

間欠的絶食による摂取エネルギー制限がラット骨格筋の
PGC-1 α および GLUT-4 蛋白発現量に及ぼす影響
Effects of calorie restriction by intermittent fasting
on PGC-1 α and GLUT-4 protein contents in rat skeletal muscle.

東田一彦¹⁾, 樋口 満²⁾, 寺田 新³⁾
Kazuhiko HIGASHIDA¹⁾, Mitsuru HIGUCHI²⁾, Shin TERADA³⁾

¹⁾ 立命館大学スポーツ健康科学部

²⁾ 早稲田大学スポーツ科学学術院

³⁾ 東京大学大学院 総合文化研究科 生命環境科学系 身体運動科学研究室

¹⁾ Faculty of Sport and Health Science, Ritsumeikan University

²⁾ Faculty of Sport Sciences, Waseda University

³⁾ Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo

キーワード: 間欠的絶食, 骨格筋, 糖輸送体 GLUT-4, ラット, 転写補助因子 PGC-1 α

Key words: Intermittent fasting, GLUT-4, PGC-1 α , skeletal muscle, rat

Abstract

The purpose of this study was to examine the effects of calorie restriction by intermittent fasting on transcriptional co-activator, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α) and glucose transporter, GLUT-4 protein contents in rat skeletal muscle. Four-week-old male Sprague-Dawley rats were randomly assigned either to 1) intermittent fasting (IF: n=5), 2) endurance exercise training (EX: n=5), or 3) control group (CON: n=5). IF group rats were provided with standard chow on alternate days for 6 wk, whereas rats in CON and EX groups were maintained on an ad libitum diet. EX group rats performed 3-h swimming exercise/day for 1 wk before sacrifice. After the 6-wk intervention, epitrochlearis muscles were excised for measurements of PGC-1 α and GLUT-4 protein contents. The body weight and total intra-abdominal fat mass were significantly lower in IF group than CON and EX groups ($p<0.05$), providing evidence that energy intake was severely restricted in IF group rats. PGC-1 α and GLUT-4 protein contents in epitrochlearis muscle were significantly higher in EX group than CON and IF group ($p<0.05$). In contrast, no significant difference in PGC-1 α was observed between CON and IF groups. Furthermore, GLUT-4 protein content was significantly lower in IF group than CON group ($p<0.05$). These results demonstrate that long-term intermittent fasting induces down-regulation of GLUT-4 content in rat skeletal muscle.

スポーツ科学研究, 10, 1-11, 2013 年, 受付日:2012 年 7 月 28 日, 受理日:2013 年 1 月 15 日

連絡先: 寺田新 東京大学大学院 総合文化研究科 生命環境科学系 身体運動学研究室

〒153-8902 東京都目黒区駒場 3-8-1 TEL:03-5454-6863 FAX:03-5454-4317

E-mail:terada@idaten.c.u-tokyo.ac.jp

I. 緒言

食事などで摂取した糖質の 80 %以上が骨格筋に取り込まれ(DeFronzo et al., 1981), グリコーゲン合成もしくは解糖系およびミトコンドリアにおける ATP 合成のために利用される. 一方, 2 型糖尿病患者では, 骨格筋の血糖処理能力が低下しており, 糖尿病発症の一因であると考えられている(DeFronzo et al., 1981). また, 通常の生理的条件下においては, 骨格筋における糖代謝は, 糖が血液中から骨格筋に取り込まれる段階, すなわち糖輸送により律速されている可能性が多くの先行研究の結果から示唆されている(Kubo et al., 1986, Ziel et al., 1988, Fink et al., 1992, Ren et al., 1993). したがって, 体内で最大の糖処理器官である骨格筋の糖取り込み機能を高めることは糖尿病の予防と治療において非常に重要であると言える.

骨格筋の糖取り込みは, インスリンと筋収縮という両生理的刺激により増強されるが, その際, GLUT-4 と呼ばれる糖輸送体が重要な役割を果たしている(Holloszy and Hansen, 1996). Henriksen et al.(1990)はインスリンおよび筋収縮刺激, さらには両刺激を組み合わせたときの骨格筋糖取り込み速度と GLUT-4 発現量の間に高い正の相関関係が認められることを報告している. したがって, 骨格筋における糖取り込み能力, さらには全身での糖代謝能に関して, GLUT-4 が果たす役割は重要であり, 骨格筋の GLUT-4 を増加させることは, 糖尿病の予防および治療を目的とした手段の一つとして有効であると考えられる. これまでに行われた数多くの研究により, 50~70 % $\dot{V}O_2$ max の運動強度で 1~2 時間にわたって行われる持続的運動トレーニングにより骨格筋 GLUT-4 発現量が増加し, それに伴い骨格筋糖取り込み能力も向上することが報告されている(Holloszy and Hansen, 1996). これらの知見は, 身体運動トレーニングが糖尿病の予防および治

療のための有効な手段であることを示す科学的な根拠となっている. しかしながら, 糖尿病患者に対する運動療法は, その有効性が認められているにもかかわらず, 合併症や過体重などの理由から, その実施が不可能な場合もある. したがって, 運動が実施できないような糖尿病患者でも, 運動と同様に骨格筋の GLUT-4 を増加させ, 糖代謝能を改善できる手段が求められている.

