

持久性トレーニング後のテーパリングが持久力とマウス骨格筋ヘキソキナーゼ II、 およびミトコンドリアタンパク含量に及ぼす影響

Effects of tapering on endurance capacity, hexokinase 2 and mitochondria protein contents
in skeletal muscle of trained mice

谷口祐一¹⁾、篠原暁子²⁾、樋口満^{2), 3)}

¹⁾ 龍谷大学農学部

²⁾ 早稲田大学スポーツ科学学術院

³⁾ 早稲田大学アクティブ・エイジング研究所

Hirokazu Taniguchi¹⁾, Akiko Shinohara²⁾, Mitsuru Higuchi^{2), 3)}

¹⁾ Faculty of agriculture, Ryukoku University

²⁾ Faculty of Sport Sciences, Waseda University

³⁾ Institute of Advanced Active Aging Research, Waseda University

キーワード: 持久力、テーパリング、ヘキソキナーゼ II、ミトコンドリア

Key words: endurance training, tapering, hexokinase 2, mitochondria

【抄 録】

目的: Bosquet ら(2007)によって検討されたメタアナリシスにより、トレーニング強度を維持したまま、2 週間のトレーニング時間を前半は著しく、後半はわずかに減少させ、全体のトレーニング時間を半減させるテーパリング手法がパフォーマンスの向上につながる可能性が示唆されている。本研究は、Bosquet ら(2007)によって検討されたテーパリング手法が持久力、骨格筋ヘキソキナーゼ II およびミトコンドリアタンパク含量に及ぼす影響について明らかとすることを目的とした。

方法: 8 週齢の雄 C57BL/6Jcl マウス(n=18)に対し、7 週間のトレッドミル運動を負荷した後、トレーニング継続群、テーパリング群および脱トレーニング群の 3 群に群分けを行った(各 n=6)。2 週間の各期間後、トレッドミルを用いて疲労困憊に至るまでの運動継続時間を測定し、その直後に解剖して腓腹筋におけるヘキソキナーゼ II およびミトコンドリアタンパク含量をウエスタンブロット法にて解析した。

結果: 運動継続時間はトレーニング継続群とテーパリング群と比較して脱トレーニング群において有意に低い値を示した(p<0.05)。一方で、トレーニング継続群とテーパリング群との間には有意な差は認められなかった。また、腓腹筋におけるヘキソキナーゼ II タンパク含量は、他の 2 群と比較してトレーニング継続群において有意に高い値を示した(p<0.05)。ミトコンドリア複合体 I Ndufa9 サブユニットおよびミトコンドリア複合体 IV サブユニット IV タンパク含量においては、トレーニング継続群と比較して、テーパリング群では有意な差は認められなかったが、脱トレーニング群では有意に低い値を示した(p<0.05)。

結論: 本研究の結果から、トレーニングの継続と比較して 2 週間のテーパリングは持久力と、骨格筋のヘキソキナーゼ II およびミトコンドリアタンパク含量を増加させない可能性が推察された。これらの結果は、Bosquet ら(2007)によるメタアナリシスにより解析されたテーパリング手法では、持久力の向上につながる可能性を示唆している。

スポーツ科学研究, 14, 29-36, 2017年, 受付日:2016年4月12日, 受理日:2017年4月24日

連絡先:樋口満 〒359-1192 埼玉県所沢市三ヶ島2-579-15 早稲田大学スポーツ科学学術院

Tel and Fax: 042-947-6745, E-mail: mhiguchi@waseda.jp

I. 背景

持久力は持久性スポーツにおける競技力の決定要因であるため、持久力を効率よく向上させるトレーニング方法や、その機序について多くの興味・関心が寄せられている。持久力を決定する要素の 1 つとしては、骨格筋におけるタンパク含量が関係していると考えられており、Fuegerら(2005)によって、解糖系の律速酵素であるヘキソキナーゼ(HK)Ⅱタンパク含量が持久力の決定要因であることが報告されている。

