

# 博士論文

セッション間の回復時間の違いが  
レジスタンストレーニングの筋肥大効果に与える影響

The influence of recovery period between exercise sessions  
on the muscle-hypertrophic effect of resistance training

平成 29 年度  
東京大学大学院 総合文化研究科  
広域科学専攻 生命環境科学系 身体運動科学  
31-157706  
竹垣 淳也

## 目次

開示事項（倫理審査・利益相反・研究費助成）	4
略語一覧	5
序論	7
第1章：研究の背景	11
レジスタンス運動の基礎	12
レジスタンス運動に対する筋の同化応答	13
レジスタンス運動に対する筋の異化応答	18
レジスタンス運動と回復時間	25
レジスタンス運動における、回復時間の不足に伴うオーバートレーニング	28
第1章のまとめ	32
第2章：セッション間の回復時間の違いが長期的なレジスタンストレーニング効果に与える影響の検討	33
緒言	34
材料と方法	36
結果	43
考察	68
第3章：セッション間の回復時間の違いが短期的なレジスタンストレーニング効果に与える影響の検討	76
緒言	77
実験①：マウス骨格筋における、電気刺激によるレジスタンス運動効果の検証	79
緒言	79
材料と方法	80
結果	82
考察	84



実験②：セッション間の回復時間の違いが、筋タンパク質合成に与える影響の検討	86
緒言	86
材料と方法	88
結果	91
考察	103
実験③：セッション間の回復時間の違いが、筋タンパク質分解系に与える影響の検討	108
緒言	108
材料と方法	110
結果	113
考察	125
第3章のまとめ	130
第4章：統括論議	131
本研究で得られた知見のまとめ	132
長期的なトレーニングと短期的なトレーニングの間に生じる応答の差異	134
回復時間を短縮させた場合のレジスタンストレーニング応答の変化	139
回復時間を過剰に短縮させた場合のレジスタンス運動応答の変化	144
結語	151
引用文献	152
関連論文	162
謝辞	163

## 開示事項

### 動物実験に関する倫理審査

本研究のすべての実験は、東京大学および共同研究者の所属する日本体育大学の実験動物委員会の承認を得てから遂行された。

### 利益相反

本研究に関して、開示すべき利益相反事項はない。

### 研究費助成

本博士論文の第3章に関する研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金（特別研究員奨励費：17J05729）、及び公益財団法人 中富健康科学振興財団 平成 29 年度研究助成金を受けて行われた。

## 略語一覽

4E-BP1: 4E-binding protein 1

4-HNE: 4-hydroxy-2-nonenal

5' TOP: 5' end oligopyrimidine tract

AMPK: AMP-activated protein kinase

ACSM: American College of Sports Medicine

cDNA: complementary DNA

CHOP: C/EBP-homologous protein

CK: creatine kinase

DEPTOR: DEP domain containing mTOR-interacting protein

DNA: deoxyribonucleic acid

EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid

FBR: fractional breakdown rate

FoxO: Forkhead box O

FSR: fractional synthesis rate

GAP: GTPase-activating protein

GTP: guanosine triphosphate

IL: interleukin

LC3: Autophagy marker Light Chain 3

mTOR: mammalian / mechanistic target of rapamycin

MuRF-1: Muscle RING-Finger Protein-1

NF- $\kappa$ B: nuclear factor kappa B

NP40: Nonidet P-40

NSCA: National Strength and Conditioning Association

p70S6K: ribosomal protein S6 kinase beta-1

PA: phosphatidic acid

PBS: Phosphate-buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PI3K: phosphatidylinositol-3 kinase

PRAS40: protein-rich Akt substrate 40 kDa

PVDF: polyvinylidene difluoride

Raptor: regulatory-associated protein of mTOR

Rheb: Ras homolog enriched in brain

REDD1: DNA damage response 1

RM: repetition maximum

RNA: ribonucleic acid

rRNA: ribosomal RNA

rpS6: ribosomal protein S6

SDS: sodium dodecyl sulfate

TBS: Tris-buffered saline

TNF: tumor necrosis factor

TSC: tuberous sclerosis complex

ULK: UNC-51-like kinase

## 序論

骨格筋は生体の運動を司る器官であり、その量的・質的な変化は生体の運動能力を大きく左右する。日々レジスタンス運動をはじめとする様々なトレーニングを行い、高い身体活動量を有するスポーツ選手等では量・質ともに優れた骨格筋を有しており、高い運動能力を発揮する。一方で、サルコペニア（加齢に伴う筋量・筋機能の低下）に代表される骨格筋の萎縮は、運動能力の低下を引き起こす。さらに、身体的自立を奪う危険因子であるのみならず、骨格筋萎縮はインスリン抵抗性や心疾患リスクの増大なども引き起こすことから、本邦の高齢化社会における最重要課題となっている。これらのことから、アスリートのみならず一般人も骨格筋量を維持・向上することが求められている。

レジスタンス運動は、老若男女問わず簡便に実施可能な骨格筋肥大の手段である。レジスタンス運動の歴史は 100 年以上に登り、現在も数多くの新たな知見が蓄積され続けている。レジスタンス運動は今やアスリートに留まらず、個人レベルでも健康の保持・増進の手段として広く実施されている。近年、様々なレジスタンス運動プログラムが作成されており、その効果が示されているが、それらの多くにおいてはレジスタンス運動の容量・強度・セッション間の回復時間の増減によって効果が変化している。つまり、レジスタンス運動は、主に運動の容量・強度・回復時間によって効果が決定される。一方で、これらの要素を不適切に設定し、身体に過剰な負荷を課した場合には、オーバートレーニングに至り、様々な悪影響を呈する。従って、これら 3 要素に関する基礎的な知見を集積することが、より適切なレジスタンス運動プログラムを作成する上で重要であると考えられる。

上述したように、レジスタンス運動に関する研究は近年大きな進歩を遂げており、上記の 3 要素についても広く研究がなされてきた。特にレジスタンス運動の容量に関して、ヒトを対象とした先行研究では、70%1RM の膝伸展運動を、反復不可能となるまでの回数を 1 セット 行うよりも、3 セット行う方が、運動後の筋タンパク質合成率が高まることが示されている(16)。一方で、ラットを対象とした研究で、3 秒間・50 回の等尺性収縮によるレジスタンス運動を 1-20 セットまでの範

囲で単回実施した場合、5 セット以降では筋タンパク質合成の活性化が頭打ちとなることが明らかとなっている(102)。これらのことから、過剰な容量のレジスタンス運動は実施しても実質的な効果には至らず、不要な疲労状態を呈するのみであることが窺える。一方、レジスタンス運動の強度に関しても、多くの先行研究が報告されている。レジスタンス運動を実施する際の運動強度は、遠心性収縮、等尺性収縮、求心性収縮の順に高い。さらに、運動強度の異なるレジスタンストレーニングを実施した場合には、強度の増大に伴って高い効果が得られることが明らかとなっている(133)。一方で、運動強度の高い遠心性収縮を用いてレジスタンス運動を実施する場合においても、最大収縮の 50%強度で実施した場合には著明な変化は生じないが、100%強度で実施した場合には著明な発揮トルク減少の遷延や血清中 CK 活性の上昇といった、明らかな損傷反応を呈することが報告されている(99)。このように、レジスタンス運動強度に関しても、過剰に高く設定した場合に生じる影響に関する知見は多く集積されてきている。一方で、セッション間の回復時間の違いによる運動効果の変化や、過剰な短縮により生じる影響について示した報告はこれまでにない。

ACSM や NSCA などを始めとする著名なスポーツ科学・スポーツ医科学会の推奨するレジスタンス運動プロトコルでは、通常 2-3 日の回復時間を設けることが推奨されている(1)。トレーニングを習慣的に行っている者であっても、1 日程度は設けることが推奨されている。しかしながら、先行研究で比較されている 範囲は週 1 回-4 回程度であり、効果の向上が見られるか、という観点から検証されているものがほとんどである。このため、回復時間の短縮に伴ったレジスタンス運動効果の変化や、過剰に短縮した場合に生じる現象・メカニズムについては不明な点が多い。したがって、この点を解明することは臨床現場でのレジスタンス運動プログラム作成における一つの大きな障害を解消し、詳細なエビデンスに基づいた、安全かつ効果的なレジスタンス運動プログラム処方確立と普及につながると考えられる。

本博士論文では、安全かつ効果的なレジスタンス運動プログラム処方確立と普及を目指して、セッション間の回復時間の違いがレジスタンストレーニングにおける筋肥大効果に与える影響を明らかにすることを目的とし、その達成のために下記の4つの検討課題を設定した。

## **本論文の構成**

### 第1章

レジスタンス運動による骨格筋の適応について、これまでに得られている研究分野の知見を整理し概説した。

### 第2章

回復時間の違いによる長期的なレジスタンストレーニング効果の変化を検討し、回復時間に応じた運動効果の変化、及び過剰に短縮した場合に生じる骨格筋の適応を検証した。

### 第3章

回復時間の違いによる短期的なレジスタンストレーニング効果の変化を検討し、回復時間に応じた運動開始早期の筋の適応の変化、及び過剰な短縮により生じる骨格筋の適応変化のメカニズムを検証した。

### 第4章

本研究で得られた知見をまとめた。



# 第 1 章

## 研究の背景

## レジスタンス運動の基礎

レジスタンス運動とは、各種の抵抗負荷を用いて行う運動の総称であり、筋力増強を主な目的として用いられている。レジスタンス運動を繰り返し実施することにより得られる筋力増強効果は、筋の最大随意興奮レベルと筋の形態学的変化の両者に依存する。筋興奮レベルの増大は神経興奮性の改善によるもので、筋力発揮を繰り返し実施することによる学習効果であると考えられている(69)。特に、レジスタンストレーニング開始早期に生じる筋力増強効果は、この適応による貢献が大きい。しかしながら神経興奮性の改善は比較的早期にプラトーに達し、その後の筋力向上には筋の形態学的変化が重要となる。筋の形態学的変化は主に骨格筋肥大であり、運動に伴う筋への機械的負荷（力、仕事量、速度、短縮、伸長等）と内分泌系因子（成長ホルモン、インスリン、アナボリックホルモン、細胞増殖因子等）により誘導される。また、筋特異的転写調節因子による貢献もある。筋肥大は筋組織を構成する既存の筋線維の肥大と筋線維の増殖（筋線維数の増加）によって生じると考えられている。通常、筋力増強の貢献度としては既存の筋線維の肥大によるところが大きい(2)。

レジスタンス運動そのものによる筋肥大には、上述の2因子に依るところが主要であるが、一方で食事や栄養摂取等の補助的な介入も、レジスタンス運動による効果を促進するため、極めて重要となる。特に運動後のタンパク質摂取は同化応答促進に効果的であるとされ、レジスタンス運動直後にホエイプロテインに代表される高タンパク質の栄養を摂取することによる筋肥大促進効果は数多く報告されている(60, 136, 141)。また、一方でレジスタンス運動以外の身体活動の変化も、レジスタンス運動効果に大きな影響を及ぼし得る。例えば、レジスタンス運動を実施した後に持久性運動を実施すると、レジスタンス運動による同化応答が減弱され、筋肥大効果が低下する(105)。さらに、身体活動量なども大きく関連しており、筋を活動させない状態を長時間保つと、筋の異化応答が生じ、この場合も筋肥大効果が低減する(6)。以上のように、単にレジスタンス運動を実施するだけでなく、局所・全身双方において様々な因子を考慮し、包括的なアプローチを行うことが筋肥大効果を得るためには重要であると考えられる。

## レジスタンス運動に対する筋の同化応答

### レジスタンス運動に対する筋の同化応答に関わる分子メカニズム

これまでに、レジスタンス運動による筋の同化応答は、主に mTORC1 シグナルを介して行われると考えられてきた。mTORC1 は mTOR, raptor, mLst8, PRAS40, DEPTOR からなる分子複合体で (図 1-1)、成長因子や栄養因子、機械的刺激を始めとする様々な刺激を統合する節点となる存在であり、筋タンパク質合成のための下流シグナルを活性化させる(72)。タンパク質の翻訳過程は開始・伸長・終結を含む過程であり、mTORC1 はこれらのプロセスに対して影響を及ぼす。mTORC1 は直接的に、翻訳制御因子である 4E-BP1 と p70S6K をリン酸化し、タンパク質合成を活性化する(36) (図 1-2)。一般的な真核生物の翻訳は翻訳開始機構が mRNA 5'末端に存在するキャップ構造を認識することで開始される。4E-BP1 のリン酸化は、eIF-4E とのキャップ結合を抑制し、eIF-4E を eIF-4F へと迎合させ、複合体が形成される。これにより、キャップ依存的な翻訳が開始される。p70S6K のリン酸化は、40S リボソームサブユニットに含まれる S6 タンパク質をリン酸化し、mRNA の翻訳開始と伸長を導く(116)。p70S6K は元来、5'末端オリゴピリミジン配列 (5'TOP) によって特徴づけられる多様な mRNA サブクラス (5' TOP mRNAs) の翻訳制御と、大部分の翻訳装置の構成タンパクのエンコードを制御している。さらに、5' TOP 遺伝子ファミリーには翻訳開始・伸長に関与するタンパク質群やリボソームタンパク質が含まれており、グローバルな翻訳効率及び容量の増加に関与している。また、mTORC1 による p70S6K のリン酸化 (Thr389) は、IGF や機械的刺激等による mTORC1 活性化に呼応して増加するため、mTORC1 の活性の指標として広く用いられている。さらに、p70S6K は eIF4B や eEF2 キナーゼ等をリン酸化して翻訳効率を向上させたり、rRNA の転写因子である UBF のリン酸化を更新させることでリボソーム合成量を高めたりする。rpS6 は p70S6K によりリン酸化修飾 (Ser235/236, Ser240/244) を受け、p70S6K のリン酸化 (Thr389) と同様に mTORC1 活性化の指標として用いられる。しかしながら rpS6 そのものはタンパク質合成との正の関連性を示されたことはなく、それ自体の機能については未解明である。

## mTORC1 の上流に存在する制御因子

mTORC1 の上流に存在する制御因子は多岐に渡るが、それらの因子は主には成長因子、ストレス、エネルギー状態、酸素、アミノ酸の 5 つに統合される。さらに、mTORC1 の直接的な活性化因子はリソソーム上に存在する Rheb である。Rheb は低分子 GTPase の一種であり、GTP 結合型 Rheb が mTORC1 に結合することで mTORC1 の活性を高める。TSC1 と TSC2 は mTORC1 の上流に存在する重要な制御因子であり、GTP 結合型 Rheb を GTPase 活性により GDP 結合型 Rheb とし、GDP 結合型 Rheb は直接的に mTORC1 に作用することで、mTORC1 を負の方向へ制御する(62)。

インスリンや IGF1 などの成長因子は、PI3K や Ras 経路を活性化することにより、Akt や ERK1/2, p90RSK 等を通じて直接的に TSC1/TSC2 複合体をリン酸化し、不活化することによって mTORC1 を活性化させる(61, 82, 84, 114, 119)。さらに Akt は、TSC1/2 を介さず、PRAS40 をリン酸化し、raptor から分離させることによっても、mTOR を活性化させる(121, 134, 138, 140)。ロイシンやアルギニン等を中心とするアミノ酸も、成長因子と同様に、mTORC1 を活性化させる(11, 54)。しかしながら、その詳細な分子メカニズムは未だ明らかとなっていない。mTORC1 の直接的な活性化因子である Rheb はリソソーム上に存在しているため、mTORC1 を活性化させるためには mTORC1 をリソソーム膜状に局在させる必要がある。アミノ酸を添加された HEK293 細胞で mTORC1 がリソソーム上に移動すること、その移動にはリソソームに局在した Ragulator と結合した Ras 様低分子 GTPase (Rag) 分子群 (RagA/B および RagC/D) の複合体が関与すること、アミノ酸添加によって Rag 分子群が GTP 結合型になることで mTORC1 と結合し mTORC1 をリソソーム上に配置させることが明らかとなった。このことから、アミノ酸が mTORC1 の局在に関与していることが示された(8, 120)。

一方で、低エネルギー状態や低酸素状態、DNA 損傷などによって特徴づけられるような負のストレスも、TSC1/2 を介して mTORC1 に影響を及ぼすことが明らかとなっている。低酸素や低エネルギー状態によって活性化される AMPK は、TSC2 をリン酸化し、Rheb に対する GAP 活性を高める(62)。また、Akt のように、AMPK は mTORC1 に対して直接的に作用することも報告されている。

すなわち、AMPK は raptor をリン酸化し、14-3-3 タンパク結合と mTORC1 の構造変容を導く(51)。低酸素状態は、REDD1 の発現増加を引き起こし、TSC2 を活性化させる(15)。さらに、DNA 損傷も、様々なメカニズムを経て mTORC1 に作用する(15, 33, 117)。つまり、様々なシグナルが TSC1/2 を介して、mTORC1 を制御するのである。

レジスタンス運動に伴う mTORC1 シグナルの活性化に、筋収縮そのものによる機械的刺激が大きく関与していることは明らかである。機械的刺激による mTORC1 の活性化についての分子メカニズムには、成長因子やアミノ酸と異なるメカニズムによって mTORC1 を活性化すると考えられている。その詳細なメカニズムは不明であるが、いくつかの研究によって、フォスファチジン酸 (PA) が関与している可能性が示唆されている。PA は細胞膜の成分であり、最も単純なジアシルグリセロールリン酸である。PA は筋収縮によって Akt 非依存的に増加し、mTORC1 の FRB ドメインに結合することで mTORC1 の活性化を促す。この PA が、様々な形式の機械的刺激に寄って細胞内濃度が増加すること(24, 58, 101)、機械的刺激のように、PA によっても PI3K 非依存的な mTORC1 の活性化が生じること(101)、PA の合成を阻害する 1-ブタノールによって、機械的刺激による PA の増加と mTORC1 の活性化が抑制されること(58, 101)が明らかとなっており、これらの報告から、機械的刺激による PA の新生が、mTORC1 の活性化に重要であることが示唆されている。しかしながら、その詳細なメカニズムについては、今後さらなる検討が必要であろう (図 1-2)。

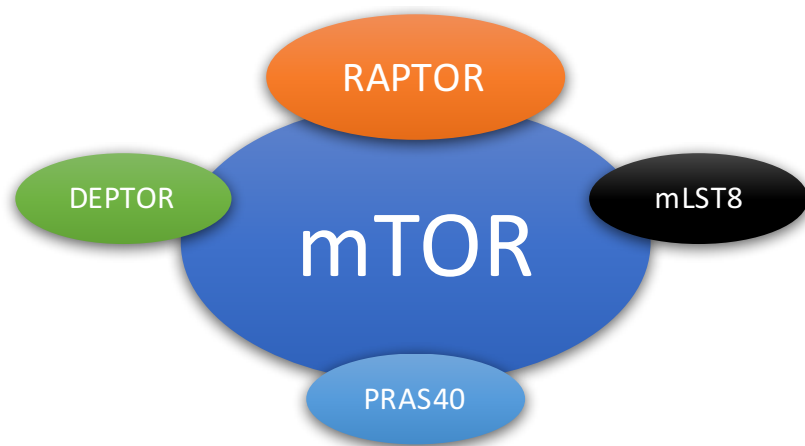


図1-1. mTOR complex 1の概略図

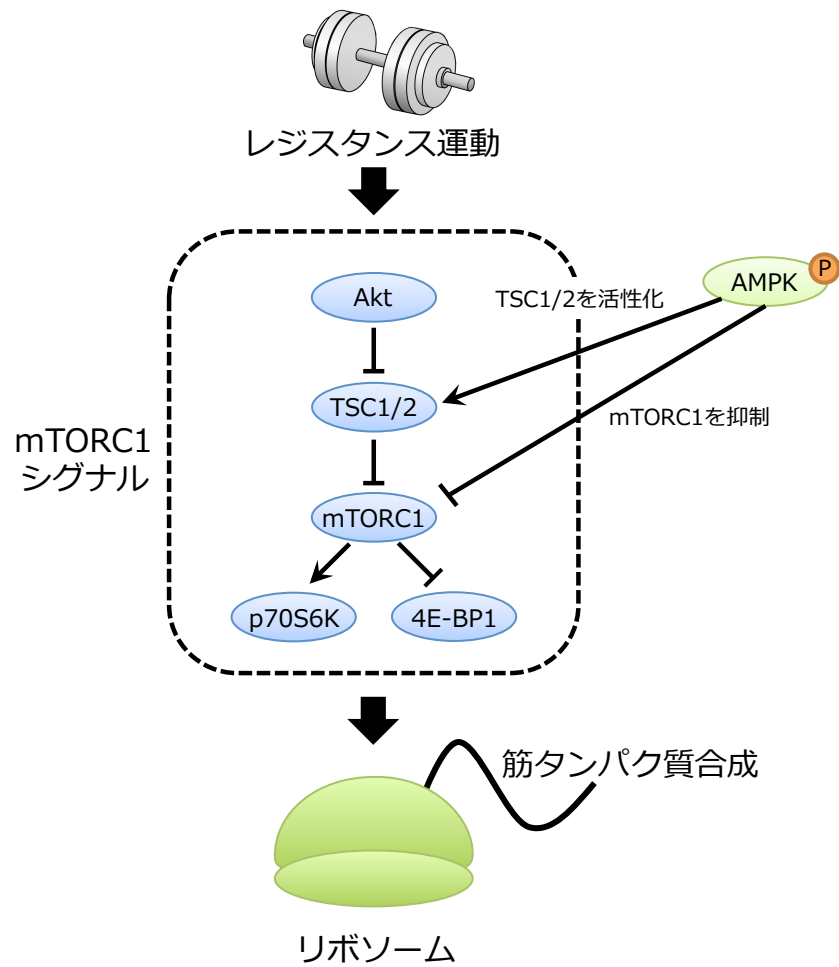


図1-2. レジスタンス運動によるmTORC1シグナルの活性化と筋タンパク質合成

## レジスタンス運動による筋の異化応答

### レジスタンス運動による筋の異化応答に関わる分子メカニズム

先述の通り、レジスタンス運動は機械的刺激による mTORC1 の活性化を導き、筋タンパク質合成を増加させる。一方で、レジスタンス運動は筋タンパク質分解も増加させる(111) (図 1-3)。しかしながら、十分な栄養素が存在する場合、運動後には筋タンパク質の合成と分解のネットバランスが合成へと傾くため、骨格筋肥大が惹起される。本項目では、骨格筋におけるタンパク質分解を担う主要な系である、ユビキチン・プロテアソーム系と、オートファジー・リソソーム系について概説することとする。