Nisoli et al.(2005)は, 摂食と絶食を一日毎に繰り返す間欠的絶食による摂取エネルギー制限を行った場合, マウスの心筋や脂肪組織において核内蛋白質 Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α)の発現量が増加することを報告している. PGC-1 α は, 寒冷暴露による褐色脂肪細胞のミトコンドリア, 特に脱共役タンパク質(Uncoupling protein-1, UCP-1)の増加において重要な役割を果たす転写補助因子として発見され(Puigserver et al. 1998), 最近では, 褐色脂肪細胞だけではなく, 心筋や骨格筋など他の組織においてもミトコンドリア系酵素の発現調節を担う重要分子であることが知られている(Puigserver and Spiegelman. 2003). さらに, 近年 PGC-1 α が, Myocyte Enhancer Factor 2C (MEF2C)と呼ばれる転写因子を活性化させ, GLUT-4 の遺伝子発現も増強することが報告されている(Michael et al., 2001). 間欠的絶食による心筋および脂肪組織の PGC-1 α の増加には Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS)による一酸化窒素(Nitric Oxide:NO)の増加が関与している可能性が示唆されており(Nisoli et al. 2005), この eNOS は骨格筋でも多く発現している(Perreault et al., 2000). したがって, Nisoli et al.(2005)の研究では検討がなされていないものの, 心筋と脂肪組織同様に, 間欠的絶食により骨格筋でも PGC-1 α さらには GLUT-4 が増加する可能性が考えられる. そこで本研究では, 6 週間の

間欠的絶食がラット骨格筋の PGC-1 α および GLUT-4 発現量に及ぼす影響について検討することを目的とした。

II. 方法

1. 実験動物および飼育条件

本実験では、体重が 70~90 g の 4 週齢の Sprague-Dawley (SD) 系雄ラット(日本クレア社) 15 匹を用いた。ラットは、室温 25 °C、湿度 30 %、午後 9 時~午前 9 時を暗期に設定した飼育室において、ステンレス製ケージを使用し、2~3 匹ずつ飼育した。予備飼育期間には、飼料として市販の固形飼料(CE-2:日本クレア社)と飲料として水道水を自由摂取させた。

予備飼育終了後、ラットを 1) コントロール群(CON 群, n = 5), 2) 間欠的絶食群(IF 群, n = 5), 3) 持久的トレーニング群(EX 群, n = 5)に、無作為に分けた。CON 群と EX 群には、予備飼育期間に引き続き、固形飼料(CE-2, 日本クレア社)を 6 週間自由摂取させた。IF 群には、固形飼料を一日おきに摂取させた。給餌日には自由摂取とし、解剖日の前日が給餌日になるように設定した。EX 群のトレーニングには、水泳運動を用いた。水温 35 \pm 1 °C に調節した水を 70 L のポリバケツに水深 40 cm になるまで注ぎ、5 匹同時に泳がせた。トレーニング開始前の 2 日間、水泳運動に慣れさせるために 10 分間予備水泳運動を行わせた。トレーニング期間は、解剖日の 1 週間前から前日までの 7 日間とし、1 日 1 回午後 1 時から午後 4 時までの 3 時間水泳運動を行った。本実験で用いた水泳トレーニングを行うことで、ラット骨格筋における PGC-1 α および GLUT-4 が増加することが先行研究により報告されており(Terada et al., 2001; Terada et al. 2002), 本研究では EX 群をポジティブコントロール群として設けた。なお、本実験は、早稲田大学スポーツ科学部動物実験倫理委員会の承認を得て行われた。

2. 組織の摘出および保存

6 週間の飼育期間終了日の午後 1 時~3 時に採血および組織試料の採取を行った。体重測定終了後、体重 100 g あたり 5 mg のペントバルビタールナトリウムを投与することによる完全麻酔下にて解剖を行った。解剖時には心臓から血液を採取した後、骨格筋(滑車筋、上腕三頭筋)および腹腔内脂肪を摘出した。採取した血液は、ベノジェクト II 血清分離用真空採血管(TERUMO 社)に移し、十分に放置した後、3000 rpm で 10 分間遠心して血清を得た。副睾丸脂肪、腹膜後方脂肪、および腸間膜脂肪を摘出し、3 つの合計脂肪量を電子天秤で測定し、腹腔内脂肪量とした。骨格筋サンプルは、液体窒素中で凍結し、分析まで-80 °C のフリーザー中にて保存した。

