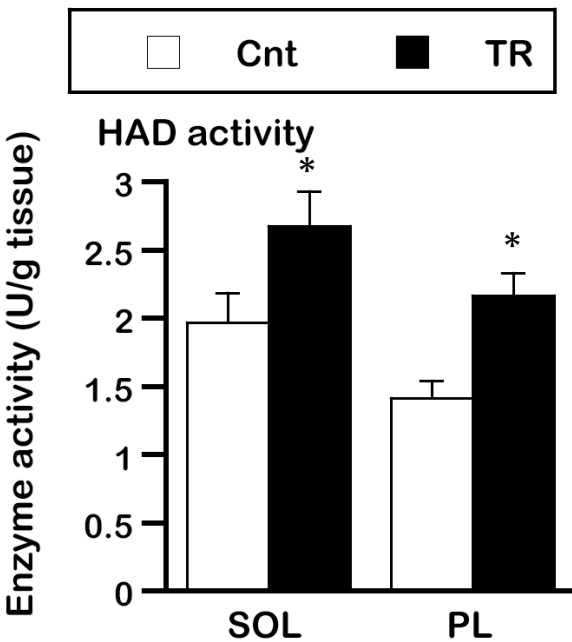


Fig. 2 HAD activity in the soleus and plantaris muscles. *, significantly different from the control (Cnt) group at $P < 0.05$.

有意な増加が観察された ($P < 0.05$, Fig.3) .

ヒラメ筋におけるCPT活性とHAD活性との相関をFig, 4に示した. TR群において有意な相関を示したが ($P < 0.05$) , Cnt群では有意な相関がみられなかった. また, 足底筋では両群とも有意な相関がみられなかった.

CPT活性とCS活性においてもTR群のヒラメ筋だけで有意な相関が観察された ($P < 0.05$, Fig. 5) .

考察

本研究では, ラットにおいて長期間の持続的トレーニングが, 脂肪酸のミトコンドリア内への輸送を促進するCPTの活性に及ぼす影響を観察した.

持続的トレーニングによってCPT活性は有意に増加した ($P < 0.05$, Fig. 1) . このことは,

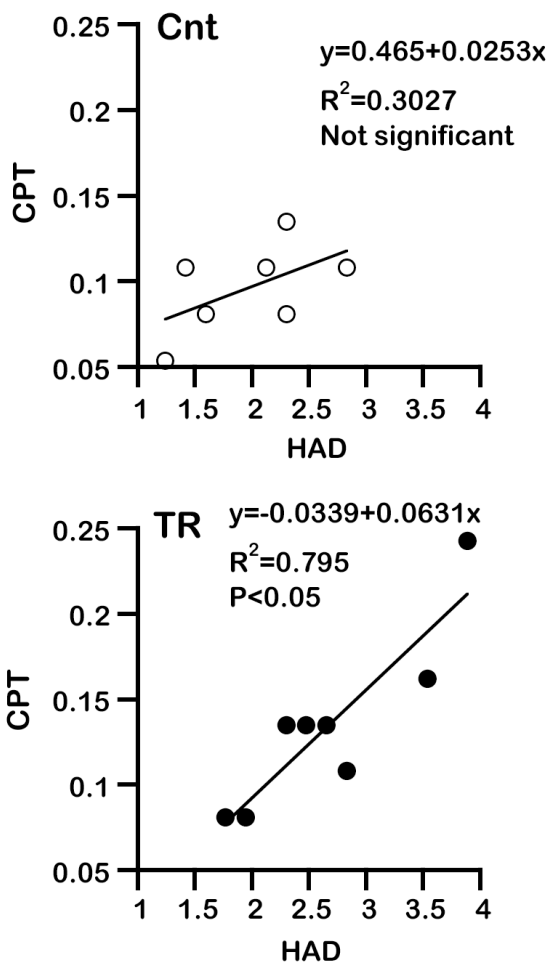


Fig. 4 Relationship between CPT and HAD activities in the soleus muscle.

トレーニングによって脂肪酸のミトコンドリアマトリックスへの輸送能力が増大し、エネルギー源としての脂質の利用が促進されることを示している。

本研究では、トレーニング後にHAD活性とCS活性にも有意な増加が観察され (Figs. 2, 3), さらにCPT活性とHAD, CS活性が有意な正の相関を示した (Figs. 4, 5)。このことから、持久的なトレーニングによってβ酸化系やクエン酸回路の代謝能力が増大するとともに、ミトコンドリア内への脂肪酸の輸送能力も

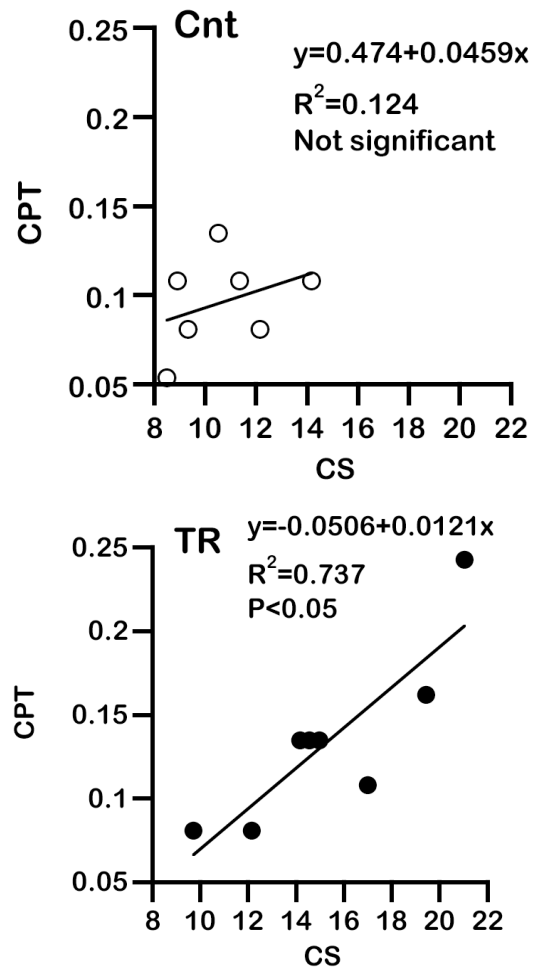


Fig. 5 Relationship between CPT and CS activities in the soleus muscle.