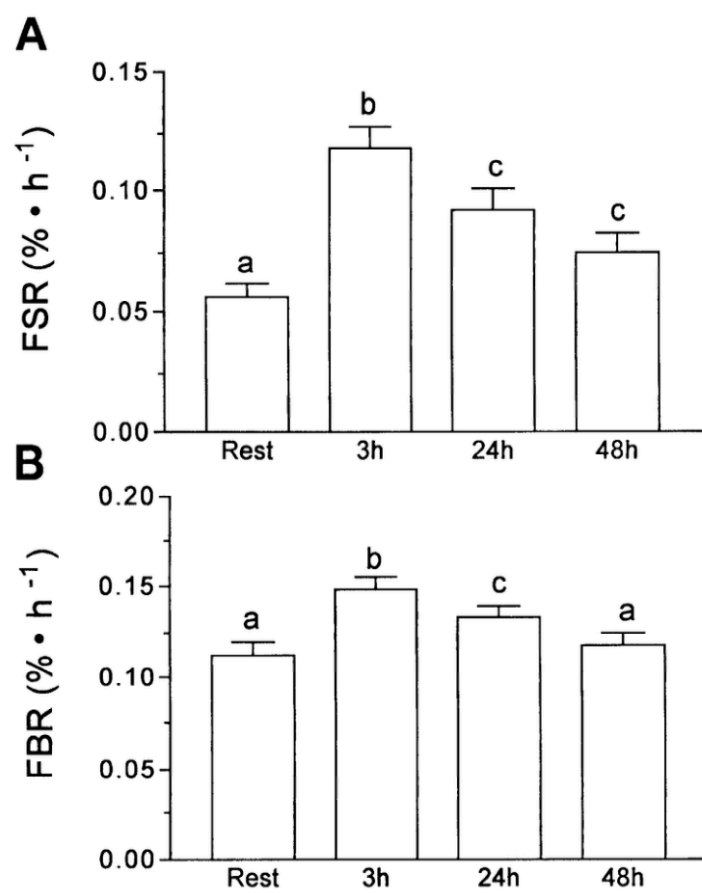


図1-3. 単回のレジスタンス運動後の筋タンパク質合成・分解の推移  
A : 筋タンパク質合成速度, B : 筋タンパク質分解速度。  
Phillips et al., Am J Physiol Endocrinol Metab, 1997より引用。

#### ユビキチン・プロテアソーム系 (図 1-4)

ユビキチン・プロテアソーム系では、不要となったタンパク質に対してユビキチン分子鎖が共有結合する (ユビキチン化) ことで標的化され、26S プロテアソームによる分解が行われる。タンパク質のユビキチン付加反応は、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) によって行われる(87)。まず、ユビキチンは ATP のエネルギーを利用して C 末端のグリシン残基がアデニル化され、ユビキチン活性化酵素のシステイン残基とチオエステル結合し活性型ユビキチンを形成する。次に、活性型ユビキチンはユビキチン結合酵素のシステイン残基とチオエステル結合し、ユビキチンリガーゼを介して基質タンパク質のリジン残基に対してイソペプチド結合する (ユビキチン化)。さらに、基質と結合したユビキチンの 48 番目のリジンに別のユビキチンがイソペプチド結合し、この反応が繰り返され、ユビキチン鎖が形成される。このユビキチン鎖は分解シグナルとなって、26S プロテアソームによって認識され、基質タンパク質が ATP 依存的に迅速に分解される。なお、一度タンパク質がユビキチン化されると、脱ユビキチン化酵素によりユビキチン鎖が消去されない限りは、プロテアソームにドッキングされ、分解される(123)。

Atrogin-1 / MAFbx と MuRF-1 は、最初に同定された E3 ユビキチンリガーゼであり、ユビキチン・プロテアソーム系の指標として広く用いられている。これら 2 つのユビキチンリガーゼは、横紋筋と平滑筋特異的に発現している(9, 14, 46)。さらに、Atrogin-1 と MuRF-1 をノックアウトしたマウスでは、脱神経による骨格筋萎縮に抵抗性が生じること(14)、MuRF-1 ノックアウトマウスでも、デキサメタゾンによる筋萎縮に対して抵抗性が生じることが明らかとなっている(7)。また、Atrogin-1 をノックアウトした動物で、絶食による筋萎縮が軽減することも報告されている(27)。これまでに、MuRF-1 はトロポニン I やミオシン重鎖、アクチン、ミオシン結合タンパク質 C、ミオシン軽鎖 1、ミオシン軽鎖 2 などの、骨格筋の構造タンパク質をユビキチン化することが報告されている(23, 26, 38, 67, 113)。一方で、Atrogin-1 の基質は、主に成長関連プロセスや生存経路で同定されている。Atrogin-1 により筋の鍵転写因子である MyoD や、タンパク質合成の重要な活性化因

子である eIF3-f の分解が促進されることが報告されている(29, 135)。しかしながら、最近の研究で、それそのものがユビキチン化へとつながるかは証明されていないものの、Atrogin-1 が転写因子や翻訳装置の構成要素、解糖・糖新生に関連する因子やミトコンドリアのタンパク質だけでなく、ミオシンやデスミン、ビメンチンといった筋原線維タンパク質とも相互作用することが報告されている(80)。以上のように、Atrogin-1 と MuRF-1 は、レジスタンス運動による骨格筋量の増加や筋力増強効果にオーバートレーニングがどのような影響を及ぼすかを調べる上で、ユビキチン・プロテアソーム系の中でも特に着目すべき因子といえよう。

#### ユビキチン・プロテアソーム系の上流因子

Atrogin-1 と MuRF-1 の上方制御は通常、Akt によって、転写因子である FoxO ファミリーへの負の制御によって阻害される(73, 124, 132)。FoxO はフォークヘッド型の転写因子であり、骨格筋の FoxO ファミリーには、FoxO1・FoxO3・FoxO4 の 3 種のアイソフォームが存在する。Akt は FoxO をリン酸化し、FoxO の核から細胞質への移動を促す。FoxO による Atrogin-1 と MuRF-1 の上方制御には、FoxO の核内への移行と活性が必要である。また、FoxO3 は、骨格筋内での遺伝子導入を用いた研究により、Atrogin-1 の発現を促進させ、筋萎縮を惹起させることが明らかとなっている(124)。また、FoxO1 を過剰発現させる遺伝子改変マウスは著明な筋量減少と筋線維萎縮を示すことから、FoxO により筋量減少が促進されるという考えが支持されている(63)。一方で、RNAi を用いた FoxO 発現のノックダウンにより、筋萎縮中の Atrogin-1 発現の上方制御を阻害し、筋量減少が抑制されることが示されている(78, 124)。すなわち、筋タンパク質合成と分解のクロストークは、Akt のみではなく、FoxO も関与する。そして、筋タンパク質分解活性化状態において Akt が抑制されているが、FoxO が誘導されているときには、タンパク質合成はさらに抑制される。これは FoxO 活性がリン酸化やアセチル化、モノユビキチン化、ポリユビキチン化を含む異なる翻訳後修飾によって制御されているためである(59)。このように、ユビキチン・プロテアソーム系を解する筋タンパク質分解には、FoxO が極めて重要な制御因子として作用していることが明らかであり、オーバートレーニングに伴う筋タンパク質代謝を解明するにあたって、追求すべき点であると言える。

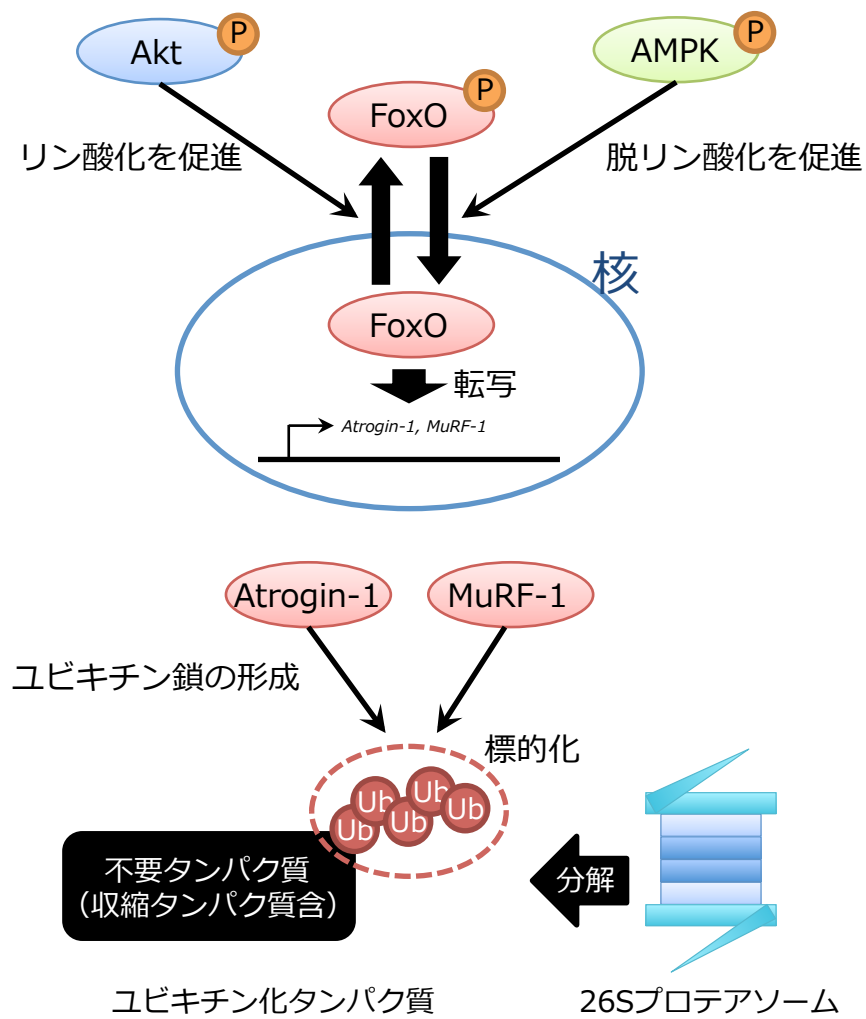


図1-4. ユビキチン・プロテアソーム系の概略図

## オートファジー・リソソーム系 (図 1-5)

オートファジーは、様々な生物・細胞に存在する主要なタンパク質分解経路の一つである(50, 92)。オートファジーは、飢餓時のアミノ酸供給および不良タンパク質や長命タンパク質の除去に貢献する。他のタンパク質分解系と比較して、より多くのアミノ酸を得ることができることが特徴である。オートファジーでは、オートファゴソームと呼ばれる二重膜によって細胞内のタンパク質が包括されたオルガネラが形成され、これにリソソームが結合し、リソソーム内のタンパク質分解酵素によってタンパク質が分解される。オートファジーは持久性運動やレジスタンス運動によっても生理的に誘導されることから(44, 77)、オーバートレーニングに伴う筋タンパク質代謝を解明するためにも、明らかにしなければならない要因であろう。

オートファジーは、①誘導と隔離膜形成、②伸長とオートファゴソーム形成、③リソソームとの融合、④分解と再生のプロセスに大分される(50)。まず①誘導と隔離膜形成の段階では、栄養飢餓や低酸素状態、酸化ストレス、感染、DNA 損傷などを始めとする様々な刺激に晒された際に、扁平な隔離膜が形成される。この際に、クラス III PI3 K/ Vps34, Atg6/Beclin1, Atg14, Vps15/p150 による複合体と、Atg/ULK1 を含む複合体が、形成開始に関与する。次に、②伸長とオートファゴソーム形成段階へと移行する。まず、隔離膜の伸長は、LC3-II と Atg5-Atg12-Atg16L 複合体が制御する。LC3 は、proLC3 として合成された後、直ちに C 末端 22 残基が Atg4B により切断され、LC3-I となる。細胞質の可用性タンパク質である LC3-I の C 末端に、Atg7 と Atg3 が触媒するユビキチン様修飾によりリン脂質ホスファチジルエタノールアミン (PE) が共有結合して LC3-II となり、オートファゴソーム膜に局在化する。さらに、LC3-II の発現量はオートファゴソームの数と相関し、比較的簡便に観察可能であることから、オートファゴソーム形成の生化学的定量に用いられることが多い(91)。さらに、③リソソームとの融合の過程へ移行する。オートファゴソーム形成が完了すると、外膜へ付着した LC3-II は Atg4 によって PE から隔離され、細胞質へと戻される。さらに、リソソーム膜に存在する LAMP2, Rab7, によって、融合が行われ、最終的に④分解と再生へと移行する。融合後、リソソームの液胞酸加水分解酵素と、プロテイナーゼ A, B などにより、嚢胞内

の分解が行われる。分解により生じたアミノ酸などの小分子は、細胞質へ戻され、タンパク質合成や飢餓状態における細胞機能の調整などに用いられる(56)。

レジスタンス運動におけるオートファジー適応を考える上で、特に関連性が高いと考えられるプロセスは、オートファゴソーム形成段階と考えられる。ULK1 はオートファゴソーム形成の制御過程における最上流に位置する因子であり、Atg13 及び FIP200 と複合体を形成することでオートファジーを正に制御する。この ULK1 に関して、AMPK によってリン酸化 (Ser555) され、活性化すること(85)、逆に mTORC1 によって別のサイト (Ser757) がリン酸化され、不活性化することが明らかとなっている(22)。従って、回復時間の変化に伴うオートファジーの適応を検討する際には、これらの因子に着目して解析を行うことが肝要となろう。

### 選択的オートファジー

元来、オートファジーは、ユビキチン・プロテアソーム系と対照的に、非選択的なタンパク質分解機構とされてきた。しかし近年、ミトコンドリアなどの特定の細胞小器官や細菌、ポリユビキチン化タンパク質の凝集体などが選択的にオートファジーによって分解されていることが明らかとなってきた。これらは、非選択的に行われるオートファジーに対して、選択的オートファジーと呼ばれる。オートファジーの過程で形成されたオートファゴソームには、選択性がない。従って、選択的に分解される物質とオートファゴソームをつなぐアダプタータンパク質が必要となる。p62/SQSTM1 は主要なアダプタータンパク質の一つであり、主にユビキチン鎖と結合する。先述の通り、骨格筋内の収縮タンパク質は、ユビキチン・プロテアソーム系による分解の対象であり、ポリユビキチン鎖が形成されることが多い。従って、p62 を介した選択的オートファジーにより、収縮タンパク質の分解が行われる可能性が考えられる。よって、本研究においても、検討すべき点であろう。

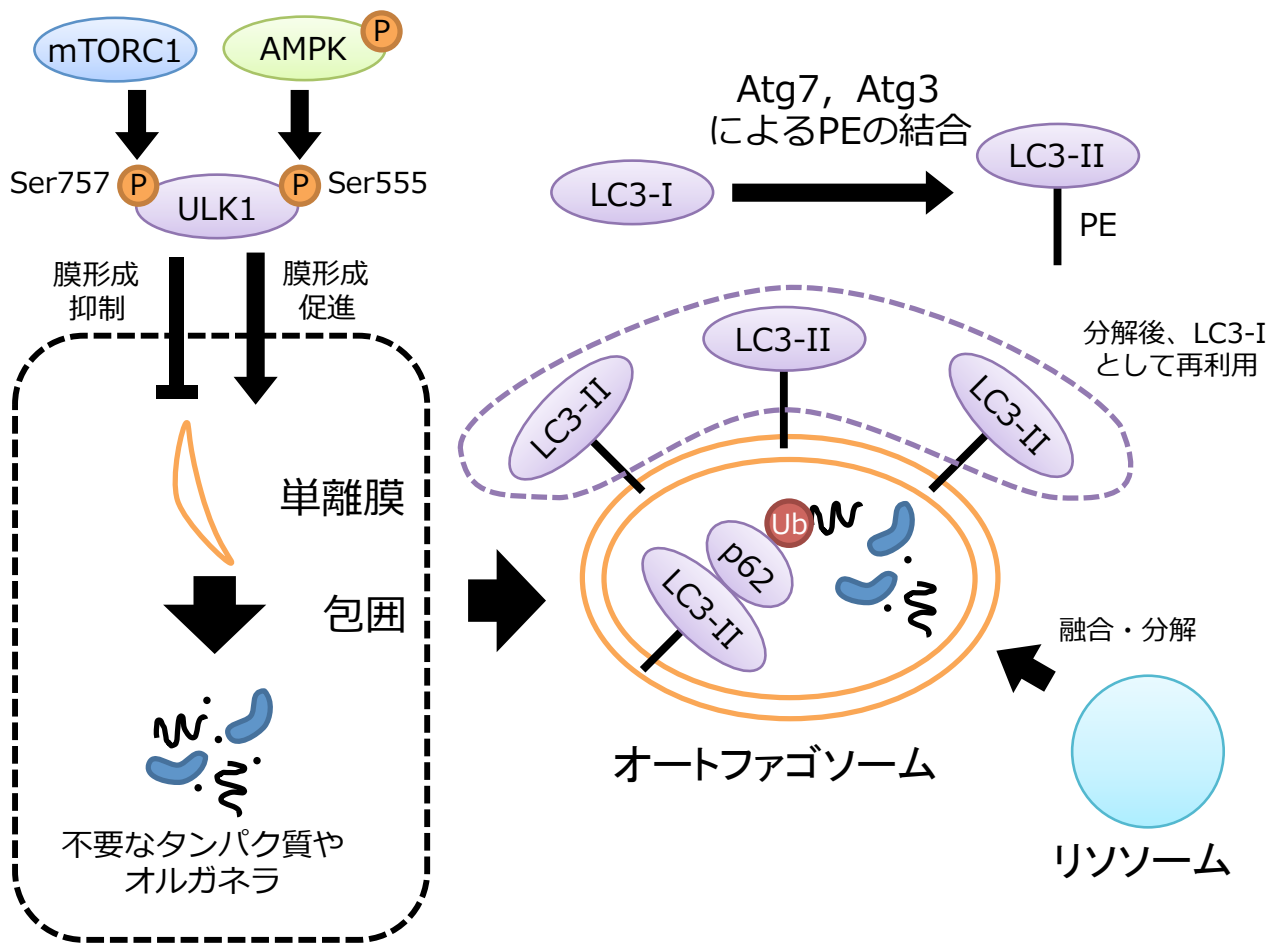


図1-5. オートファジーの概略図

## レジスタンス運動と回復時間

骨格筋肥大や発揮筋力の増大といった、主要なレジスタンス運動による主要な効果の程度は、レジスタンス運動の容量・強度・回復時間（実施頻度）によって決定されると考えられている(1)。通常、骨格筋肥大を惹起させるのであれば、週に 2-3 セッションのレジスタンス運動を行うことが推奨されている。実際に多くのレジスタンス運動に関する先行研究において、この回復時間が用いられており、さらに筋肥大効果も得られている(30, 57, 68)。一方で、少なくとも、週 4 日までの実施であれば、回復時間を短縮させたとしても、最大発揮トルクの増大効果が僅かに減少するものの、筋力増強効果にはほとんど影響が生じないことが報告されている。例えば、レジスタンス運動を週 2 回行った場合と週 3 回行った場合を比較すると、何れの回復時間（実施頻度）でも筋力増大が同程度生じることが、若年者・老年者双方で報告されている(21, 95)。さらに、レジスタンス運動を週 1 回行った場合と週 2 回行った場合を比較しても、その筋力増大の程度に違いがないことが、若年女性と老年者で示されている(17, 34)。一方で、レジスタンス運動を週 1 回行った場合と 3 回行った場合を比較すると、週 3 回行った場合の方が筋力増大の程度が強いことが報告されている(89)。しかしながら、週 2 回、3 回、4 回を比較した場合に、筋力増大応答に違いがなかったことを報告する先行研究も存在する(127)。このように、レジスタンストレーニングの効果と実施頻度との間の関係は、統一した見解が得られていない（表 1-1）。加えて、これらの先行研究では週あたりの実施回数を調整しているのみであり、厳密に回復時間のみを変化させた検討は行われておらず、筋タンパク質代謝や、合成系・分解系シグナルに及ぼす影響なども明らかとなっていない。



表 1-1. 実施頻度と運動効果のまとめ

比較内容	対象者	結果	文献
週1回 vs 週2回	若年女性	筋力増大応答に差なし	Burt et al., 2007
週1回 vs 週2回	老年者	筋力増大応答に差なし	Difranco-Donoghue et al., 2007
週2回 vs 週3回	若年男性	筋力増大応答に差なし	Carroll et al., 1998
週2回 vs 週3回	老年者	筋力増大応答に差なし	Murlasits et al., 2012
週1回 vs 週3回	若年男性	週3回の方が筋力増大の程度が高い	McLester et al., 2000
週2回 vs 週3回 vs 週4回	中年男性	筋力増大応答に差なし	Serra et al., 2015

## レジスタンス運動における、回復時間の不足に伴うオーバートレーニング

オーバートレーニングは元来、持久性の運動及びトレーニングによって発生するものが中心的に研究されてきた（図 1-6）。しかしながら先行研究で示されているように、その解釈には慢性的なオーバーワーク，身体的な過度な訓練，オーバートレーニング症候群，バーンアウト，過度な疲労，慢性的な疲労症候群，適応の失敗など、様々な意味合いを含んで用いられていた(40)。この中でも特にオーバートレーニング症候群が中心的に研究されており、その主要な徴候としてテストステロンの減少，コルチゾールレベルの上昇，交感神経緊張の低下，交感神経性ストレス応答の増加，CK の増加などがあげられる。1990 年代頃からレジスタンス運動に関するオーバートレーニングの報告もなされはじめた。こちらについてもオーバートレーニングの定義は曖昧であるが、共通して有する性質として、運動により生じた疲労に対する不十分な回復がある。また、持久性運動によるオーバートレーニングの研究を参考に行われてきたことから、その報告には上述のオーバートレーニング症候群に準ずるものが多い。例えば、高強度のレジスタンス運動を週 6 回繰り返した場合、週 1 回の場合と比較して 1RM が減少し、さらにトレーニング後の血中エピネフリン濃度やノルエピネフリン濃度が増加することが報告されている(42)。また、同様の介入によって 1RM の減少が生じたものの、血中のテストステロンやコルチゾール、成長ホルモンなどは著明な影響を受けないということも報告されている(41)。さらに別の研究で、レジスタンス運動を毎日実施した場合、週 2 回繰り返した場合と比較して 1RM が減少すること、交感神経活性が上昇するが、 $\beta 2$  アドレナリン受容体の密度が減少することが報告されている(43)。これらの先行研究は何れもヒト生体を対象としたものであるが、結果として持久性運動によるオーバートレーニングとはやや異なる応答が得られることが示された。

2000 年台に入り、実験動物を対象とした、レジスタンス運動によるオーバートレーニングに関する研究報告がなされた。Coffey らは、ラットを用いて 3 時間毎にレジスタンス運動を 4 回繰り返した場合に、p70S6K のリン酸化レベル（Thr389）は上昇するが、同時に炎症応答（IKK のリン酸化・TNF- $\alpha$  の発現増加）などが生じることを報告した(25)。さらに Souza らは、ラットに週 5 日