3. 骨格筋 PGC-1 α および GLUT-4 蛋白発現量

EX 群で実施したラットの水泳運動時には前肢骨格筋群が主に動員されることから(Terada and Tabata, 2004), 本研究では滑車筋を対象として PGC-1 α および GLUT-4 蛋白発現量の分析を行った。氷水中に浸したガラス製ホモジナイザーに骨格筋サンプル(滑車筋)を入れ、Protease Inhibitor(SIGMA 社)を添加したホモジナイズバッファー(RIPA lysis buffer, Upstate 社)を加えてホモジナイズした。蛋白濃度を BCA Protein Assay Kit(PIERCE 社)を用いて測定した。PGC-1 α および GLUT-4 測定用に、それぞれ蛋白濃度が 3 μ g/ μ l, 0.5 μ g/ μ l となるようにホモジナイズバッファーと Sample buffer(和光純薬社)で調整した。その後、PGC-1 α 測定用サンプルは、95 °C で 5 分間加温した。

タンパク質は、Laemmli(1970)の方法に基づき SDS-PAGE 法により分離した。PGC-1 α および GLUT-4 の分析には、それぞれ 7.5 % および 10 % の Resolving Gel を用い、1 レーンあたり 90 μ g および 10 μ g のタンパク質サンプルをアプ

いた。サンプルがゲルの下端に達するまで 100 V で通電した。

電気泳動終了後、速やかにゲルを取り出し、ウエット式ブロッティング装置 (Bio-Rad 社) を用いて、200 mA で 90 分間通電し、Poly Vinylidene DiFluoride (PVDF) メンブレン (Milipore 社) にタンパク質を転写した。転写したメンブレンは、10 % (w/v) スキムミルク/Tris-Buffered Saline, 0.1 % Tween 20 (TBS-T) を用いて 1 時間のブロッティング処理を行い、一次抗体反応 (anti-PGC-1 α (Calbiochem 社), 5000 倍希釈; anti-GLUT-4 (generous gift from Dr. Mike Mueckler at Washington University School of Medicine), 10000 倍希釈) を 4 °C で一晩行った。翌朝、メンブレンを TBS-T で洗浄し、二次抗体反応 (HRP-conjugated anti-rabbit IgG, 10000 倍希釈) を室温で 1 時間行った。TBS-T および TBS で十分に洗浄した後、化学発光検出試薬 (ECL reagent, Amersham Biosciences 社) と 1 分間反応させた。反応終了後、LAS-3000 (FUJIFILM 社) を用いて、抗原の検出を行った。得られたバンドは SIGMAGEL (STATCON 社) を用いて定量し、その値を CON 群の平均値に対する相対値で表した。

4. 骨格筋酵素活性

氷水中に浸したガラス製ホモジナイザーに骨格筋サンプル (滑車筋) と 9 倍量のホモジナイズバッファー (175 mM KCl; 10 mM Glutathione (GSH); 2 mM EDTA; pH 7.4) を入れ、ホモジナイズした後、凍結・溶解を 2 度繰り返した。クエン酸合成酵素 (CS) 活性測定には、ホモジネートをそのまま使用し、3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (3-HAD) 活性の測定には、ホモジネートを 700 μ g で 10 分間遠心して得られた上清を用いた。ミトコンドリア酸化系酵素の指標として CS 活性を、Sere の方法 (1969) に従い測定し

た。また、ミトコンドリア β 酸化系酵素の指標として 3-HAD 活性を Bass et al. (1968) の方法に基づいて測定した。

5. 筋グリコーゲン濃度

骨格筋サンプル (上腕三頭筋) を冷却したガラス製ホモジナイザーに入れ、0.3 M の過塩素酸でホモジナイズした。筋グリコーゲン濃度を Lowry & Passoneau (1972) の方法により測定した。上腕三頭筋の筋線維組成及び安静時の筋グリコーゲン濃度は滑車筋とほぼ同等であり、さらに滑車筋と同様に水泳運動に動員されることから (Nesher et al., 1980, Delp and Duan, 1996, Terada et al., 2004), 筋グリコーゲン用サンプルとして上腕三頭筋を用いた。

6. 血清グルコース濃度

血清グルコース濃度は、グルコース C II テストワコー (和光純薬社) を用いて測定した。

7. 統計処理

データは全て平均値 \pm 標準誤差で表した。統計は Sigma Stat (Jandel Scientific 社) を用いて行った。3 群間の比較には、一元配置の分散分析を用い、多重比較には Fisher LSD 法を用いた。統計学的有意水準は危険率 5 % 未満とした。