持久系競技のパフォーマンスを高める手法として、競技前に一時的にトレーニング量を減少させる“テーパリング”が実施されている(Kubukeli 2002, Mujika 2004)。先行研究において、運動強度を減らさずに運動時間を減少させる 4 日および 8 日間のテーパリングが、トレーニング休止に伴う電子伝達系酵素(チトクロームオキシダーゼ; CYTOX)活性の減少を抑制し、さらにトレーニングを継続した群と比較して高い換気性閾値を示すことが示唆されている(Neary 1992)。従って、骨格筋における電子伝達系のタンパクに対する脱トレーニングの影響を抑制することに加えて、有酸素エネルギー代謝を高めることがテーパリングによる持久性パフォーマンスの向上と関係していると考えられる。

一方で、Bosquet ら(2007)によって検討されたメタアナリシスにより、トレーニング強度を維持したまま、2 週間のトレーニング時間を前半は著しく、後半はわずかに減少させ、全体のトレーニング時間を半減させるテーパリング手法がパフォーマンスを効率的に向上させる可能性が示唆されている。この報告は Neary ら(1992)の先行研究と比較して運動強度を低下させないという点で一致するものの、テーパリングの期間が異なるため、2 週間のテーパリングが、電子伝達系のタンパクに対する脱トレーニングの影響を抑制するのかどうかということについては再検証が必要であると考えられる。また、テーパリングが持久力の決定要因である骨格筋 HK Ⅱタンパク含量に及ぼす影響についても解明されていない。テーパリングとこれらの

タンパク含量との関係性を解明することにより、テーパリングの有用性に対する科学的根拠の構築につながることや、今後、その関係性を応用したトレーニング手法の発展につながる可能性が考えられる。

そこで本研究は、ヒト研究におけるメタアナリシスの結果を参考に、持久性トレーニング後における 2 週間のテーパリングが持久力と、骨格筋ヘキソキナーゼⅡおよび電子伝達系のタンパク含量に及ぼす影響について明らかとすることを目的とした。

II. 方法

1. 研究対象

骨格筋 HK Ⅱおよび電子伝達系のタンパク含量の解析には骨格筋を摘出しなければならないため、本実験では 8 週齢の雄 C57BL/6Jcl マウスを対象としたトレーニング負荷実験を実施した。18 匹のマウスは室温 25℃、12 時間の明暗サイクルを設定した飼育室において、ポリカーボネート樹脂製の飼育ケージを用いて飼育された。全ての飼育期間を通して、市販の固形飼料(CE-2、オリエンタル酵母)および水道水を自由摂取させた。また本実験は、早稲田大学動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。

2. トレーニング条件および群分け

本実験では運動効果に対するテーパリングの影響を検討するため、テーパリングの前に 7 週間のトレーニング期間を設けた。トレッドミル(KN-73、夏目製作所)を用いて、1 週目に 3 回の馴化を実施した後、速度:25 m/分、斜度:10°、時間:90 分/回、頻度:5~6 回/週のトレーニングを 6 週間負荷した。その後、同じトレーニングを負荷し続けたトレーニング継続群(n=6)および運動時間のみを減少させたテーパリング群(n=6)に加えて、脱トレーニングによる影響を比較検討するためにトレーニングを休止した脱トレーニング群(n=6)の 3 群に群分けをした(表 1)。

表 1. 群分け後のトレーニング時間*

日数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
トレーニング群	0	90	90	90	90	90	0	90	90	90	90	90	0	
テーパリング群	0	90	75	55	45	40	0	35	30	30	25	25	0	持久力測定 および解剖
脱トレーニング群	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	0	

※各群における速度(25 m/分)および斜度(10°)は同じ、各 n=6

3. テーパリング条件

先行研究(Bosquet 2007)におけるメタアナリシスの結果を参考とし、本実験ではトレーニング強度を維持したまま(速度:25 m/分、斜度:10°)、2週間の前半は著しく、後半はわずかにトレーニング時間を減少させ、全体のトレーニング時間を半減させる手法を用いた(表 1)。トレーニング期間の終了後、1 日目はトレーニングを負荷せず、2~6 日目のトレーニング時間を 90、75、55、45、40 分と段階的に減少させ、7 日目はトレーニングを負荷せず、8~12 日のトレーニング時間を 35、30、30、25、25 分と減少させた。持久力測定の前日(13 日目)はトレーニングを負荷せず、14 日目に持久力の測定および解剖を行った。