(連続実施)，12 週間，負荷漸増的にレジスタンス運動を実施した場合に、筋線維横断面積が減少すること、筋内の Atrogin-1 の発現量が増加すること、IGF-I の発現量が減少すること、MyoD や Myogenin などの分化や再生に関与する因子の発現量が減少することを報告している(131)。これらのことから、レジスタンス運動におけるオーバートレーニングは、少なくとも筋タンパク質分解系を活性化させ、運動効果を阻害している可能性が考えられる。一方で、これらの先行研究においては mTORC1 シグナルを中心とする筋タンパク質合成系については詳細な検討が行われていない。加えて、分解系についてはユビキチン・プロテアソーム系に関する解析が行われているのみであり、オートファジーに関する適応は明らかとなっていない。従って、筋タンパク質合成・分解の双方について、詳細に検討を行う必要があると考えられる。

一方で、これらの先行研究では、純粋なレジスタンス運動としての適応が阻害される可能性の考えられる運動プロトコルが採用されている。Coffey らの報告では、ラットを通電可能な板状に乗せ、足底部に通電し、痛み刺激からの逃避行動（跳躍）を取らせることで、スクワット運動を実施させている(25, 71)。しかしながらこの先行研究において用いられたモデルでは、レジスタンス運動を 1 セッション行っただとしても mTORC1 シグナルの活性化が得られていないなど、セッション当たりの運動強度・容量が不十分であると考えられる。さらに Souza らの報告では、ラットに重錘を負荷して水槽へ入れ、2 足起立時の身長以上の水深の水を入れることで、溺没からの逃避行動（跳躍）を取らせることでスクワット運動を実施させている(131)。この運動方法では跳躍して頭部が水槽外へ出ている間しか呼吸ができず、全身性の低酸素状態などが生じ、それに対する適応が複合して生じている可能性が考えられる。これらのことから、純粋なレジスタンス運動のみによる適応とは少々乖離する可能性があるため、これらの報告の解釈の上で留意しなければならない（図 1-7）。

最近、新たなオーバートレーニングに関する報告がなされた。Nicoll らは、ヒト生体において、高強度のレジスタンス運動（70%1RM×10 回×5 セット）を 1 日 2 回 7.5 日行うことで、最大発揮筋力が低下するが、それが 1 週間で回復すること、ERK・JNK の総タンパク質の発現量が増加することを報告した(98)。さらに、同じ報告内で、レジスタンス運動（100%1RM×1 回×10 セット）を 1 日

1 回 2 週間行うことで、ERK (Thr202/Tyr204) と JNK (Thr183/Tyr185, Thr221/, Tyr223) のリン酸化型タンパク質発現量が増加することを示した。これらのことから、オーバートレーニングは MAPK シグナルに対しても変化を与える可能性が示唆される。しかしながらこの報告内では、群間の運動条件に乖離が大きいことを留意すべきであろう。

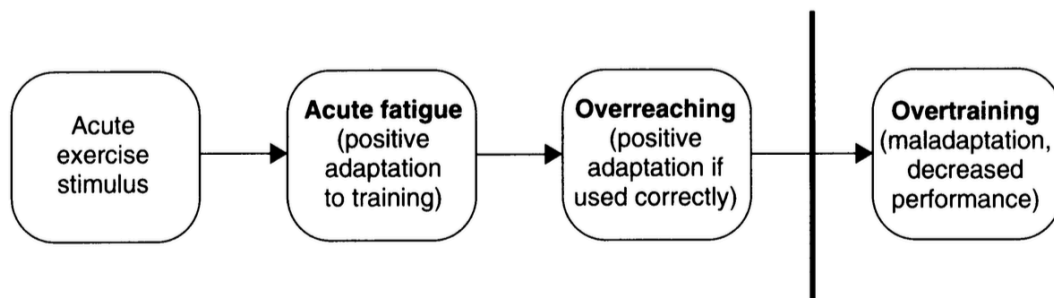


図1-6. オーバートレーニングに至る過程

急性的な運動刺激→急性的な疲労状態→オーバーリーチング→オーバートレーニング。  
Fry et al., *Sports Med*, 1997より引用。

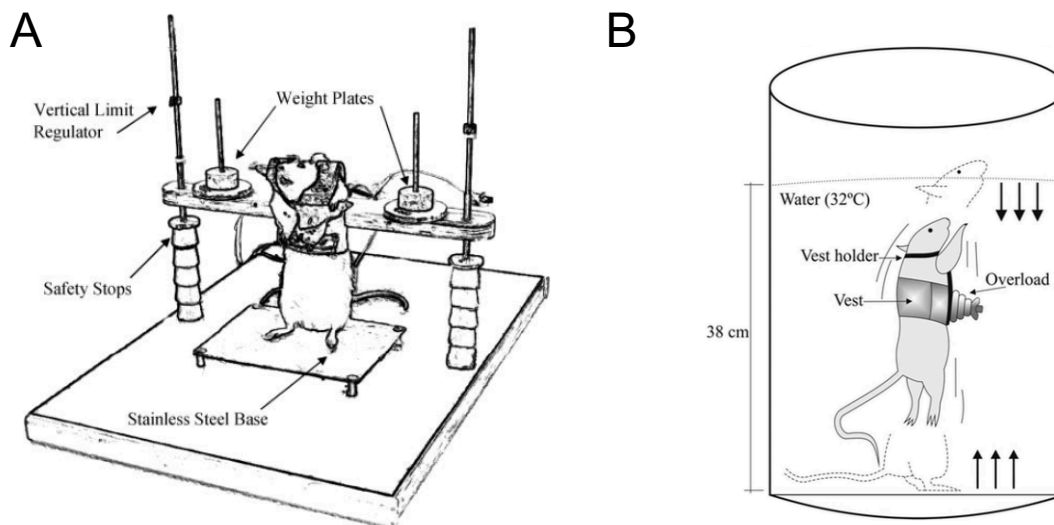


図1-7. 実験動物を用いた先行研究のレジスタンス運動モデル

実験動物を対象としたレジスタンス運動におけるオーバートレーニング研究において用いられたレジスタンス運動モデル。A : Coffey et al., 2007において用いられたモデル。B : Souza et al., 2014において用いられたモデル。

Krisan et al., *J. Appl Physiol*, 2004; Souza et al., *J Strength Cond Res*, 2014より引用。

## 第1章のまとめ

第1章の前半では、骨格筋タンパク質代謝に関する基礎的理解や、レジスタンス運動により生じるそれらの変化について、これまでに得られている知見について整理し概説した。さらに第1章の後半では、レジスタンス運動を実施する上で、回復時間の変化が及ぼす影響について、これまでに得られている知見を整理し概説した。レジスタンス運動は今やアスリートのみならず、一般人の間でも健康の保持増進等を目的として広く用いられているが、主要な効果決定因子の一つである回復時間の違いによる運動効果の変化については、未解明な点が多い。そこで、レジスタンス運動における回復時間の違いによる運動効果の変化や、回復時間の過剰な短縮に伴うオーバートレーニングによる適応変化やそのメカニズムを明らかにすれば、より根拠に基づいたレジスタンス運動処方が可能となると考えられる。

## 第2章

セッション間の回復時間の違いが  
長期的なレジスタンストレーニング効果に  
与える影響の検討

## 緒言

前述したように、ACSMをはじめとする著名なスポーツ医科学会では、レジスタンス運動を繰り返す際の回復時間は 2-3 日設けることが推奨されている。しかしながら、セッション間の回復時間、若しくはレジスタンス運動の実施頻度に対するトレーニング効果の変化を検討した先行研究では、発揮張力の変化は確認されているものの、骨格筋肥大効果及びそれに関連する分子生物学的な検討などはほとんど行われていない。

これまでに実施されてきたレジスタンス運動に関する研究はヒトを対象としたものがほとんどである。一方で、回復時間の不足により生じる影響については現在報告されている根拠が乏しく、身体に不可逆的な障害等を残す可能性が存在する。従って、医学的・倫理的観点から、ヒトを対象として研究を実施する場合、不可逆的な障害を生じる可能性のある範囲まで回復時間を短縮することが困難であった。この点が、セッション間の回復時間の違いが運動効果に及ぼす影響が十分に解明されていない主要因であると考えられる。このような課題を解決し、将来的な回復時間と運動効果についての研究発展を導くため、本研究では近年開発された、実験動物を用いたレジスタンス運動モデルを採用した。

実験動物を用いたレジスタンス運動モデルでは、経皮的な電気刺激を用いて他動的に筋を収縮させることにより、運動を実施する。これにより、ヒトがレジスタンス運動を実施した場合と異なり、心理的な要因を排除して試験を行うことができる。加えて、遺伝的背景による運動に対する応答差の排除が可能であり、更に高い再現性を持たせることができる。従って、実験動物を用いたレジスタンス運動モデルを採用することにより、ヒトを対象とした場合のオーバートレーニングに関与する倫理的問題を解決できる点に加えて、回復時間のみを変化させるという基礎的な知見を生み出す本研究において、より統制を有した試験を可能とさせる、等といったメリットを有すると考えられる。

本研究では、これまでに電気刺激による筋収縮を用いたレジスタンストレーニングにおいて、筋肥大が生じることが示されている Sprague-Dawley ラットを対象に実験を行った。72 時間（通常の



回復時間)、24 時間 (短い回復時間)、8 時間 (過剰に短い回復時間) の 3 種の回復時間を設定し、一般的な回復時間を設けた場合に十分な骨格筋肥大を誘導する回数のレジスタンス運動において、回復時間を短縮させることにより、骨格筋量や発揮トルク等のダイナミックな変化、さらにそれらに対して寄与し得る因子の変化にどのような影響が生じるかを検討した。

## 材料と方法

### 実験動物

本実験は、10-16 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラット（日本クレア，東京，日本）を用いた。全てのラットは、12 時間の明暗サイクル（明期：6:00-18:00，暗期：18:00-6:00）に管理された飼育室において飼育した。餌と水はそれぞれ自由摂取とした。

### 実験プロトコル

ラットを無作為に、レジスタンス運動を 72 時間毎に行う群（72H 群），24 時間毎に行う群（24H 群），8 時間毎に行う群（8H 群）に分類した。72H 群は 10 週齢時、24H 群は 14 週齢時、8H 群は 16 週齢時にそれぞれレジスタンス運動を開始させ、全ての動物に 18 セッションのレジスタンス運動を実施させた（72H 群・24H 群は 8:00-12:00，8H 群は 8:00-12:00，16:00-20:00，24:00-4:00 に運動実施）。最終の運動セッションによるシグナルの変化を抑える各群最終のレジスタンス運動（17 週齢時で統一）から 48 時間後（通常、運動により生じる mTORC1 シグナルの変化が基礎状態へ戻っている時間）に、摂餌によるシグナル変化を抑制するため、一晩絶食させた上でイソフルラン吸入麻酔薬の投与下で心臓からの放血により屠殺した。解析に用いるサンプルとして、両腓腹筋内側頭と血清を採取し、即座に液体窒素で凍結した後、-80°Cで保管した。

### 筋収縮方法

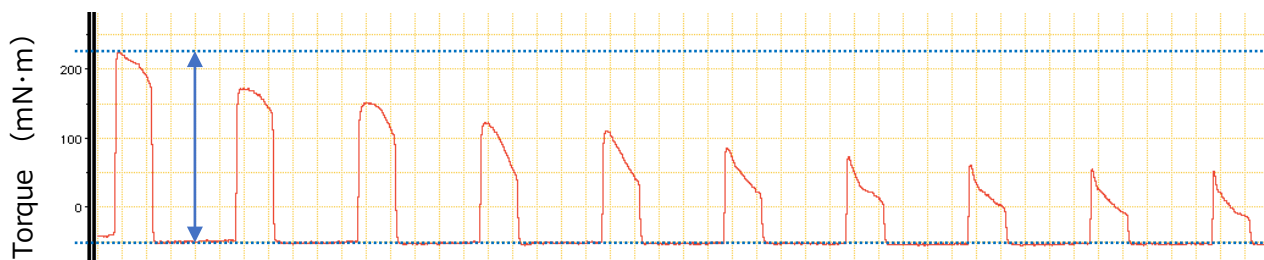
骨格筋の収縮は先行研究(103)に基づき、電気刺激により惹起した。イソフルランの吸入投与による麻酔下にて、各ラットの右脚下腿部を剃毛し、アルコール綿で拭いた。その後、ラットを伏臥位で右脚をプレートに足関節角度 90°で固定し、表面電極（ビトロード V，日本光電，日本）を腓腹筋内側頭筋腹部と踵部に貼付し、電気刺激装置（SEN-3301，日本光電，日本）とアイソレータ（SS-104J，日本光電，日本）に接続した。

## レジスタンス運動プロトコル

ラットの右腓腹筋に対して、電気刺激にて等尺性筋収縮を誘発した。先行研究に基づき(103)、全ての運動セッションにおいて、電気刺激による筋収縮を、3 秒間 10 回を 1 セットとし、3 分間の休息を設けて 5 セット実施した。電気刺激は 100 Hz、4 ms の矩形波（先行研究(103)と同様）を用いて実施した。なお、先行研究において、本プロトコルを用いて週 3 回・12 回の運動を行うことにより、約 10 %の筋肥大が生じることが報告されている。

## 最大発揮トルク・力積

先行研究を参考に(130)、各セッションにおける最大等尺性底屈トルク及び力積を測定した（図 2-1）。トルク信号は 16 ビットのアナログ/デジタル変換器（Power Lab/16SP, AD Instruments, オーストラリア）を用いてサンプリング周波数 2000Hz にて連続的に測定し、Power Lab Chart 5（AD Instruments）ソフトウェアにて解析を行った。



**図2-1. 最大発揮トルクの測定**

最大発揮トルクの測定方法。各セッションの初回セットにおいて、最も高いトルク値から基線のトルク値を引くことで算出する。

## 免疫組織学的観察

解析対象の腓腹筋サンプルの凍結切片を室温で 2 %パラホルムアルデヒドで 15 分間固定した。固定後、切片を室温で 5 %ヤギ血清, 1 % (v/v) Triton X-100 を含む PBS 中で 1 時間ブロッキングした。その後、Laminin 一次抗体 (L8271, シグマアルドリッチジャパン, 日本) を用いて 4°Cにて一

晩反応させた。二次抗体は室温で 1 時間反応させた。蛍光顕微鏡を用いて撮影した後、Image J (NIH, Bethesda, MD) より、筋 1 サンプル当たり無作為に 300 線維以上の面積を測定した。

### 細胞成分分画

細胞質と核の分画は、Dimauro らのプロトコルを参考に実施した(35)。まず、筋サンプルを、STM buffer [250 mM sucrose, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>]内で、テンプロック型ホモジナイザーを用いて氷上でホモジナイズし、30 分間静置した。その後、800 g で 15 分間、4°Cにて遠心分離した。回収した上清をさらに 800 g で 10 分間、4°Cにて遠心分離し、得られた上清をさらに 11,000 g で 10 分間、4°Cにて遠心分離した。回収した上清を 100 %アセトンと混合し、-20°Cにて 1 時間インキュベートした後、12,000 g で 5 分間、4°Cにて遠心分離した。その後、上清を捨て、得られたペレットを再び STM buffer で溶解させ、細胞質分画とした。一方、初めの遠心で得られたペレットは、再び STM buffer にて懸濁し、15 秒間ボルテックスした。その後、500 g で 15 分間、4°Cにて遠心分離した。得られたペレットは STM buffer で再懸濁し、再び 15 秒間ボルテックスした後、1,000 g で 15 分間、4°Cにて遠心分離した。これにより得られたペレットを NET buffer [20 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 M NaCl, 0.2 mM EDTA, 20 % glycerol, 1% Triton-X-100]にて懸濁し、15 秒間ボルテックスした。さらに氷上で 30 分間静置した後、19 G の注射針を 5 回往復させ、10 秒間の超音波破碎を行い、9,000 g で 30 分間、4°Cにて遠心分離した。これにより得られた上清を、細胞核分画とした。なお、両分画の純度は、ウエスタンブロッティングによる GAPDH 及び Histon H3 の検出により評価した。

### ウエスタンブロッティング

筋サンプルを、プロテアーゼ阻害剤とホスファターゼ阻害剤を含む RIPA buffer [100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 % NP40, 0.1 % SDS, 0.1 % sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl (Thermo Fisher Scientific, アメリカ) により氷上でホモジナイズした。その後、10,000 g で 10 分間、4°Cにて遠心分離し、上清を回収した。RC DC Protein Assay (Bio-rad, アメリカ) キットを用いて Lowry

法によりタンパク質濃度を測定した後、3× Blue Loading Buffer (CST ジャパン, 日本) と混合し、95°C で 5 分間煮沸した。7.5-15% SDS-polyacrylamide gel を用いて 20μg のタンパク質を電気泳動 (100 V, 75 分) によって分離し、PVDF メンブレンに転写した (100 V, 60 分)。転写した PVDF メンブレンは、5 % スキムミルクを含む TBS-T でブロッキング後、4°C で一次抗体を一晩反応させた。使用した一次抗体は、表 2-1 に示す。一次抗体反応後、TBS-T で 5 分間、3 回洗浄した。その後、室温で二次抗体を 1 時間反応させ、Clarity Western ECL Substrate (Bio-rad, アメリカ) により化学発光させ、スキャナー (Chemi Doc, Bio-rad, アメリカ) で撮影し、バンドを視覚化した。タンパク質の定量は Quantity One (Ver. 4.5.2, Windows, Bio-rad, アメリカ) を用いて行った。

#### 定量的リアルタイム PCR

筋サンプルから、TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific, アメリカ) を用いて全 RNA を抽出した。抽出後、Nano Drop 1000 (Thermo Fisher Scientific, アメリカ) を用いて全 RNA の濃度を測定し、各個体につき 1,500 ng の全 RNA を、High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, アメリカ) を用いて cDNA へと逆転写した。リアルタイム PCR は、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡, 日本) と Mini Option Real-Time PCR System (Bio-rad, アメリカ) を用いて実施した。使用したプライマーは、表 2-2 に示す。

#### リボソーム RNA 量の解析

筋サンプルから、TRIzol reagent を用いて全 RNA を抽出し、筋 1 mg 当たり 2 μL の TE で溶解した。溶解後、5μL の全 RNA 溶液と 1μL の 100 % グリセロール、1μL の GR Red Loading Buffer (Biocraft, 東京, 日本) を混合させ、TAE バッファー中で 1 % アガロースゲルにより分離した。その後、紫外線照射により発光させ、スキャナー (Chemi Doc, Bio-rad, アメリカ) で撮影した。バンドの定量は、Quantity One (Ver. 4.5.2, Windows, Bio-rad, アメリカ) を用いて行った。

## 統計処理

全てのデータは、平均値±標準誤差で示した。なお、任意単位は 72H 群の対照側を 1 として示した。体重・血中 CK 活性については、一元配置分散分析と Bonferroni の多重比較検定を行った。体重・血中 CK 活性以外のデータについては、レジスタンス運動（有り無し）×回復時間の二元配置分散分析を行った。回復時間による主効果または交互作用が認められた場合は、Bonferroni の多重比較検定を行った。有意水準は  $P < 0.05$  とした。全ての統計処理は、SPSS（IBM，日本）を用いた。

表 2-1. 一次抗体リスト

標的タンパク質	メーカー	型番	希釈
p-Akt <sup>Ser473</sup>	Cell Signaling Technology	#9271	1:1000
Akt	Cell Signaling Technology	#4685	1:1000
p-TSC2 <sup>Ser1387</sup>	Cell Signaling Technology	#5584	1:1000
TSC2	Cell Signaling Technology	#4308	1:1000
p-p70S6K <sup>Thr389</sup>	Cell Signaling Technology	#9205	1:1000
p70S6K	Cell Signaling Technology	#2708	1:1000
p-rpS6 <sup>Ser240/244</sup>	Cell Signaling Technology	#2215	1:1000
rpS6	Cell Signaling Technology	#2217	1:1000
p-4E-BP1 <sup>Thr37/46</sup>	Cell Signaling Technology	#9459	1:1000
4E-BP1	Cell Signaling Technology	#9452	1:1000
p-FoxO1 <sup>Ser256</sup>	Cell Signaling Technology	#84192	1:1000
FoxO1	Cell Signaling Technology	#2880	1:1000
p-FoxO3a <sup>Ser253</sup>	Cell Signaling Technology	#9466	1:1000
FoxO3a	Cell Signaling Technology	#2497	1:1000
NF- $\kappa$ B	Cell Signaling Technology	#8242	1:1000
Ubiquitin	Cell Signaling Technology	#3933	1:1000
p-ULK1 <sup>Ser757</sup>	Cell Signaling Technology	#14202	1:1000
p-ULK1 <sup>Ser555</sup>	Cell Signaling Technology	#5869	1:1000
ULK1	Cell Signaling Technology	#8054	1:1000
p62 / SQSTM1	Medical & Biological Laboratory	PM045	1:1000
LC3	Cell Signaling Technology	#2775	1:1000
REDD1	Proteintech	10638-1-AP	1:1000
p-AMPK <sup>Thr172</sup>	Cell Signaling Technology	#2531	1:1000
AMPK	Cell Signaling Technology	#2532	1:1000
4-HNE	Abcam	ab48506	1:1000

表 2-2. プライマーリスト

標的mRNA	Forward	Reverse
Atrogin-1 / MAFbx	TGAGCGACCTCAGCAGTTAC	TTCTCTTCTTGGCTGCGACG
MuRF-1 / Trim63	AGTGTCCATGTCTGGAGGTCGTTT	ACTGGAGCACTCCTGCTTGTAGAT
GAPDH	GTGAAGGTCGGTGTGAACG	ATTTGATGTTAGTGGGGTCTCG



## 結果

### 最大発揮トルク・力積

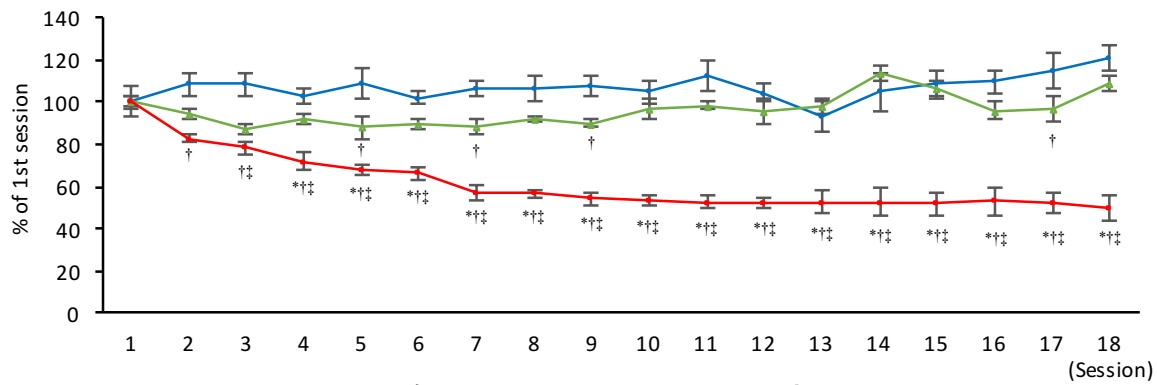
#### 最大発揮トルク (図 2-2)