III. 結果

1. 体重および腹腔内脂肪量

体重および腹腔内脂肪量の結果を **Table 1** に示した。6 週間の実験期間終了時の IF 群の体重は、他の 2 群に比べて有意に低い値を示した ($p < 0.001$)。また、EX 群の体重は、CON 群に比べて有意に低い値を示した ($p < 0.05$)。

腹腔内脂肪量も、CON 群および EX 群に比べて、IF 群において有意に低い値を示した (IF vs. CON: $p < 0.001$, IF vs. EX: $p < 0.05$)。また、EX

群の腹腔内脂肪量も, CON 群に比べて有意に低い値であった ($p < 0.01$). しかしながら, 体重

100 g 当りの相対的な腹腔内脂肪量は, 3 群間に有意な差は認められなかった.

Table 1. Body weight, intra-abdominal fat mass and serum glucose concentration in rats

		CON	IF	EX
Body weight	(g)	444±10 ^{\$}	248±14 ^{***, \$\$\$}	401±14
Intra-abdominal fat	(g)	17.2±1.2 ^{\$\$}	8.1±0.9 ^{***, \$}	12.4±1.1
Intra-abdominal fat	(g/100g BW)	3.9±0.2	3.2±0.2	3.1±0.2
Serum glucose	(mg/dl)	217±4	193±10	205±11

Values are mean±SEM. *** indicate significant differences from CON group at a level of $p < 0.001$. \$, \$\$ and \$\$\$ indicate significant differences from EX group at levels of $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively. CON: ad libitum fed, IF: Intermittent fasting, EX: endurance exercise training

2. 骨格筋 PGC-1 α 蛋白発現量

Figure 1 に滑車上筋の PGC-1 α 蛋白発現量の結果を示した. EX 群の骨格筋 PGC-1 α 発現

量は, CON 群および IF 群に比べて有意に高い値を示した ($p < 0.01$). CON 群と IF 群の間には有意な差は認められなかった.

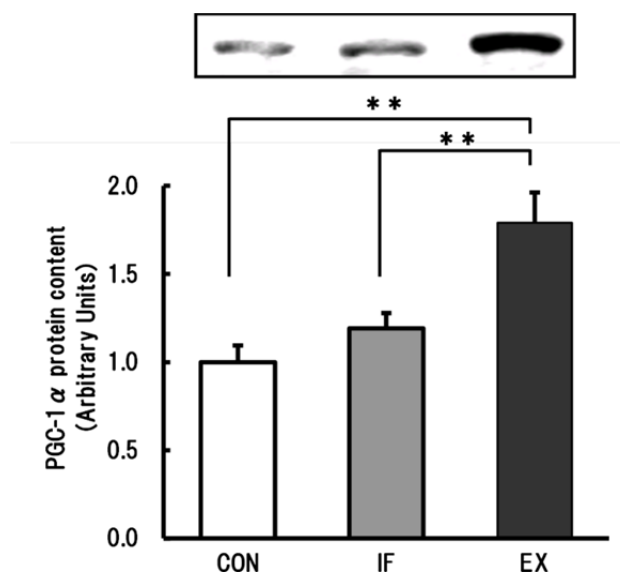


Figure 1. Effects of intermittent fasting and endurance exercise training on PGC-1 α protein contents in rat epitrochlearis muscles. Values are mean±SEM. ** indicates significant difference at a level of $p < 0.01$. CON: ad libitum fed, IF: Intermittent fasting, EX: endurance exercise training.

3. 骨格筋 GLUT-4 蛋白発現量

滑車上筋における GLUT-4 蛋白発現量の結果を Figure 2 に示した. EX 群の骨格筋 GLUT-4 発現量は, CON 群および IF 群に比べて有意に

高い値を示した (EX vs. CON: $p < 0.05$, EX vs. IF: $p < 0.001$). 一方, IF 群の GLUT-4 発現量は, CON 群に比べて 32 % 有意に低い値であった ($p < 0.05$).