高まることを示している。β酸化によって生成されたアセチル-CoAは、クエン酸回路に入り、その後有酸素的にエネルギーが産生される。β酸化だけが過剰に進行すると、アセチル-CoAの蓄積が生じ、細胞質からミトコンドリア内への脂肪酸の輸送が抑制される。ことから、脂質代謝の亢進には、脂肪酸のミトコンドリア内への輸送能力の向上やβ酸化の亢進とともにクエン酸回路の活性化が不可欠であると考えられる。トレーニング開始から1週間毎に5週目までHAD活性とCS活性の変化過程を観察し

た先行研究では、両者とも3週目から有意な増加を示すことが報告されている[4]。また、多くの先行研究で、持久的トレーニング後、HAD活性とCS活性が共に有意に増加していたことが観察されている[1,4,9,10,14,15]。

本研究において、CPT活性の増加及びHAD活性やCS活性との有意な正の相関は、ヒラメ筋において観察されたが、足底筋においては観察されなかった。ラットにおいて、ヒラメ筋はtype I線維が約85%、type IIa線維が約15%と、主に遅筋線維で構成されている。一方、足底筋はtype I線維が約17%、type IIa線維が約27%、type IIb線維が約56%であり、中間筋線維と速筋線維で構成されている[16]。本研究と同様に、他の先行研究においても、持久的トレーニング後に足底筋のHAD活性とCS活性が顕著に増加することが報告されている[9,10]。このことは、足底筋においても脂質代謝能力の向上がみられることを示している。しかしながら、足底筋ではCPT活性に有意な増加がみられなかったことから、本研究で行ったトレーニングでは遅筋線維において、より一層脂質代謝能力の向上がみられることが示唆された。

以上、本研究では持久的走行トレーニングによって骨格筋のCPT活性が顕著に増加し、その増加が β 酸化系及びクエン酸回路の酵素活性の増加と関連していることが明らかとなった。これはエネルギー基質としてより多くの脂肪酸を動員するために不可欠な適応性変化と考えられる。

参考文献

1. Lorraine P Turcotte, Erik A Richter, Bente Kiens. 1992. Increased plasma FFA uptake and oxidation during prolonged exercise in trained vs. untrained humans. *Endocrinol*

Metab 25, 791-799.

2. 池田義雄, 井上修二, 井口利樹, 大村裕, 大野誠, 奥田拓道, 片岡邦三, 河上征治, 川村功, 衣笠昭彦, 佐藤祐造, 徳永勝人, 丸浜喜亮, 吉松博信. 1997. 肥満・肥満症の指導マニュアル. 医歯薬出版株式会社
3. 井上修二, 池田義雄, 大野誠, 宗像伸子. 1994. 肥満症テキスト. 南江堂.
4. 鈴木淳一, 平塚勇介, 東浦拓郎. 2004. 持久的走行トレーニング初期段階における骨格筋の脂質代謝関連酵素活性の変化過程. 北海道教育大学冬季スポーツ教育研究センター紀要7, 9-14.
5. Rahman SM, Wang YM, Yotsumoto H, et al. 2001. Effects of conjugated linoleic acid on serum leptin concentration, body-fat accumulation, and beta-oxidation of fatty acid in OLETF rats. *Nutrition* 17, 385-390.
6. Wang YM, Rahman SM, Nagao K, et al. 2003. Comparison of the effects of triacylglycerol-CLA on hepatic lipid metabolism in OLETF obese rats. *J Oleo Sci* 52, 121-128.
7. 柳田晃良, 永尾晃治. 2003. 共役リノール酸の抗肥満・抗高脂血症作用とその機序. *肥満研究* 9, 194-196.
8. Mathews CK, Holde KEV and Ahern KG. 2000. *Biochemistry, Third Edition*. Pearson Education Inc.
9. Suzuki J. 2005. Microvascular angioadaptation after endurance training with L-arginine supplementation in rat heart and hindleg muscles. *Exp Physiol* 90, 763-771.
10. Suzuki J. 2006. L-arginine supplementation causes additional effects on exercise-induced angiogenesis and VEGF expression in the heart and hind-leg muscles of middle-aged rats. *J Physiol Sci* 56, 39-44.
11. Abel D. Evaluation of mitochondrial function, Version: 1. Animal Models of Diabetic Complications Consortium.

12. Bass A, Brdiczka D, Eyer P, Hofer S, Pette D. 1969. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *European J Biochem* 10, 198-206.
13. Srere PA. 1969. Citrate synthase. *Methods in Enzymology* 13, 3-11.
14. Vansant Gm, Den Besten C, Weststrate JA, et al. 1988. Body fat distribution and the prognosis for weight reduction: preliminary results. *Int J Obesity* 12, 133-140.
15. Borkan GA, Hulth DE, Gerzof SG, Robbins AH, Silbert CK. 1983. Age changes in body composition revealed by computed tomography. *J Gerontol* 38, 673-677.
16. Suzuki J. 2002. Microvascular remodelling after endurance training with Co^{2+} treatment in the rat diaphragm and hind-leg muscles. *Jpn J Physiol* 52, 409-419.