各セッションにおける最大発揮トルクは、72H 群・24H 群ではセッションの経過に伴う緩徐な増加傾向を示したが、8H 群は開始早期から減少傾向を示し、4 セッション目以降、1 セッション目と比較して有意な低値を示した。また、1 セッション目と 18 セッション目における最大発揮トルクにおいて、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、72H 群と 24H 群の 18 セッション目は、1 セッション目よりも有意に高い値を示した。また、8H 群の 18 セッション目の最大発揮トルクは、72H 群・24H 群よりも有意に低い値を示した。

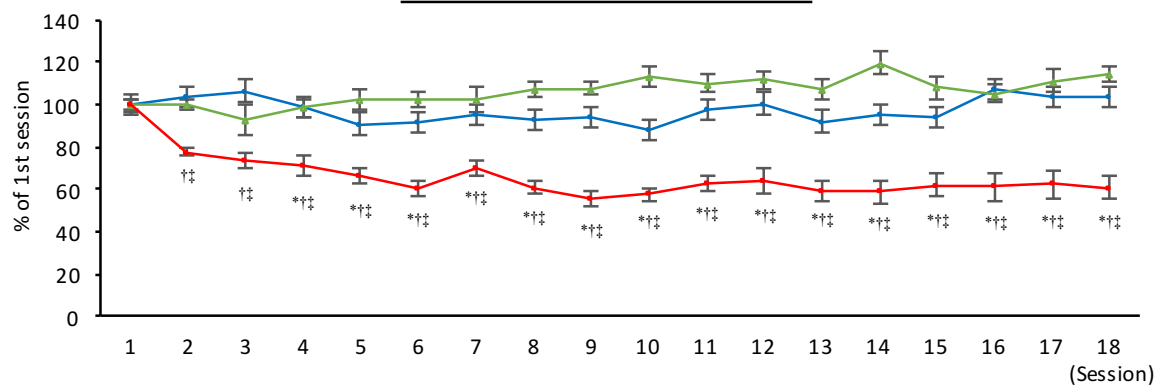
#### 力積 (図 2-2)

各セッションにおける力積は、72H 群・24H 群では有意な変化は認められなかったが、8H 群では開始早期から減少傾向を示し、4 セッション目以降、1 セッション目と比較して有意な低値を示した。また、1 セッション目と 18 セッション目における力積において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、8H 群の 18 セッション目は 1 セッション目よりも有意に低い値を示し、さらに 72H 群・24H 群よりも有意に低い値を示した。

## A 各セッションの最大発揮トルク

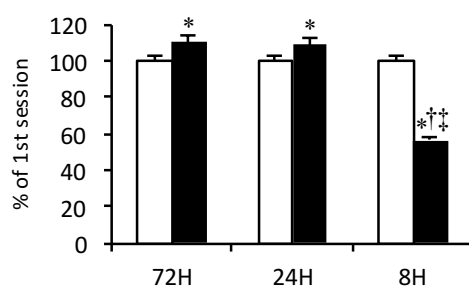


## B 各セッションの力積

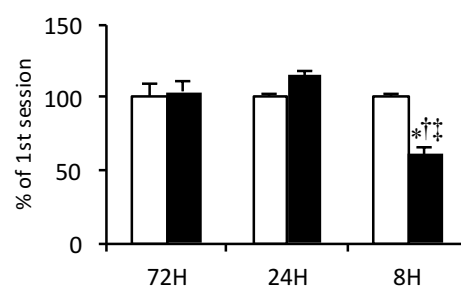


—○— 72H  
—△— 24H  
—□— 8H

## C 最大発揮トルク



## D 力積



□ Session 1  
■ Session 18

図2-2. セッション毎の最大発揮トルク・力積の変化

A: 各セッションの最大発揮トルク, B: 各セッションの力積, C: 初回・最終セッションの最大発揮トルク, D: 初回・最終セッションの力積。データは平均値±標準誤差で示している。

\* $P < 0.05$  Session 1との有意差。† $P < 0.05$  同セッションの72H群との有意差。‡ $P < 0.05$  同セッションの24H群との有意差。

## 体重・筋湿重量・筋線維横断面積

### 体重（図 2-3）

18 セッション終了後の体重は、3 群間で有意な差は認められなかった。

### 筋湿重量（図 2-3）

体重（g）当たりの筋湿重量（mg）の相対重量比において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、72H 群と 24H 群では対照側と比較して運動側で有意に高い値を示した。

### 筋線維横断面積（図 2-3）

筋線維横断面積において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、72H 群と 24H 群では対照側と比較して運動側で有意に高い値を示した。さらに、8H 群の運動側は、72H 群・24H 群の運動側よりも有意に低い値を示した。

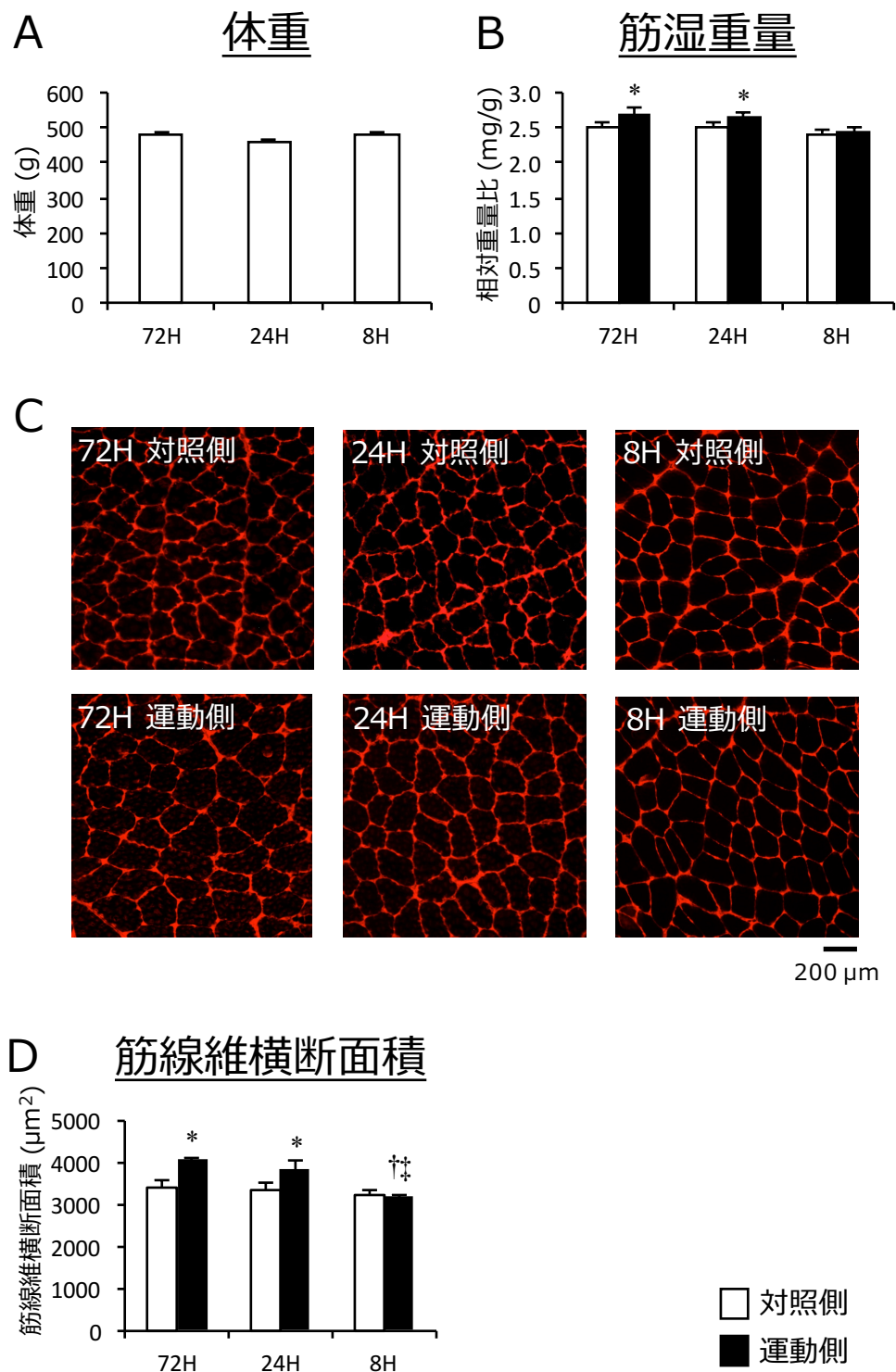


図2-3. 体重・筋湿重量・筋線維横断面積の変化

A : 体重, B : 筋湿重量, C : 抗Laminin免疫染色画像, D : 筋線維横断面積。データは平均値±標準誤差で示している。\*P < 0.05 対照側との有意差。†P < 0.05 同側の72H群との有意差。‡P < 0.05 同側の24H群との有意差。

## ユビキチン・プロテアソーム系

回復時間の短縮に伴う筋肥大効果の変化に対して、筋タンパク質分解系が関与する可能性が考えられる。従って、主要な筋タンパク質分解系の一つであるユビキチン・プロテアソーム系について検討を行った。

### ユビキチン化タンパク質 (図 2-4)

ユビキチン化タンパク質の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、全ての群で対照側と比較して運動側で有意に高い値を示した。また、8H 群の運動側は、72H 群と比較して有意に高い値を示した。

### Atrogin-1 (図 2-4)

Atrogin-1 の mRNA 発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、8H 群において対照側と比較して運動側で有意に高い値を示した。また、8H 群の対照側は、72H 群と比較して有意に低い値を示した。さらに、24H 群の運動側は、72H 群と比較して有意に低い値を示した。8H 群の運動側は、72H 群・24H 群と比較して有意に高い値を示した。

### MuRF-1 (図 2-4)

MuRF-1 の mRNA 発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、24H 群において対照側と比較して運動側で有意に低い値を示した。8H 群において、対照側と比較して運動側で有意に高い値を示した。また、8H 群の運動側は、72H 群・24H 群と比較して有意に高い値を示した。

### FoxO1 (図 2-5)

FoxO1 のリン酸化型タンパク質 (Ser256) の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、全ての群で対照側と比較して運動側で有意に高い値を示した。また、8H 群の運動側は、72H 群・24H 群と比較して有意に高い値を示した。FoxO1 の総タンパク質の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。一方で、レジスタンス運動による負の主効果が認められた。FoxO1 のリン酸化型タンパク質・総タンパク質比において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。一方で、レジスタンス運動による正の主効果が認められた。

#### FoxO3a (図 2-6)

FoxO3a のリン酸化型タンパク質 (Ser253) の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。また、レジスタンス運動や回復時間による主効果も認められなかった。FoxO3a の総タンパク質の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、8H 群において、対照側と比較して運動側で有意に高い値を示した。また、8H 群の運動側は、72H 群・24H 群と比較して有意に高い値を示した。FoxO3a のリン酸化型タンパク質・総タンパク質比において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。一方で、レジスタンス運動による負の主効果が認められた。

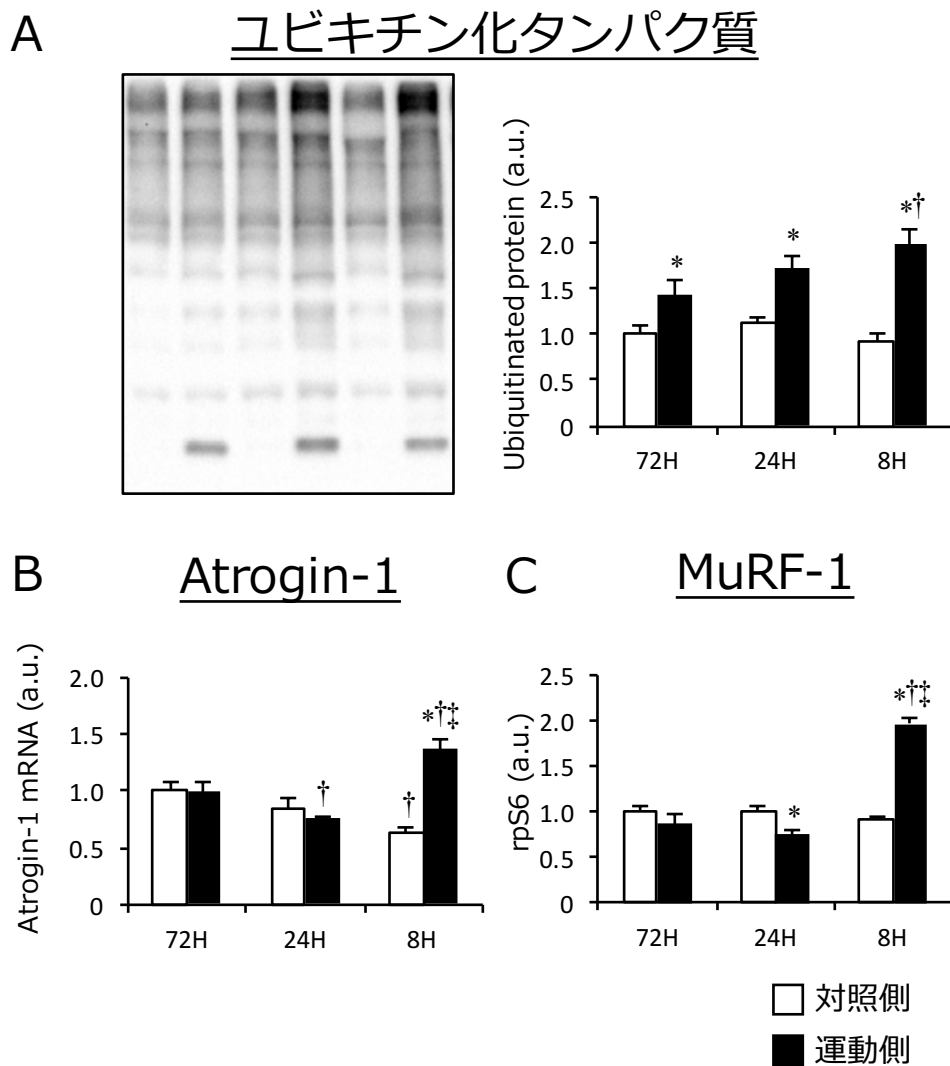


図2-4. ユビキチン・プロテアソーム系 (1/3)

A : ユビキチン化タンパク質発現量, B : Atrogin-1 mRNA発現量, C : MuRF-1 mRNA発現量。  
データは平均値±標準誤差で示している。\* $P < 0.05$  対照側との有意差。† $P < 0.05$  同側の72H群との有意差。‡ $P < 0.05$  同側の24H群との有意差。

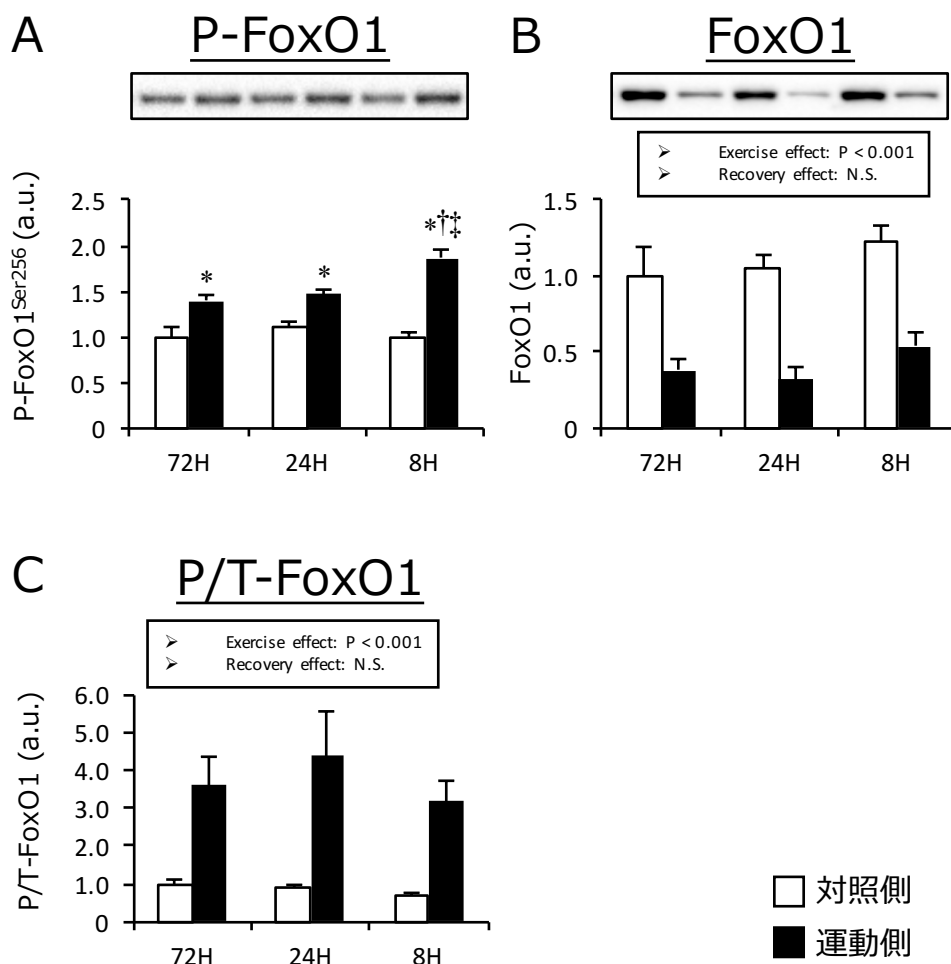


図2-5. ユビキチン・プロテアソーム系 (2/3)

A : FoxO1のリン酸化型タンパク質発現量, B : FoxO1の総タンパク質発現量, C : FoxO1のリン酸化率。データは平均値±標準誤差で示している。\*P < 0.05 対照側との有意差。†P < 0.05 同側の72H群との有意差。‡P < 0.05 同側の24H群との有意差。



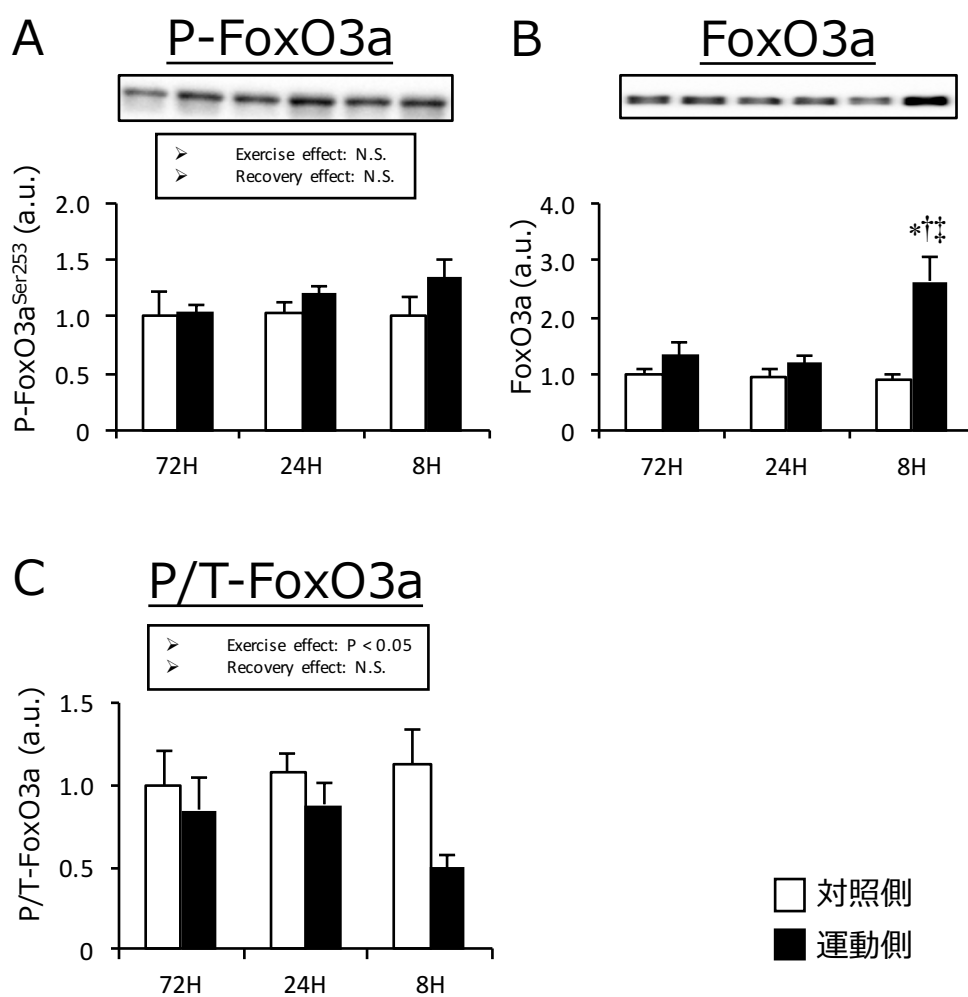


図2-6. ユビキチン・プロテアソーム系 (3/3)

A : FoxO1のリン酸化型タンパク質発現量, B : FoxO1の総タンパク質発現量, C : FoxO1のリン酸化率。データは平均値±標準誤差で示している。\* $P < 0.05$  対照側との有意差。† $P < 0.05$  同側の72H群との有意差。‡ $P < 0.05$  同側の24H群との有意差。

## 転写因子の核内移行

回復時間の短縮に伴い、主要な筋タンパク質分解系の一つであるユビキチン・プロテアソーム系に対して変化が生じていることが示された。従って、より詳細なメカニズムの解明を目指して、ユビキチンリガーゼの転写を促す転写因子の核内移行について検討した。

### FoxO1 (図 2-7)

FoxO1 の細胞質内の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。一方で、レジスタンス運動による負の主効果と回復時間の短縮による主効果が認められた。多重比較の結果、72H 群に対して 24H 群が有意に低値を示した。FoxO1 の核内発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。一方で、レジスタンス運動による負の主効果が認められた。

### FoxO3a (図 2-7)

FoxO3a の細胞質内の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。一方で、回復時間による主効果が認められた。多重比較の結果、24H 群に対して 8H 群が有意に高値を示した。FoxO3a の核内の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。一方で、回復時間による主効果が認められた。多重比較の結果、72H 群に比較して 24H 群が有意に高値を示した。さらに、24H 群に比較して 8H 群が有意に低値を示した。