4. 持久力(運動継続時間)の測定

脱トレーニング群における走行動作の変化が持久力に及ぼす影響を和らげるため、持久力測定の 2 日および 3 日前に脱トレーニング群に対して他の群と同強度(速度:25 m/分、斜度:10°)、10 分間のトレッドミル走行練習を負荷した(表 1)。持久力の測定は Wagner ら(2001)の手法を参考として、各期間終了後、速度を 25 m/分、斜度を 20° に固定したトレッドミルを用いてマウスが疲労困憊に至るまでの時間を測定した。

5. 解剖および骨格筋の保存

持久力の測定直後、ペントバルビタールナトリウム(5 mg/100 g 体重)の腹腔内投与による完全麻酔条件下において解剖を実施した。体重、肝臓、精巣上体脂肪および腓腹筋重量を測定し、骨格筋タンパク含量測定のため液体窒素を用いて腓腹筋を急速凍結し、分析まで-80℃の冷凍庫において保存した。

6. 骨格筋タンパク含量の測定

凍結保存しておいた腓腹筋を、氷冷下において 1/100 Protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich)を含む Radio-Immunoprecipitation Assay Lysis Buffer (Upstate Biotechnology)に浸漬させホモジナイズを行った。凍結融解を 2 回行ったのち、5 分、700 G の条件で遠心分離を実施し、分離された上清を測定サンプルとして用いた。次に測定サンプルの総タンパク含量を BCA Protein Assays (Thermo Fisher Scientific)で求め、各サンプルの総タンパク含量が同一となるように Sample Buffer Solution (2ME+) (Wako Pure Chemical Industries)と混合した後、5 分、100℃の条件で加熱しタンパク質を可溶化した。

可溶化されたサンプルは、10% ミニプロティアン TGX ゲル(Bio-Rad)を用いたポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離された後、ミニトランスブロットセル(Bio-Rad)を用いてゲルからポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜に転写された。転写後、10% スキムミルク/リン酸緩衝生理食塩水 + 0.1% ツイー ン 20 (PBST)に PVDF 膜を浸漬し、室温で 1 時間振とうしてブロッキングを行った。各タンパク含量を測定するための一次抗体の希釈濃度は、1% スキムミルク/PBST にそれぞれ HK II (1:1000、Cell Signaling Technology, #2867)、ミトコンドリア複合体 I NADH デヒドロゲナーゼ (ユビキノ ン) 1 α 部分複合体 9 (Ndufa9)サブユニット (1:1000、Invitrogen, #459100)およびミトコンドリア複合体 IV サブユニット IV (1:1000、Invitrogen, #A21348)とし、抗原抗体反応は冷蔵および振とう条件下においてオーバーナイトインキュベーションを行った。翌日、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗マウスおよびウサギ IgG 抗体(1:5000、Jackson Immuno Research, #715-035-151 および #711-035-152)を用いた二次抗体反応を 1 時間

行った後、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Bio-Sciences)および LAS-3000 (フジフィルム)を用いて抗原の化学発光を検出した。

7. 解析方法

各タンパク含量は、ImageJ (NIH)を用いて検出された化学発光の解析を行った。また統計解析には SPSS Statistics 21 (IBM)を使用し、各測定項目における正規性をコルモゴロフ-スミルノフ検定を用いて検証した後、群間比較のために一元配置分散分析を行った。群間の多重比較にはテューキーの範囲検定を用いた。また各骨格筋タン

パク含量と持久力との関係性を検討するために、ピアソンの積率相関係数を用いた相関解析も併せて実施した。測定項目は全て平均値±標準誤差で示し、統計解析の有意水準は $p<0.05$ とした。