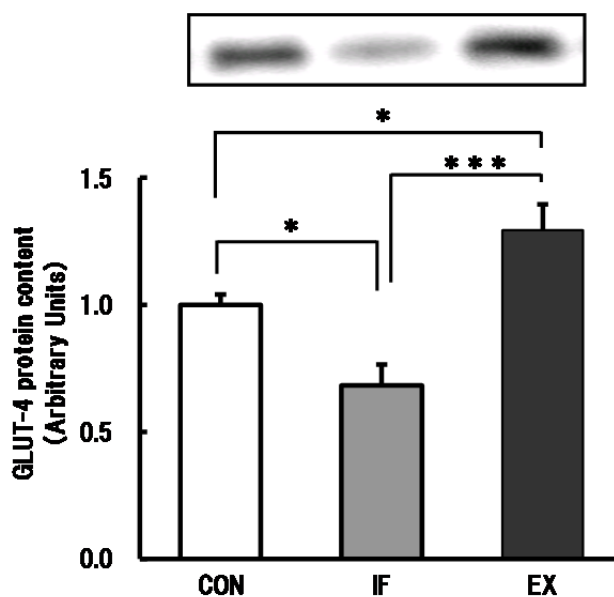


Figure 2. Effects of intermittent fasting and endurance exercise training on GLUT-4 protein contents in rat epitrochlearis muscles. Values are mean±SEM. * and *** indicate significant differences at levels of $p<0.05$ and $p<0.001$, respectively. CON: ad libitum fed, IF: Intermittent fasting, EX: endurance exercise training.

4. 骨格筋酵素活性

骨格筋酵素活性の結果を **Figure 3** に示した。滑車上筋の CS 活性は、CON 群および IF 群に比べて EX 群において有意に高い値を示した (EX vs. CON: $p<0.05$, EX vs. IF: $p<0.01$)。一方、CON 群と IF 群の間には有意な差は認められな

った。

EX 群の 3-HAD 活性は、CON 群および IF 群に比べて有意に高い値を示した ($p<0.05$)。CON 群と IF 群の間には有意な差は認められなかった。

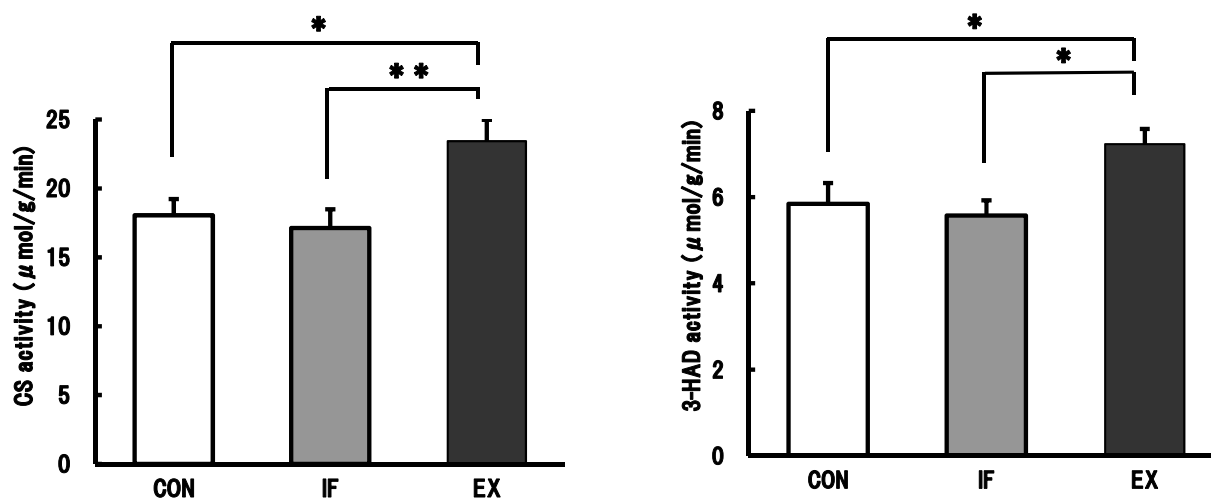


Figure 3. Effects of intermittent fasting and endurance exercise training on Citrate synthase (CS) and 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (3-HAD) activities in rat epitrochlearis muscles. Values are mean±SEM. * and ** indicate significant differences at levels of $p<0.05$ and $p<0.01$, respectively. CON: ad libitum fed, IF: Intermittent fasting, EX: endurance exercise training.

5. 筋グリコーゲン濃度

筋グリコーゲン濃度の結果を **Figure 4** に示した。上腕三頭筋の筋グリコーゲン濃度は、EX 群にお

いて他の 2 群に比べて有意に高い値を示した ($p < 0.01$)。一方、IF 群と CON 群の間には有意な差は認められなかった。

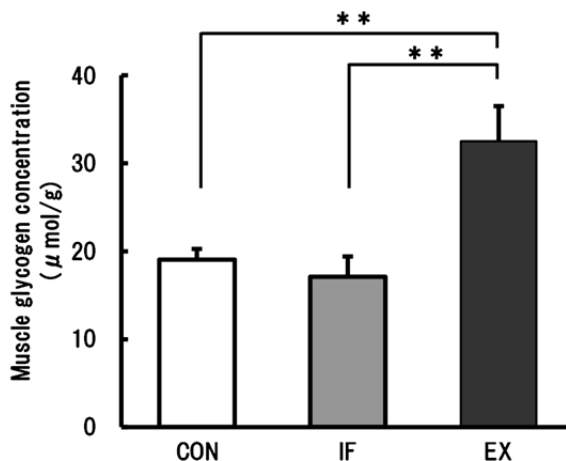


Figure 4. Effects of intermittent fasting and endurance exercise training on glycogen concentrations in rat triceps muscle. Values are mean±SEM. ** indicates significant difference at a level of $p < 0.01$. CON: ad libitum fed, IF: Intermittent fasting, EX: endurance exercise training.