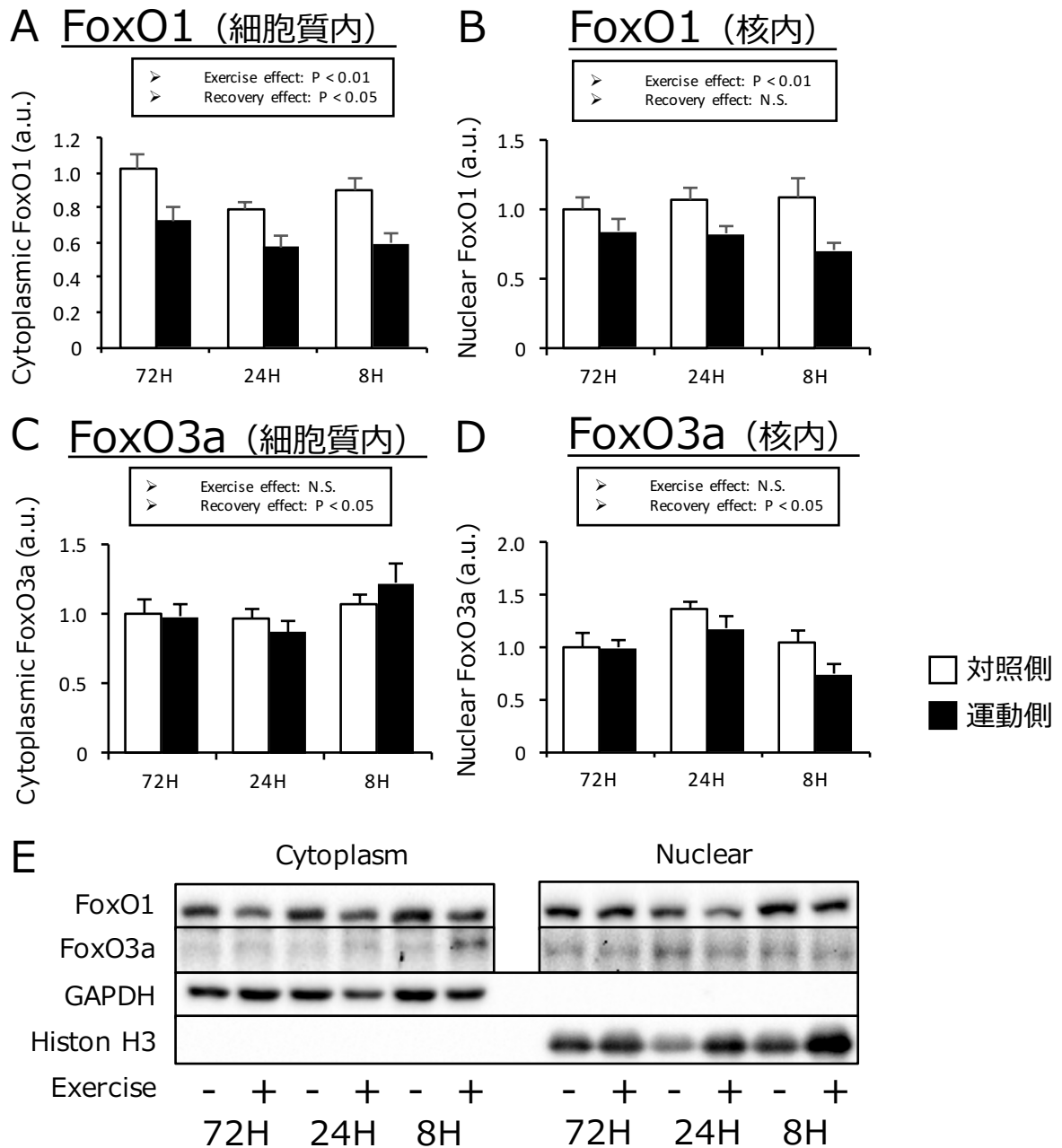


図2-7. 転写因子の核内移行

A : 細胞質内のFoxO1タンパク質発現量, B : 核内のFoxO1タンパク質発現量, C : 細胞質内のFoxO3aタンパク質発現量, D : 核内のFoxO3aタンパク質発現量, E : 細胞質内のNF- $\kappa$ Bタンパク質発現量, F : 核内のNF- $\kappa$ Bタンパク質発現量, G : 各バンド。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示している。 $*P < 0.05$  対照側との有意差。 $\dagger P < 0.05$  同側の72H群との有意差。 $\ddagger P < 0.05$  同側の24H群との有意差。

## オートファジー

回復時間の短縮に伴う筋肥大効果の変化に対して、筋タンパク質分解系が関与する可能性が考えられる。従って、主要な筋タンパク質分解系の一つであるオートファジーについて検討を行った。

### LC3 (図 2-8)

LC3-I の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、24H 群と 8H 群の運動側において、対照側と比較して有意に高い値を示した。さらに、8H 群の運動側は、72H 群・24H 群よりも有意に高い値を示した。LC3-II の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、24H 群と 8H 群の運動側において、対照側と比較して有意に高い値を示した。さらに、8H 群の運動側は、72H 群・24H 群よりも有意に高い値を示した。

### p62 / SQSTM (図 2-8)

p62 / SQSTM の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、24H 群と 8H 群の運動側において、対照側と比較して有意に高い値を示した。さらに、24H 群の運動側は、72H 群と比較して有意に高い値を示した。さらに、8H 群の運動側は、72H 群・24H 群よりも有意に高い値を示した。

### ULK1 (図 2-9)

ULK1 のリン酸化型タンパク質 (Ser757) の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、24H 群と 8H 群の運動側において、対照側と比較して有意に高い値を示した。さらに、24H 群の運動側は、72H 群よりも有意に高い値を示した。また、8H 群の運動側は、72H 群・24H 群よりも有意に高い値を示した。ULK1 の別のリン酸化型タンパク質 (Ser555) の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重

比較の結果、すべての群の運動側において、対照側と比較して有意に高い値を示した。さらに、8H 群の運動側は、72H 群・24H 群よりも有意に高い値を示した。ULK1 の総タンパク質の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、8H 群の運動側において、対照側と比較して有意に高い値を示した。さらに、8H 群の運動側は、72H 群・24H 群よりも有意に高い値を示した。

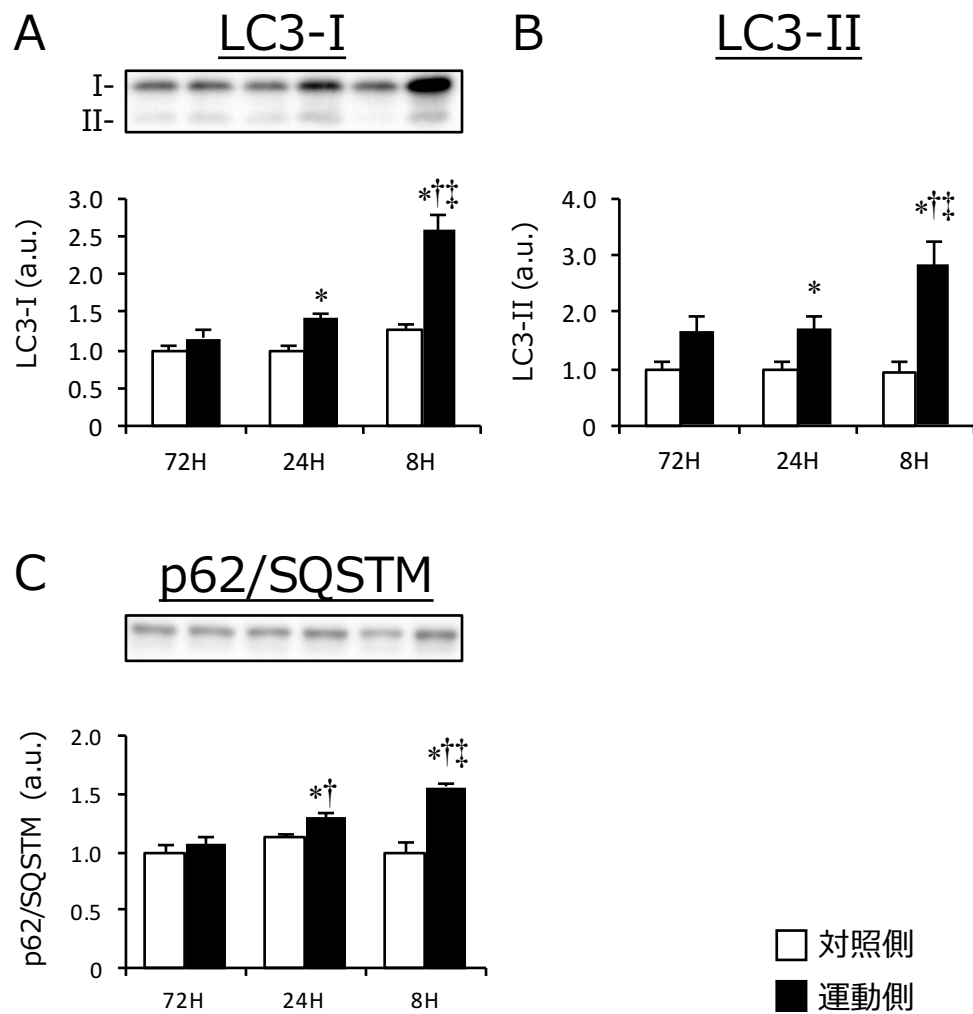


図2-8. オートファジー (1/2)

A : LC3-Iのタンパク質発現量, B : LC3-IIのタンパク質発現量, C : p62/SQSTMの総タンパク質発現量。データは平均値±標準誤差で示している。\* $P < 0.05$  対照側との有意差。† $P < 0.05$  同側の72H群との有意差。‡ $P < 0.05$  同側の24H群との有意差。

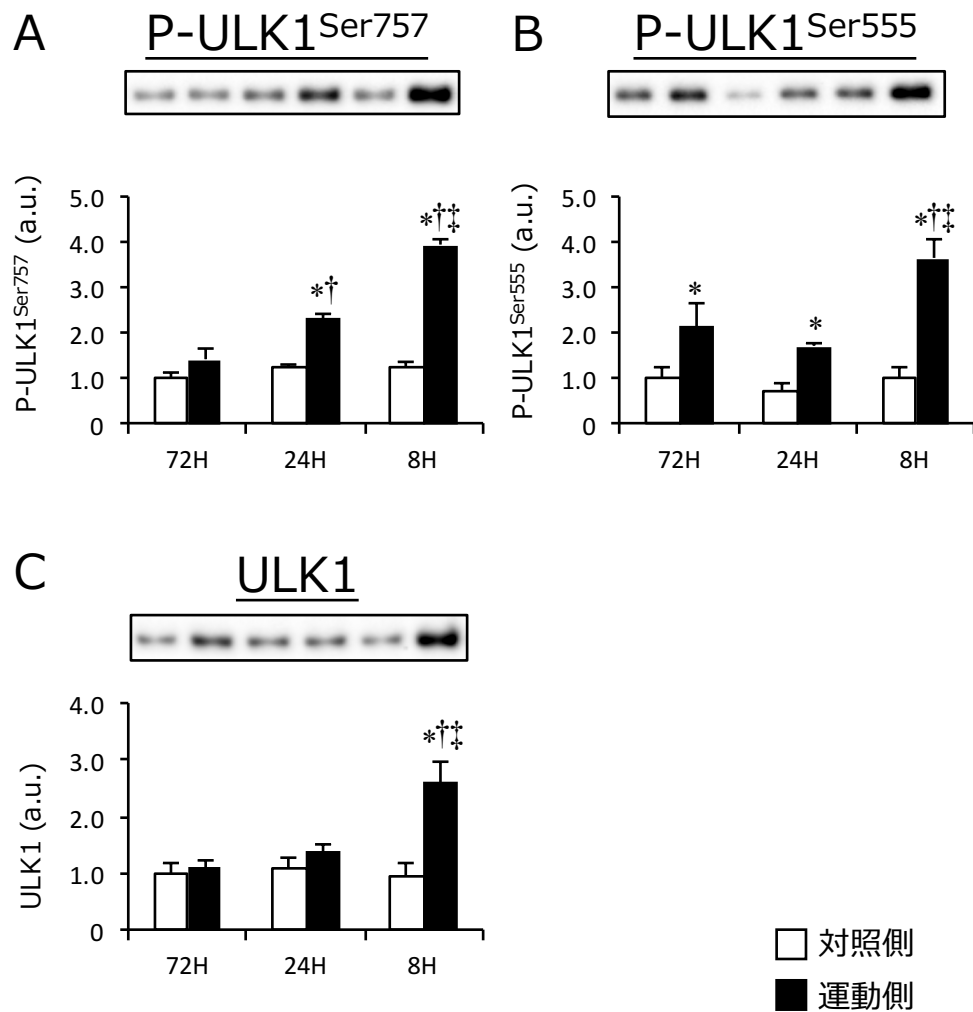


図2-9. オートファジー (2/2)

A : ULK1のリン酸化型タンパク質発現量 (Ser757) , B : ULK1のリン酸化型タンパク質発現量 (Ser555) , C : ULK1の総タンパク質発現量。データは平均値±標準誤差で示している。\* $P < 0.05$  対照側との有意差。† $P < 0.05$  同側の72H群との有意差。‡ $P < 0.05$  同側の24H群との有意差。

## mTORC1 シグナル

回復時間の短縮に伴う筋肥大効果の変化に起因し得る、mTORC1 シグナルについて検討した。

### Akt (図 2-10)

Akt のリン酸化型タンパク質 (Ser473) の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。また、レジスタンス運動・回復時間いずれの主効果も認められなかった。一方、Akt の総タンパク質の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、全ての群で対照側と比較して運動側で有意に高い値を示した。また、24H 群の運動側は、72H 群よりも有意に高い値を示した。さらに、8H 群の運動側は、72H 群・24H 群よりも有意に高い値を示した。

### TSC2 (図 2-10)

TSC2 のリン酸化型タンパク質 (Ser1387) の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、8H 群で対照側と比較して運動側で有意に高い値を示した。また、8H 群の運動側は、72H 群よりも有意に高い値を示した。一方で、TSC2 の総タンパク質の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、24H 群と 8H 群で対照側と比較して運動側で有意に高い値を示した。また、8H 群の運動側は、72H 群よりも有意に高い値を示した。

### p70S6K (図 2-11)

p70S6K のリン酸化型タンパク質 (Thr389) の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、8H 群で対照側と比較して運動側で有意に高い値を示した。また、8H 群の運動側は、72H 群よりも有意に高い値を示した。p70S6K の総タンパク質発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。一方で、運動に



よる正の主効果と、回復時間による主効果が認められた。多重比較の結果、24H 群に比較して 8H 群が低値を示した。

#### rpS6 (図 2-11)

rpS6 のリン酸化型タンパク質 (Ser240/244) の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、8H 群で対照側と比較して運動側で有意に高い値を示した。また、8H 群の運動側は、72H 群・24H 群よりも有意に高い値を示した。rpS6 の総タンパク質の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、8H 群で対照側と比較して運動側で有意に高い値を示した。また、8H 群の運動側は、72H 群・24H 群よりも有意に高い値を示した。

#### 4E-BP1 (図 2-12)

4E-BP1 のリン酸化型タンパク質 (Thr37/46) の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、24H 群で対照側と比較して運動側で有意に低い値を示した。また、8H 群で、運動側において対照側と比較して有意に高い値を示した。さらに、8H 群の運動側は、72H 群・24H 群よりも有意に高い値を示した。4E-BP1 の総タンパク質の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、8H 群で対照側と比較して運動側で有意に高い値を示した。また、8H 群の運動側は、72H 群・24H 群よりも有意に高い値を示した。4E-BP1 の総タンパク質における  $\gamma / (\alpha + \beta + \gamma)$  アイソフォーム比において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。また、レジスタンス運動・回復時間による主効果も認められなかった。

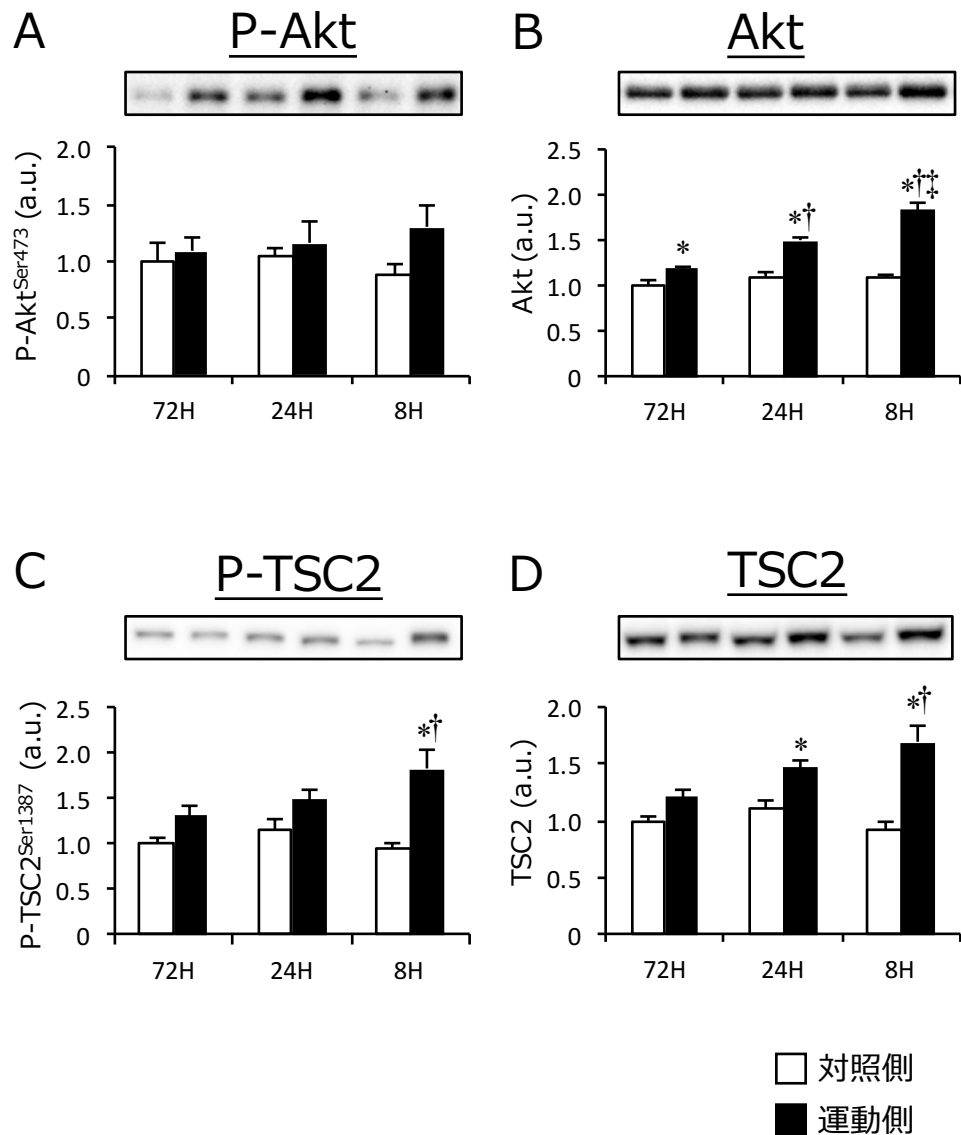


図2-10. mTORC1 シグナル (1/3)

A : Aktのリン酸化型タンパク質発現量, B : Aktの総タンパク質発現量, C : TSC2のリン酸化型タンパク質発現量, D : TSC2の総タンパク質発現量。データは平均値±標準誤差で示している。  
\* $P < 0.05$  対照側との有意差。† $P < 0.05$  同側の72H群との有意差。‡ $P < 0.05$  同側の24H群との有意差。

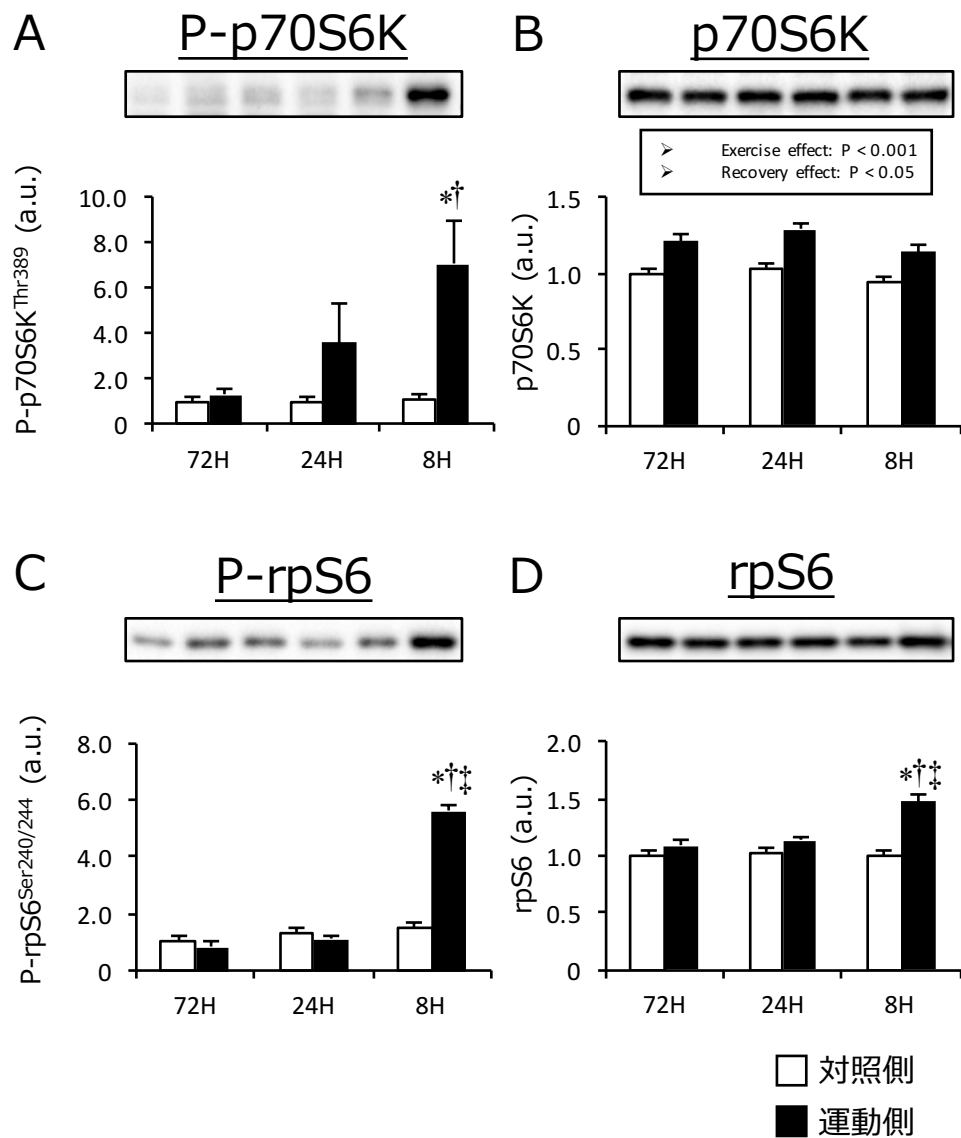


図2-11. mTORC1 シグナル (2/3)