III. 結果

1. 身体組成および摂餌量

体重、肝臓、精巣上体脂肪および腓腹筋重量において各群間における有意な差は認められなかった。また、全期間を通じた摂餌量における群間差は認められなかった(表 2)。

表 2. 身体組成、摂餌量および血中乳酸濃度

	トレーニング継続群			テーパリング群			脱トレーニング群		
体重 (g)	27.12	±	0.93	28.57	±	0.86	26.63	±	0.83
肝臓 (g)	1.17	±	0.06	1.31	±	0.05	1.20	±	0.04
精巣上体脂肪 (g)	0.42	±	0.03	0.43	±	0.03	0.46	±	0.02
腓腹筋 (g)	0.12	±	0.00	0.12	±	0.00	0.13	±	0.00
摂餌量 (g/日)	3.63	±	0.12	3.73	±	0.16	3.46	±	0.07

平均値±標準誤差、各 n=6

2. 持久力

疲労困憊までの運動継続時間を測定した結果、脱トレーニング群と比較して、トレーニング継続群およびテーパリング群において有意に長い

運動継続時間が認められた($p<0.05$)。一方で、トレーニング継続群とテーパリング群との間には有意な差は認められなかった(図 1)。

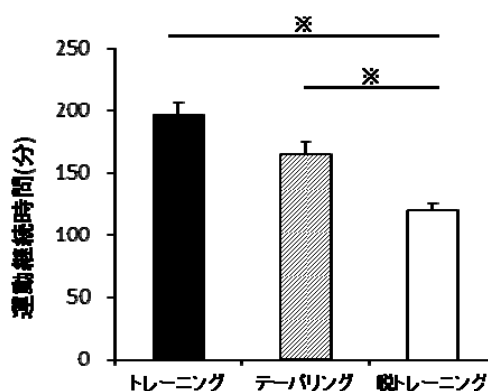


図 1. 持久力測定結果
平均値±標準誤差、※: $p<0.05$

3. 骨格筋 HK II およびミトコンドリアタンパク含量

測定の結果、腓腹筋における HK II タンパク含量は、トレーニング継続群においてテーパリング群および脱トレーニング群よりも有意に高い値が認められた($p < 0.05$)。テーパリング群および脱トレーニング群との間には、有意な差が認められなかった。

電子伝達系の構成タンパク質であるミトコンドリア複合体 I Ndufa9 サブユニットおよびミトコンドリア複合体 IV サブユニット IV については、トレーニング継続群におけるタンパク含量が脱トレーニング群と比較して有意に高い値を示した一方で、テーパリング群と他の 2 群との間には有意な差が認められなかった(図 2)。