6. 血清グルコース濃度

解剖時の血清グルコース濃度には、3 群間に有意な差は認められなかった (Table 1)。

IV. 論議

本研究の主な知見は、1) 6 週間の間欠的絶食は、ラット骨格筋における PGC-1 α 発現量およびミトコンドリア系酵素活性には影響を及ぼさない、2) 骨格筋の糖輸送体 GLUT-4 発現量が長期間の間欠的絶食による摂取エネルギー制限により顕著に減少する、という 2 点である。

アデノウイルスにより PGC-1 α 遺伝子を導入した骨格筋培養細胞 (L6 myotube) や、骨格筋特異的に PGC-1 α を高発現させたトランスジェニックマウスにおいて、GLUT-4 の発現量が増加し、それに伴い糖取り込み機能が向上することが報告されている (Michael et al., 2001; Wende et al., 2007)。身体運動トレーニングを行うことで、骨格筋の PGC-1 α 発現量が増加することも数多く報告されており (Terada et al., 2002; Terada and Tabata 2004)、運動による骨格筋 GLUT-4 増加

のメカニズムに PGC-1 α が関与していると考えられている。本研究でも、先行研究と同様に 1 週間の持久的トレーニングを実施した EX 群の骨格筋において、PGC-1 α および GLUT-4 発現量の増加が認められ (Fig 1, 2)、さらに筋グリコーゲン濃度も上昇していた (Fig 4)。一方、一日毎に摂食と絶食を繰り返す間欠的絶食による摂取エネルギー制限が、脂肪組織および心筋における PGC-1 α を増加させることが近年報告されている (Nisoli et al., 2005)。この先行研究の結果から、間欠的絶食により、心筋や脂肪組織だけではなく、骨格筋においても PGC-1 α 、さらには GLUT-4 の発現量が増加することも考えられた。そこで、本研究では、先行研究と同様の方法を用い、ラットを対象として間欠的絶食を行わせた。その結果、IF 群の体重は、CON 群に比べて約 45 % 低い値を示した (Table 1)。ラットを対象として行われた先行研究において、30 % の摂取エネルギー制限を行わせた場合、自由摂取群と比較して体重が 27 % 減少したことが報告されている (Hancock et al., 2010)。そのため、本研究でも、

長期間の間欠的絶食を行うことで、上記の体重減少量と同程度に摂取エネルギーが制限されていたと考えられる。しかしながら、仮説に反し、6週間の間欠的絶食後において、PGC-1 α の増加は認められず(Fig. 1)、さらに、GLUT-4発現量の顕著な低下が認められた(Fig. 2)。生体内で最大の血糖処理器官である骨格筋(DeFronzo et al. 1981)の糖取り込み能力とGLUT-4濃度との間には正の相関関係が存在することが報告されていることから(Henriksen et al., 1990)、間欠的絶食は、全身の糖代謝能をかえって悪化させるかもしれない。本研究では、解剖時の血清グルコース濃度に3群間で有意な差は認められなかったものの(Table 1)、今後の研究では、経口糖負荷試験やインスリンランプ試験などのより正確な評価手法を用い、間欠的絶食による長期間の摂取エネルギー制限が全身での糖代謝機能に及ぼす影響について検討する必要があるだろう。

PGC-1 α は、GLUT-4だけではなく、ミトコンドリア系酵素の遺伝子発現調節においても重要な役割を果たしていることが知られている(Puigserver and Spiegelman, 2003)。Nisoli et al. (2005)は、本研究と同様の間欠的絶食を実施することにより、PGC-1 α の発現量増加に伴い、マウスの心筋や脂肪組織においてミトコンドリア新生が生じることを報告している。本研究では、同様の間欠的絶食をラットに対して行ったものの、骨格筋におけるCSおよび3-HADといった主要なミトコンドリア系酵素の活性には変化は認められなかった(Fig 3)。Nisoli et al. (2005)は、本研究よりも長い3ヶ月の介入期間を設けている。したがって、間欠的絶食によりミトコンドリア新生を生じさせるには、さらに長期間にわたる介入が必要であるのかもしれない。