A : p70S6Kのリン酸化型タンパク質発現量, B : p70S6Kの総タンパク質発現量, C : rpS6のリン酸化型タンパク質発現量, D : rpS6の総タンパク質発現量。データは平均値±標準誤差で示している。\* $P < 0.05$  対照側との有意差。† $P < 0.05$  同側の72H群との有意差。‡ $P < 0.05$  同側の24H群との有意差。

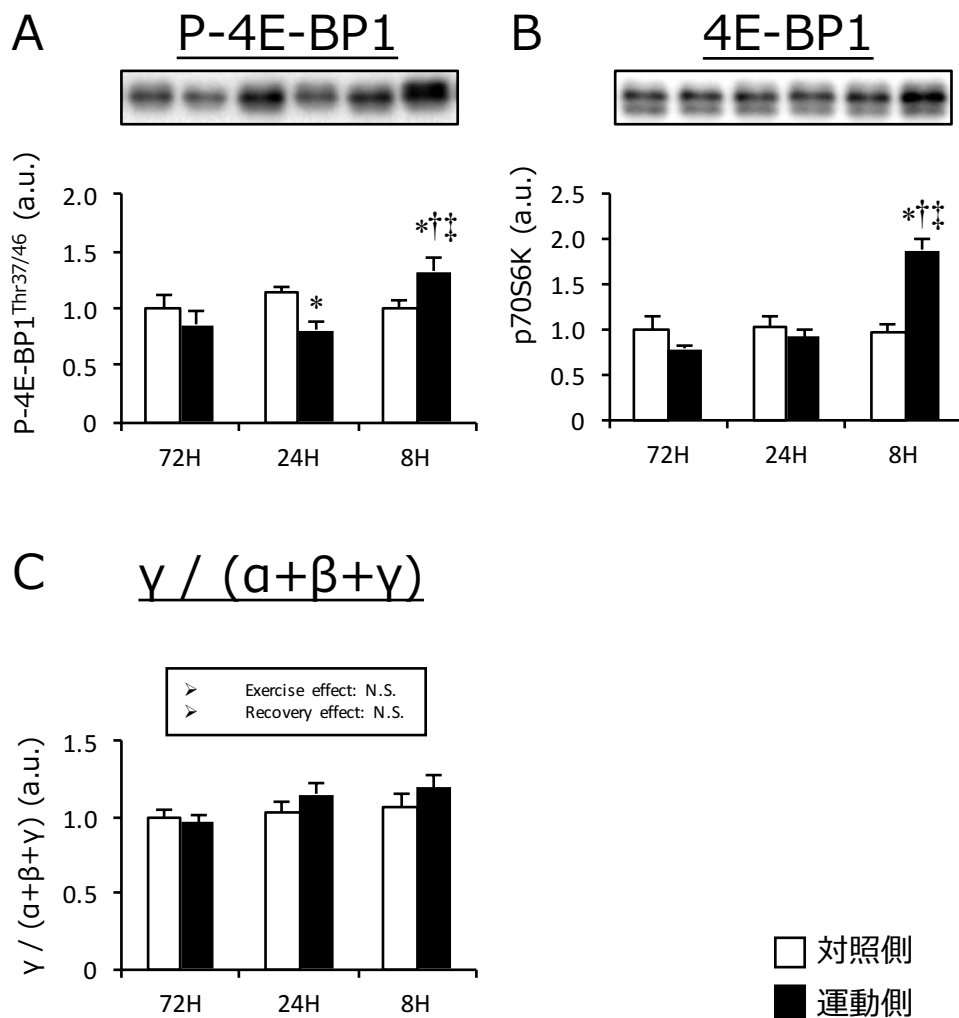


図2-12. mTORC1 シグナル (3/3)

A : 4E-BP1のリン酸化型タンパク質発現量, B : 4E-BP1の総タンパク質発現量, C :  $\gamma$ アイソフォーム比。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示している。\* $P < 0.05$  対照側との有意差。† $P < 0.05$  同側の72H群との有意差。‡ $P < 0.05$  同側の24H群との有意差。

## その他の因子

その他の筋肥大を抑制し得る因子として、翻訳容量を決定するリボソーム量、エネルギーセンサーであり、mTORC1 シグナルを抑制する AMPK、DNA の損傷などに伴い発現が増加し、mTORC1 シグナルを抑制する REDD1、分解系の活性化及び翻訳阻害を行う酸化ストレスの指標となる 4-HNE、炎症反応のメディエーターである NF- $\kappa$ B、骨格筋損傷マーカーの一つである血中 CK 活性について検討した。

### リボソーム量 (図 2-13)

総 RNA 含有量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、全ての群の運動側において、対照側と比較して有意に高い値を示した。また、24H 群の運動側は、72H 群よりも有意に高い値を示した。さらに、8H 群の運動側は、72H 群・24H 群よりも有意に高い値を示した。また、18S + 28S rRNA の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、全ての群の運動側において、対照側と比較して有意に高い値を示した。また、8H 群の運動側は、72H 群・24H 群よりも有意に高い値を示した。

### AMPK (図 2-14)

AMPK のリン酸化型タンパク質 (Thr172) の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。一方で、レジスタンス運動による正の主効果が認められた。AMPK の総タンパク質の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。また、レジスタンス運動や回復時間の変化による主効果も認められなかった。

#### REDD1 (図 2-15)

REDD1 のタンパク質の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、8H 群の運動側において、対照側と比較して有意に高い値を示した。また、8H 群の運動側は、72H 群・24H 群と比較して有意に高い値を示した。

#### 酸化ストレス (図 2-16)

4-HNE のタンパク質の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、全ての群の運動側において、対照側と比較して有意に高い値を示した。また、24H 群の運動側は、72H 群と比較して有意に高い値を示した。

#### NF- $\kappa$ B (図 2-17)

NF- $\kappa$ B の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、24H 群・8H 群において、対照側と比較して運動側で有意に高い値を示した。また、24H 群の運動側は、72H 群と比較して有意に高い値を示した。さらに、8H 群の運動側は、72H 群・24H 群と比較して有意に高い値を示した。NF- $\kappa$ B の細胞質内の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、24H 群と 8H 群の運動側において、対照側と比較して有意に高い値を示した。さらに、8H 群の運動側は、72H 群・24H 群 よりも有意に高い値を示した。NF- $\kappa$ B の核内の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、24H 群と 8H 群の運動側において、対照側と比較して有意に高い値を示した。さらに、24H 群と 8H 群の運動側は、72H 群と比較して有意に高い値を示した。

#### 血中 CK 活性 (図 2-18)

血中 CK 活性において、3 群間に有意差は認められなかった。

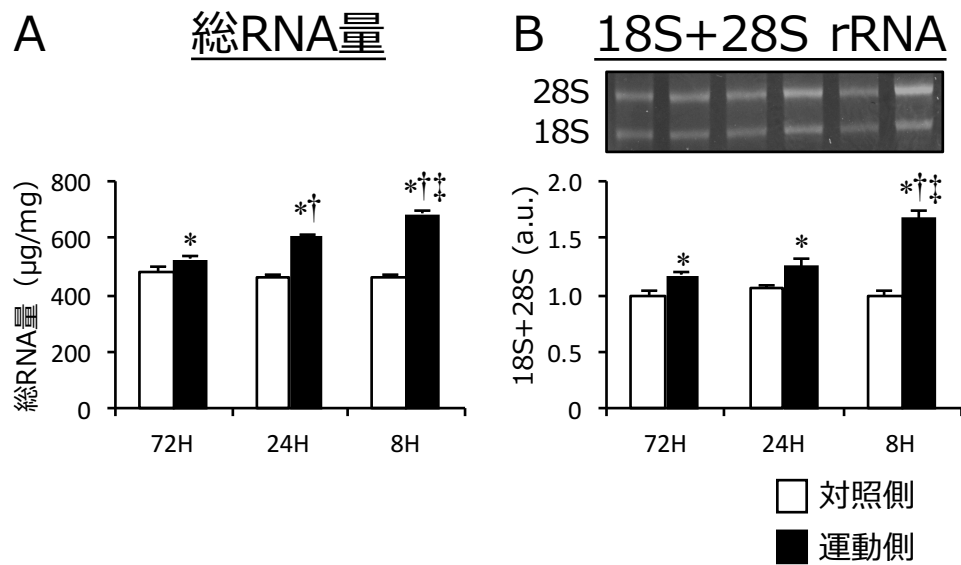


図2-13. リボソーム

A : 総RNA量, B : 18S+28S rRNA発現量。データは平均値±標準誤差で示している。\*P < 0.05 対照側との有意差。†P < 0.05 同側の72H群との有意差。‡P < 0.05 同側の24H群との有意差。

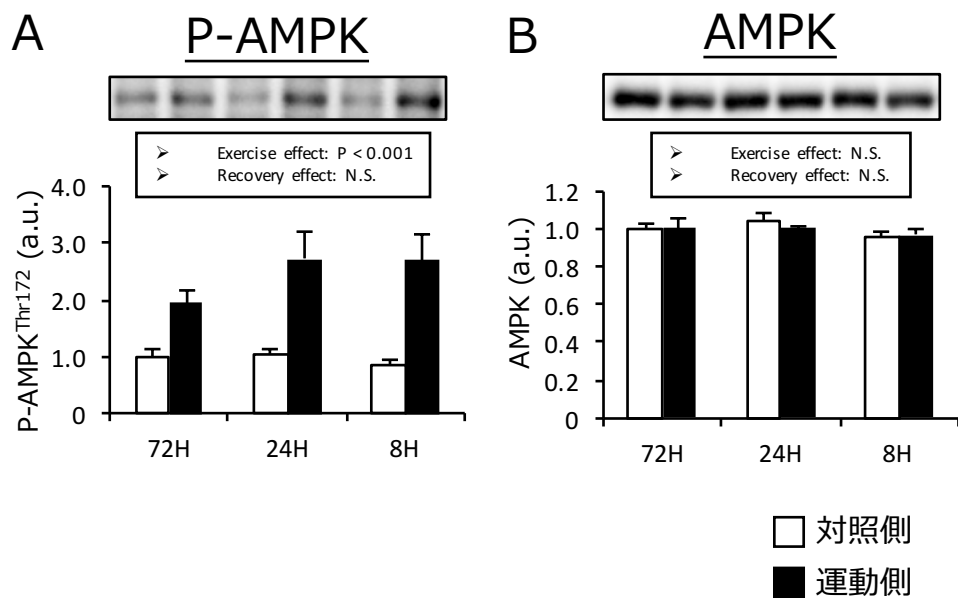


図2-14. AMPK

A : AMPKのリン酸化型タンパク質発現量, B : AMPKの総タンパク質発現量。データは平均値±標準誤差で示している。\*P < 0.05 対照側との有意差。†P < 0.05 同側の72H群との有意差。‡P < 0.05 同側の24H群との有意差。

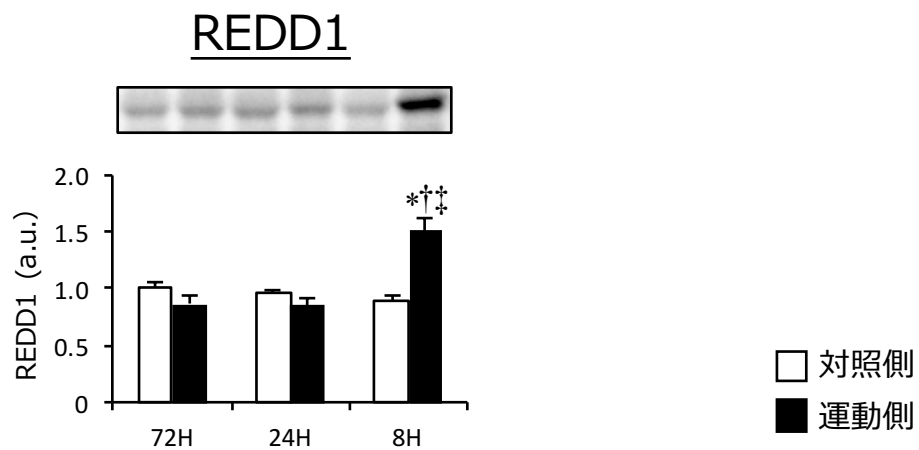


図2-15. REDD1

REDD1のタンパク質発現量。データは平均値±標準誤差で示している。\*P < 0.05 対照側との有意差。†P < 0.05 同側の72H群との有意差。‡P < 0.05 同側の24H群との有意差。

## 4-HNE結合タンパク質

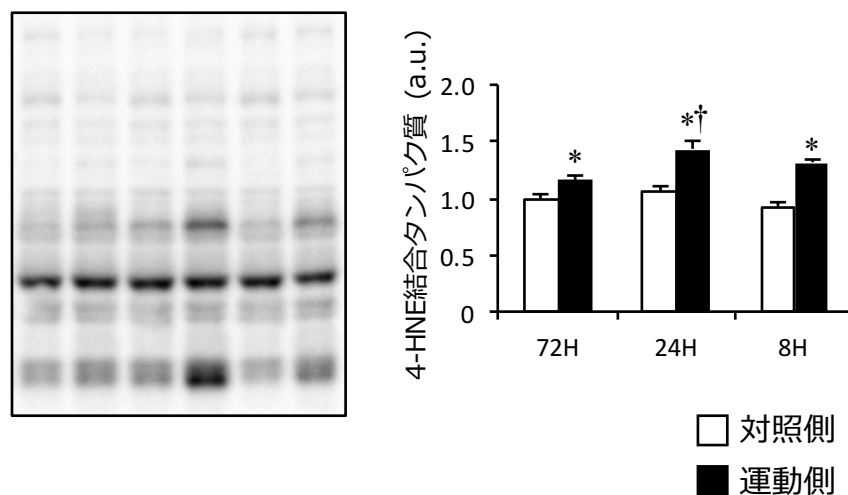


図2-16. 4-HNE結合タンパク質

4-HNE結合タンパク質発現量。\*P < 0.05 対照側との有意差。†P < 0.05 同側の72H群との有意差。‡P < 0.05 同側の24H群との有意差。



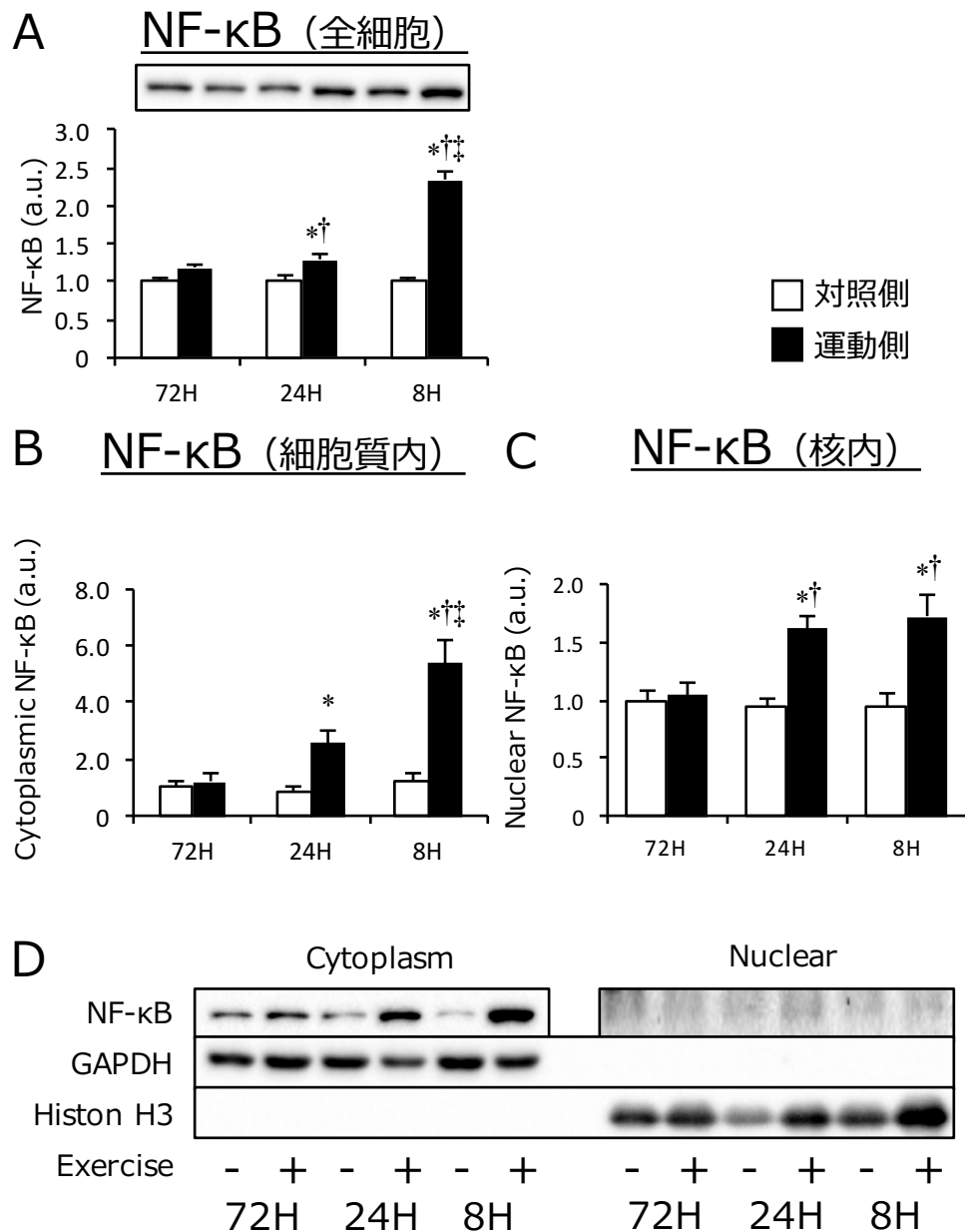


図2-17. NF-κB

A: NF-κBの全細胞内のタンパク質発現量, B: NF-κBの細胞質内のタンパク質発現量, C: NF-κBの核内タンパク質発現量, D: 細胞質と核におけるNF-κBのバンド。データは平均値±標準誤差で示している。\* $P < 0.05$  対照側との有意差。† $P < 0.05$  同側の72H群との有意差。‡ $P < 0.05$  同側の24H群との有意差。

## 血中CK活性

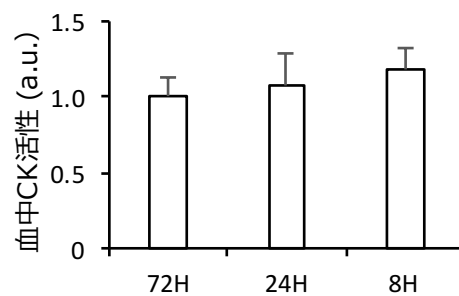


図2-18. 血中CK活性

血中CK活性。データは平均値±標準誤差で示している。

## 考察

### 本研究における知見のまとめ

本研究では、通常筋肥大を生じる回数のレジスタンス運動において、セッション間の回復時間を短縮した場合にどのような応答変化が生じるかを調べた。本研究により得られた主な所見は、以下の通りである：1) 回復時間を極端に短縮することにより、最大発揮トルクの回復が不十分となった、2) 回復時間を極端に短縮することにより、筋肥大効果が消失した、3) 回復時間を極端に短縮することにより、筋タンパク質のユビキチン化が促進された、4) 回復時間の短縮に伴い、オートファゴソーム形成が促進された、5) 回復時間の短縮に伴い、mTORC1 シグナルの活性化が高まった。これらの所見は、回復時間の短縮は筋肥大効果の促進を促すが、過度に短縮した場合には筋力回復・分解系の活性化を促し、筋肥大効果を消失させる可能性を示唆する。

### 回復時間と最大発揮トルク・力積・骨格筋量の変化

本研究において、回復時間を極端に短縮させた場合には、セッション毎の最大発揮トルクが速やかに低下していた（図 2-2）。ヒトを対象とした先行研究で、10 回×10 セットの最大求心性膝伸展運動を実施した場合に、運動直後には最大等尺性発揮トルクが運動前の 6 割程度まで減少するものの、24 時間後には運動前と差がなくなることが示されている(90)。他の同様の先行研究でも、運動から 24 時間後には、運動前と差がないことが報告されている(45)。実際に、本研究において、72H 群・24H 群では、各セッションにおける発揮トルク・力積は変化がない、若しくは緩徐な増加傾向にあった。従って、本研究で設定した 72 時間・24 時間という回復時間は単回のレジスタンス運動で生じる発揮トルクの低下を十分に回復できる時間であったと考えられる。一方で、8H 群ではセッションの経過に伴い最大発揮トルク及び力積が低下していた（図 2-2）。従って、本研究で設定された 8 時間というセッション間の回復時間は、単回のレジスタンス運動により生じる発揮トルクの低下を回復させるためには不十分であり、オーバートレーニングを惹起させるのに妥当な短さの回復時間であったと考えられる。

最大発揮トルクの増大や、筋湿重量の増加、筋線維横断面積の増大は、レジスタンストレーニングを行う上で得られる主要な効果である。本研究では、72H 群・24H 群では最大発揮トルクが初回に比べて最終セッションで増加しており、さらに骨格筋肥大も生じていた（図 2-3）。これらの知見は、回復時間を短縮させることは、運動効果の早期化をもたらすことを示唆する。一方で、8H 群では最大発揮トルクは初回に比べて最終セッションで低下しており、筋肥大効果も生じていなかった（図 2-2, 2-3）。このことから、回復時間が不足していた場合には、レジスタンス運動の効果が消失する、さらには負の効果を生じることを示唆する。以上のことから、レジスタンス運動を適切に実施するためには、少なくとも運動の容量・強度を維持できる範囲で行う必要があり、それらを損なうと効果の低減や負の効果を発生させる可能性が生じることが示唆される。