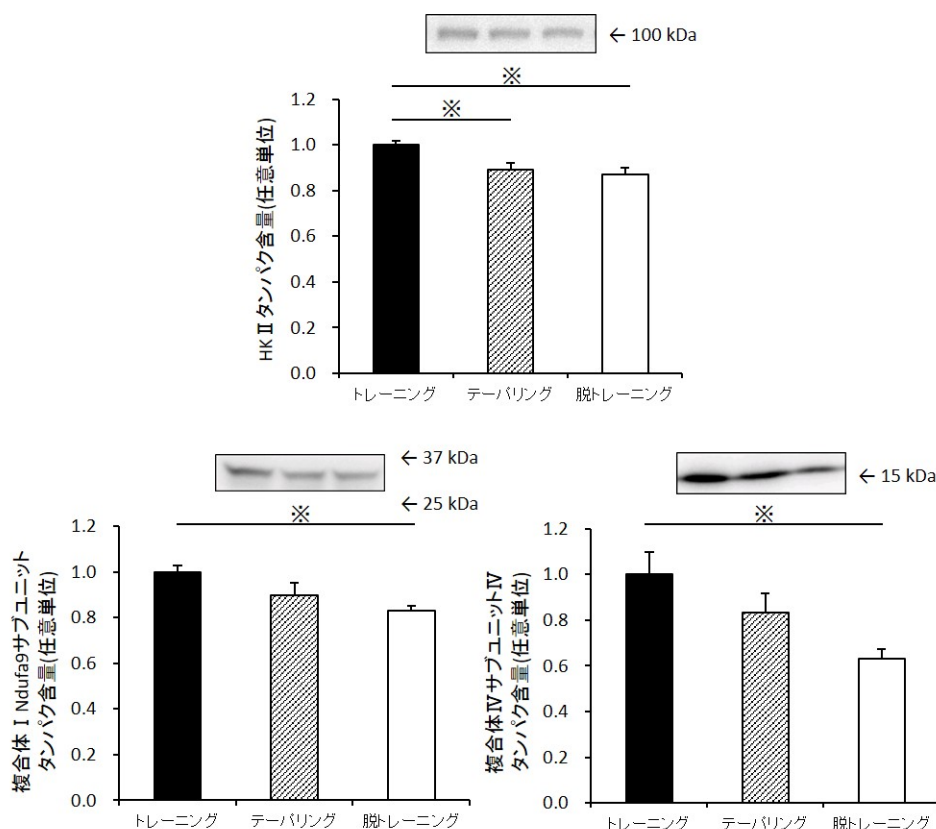


図 2. 腓腹筋 HK II およびミトコンドリアタンパク含量測定結果

平均値 ± 標準誤差、※: $p < 0.05$ 、HK II : ヘキサキナーゼ II、複合体 I Ndufa9 サブユニット: ミトコンドリア複合体 I NADH デヒドロゲナーゼ (ユビキノン) 1 α 部分複合体 9

4. 持久力と骨格筋 HK II およびミトコンドリアタンパク含量との相関関係

相関分析の結果を図 3 に示す。本実験では、疲労困憊までの運動継続時間と腓腹筋の HK II、

ミトコンドリア複合体 I Ndufa9 サブユニットおよびミトコンドリア複合体 IV サブユニット IV タンパク含量との間に有意な正の相関関係が認められた ($p < 0.05$)。

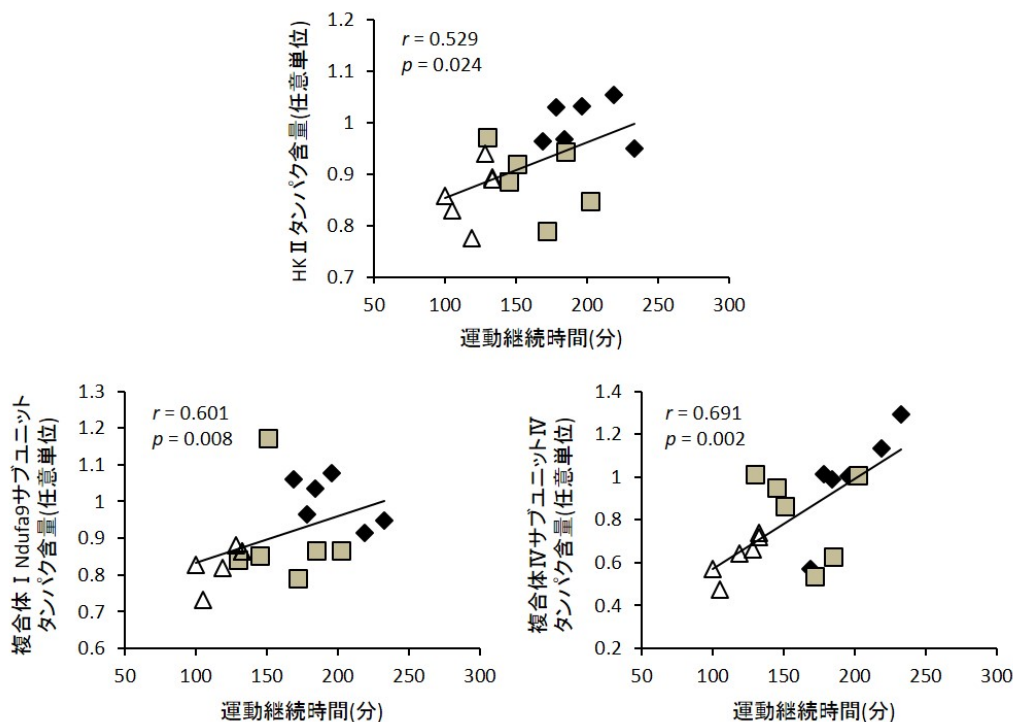


図 3. 持久力と腓腹筋 HK II およびミトコンドリアタンパク含量との相関関係

r: 相関係数、◆: トレーニング継続群、■: テーパーリング群、△: 脱トレーニング群、HK II: ヘキソキナーゼ II、複合体 I Ndufa9 サブユニット: ミトコンドリア複合体 I NADH デヒドロゲナーゼ (ユビキノ) 1 α 部分複合体 9