本研究では、間欠的絶食による骨格筋GLUT-4発現量減少のメカニズムは明らかにすることはできなかった。先行研究により、選択的に

膵臓ランゲルハンス島を破壊し、インスリン分泌を低下させるStreptozotocin(STZ)の投与により、骨格筋GLUT-4の発現量が顕著に低下することが知られている(Kawanaka et al., 1996)。これらの結果は、GLUT-4の発現調節におけるインスリンの重要性を示唆している。本研究のIF群で観察されたGLUT-4発現量の低下は、絶食中に食物が体内に取り込まれないことで血糖値が上昇せず、インスリン分泌が減少したことに起因するのかもしれない。

GLUT-4の発現量以外に、骨格筋の血糖取り込み機能に及ぼす別の因子として、体脂肪、特に内臓脂肪量(腹腔内脂肪量)が挙げられる。ラットに高脂肪食を摂取させた場合、骨格筋のGLUT-4の発現量の変化は認められないものの、骨格筋糖取り込み能力が低下し、その骨格筋糖取り込み能力と腹腔内脂肪の総量との間に負の相関関係が認められることが報告されている(Han et al., 1997, Kim et al., 2000)。さらに、Racette et al. (2006)は、ヒトにおいて、体脂肪率(%Fat)よりも、腹部脂肪量の間接的な指標である腹部周径囲と全身のインスリン感受性との間により強い関係性が認められることを報告しており、インスリン抵抗性発症における腹部脂肪量の重要性を指摘している。最近では、肥大した脂肪細胞から分泌されるレジスチンやTumor necrosis factor α (TNF α)などのアディポサイトカインがインスリンの情報伝達経路を悪化させることも明らかとなっており、脂肪量を減らす重要性が示唆されている(Dyck et al., 2006)。本研究では、体重当りの相対的な腹腔内脂肪量には3群間で有意な差は認められなかったが、IF群の腹腔内脂肪の総量は、CON群およびEX群と比較して、有意に低い値を示していた(Table 1)。したがって、間欠的絶食は、骨格筋のGLUT-4には好ましい影響を及ぼさないものの、腹腔内脂肪の総量を減少させることで、アディポサイトカインの分泌を介して骨格

筋の糖取り込み機能, さらには全身の糖代謝機能の維持・改善に寄与するかもしれない. 間欠的絶食による GLUT-4 の減少というマイナスの効果と, 腹腔内脂肪の減少というプラスの効果のどちらが骨格筋の糖取り込み機能および全身の糖代謝機能に強い影響を及ぼすのか, 先述したような経口糖負荷試験やインスリンクランプ試験などを行い, 評価する必要があると考えられる.

本研究では, IF 群の体重は他の 2 群と比較して有意に低い値であった (Table 1). 最近, Halberg et al. (2005) は, 間欠的絶食でも, 介入期間中の総摂取エネルギー量を減らさずに体重を維持した場合には, GLUT-4 を減少させることなく, 健常男性のインスリン感受性を改善できることを報告している. また, Cartee et al. (1994) は, 毎日の摂取エネルギーを自由摂取群の 60 % に抑えるという手法による摂取エネルギー制限の場合には, 5 ヶ月という長期間の介入後においても, ラット骨格筋の GLUT-4 発現量の減少を伴わずに, 骨格筋のインスリン感受性が改善することを報告している. したがって, 体重を維持した間欠的絶食や, 同じ摂取エネルギー制限ではあるものの, 毎日一定量の摂取エネルギーを制限する方が, 骨格筋の糖取り込み能力および全身の糖代謝機能の向上のために有効かつ安全な手段であるかもしれない.

以上, 本研究をまとめると, 6 週間の間欠的絶食による摂取エネルギー制限は, ラット骨格筋の PGC-1 α 発現量およびミトコンドリア系酵素活性には影響を及ぼさないものの, 糖輸送体 GLUT-4 発現量を顕著に減少させることが明らかとなった.

引用文献

- ・ Bass A., Brdiczka D., Eyer P., Hofer S., Pette D. (1968) Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eur J Biochem.*, 10, 198–206.
- ・ Cartee G.D., Kietzke E.W., Briggs-Tung C. (1994) Adaptation of muscle glucose transport with caloric restriction in adult, middle-aged, and old rats. *Am J Physiol.*, 266, R1443-R1447.
- ・ DeFronzo R.A., Ferrannini E., Sato Y., Felig P., Wahren J. (1981) Synergistic interaction between exercise and insulin on peripheral glucose uptake. *J Clin Invest.*, 68, 1468–1474.
- ・ Delp DM and Duan C. (1996) Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J Appl Physiol.*, 80, 261-270.
- ・ Dyck DJ, Heigenhauser GJ, Bruce CR. (2006) The role of adipokines as regulators of skeletal muscle fatty acid metabolism and insulin sensitivity. *Acta Physiol (Oxf).*, 186, 5-16.
- ・ Fink RI, Wallace P, Brechtel G, Olefsky JM. (1992) Evidence that glucose transport is rate-limiting for in vivo glucose uptake. *Metabolism*, 41, 897-902.
- ・ Halberg N., Henriksen M., Söderhamn N., Stallknecht B., Ploug T., Schjerling P., Dela F. (2005) Effect of intermittent fasting and refeeding on insulin action in healthy men. *J Appl Physiol.*, 99, 2128-2136.
- ・ Hancock CR, Han DH, Higashida K, Kim SK, Holloszy JO. (2010) Does calorie restriction induce mitochondrial biogenesis? A reevaluation. *Faseb J*, 25, 785-791.
- ・ Han DH, Hansen PA, Host HH, Holloszy JO. (1997) Insulin resistance of muscle glucose transport in rats fed a high-fat diet: a