#### 回復時間とユビキチン・プロテアソーム系

本研究において観察された回復時間の過度な短縮による筋肥大効果の減弱メカニズムとして、筋タンパク質分解系の変化が関与している可能性が考えられる。従ってまず、主要な筋タンパク質分解系として知られているユビキチン・プロテアソーム系について解析を実施した。全ての群において、運動によりタンパク質のユビキチン化が生じていたが、回復時間を 24 時間まで短縮した場合にはユビキチン化のさらなる亢進は生じなかった（図 2-4）。単回のレジスタンス運動を行った場合には筋タンパク質の合成と分解の双方が活性化され、さらに合成が分解を上回るために筋肥大が生じる(111)。従って、本研究において、運動効果が生じる範囲での回復時間の短縮は、レジスタンス運動により生じるユビキチン・プロテアソーム系の活動には顕著な変化を与えなかったことが示唆される。一方で、回復時間を過剰に短縮した場合には、タンパク質のユビキチン化が亢進していた（図 2-4）。Mascher らは、レジスタンス運動を 48 時間空けて繰り返し実施した場合に、ユビキチンリガーゼである Atrogin-1 と MuRF-1 の mRNA 発現量の増加が軽度抑制されることを報告している(86)。従って通常のレジスタンス運動としての適応が得られていた場合、タンパク質のユビキチン化がより亢進することは生じがたい。よって、回復時間を過度に短縮した場合には、通常とは明らかに異なる負の適応が発生していることが疑われる。本研究ではさらに、ユビキチンリガー

ぜの転写因子である FoxO1・FoxO3a の脱リン酸化について解析を行った。これらの因子は何れも、脱リン酸化されることによって核内へと移行し、Atrogin-1・MuRF-1 の転写を促す。しかしながら両因子ともにその脱リン酸化率を比較検討した結果、レジスタンス運動或いは回復時間による主効果は認められたものの、交互作用は認められなかった（図 2-5, 2-6）。さらに、両因子の核内における発現量も測定したが、同様に著明な変化は認められなかった（図 2-7）。レジスタンス運動に伴う FoxO の脱リン酸化の経時変化はあまり明らかとなっていないが、Mascher らが報告しているユビキチンリガーゼの mRNA 発現量の推移を見ると、運動後 48 時間ではほぼ発現量の増加が収まっていることから(86)、今回のサンプリングの時間では既に脱リン酸化が収束していることが考えられる。従って、どの FoxO の脱リン酸化を経て生じるタンパク質のユビキチン化であるかを特定することは困難であるが、少なくとも回復時間の短縮は、タンパク質のユビキチン化を亢進させることは現象レベルで示唆された。

#### 回復時間とオートファジー

本研究における回復時間の過度な短縮に伴う筋肥大効果の減弱メカニズムとして、もう一つの主要な筋タンパク質分解系であるオートファジーの変化に着目した。先行研究では、単回のレジスタンス運動を実施した際には骨格筋におけるオートファゴソーム形成は変化しないことが示されている(4)。本研究において、一般的な回復時間である 72H 群と比較して、回復時間を短縮させた 24H 群では、運動によって p62 発現量・LC3-II の発現量の増加していた（図 2-8）。従って、回復時間の短縮によりオートファゴソーム形成が亢進したことが示された。よって、24H 群では有意な骨格筋肥大は生じているものの、オートファジーの活性化も発生しており、効率的な筋肥大が阻害されている可能性が示唆された。さらに、回復時間を過度に短縮させた 8H 群では、24H 群よりも更に高い p62 の発現量の増加・LC3-II の発現量の増加が認められた（図 2-8）。従って、回復時間の短縮に伴い、オートファゴソーム形成が更に亢進したことが示された。よって、8H 群における筋肥大効果の消失には、オートファジーの高度な活性化が関与している可能性が示唆された。また、本研究ではオートファゴソーム形成の上流因子である ULK1 についても解析を行っている。しかしな

がら、mTORC1 の下流に存在し、オートファゴソーム形成を抑制する Ser757 のリン酸化型タンパク質発現量が回復時間の短縮に伴い増加していた（図 2-9）。一方で、AMPK の下流に存在し、オートファゴソーム形成を促進する Ser555 のリン酸化型タンパク質発現量は回復時間を過剰に短縮させた場合のみ、発現量が増加していた（図 2-9）。以上のことから、ULK1 のリン酸化のみでは回復時間の短縮に伴うオートファゴソーム形成の変化を説明できず、オートファゴソーム形成の亢進メカニズムについては、今後より詳細な検討を行う必要がある。

### 回復時間と mTORC1 シグナル

本研究において観察された回復時間の過度な減弱に伴う筋肥大効果の減弱メカニズムとして、筋タンパク質合成の抑制が発生している可能性を考え、筋タンパク質合成を中心的に活性化させる mTORC1 シグナルについて解析した。いずれのリン酸化タンパク質の発現量についても、72H 群では変化は生じていなかった（図 2-10, 2-11, 2-12）。一方で、回復時間を短縮させた 24H 群では、リン酸化の 4E-BP1 発現量の減少が生じていた（図 2-12）。4E-BP1 は、リン酸化・ $\gamma$  アイソフォームへの移行により、翻訳開始を促す(37, 94)。従って、24H 群では、わずかにタンパク質の合成が抑制されている可能性が示唆された。一方で回復時間を過度に短縮させた 8H 群では、mTORC1 の上流因子である TSC2 のリン酸化タンパク質（Ser1387）の発現増加・mTORC1 の下流に位置する p70S6K のリン酸化タンパク質（Thr389）の発現増加・p70S6K の下流に位置する rpS6 のリン酸化タンパク質（Ser240/244）の発現増加が認められた（図 2-10, 2-11, 2-12）。さらに、mTORC1 の下流に位置する 4E-BP1 のリン酸化タンパク質（Thr37/46）の発現増加も認められた（図 2-12）。これらのことから、8H 群においては運動終了 48 時間後においても mTORC1 シグナルが活性化しており、タンパク質の合成が活性化している可能性が示唆された。一方で Kato らは、500 回の遠心性収縮を実施した場合に、p70S6K のリン酸化タンパク質の発現が上昇しているにも関わらず、実際の筋タンパク質合成が上昇していないことを報告している(65)。従って、8H 群においては、mTORC1 シグナルは活性化しているものの、実際の筋タンパク質合成が生じているかは不明であり、この点についてはより深く検討する必要があると考える。

## その他の筋肥大抑制関連因子・分解系活性化因子

上述の通り、本研究において、回復時間の短縮に伴う分解系の亢進が観察された。このメカニズムを探求するため、本研究では筋肥大抑制に関連し得る因子・分解系に関与し得る因子（リボソーム、酸化ストレス、AMPK、REDD1）について解析を行った。

先行研究において、Nakada らはリボソーム量の変化が筋肥大率と正の相関を示すことを報告しており、リボソーム量が筋肥大率を決定することを示唆している(96)。従って本研究においても、リボソーム量の変化が回復時間の過度な短縮に伴う筋肥大効果の消失に関与している可能性を考え、リボソーム量の指標として用いられる total RNA 含有量、18S+28S rRNA の発現量について解析を行った。その結果、72H 群において増加が認められ、さらに 24H 群では 72H 群と比較して同等～やや高い増加が認められた（図 2-13）。従って、回復時間を短縮させた場合にはリボソーム量の増加が早期に、やや高く得られることが示唆された。一方で回復時間を過度に短縮させた 8H 群では、両因子ともに 72H 群・24H 群と比較して有意に高い増加が認められた（図 2-13）。従って、回復時間を過度に短縮させた場合にもリボソーム量の増加は得られ、さらにその程度が高くなることが示唆された。同時に、リボソーム量の変化は過度に回復時間を短縮させた場合の筋肥大効果の減弱には関与しない可能性が示唆された。

続いて、分解系に関与する因子として AMPK を測定した。AMPK は細胞内のエネルギーセンサーとして作用し、レジスタンス運動においては特に運動直後～1 時間後において、高い活性化（Thr172 のリン酸化）を示すこと報告されている(105)。さらにリン酸化された AMPK は FoxO を活性化させることにより、タンパク質のユビキチン化やオートファゴソーム形成を促進することが明らかとなっている(97, 122)。従って本研究において、回復時間の短縮が、AMPK のリン酸化を介して分解系の亢進を促した可能性を考え、AMPK について解析を行った。しかしながら AMPK については、運動によりリン酸化されることは認められたが、群間差等は認められなかった（図 2-14）。従って、少なくとも運動から 48 時間後の時点では回復時間の短縮に伴う分解系の亢進には関与しない可能性が示唆された。

続いて、分解系に関与する因子として REDD1 を測定した。REDD1 は mTORC1 シグナルへの抑制因子として作用し、レジスタンス運動においては運動容量を増加させた場合などにその発現量が増加することが報告されている(102)。さらに、REDD1 は mTORC1 シグナルへの抑制因子として働くと同時に、Akt などへ抑制的に作用することが報告されている(32)。従って本研究において、Akt-FoxO 連関を通じて分解系を亢進する可能性を考え、REDD1 について解析を行った。REDD1 は通常の回復時間でレジスタンス運動を実施させた場合には、運動終了 48 時間後の時点では発現量の増加は認められなかった。さらに、回復時間を短縮させた場合にも、その増加は認められなかった。一方で、回復時間を過度に短縮させた場合にはその発現量の増加が認められた(図 2-15)。従って、回復時間を過度に短縮させた場合に生じる分解系の亢進に、REDD1 は関与している可能性が示唆された。しかしながら、同時点での Akt のリン酸化タンパク質の発現量には、回復時間の長短による差異は認められていない。これらのことから、REDD1 による関与の可能性は考えられるものの、その程度には議論の余地が残される。

次に、分解系に関与する因子として酸化ストレスを測定した。酸化ストレスはレジスタンス運動や疲労性の運動において骨格筋内・血液中での発現増加が生じることが明らかとなっている(12, 55)。先行研究から、酸化ストレスは廃用性筋萎縮などを始めとする様々な骨格筋萎縮において、その増加が認められており(115)、ユビキチン・プロテアソーム系、オートファジーの双方の活性化を促すことが示されている(75, 88)。従って、本研究における回復時間の短縮に伴う分解系の亢進に、酸化ストレスが関与している可能性を考え、酸化ストレス指標として用いられる 4-HNE 結合タンパク質発現量について解析を行った。その結果、全ての群で発現量の増加が認められた。さらに回復時間の短縮により、その発現量の増加がより高くなることが認められた(図 2-16)。従って、回復時間の短縮によるオートファゴソーム形成に、酸化ストレスが関与する可能性が示唆された。一方で、回復時間を過度に短縮させた場合には、酸化ストレスの増加は通常の回復時間と変わらないことが認められた。従って、回復時間の過度な短縮による分解系の亢進には、酸化ストレスは関与しない可能性が示唆された。

次に、分解系に関与する因子として NF- $\kappa$ B を測定した。NF- $\kappa$ B は TNF- $\alpha$ ・IL-1 $\beta$  等を始めとする種々の炎症サイトカインの転写因子であり(79)、炎症反応のメディエーターとして作用する。同時に、炎症反応はユビキチン・プロテアソーム系・オートファジーの双方を活性化させることが明らかとなっている(74, 93)。さらに運動においても、遠心性収縮を伴う運動や、過度な容量の運動を行うことに寄って発生することが明らかとなっている(76, 129)。従って、本研究において、炎症反応の発生により分解系の亢進が生じている可能性を考え、NF- $\kappa$ B の発現量について解析を行った。その結果、通常の回復時間でレジスタンス運動を実施した場合には発現量に変化は認められなかったが、回復時間を短縮させた場合には、短縮に伴う発現量の増加が認められた(図 2-17)。従って、回復時間の短縮に伴う分解系の亢進に、炎症反応の発生が関与している可能性が示唆された。一方で、NF- $\kappa$ B の核内発現量を測定したところ、回復時間の短縮・過剰な短縮によって発現量の増加が認められたものの、群間に差は認められなかった。この点については、本研究におけるサンプリングの時間点が最終セッションから 48 時間後であり、急性的な応答が消失していることが関与している可能性が示唆される。炎症反応による応答をより詳細に解明するためにも、今後急性期における検討を行う必要があると考える。

最後に、筋損傷のマーカーとして、血清中の CK 活性を測定した。血清中の CK 活性は、筋損傷が生じた場合に増大することが広く知られている。本研究においても、短い回復時間でレジスタンス運動を繰り返すことにより、筋損傷が生じていた可能性を考え、血清中の CK 活性の測定を行った。その結果、回復時間の違いによる CK 活性の変化は認められなかった(図 2-18)。従って、このデータから解釈すれば、レジスタンス運動間の回復時間の短縮・過剰な短縮は、筋損傷の発生を誘導しなかったと考えられる。しかしながら、本研究においてレジスタンス運動を行った部位は腓腹筋のみであり、腓腹筋のみの損傷は全身的な CK 活性の変化を惹起するのに不十分であった可能性が考えられる。加えて、本研究における形態学的解析を行う上で、回復時間を過剰に短縮した群では中心核を有する筋線維が観察されたことなどから、実際に血清中の CK 活性に反映はされていないものの、筋損傷が生じていた可能性は十分に考えられる。これらの点については、より詳細な



形態学的解析や、筋内の損傷関連因子等の測定などを実施し、慎重に評価を行っていく必要があると考える。

## まとめ

以上のことから、同一のセッション数で、セッション間の回復時間を短縮させた場合（72 時間から 24 時間の範囲）には、わずかに分解系が亢進するものの発揮筋力の増大や骨格筋肥大は十分に獲得できることが明らかとなった。このことから、回復時間を短縮させた場合には、運動効果の早期化が得られることが示唆された。しかしながら、通常のリcovery時間では発生しない炎症反応や、酸化ストレスの蓄積が生じていることから、実際の医療・スポーツの現場においては、必ずしも推奨されるべきではない可能性が示唆される。一方で、同一のセッション数でセッション間の回復時間を過度に短縮させた場合（8 時間）には、セッション毎の運動容量・強度の低下、発揮トルクの減弱、筋肥大効果の消失、分解系の高い活性化、REDD1 の発現の増加、炎症反応の発生など、運動効果が得られないばかりか、様々な負の効果を生じることが明らかとなった。これらの知見から、実際の医療・スポーツの現場において、回復時間の過剰な短縮が回避すべきである明確な根拠が示されたと考える。一方で、本検討では mTORC1 シグナルの変化は検討したものの、実際のタンパク質合成は検討していない。さらに、レジスタンス運動を繰り返し実施している最中の筋タンパク質分解系の変動などについても、検討していない。レジスタンス運動を繰り返し実施する際のセッション間の回復時間の違いが筋タンパク質代謝に及ぼす影響をより詳細に明らかにするためにも、これらの点について検討を行う必要がある。

## 第 3 章

セッション間の回復時間の違いが  
短期的なレジスタンストレーニング効果に  
与える影響の検討

## 緒言

第 2 章における研究結果から、レジスタンス運動を繰り返し実施する際に回復時間を短縮すると、ある程度の段階までは運動効果の早期化が得られるものの、過度に短縮させた場合には運動容量・強度を保てないだけでなく、運動効果（筋肥大効果）が消失することが明らかとなった。しかしながらその分子メカニズム、特に運動を繰り返し実施している最中にどのような変化が生じているかは明らかとなっていない。従って、第 3 章では、レジスタンス運動を繰り返し実施する最中に、回復時間の違いが筋タンパク質代謝へどのような影響が生じているかを明らかとする。

mTORC1 シグナルは、長らく筋タンパク質合成において中心的な役割を担うと考えられてきた。しかしながら近年、先述の通り、必ずしも mTORC1 シグナルの活性と筋タンパク質合成の活性は一致しないとする知見が報告された。Kato らは、500 回の遠心性収縮をラットの前脛骨筋に実施した場合に、mTORC1 の下流に位置し、mTORC1 シグナルの活性の指標として用いられる p70S6K のリン酸化が上昇するにも関わらず、実際の筋タンパク質合成は上昇しないことを報告している(65)。また、Ogasawara らは、mTORC1 の阻害剤であるラパマイシンを投与した状態で、本研究と同様のレジスタンス運動をラットに実施させた場合に、活性化の程度は減弱するものの、p70S6K 及び他の下流因子のリン酸化が消失するにも関わらず、筋タンパク質合成の活性化が生じること、さらに長期的に週 3 回 4 週間運動を実施した場合にも、筋肥大の程度は減弱するものの、筋肥大が生じることを報告している(103)。これらのことから、レジスタンス運動においては mTORC1 シグナルの活性化は中心的な役割は担うが、実際の筋タンパク質合成に直結しない可能性があり、本研究においてもこの点は明らかとせねばならない。

第 2 章において、回復時間の短縮に伴い、筋タンパク質分解系の亢進が生じていることが明らかとなった。しかしながら第 2 章における検討は運動終了後 48 時間後の時点であり、特に 24H 群・8H 群においては、セッションを繰り返し実施する中では辿らない時間点であるため、実際に繰り返し実施している最中に同様の変化が生じているかは明らかでない。筋タンパク質分解系は筋タン

パク質合成と同様に、筋タンパク質代謝及び筋肥大応答に大きな影響を与える因子であるため、回復時間に応じた運動効果の変化を解明する本研究において、明らかとする必要がある点である。

以上のことから、第 3 章では、レジスタンストレーニングを実施する際のセッション間の回復時間の違いが、短期的なトレーニング効果に与える影響を明らかとすることを目的とする。さらに近年、電気刺激によるレジスタンス運動モデルを用いて、マウスにおいても筋肥大が生じることが確認された。よって本研究においても、遺伝子操作技術の将来的な応用や、実験のスケールダウンを図るため、マウス骨格筋を対象として検討を行うこととした。以上のことから、本章においては以下の研究課題を実施する：①マウス骨格筋における、電気刺激によるレジスタンス運動効果の検証、②セッション間の回復時間の違いが、筋タンパク質合成に与える影響の検討、③セッション間の回復時間の違いが、筋タンパク質分解系に与える影響の検討。

## 実験①：マウス骨格筋における、電気刺激によるレジスタンス運動効果の検証

### 緒言

先述の通り、実験のスケールダウンや遺伝子操作の技術の将来的な応用といった観点から、研究対象にマウスを用いることが望ましい。本研究で用いてきた電気刺激による強制的な筋収縮を用いたレジスタンス運動は、その報告の多くはラットを対象として実施されている(102-104)。一方で、マウスを対象とした筋肥大介入には協働筋切除が多く用いられているが、その際の筋肥大効果は、わずか2週間で1.5倍以上の筋湿重量の増大が生じるなど、明らかに生理的範囲を超えたものである(53)。しかし近年、本研究でラットに対して用いたものと同様のレジスタンス運動プロトコルで、C57BL/6J マウスに週3回のトレーニングを実施したところ、2週間で1割程度の筋肥大が生じることが示された(137)。しかしながら、急性的な応答についてはその相同性に関する知見が不十分であるため、本実験では、マウスに対する電気刺激によるレジスタンス運動における急性的な同化応答を明らかとすることとした。

## 材料と方法

### 実験動物

本実験は、11 週齢の雄性 C57BL/6J マウス（日本クレア，東京，日本）を用いた。全てのマウスは、12 時間の明暗サイクルに管理された飼育室において飼育した。餌と水はそれぞれ自由摂取とした。

### 実験プロトコル

12 時間の絶食後、マウスに対して単回のレジスタンス運動を実施させ、運動 6 時間後（ラットの場合、筋タンパク質合成がピークとなる時間）にイソフルラン吸入麻酔薬の投与下で頸椎脱臼により屠殺した。解析に用いるサンプルとして、両腓腹筋を採取し、即座に液体窒素で凍結した後、-80°Cで保管した。

### 筋収縮方法

骨格筋の収縮は、先行研究(103)を参考として電気刺激により惹起した。イソフルランの吸入投与による麻酔下にて、各マウスの右脚下腿部を剃毛し、アルコール綿で拭いた。その後、マウスを伏臥位で右脚をプレートに足関節角度 90°で固定し、表面電極（ビトロード V，日本光電，日本）を腓腹筋外側部と内側部に貼付し、電気刺激装置（SEN-3301，日本光電，日本）とアイソレータ（SS-104J，日本光電，日本）に接続した。

### レジスタンス運動プロトコル

マウスの右腓腹筋に対して、電気刺激にて等尺性筋収縮を誘発した。先行研究を参考に(103)、全ての運動セッションにおいて、電気刺激による筋収縮を、3 秒間 10 回を 1 セットとし、3 分間の休息を設けて 5 セット実施した。電気刺激は 100 Hz、500  $\mu$ s（筋湿重量がラットの 10 %程度であるため）の矩形波を用いた。

## ウエスタンブロッティング

第2章と同様。使用した一次抗体は表 3-1 の通り。

## 筋タンパク質合成

筋タンパク質合成は、in vivo SUnSET 法を用いて測定した(47, 49)。イソフルランの吸入投与による麻酔下にて、筋切除の 15 分前に puromycin を  $0.04 \mu\text{mol puromycin} / \text{g body weight}$  で腹腔投与した。先述の溶解処理の後、 $2,000 \text{ g}$  にて 3 分間、 $4^{\circ}\text{C}$  で遠心分離し、上清を抽出し、ウエスタンブロッティングを行った。Mouse monoclonal anti-puromycin antibody (Tezze, #242MABE343, Millipore, Billerica, MA)を用いて puromycin 結合タンパク質を検出・定量し、筋タンパク質合成の指標とした。

## 統計処理

全てのデータは、平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。なお、任意単位は対照側を 1 として示した。全てのデータは、対応のない t 検定を行った。有意水準は  $P < 0.05$  とした。全ての統計処理は、SPSS (IBM, 日本) を用いた。

表 3-1. 一次抗体リスト

標的タンパク質	メーカー	型番	希釈
p-Akt <sup>Ser473</sup>	Cell Signaling Technology	#9271	1:1000
p-p70S6K <sup>Thr389</sup>	Cell Signaling Technology	#9205	1:1000
p-rpS6 <sup>Ser240/244</sup>	Cell Signaling Technology	#2215	1:1000