IV. 考察

本実験の結果、脱トレーニング群と比較してトレーニング群およびテーパーリング群の持久力が有意に高い値を示し、トレーニング継続群と比較してテーパーリング群および脱トレーニング群の腓腹筋 HK II タンパク含量が有意に低い値を示した。またトレーニング継続群の腓腹筋ミトコンドリアタンパク含量が脱トレーニング群と比較して有意に高い値を示した一方で、テーパーリング群と他の 2 群の間には有意な差は認められなかった。これらの結果は、本実験で用いた 2 週間のテーパーリングが、骨格筋 HK II タンパク含量のトレーニング効果を脱トレーニングと同程度に消失させる可能性と、その影響が骨格筋ミトコンドリアタンパク含量には認められない可能性を示唆している。また Bosquet ら(2007)のメタアナリシスによって示唆された、効率的に持久性パフォーマンスを向上させるテーパーリング手法は、本研究では、トレーニングを継続した場合と比較してマウスの持久力と、HK II およびミトコンドリアタンパク含量の増加させない可能性が推察された。

解糖系における律速酵素である HK II は、骨格筋における糖取り込みにおいて重要な役割を担っている(Wasserman and Halseth 1998)。持久力との関係についてもよく検討されており、Fueger ら(2005)の先行研究では、腓腹筋の HK II タンパク含量が多いマウスにおいて、トレッドミル運動時における高い持久力を示すことが報告されている。この結果と一致して、本実験においても持久力と腓腹筋の HK II タンパク含量との間に有意な正の相関関係が認められた (図 3)。しかしながら一方で、テーパーリング群における腓腹筋の HK II 含量はトレーニング継続群と比較して有意に低い値を示したにも関わらず、両群間の持久力においては有意な差が認められなかった (図 1 および 2)。本研究では HK II タンパク含量と比較して、ミトコンドリアタンパク含量と持久力との間により強い相関関係が認められている (図 3)。持久力と関係するミトコンドリアタンパク含量の有意差が両群間に認められなかったため (図 2)、テーパーリング群における低い HK II タンパク含量が持久力に強く反映されなかった可能性が考えら

れる。

ミトコンドリアに含まれる電子伝達系はいくつかのサブユニットから構成されることが分かっており(McMillin and Pauly 1988)、本実験では異なるサブユニットのうちミトコンドリア複合体 I Ndufa9 サブユニットおよびミトコンドリア複合体 IV サブユニット IV それぞれのサブユニットのタンパク含量について解析を行った。実験の結果、脱トレーニング群ではトレーニング継続群と比較して両ミトコンドリアタンパク含量が有意に低い値を示した一方で、テーピング群における腓腹筋のミトコンドリアタンパク含量は、トレーニング継続および脱トレーニング両群と比較して有意な差が認められなかった(図 2)。この結果から、本実験で用いたテーピング手法では、脱トレーニングによる骨格筋のミトコンドリアタンパク含量の低下を抑えられる可能性が推察された。また先行研究における骨格筋 CYTOX 活性と持久力との関係と同様に(Neary 1992)、相関分析により持久力と腓腹筋のミトコンドリアタンパク含量との間に有意な正の相関関係が認められた(図 3)。