- reevaluation. *Diabetes*, 46, 1761-1767.
- Henriksen E.J., Bourey R.E., Rodnick K.J., Koranyi L., Permutt M.A., Holloszy J.O. (1990) Glucose transporter protein content and glucose transport capacity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 259, E593-E598.
 - Holloszy J.O., Hansen P.A. (1996) Regulation of glucose transport into skeletal muscle. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.*, 128, 99-193.
 - Kawanaka K., Higuchi M., Ohmori H., Shimegi S., Ezaki O., Katsuta S. (1996) Muscle contractile activity modulates GLUT4 protein content in the absence of insulin. *Horm Metab Res.*, 28, 75-80.
 - Kim J.Y., Nolte L.A., Hansen P.A., Han D.H., Ferguson K., Thompson P.A., Holloszy J.O. (2000) High-fat diet-induced muscle insulin resistance: relationship to visceral fat mass. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 279, R2057-R2065.
 - Kubo K., & Foley J.E. (1986) Rate-limiting steps for insulin-mediated glucose uptake into perfused rat hindlimb. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 250, E100-E102.
 - Michael L.F., Wu Z., Cheatham R.B., Puigserver P., Adelmant G., Lehman J.J., Kelly D.P., Spiegelman B.M. (2001) Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98, 3820-3825.
 - Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
 - Lowry O.H., & Passoneau J.V. (1972) *A Flexible System of Enzymatic Analysis.*, New York: Academic
 - Neshler R, Karl IE, Kaiser KE, Kipnis DM. (1980) Epitrochlearis muscle. I. Mechanical performance, energetics, and fiber composition. *Am J Physiol.*, 239,E454-460.
 - Nisoli E., Tonello C., Cardile A., Cozzi V., Bracale R., Tedesco L., Falcone S., Valerio A., Cantoni O., Clementi E., Moncada S., Carruba M.O. (2005) Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science*, 310, 314-317.
 - Perreault M, Dombrowski L, Marette A. (2000) Mechanism of impaired nitric oxide synthase activity in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia.*, 43, 427-437.
 - Puigserver P, Spiegelman BM. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev.*, 24:78-90.
 - Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92, 829-839.
 - Racette S.B., Evans E.M., Weiss E.P., Hagberg J.M., Holloszy J.O. (2006) Abdominal adiposity is a stronger predictor of insulin resistance than fitness among 50-95 year olds. *Diabetes Care.*, 29, 673-678.
 - Ren JM, Marshall BA, Gulve EA, Gao J, Johnson DW, Holloszy JO, Mueckler M. (1993) Evidence from transgenic mice that

- glucose transport is rate-limiting for glycogen deposition and glycolysis in skeletal muscle. *J Biol Chem.*, 268, 16113-16115.
- Srere P.A. (1969) Citrate synthase. *Methods Enzymol.*, 13, 3-6.
 - Terada S., Goto M., Kato M., Kawanaka K., Shimokawa T., Tabata I. (2002) Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle. *Biochem Biophys Res Commun.*, 296, 350-354.
 - Terada S. & Tabata I. (2004) Effects of acute bouts of running and swimming exercise on PGC-1alpha protein expression in rat epitrochlearis and soleus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 286, E208-E216.
 - Terada S, Yokozeki T, Kawanaka K, Ogawa K, Higuchi M, Ezaki O, Tabata I. (2001) Effects of high-intensity swimming training on GLUT-4 and glucose transport activity in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol.*, 90, 2019-2024.
 - Wende A.R., Schaeffer P.J., Parker G.J., Zechner C., Han D.H., Chen M.M., Hancock C.R., Lehman J.J., Huss J.M., McClain D.A., Holloszy J.O., Kelly D.P. (2007) A role for the transcriptional coactivator PGC-1alpha in muscle refueling. *J Biol Chem.*, 282, 36642-36651.
 - Ziel FH, Venkatesan N, Davidson MB. (1988) Glucose transport is rate limiting for skeletal muscle glucose metabolism in normal and STZ-induced diabetic rats. *Diabetes*, 37, 885-890.