本研究は、トレーニングによる骨格筋の解糖系および電子伝達系の亢進が、テーピングによってどのような影響を受けるかを検討するため、トレーニングを負荷したマウスのみを用いて実験を行った。しかしながら本実験の結果、先行研究において示唆されたテーピングによるパフォーマンス向上効果は認められなかった(Bosquet 2007)。ヒトにおいては慢性的な障害および心理面に対する回復・改善効果などが作用していることが考えられるため、生理・生化学的な指標のみでは検討できない要因が多く含まれていた可能性が否定できない。実際に、Berger ら(1999)の研究では、テーピング期における Total Mood Disturbance (総合感情障害指標)がベースライン期およびオーバートレーニング期と比較して有意に低い値を示すことが報告されており、テーピングは心理面へ好ましい影響を及ぼすと考えられる。従って、テーピングによる持久力向上機序をより詳細に明らかとするためには、今後、ヒトを対象とした検討において、より包括的・多面的な研究が必要であると考えられる。

V. 結論

本実験では、Bosquet(2007)らの先行研究により効率的にパフォーマンスを向上させることが示唆された、トレーニング強度を維持したまま、2 週間のトレーニング時間を前半は著しく、後半はわずかに減少させ、全体のトレーニング時間を半減させるテーピング手法を用いて、骨格筋の解糖系および電子伝達系タンパク含量に及ぼす影響について検討を行った。実験の結果、本研究にて用いたテーピング手法では、トレーニングを継続した場合と比較して持久力の向上につながる可能性が推察された。また解糖系の律速酵素である HK II タンパク含量と、電子伝達系のタンパク含量は持久力との間に相関関係を示したものの、テーピングにより高い値を示す傾向は認められなかった。これらの結果は、Bosquet(2007)らにより報告されたテーピング手法によるパフォーマンスの向上が、持久力とこれらのタンパク含量の変化とは異なる要因により生じている可能性を示唆している。

VI. 謝辞

本研究に際しては、文部科学省科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)(平成 25 年度～平成 26 年度、研究代表者:樋口満、挑戦的萌芽研究、課題番号 25560342)の助成を受けた。

また本研究を実施するにあたり、修了生の諏佐大志氏にご協力頂いたことに感謝する。

VII. 引用・参考文献一覧

- BERGER BG, MOTL RW, BUTKI BD, MARTIN DT, WILKINSON JG & OWEN DR. 1999. Mood and cycling performance in response to three weeks of high-intensity, short-duration overtraining, and a two-week taper. *Sports Physiol*, 13, 444-457.
- BOSQUET, L., MONTPETIT, J., ARVISAIS, D. & MUJKA, I. 2007. Effects of tapering on performance: a meta-analysis. *Med Sci Sports Exerc*, 39, 1358-65.
- FUEGER, P. T., SHEARER, J., KRUEGER, T.

- M., POSEY, K. A., BRACY, D. P., HEIKKINEN, S., LAAKSO, M., ROTTMAN, J. N. & WASSERMAN, D. H. 2005. Hexokinase II protein content is a determinant of exercise endurance capacity in the mouse. *J Physiol*, 566, 533-41.
- KUBUKELI, Z. N., NOAKES, T. D. & DENNIS, S. C. 2002. Training techniques to improve endurance exercise performances. *Sports Med*, 32, 489-509.
 - MCMILLIN, J. B. & PAULY, D. F. 1988. Control of mitochondrial respiration in muscle. *Mol Cell Biochem*, 81, 121-9.
 - MUJKA, I., PADILLA, S., PYNE, D. & BUSSO, T. 2004. Physiological changes associated with the pre-event taper in athletes. *Sports Med*, 34, 891-927.
 - NEARY JP, MARTIN TP, REID DC, BURNHAM R, QUINNEY HA. 1992. The effects of a reduced exercise duration taper programme on performance and muscle enzymes of endurance cyclists. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 65, 30-6.
 - WAGNER, K. F., KATSCHINSKI, D. M., HASEGAWA, J., SCHUMACHER, D., MELLER, B., GEMBRUCH, U., SCHRAMM, U., JELKMANN, W., GASSMANN, M. & FANDREY, J. 2001. Chronic inborn erythrocytosis leads to cardiac dysfunction and premature death in mice overexpressing erythropoietin. *Blood*, 97, 536-42.
 - WASSERMAN, D. H. & HALSETH, A. E. 1998. An overview of muscle glucose uptake during exercise. Sites of regulation. *Adv Exp Med Biol*, 441, 1-16.