## 結果

### 筋タンパク質合成 (図 3-1)

筋タンパク質合成において、対照側と比較して運動側で有意に高値を示した。

### p-Akt (図 3-2)

Akt のリン酸化タンパク質 (Ser473) の発現量において、対照側と運動側の間に有意な差は認められなかった。

### p-p70S6K (図 3-2)

p70S6K のリン酸化タンパク質 (Thr389) の発現量において、対照側と比較して運動側で有意に高値を示した。

### p-rpS6 (図 3-2)

rpS6 のリン酸化タンパク質 (Ser240/244) の発現量において、対照側と比較して運動側で有意に高値を示した。



## 筋タンパク質合成

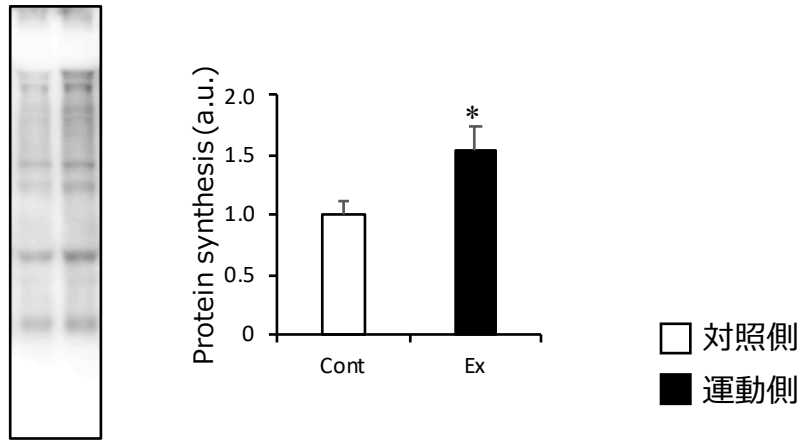


図3-1. 筋タンパク質合成

筋タンパク質合成。データは平均値±標準誤差で示している。\*P < 0.05 対照側との有意差。

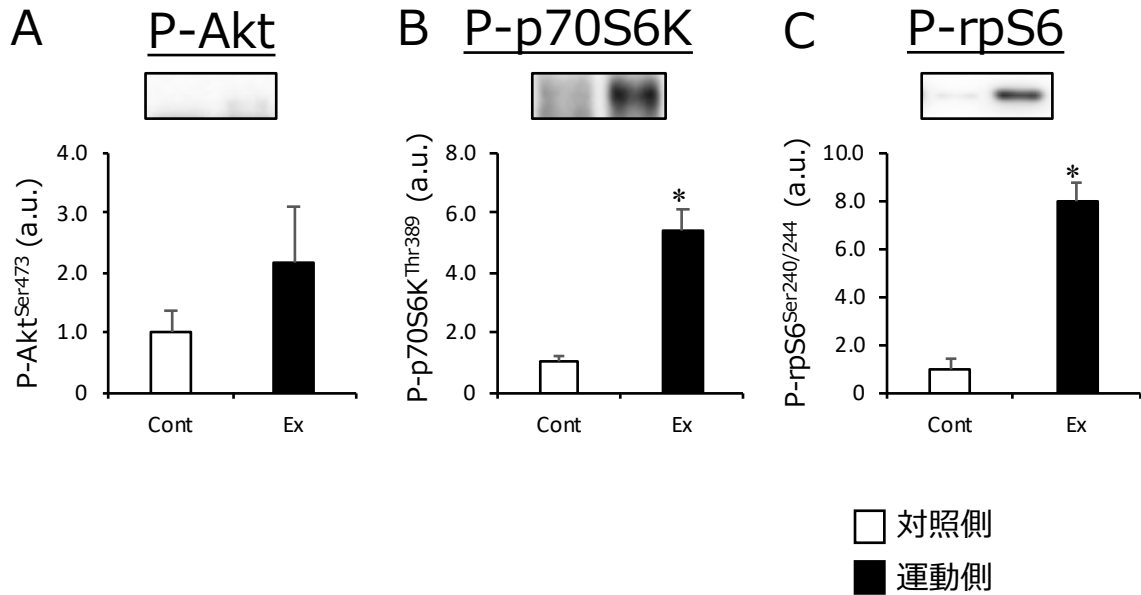


図3-2. mTORC1 シグナル

A : Aktのリン酸化型タンパク質発現量, B : p70S6Kのリン酸化型タンパク質発現量, C : rpS6のリン酸化型タンパク質発現量。データは平均値±標準誤差で示している。\*P < 0.05 対照側との有意差。

## 考察

### 本実験における知見のまとめ

先行研究から、電気刺激によるレジスタンス運動を週 4 回・2 週間行うことにより、骨格筋肥大が惹起されることが報告されている(137)。しかしながら、急性期の応答については、明らかとなっていない。従って本実験では、マウス骨格筋に対して電気刺激による強制的な筋収縮を用いた、単回のレジスタンス運動を行うことで、急性期の筋タンパク質合成およびその関連シグナルにどのような変化が生じるかを調べた。本研究により得られた主な所見は、以下の通りである：1) マウス骨格筋において、電気刺激による単回のレジスタンス運動後の筋タンパク質合成が活性化した、2) マウス骨格筋において、電気刺激による単回のレジスタンス運動後の mTORC1 シグナルが活性化した。これらの所見は、マウス骨格筋においても、電気刺激による強制的な筋収縮はレジスタンス運動効果を引き起こすことを示唆する。

### マウス骨格筋における筋タンパク質合成と mTORC1 シグナルの変化

本実験において、単回のレジスタンス運動を行った際に、筋タンパク質合成は活性化していた(図 3-1)。さらに、p70S6K、rpS6 のリン酸化型タンパク質の発現量も増加していたことから(図 3-2)、mTORC1 シグナルの活性化も生じていたと考えられる。先行研究から、ラット骨格筋を対象に、同様の電気刺激を用いた単回のレジスタンス運動を行ったところ、運動後 6 時間の時点では、筋タンパク質合成が活性化しており、さらに Akt のリン酸化型は平常状態まで抑制していたものの、p70S6K や rpS6 については、リン酸化の亢進が維持されていたことが報告されている(103)。従って、マウス骨格筋においてもラットと同様に、電気刺激による単回のレジスタンス運動によって、筋タンパク質合成や mTORC1 シグナルの活性化が生じることが示された。

### 実験①のまとめ

本検討により、マウス骨格筋を対象とした場合でも、ラット骨格筋と同様に、電気刺激による強制的な筋収縮を用いたレジスタンス運動によって、筋タンパク質合成の活性化や mTORC1 シグナルの活性化が生じることが示された。従って、電気刺激を用いたレジスタンス運動はマウス骨格筋にも応用可能であり、今後の研究展開におけるスケールダウンを図れる可能性が示唆される。

## 実験②：セッション間の回復時間の違いが、筋タンパク質合成に与える影響の検討

### 緒言

第2章における結果から、短い回復時間でレジスタンス運動を繰り返した場合、mTORC1 シグナルは高い活性化状態にあることが明らかとなった。しかしながら先述の通り、mTORC1 シグナルの活性化が生じているにも関わらず、実際の筋タンパク質合成が生じていない例や、逆にラパマイシンにより mTORC1 の活性を抑制しているにも関わらず、筋タンパク質合成が生じている例などが存在する。従って、短い回復時間のもとでレジスタンス運動を繰り返した場合、mTORC1 シグナルの活性化が生じていたとしても、実際の筋タンパク質合成は生じていない可能性が存在する。

mTORC1 シグナルが活性化している状態でタンパク質合成を抑制し得る因子が、いくつか存在する。eIF-2 $\alpha$  は、過剰な翻訳活性や筋タンパク質合成に応答して活性化する、翻訳開始抑制因子である。過剰な翻訳や筋タンパク質合成によって、小胞体内に折りたたみ不全タンパク質が蓄積すると、小胞体ストレスが発生する(83)。これにより、unfolded protein response が惹起され、主にシャペロンの産生と、翻訳開始の抑制により、小胞体ストレスの抑制が図られる(10, 20, 118, 126)。eIF-2 $\alpha$  は、unfolded protein response の下流に位置し、実際に翻訳開始の抑制を担う因子であり(66)、本研究においても、回復時間の短縮によって小胞体ストレスの蓄積が生じ、eIF-2 $\alpha$  がリン酸化され、翻訳開始が抑制されている可能性が考えられる。

一方で、酸化ストレスの蓄積も、筋タンパク質合成の抑制に関与する可能性が考えられる。先行研究から、消耗性のレジスタンス運動は、酸化ストレスの蓄積を生じることが明らかとなっている(55)。酸化ストレスの蓄積は、様々な翻訳抑制因子の活性化、もしくはそれ自身が翻訳を抑制することが報告されている。従って、過剰な回復時間の短縮を行う本研究においても、酸化ストレスの蓄積が筋タンパク質合成の抑制因子として働く可能性が考えられる。

さらに、筋タンパク質合成の抑制に働く因子として、リボソームの関与が考えられる。第1章・第2章で述べたように、筋タンパク質合成は、翻訳活性と翻訳容量（リボソーム量）によって決定

されると考えられている。従って、過剰な回復時間の短縮により、リボソーム量の不足等が生じ、筋タンパク質合成が抑制する可能性も考えられる。

以上のことから、実験②では、回復時間の短縮に伴う筋タンパク質合成とそれに関連する因子の変化を明らかにすることを目的とした。なお本研究では、筋タンパク質合成系を中心的に検討することから、電気刺激によるレジスタンストレーニングにより筋肥大が生じることを示した先行研究と同様の刺激方法（深腓骨神経に対する電気刺激による前脛骨筋収縮の惹起）でレジスタンス運動を実施した。

## 材料と方法

### 実験動物

第3章 実験①と同様。

### 実験プロトコル

マウスを無作為に、レジスタンス運動を72時間毎に行う群（72H群）、24時間毎に行う群（24H群）、8時間毎に行う群（8H群）に分類した。全ての動物に3セッションのレジスタンス運動を実施させた（図3-3）。なお、mTORC1シグナルのベースラインを可能な限り統一するために、最終セッション前に一晩の絶食を行った。各群最終のレジスタンス運動から6時間後（筋タンパク質合成がピークとなる時間）に、イソフルラン吸入麻酔薬の投与下で頸椎脱臼により屠殺した。解析に用いるサンプルとして、前脛骨筋を採取し、即座に液体窒素で凍結した後、-80°Cで保管した。

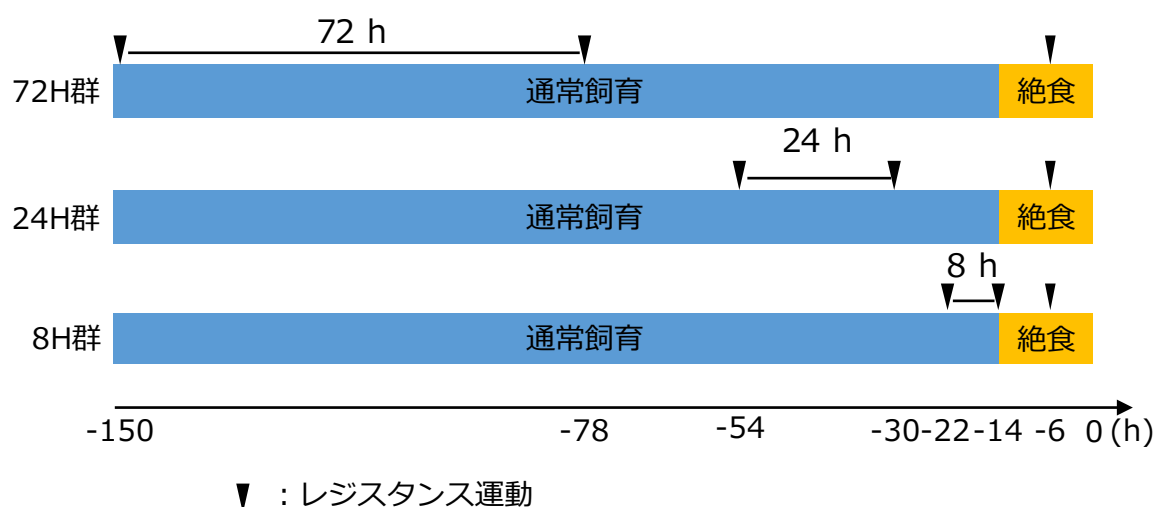


図3-3. 3章-実験②における実験プロトコル

### 筋収縮方法

骨格筋の収縮は、先行研究(3)を参考として実施した。イソフルランの吸入投与による麻酔下にて、各マウスの右脚下腿部を剃毛し、アルコール綿で拭いた。その後、マウスを仰臥位で右脚をプレー

トに足関節角度 90°で固定し、表面電極（株式会社ユニークメディカル，東京，日本）を深腓骨神経の表層部に配置した。

### レジスタンス運動プロトコル

マウスの右前頸骨筋に対して、電気刺激にて等尺性筋収縮を誘発した。先行研究を参考に(103)、全ての運動セッションにおいて、電気刺激による筋収縮を、3 秒間 10 回を 1 セットとし、3 分間の休息を設けて 5 セット実施した。電気刺激は 100 Hz、150  $\mu$ s（先行研究(3)と同様）の矩形波を用いた。

### ウェスタンブロッティング

第 2 章と同様。使用した一次抗体は表 3-2 の通り。

### 筋タンパク質合成

第 3 章 実験①と同様。

### リボソーム RNA 量の解析

第 2 章と同様。

### 統計処理

全てのデータは、平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。なお、任意単位は 72H 群の対照側を 1 として示した。全てのデータは、レジスタンス運動（有り無し） $\times$ 回復時間の二元配置分散分析を行った。回復時間による主効果または交互作用が認められた場合は、Bonferroni の多重比較検定を行った。有意水準は  $P < 0.05$  とした。全ての統計処理は、SPSS（IBM，日本）を用いた。

表 3-2. 一次抗体リスト (実験②)

標的タンパク質	メーカー	型番	希釈
p-Akt <sup>Ser473</sup>	Cell Signaling Technology	#9271	1:1000
t-Akt	Cell Signaling Technology	#9272	1:1000
p-p70S6K <sup>Thr389</sup>	Cell Signaling Technology	#9205	1:1000
t-p70S6K	Cell Signaling Technology	#2708	1:1000
p-rpS6 <sup>Ser240/244</sup>	Cell Signaling Technology	#2215	1:1000
t-rpS6	Cell Signaling Technology	#2217	1:1000
p-4E-BP1 <sup>Thr37/46</sup>	Cell Signaling Technology	#9459	1:1000
4E-BP1	Cell Signaling Technology	#9452	1:1000
CHOP	Cell Signaling Technology	#5554	1:1000
p-eIF-2 $\alpha$ <sup>Ser51</sup>	Cell Signaling Technology	#3597	1:1000
t-eIF-2 $\alpha$	Cell Signaling Technology	#5324	1:1000
p-UBF <sup>Ser388</sup>	Santa Cruz Biotechnology	sc-21637-R	1:500
t-UBF	Santa Cruz Biotechnology	sc-13125	1:500



## 結果

### 筋タンパク質合成（図 3-4）

筋タンパク質合成において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、72H と 24H 群では対照側と比較して運動側で有意に高い値を示したが、8H 群では有意な変化は認められなかった。また、8H 群の運動側は、72H 群・24H 群の運動側よりも有意に低い値を示した。

## 筋タンパク質合成

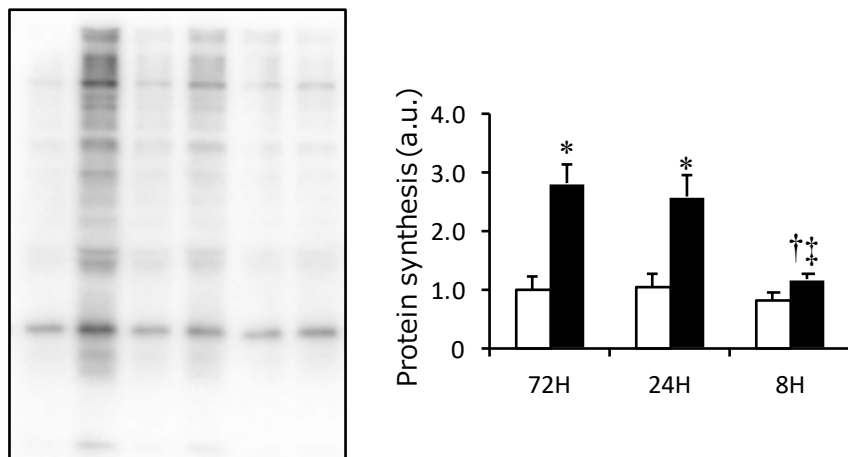


図3-4. 筋タンパク質合成

筋タンパク質合成。データは平均値±標準誤差で示している。\* $P < 0.05$  対照側との有意差。  
† $P < 0.05$  同側の72H群との有意差。‡ $P < 0.05$  同側の24H群との有意差。

### mTORC1 シグナル

筋タンパク質合成の結果から、回復時間を過剰に短縮させた場合、筋タンパク質合成が活性化しなくなることが明らかとなった。このメカニズムとして、レジスタンス運動における筋タンパク質合成を中心的に担うとされる、mTORC1 シグナルの不活化が関与している可能性が考えられる。従って、mTOR の上流に位置する Akt, mTORC1 の下流に位置する p70S6K, 4EBP-1, p70S6K の下流に位置する rpS6 のリン酸化型タンパク質量および総タンパク質量を測定した。

### Akt (図 3-5)

Akt のリン酸化型タンパク質の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、24H 群と 8H 群では対照側と比較して運動側で有意に高い値を示した。さらに、24H 群の運動側は、72H 群の運動側よりも有意に高い値を示した。また、8H 群の運動側は、72H 群・24H 群よりも有意に高い値を示した。Akt の総タンパク質の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。一方で、レジスタンス運動による正の主効果と、回復時間による主効果が認められた。多重比較の結果、72H 群に比較して 8H 群が有意に低値を示した。

### p70S6K (図 3-5)

p70S6K のリン酸化型タンパク質の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、全ての群で対照側と比較して運動側で有意に高い値を示した。さらに、24H 群の運動側は、72H 群の運動側よりも有意に高い値を示した。また、8H 群の運動速は、72H 群・24H 群よりも有意に高い値を示した。p70S6K の総タンパク質の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用、レジスタンス運動による主効果、回復時間による主効果は認められなかった。

#### rpS6 (図 3-5)

rpS6 のリン酸化型タンパク質の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、全ての群で対照側と比較して運動側で有意に高い値を示した。さらに、24H 群・8H 群の運動側は、72H 群よりも有意に高い値を示した。rpS6 の総タンパク質量に於いて、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかったが、レジスタンス運動による正の主効果は認められた。

#### 4EBP-1 (図 3-6)

4EBP-1 のリン酸化型タンパク質の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。一方で、運動による正の主効果・回復時間の短縮による主効果が認められた。多重比較の結果、72H 群と比較して 24H 群において有意に高値を示した。さらに、24H 群と比較して 8H 群において有意に低値を示した。4EBP-1 の総タンパク質の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、72H 群と 24H 群の運動側で、対照側と比較して有意に高い値を示した。さらに、24H 群の運動側は 72H 群よりも有意に高い値を示した。また、8H 群の運動側は、24H 群よりも有意に低い値を示した。4EBP-1 の  $\gamma$  アイソフォームの発現量を比較したところ、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、全ての群の運動側で、対照側と比較して有意に高い値を示し、さらに 24H 群と 8H 群の運動側は 72H 群よりも有意に高い値を示した。

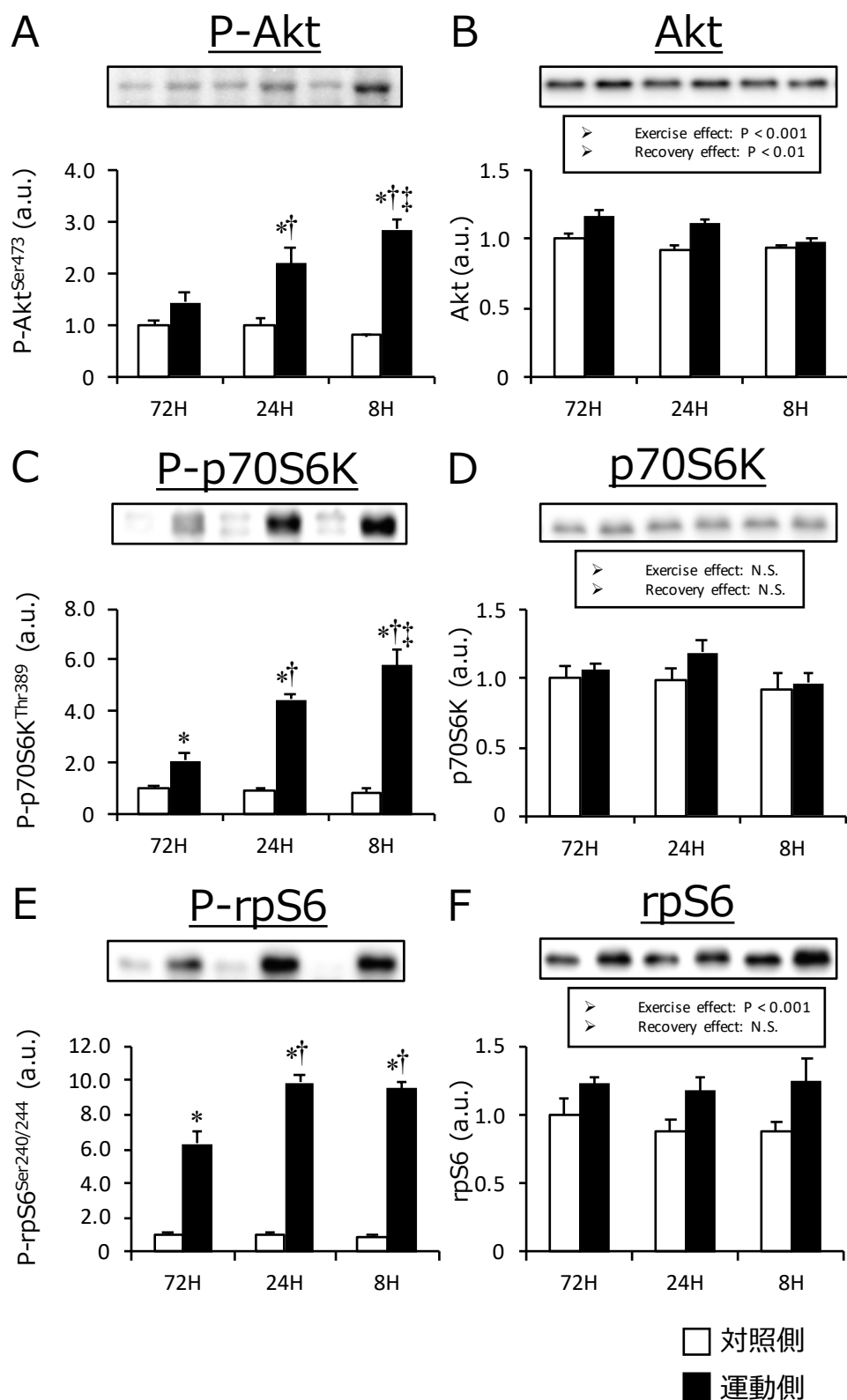


図3-5. mTORC1シグナル (1/2)

A : Aktのリン酸化型タンパク質発現量, B : Aktの総タンパク質発現量, C : p70S6Kのリン酸化型タンパク質発現量, D : p70S6Kの総タンパク質発現量, E : rpS6のリン酸化型タンパク質発現量, F : rpS6の総タンパク質発現量。データは平均値±標準誤差で示している。\*P < 0.05 対照側との有意差。†P < 0.05 同側の72H群との有意差。‡P < 0.05 同側の24H群との有意差。

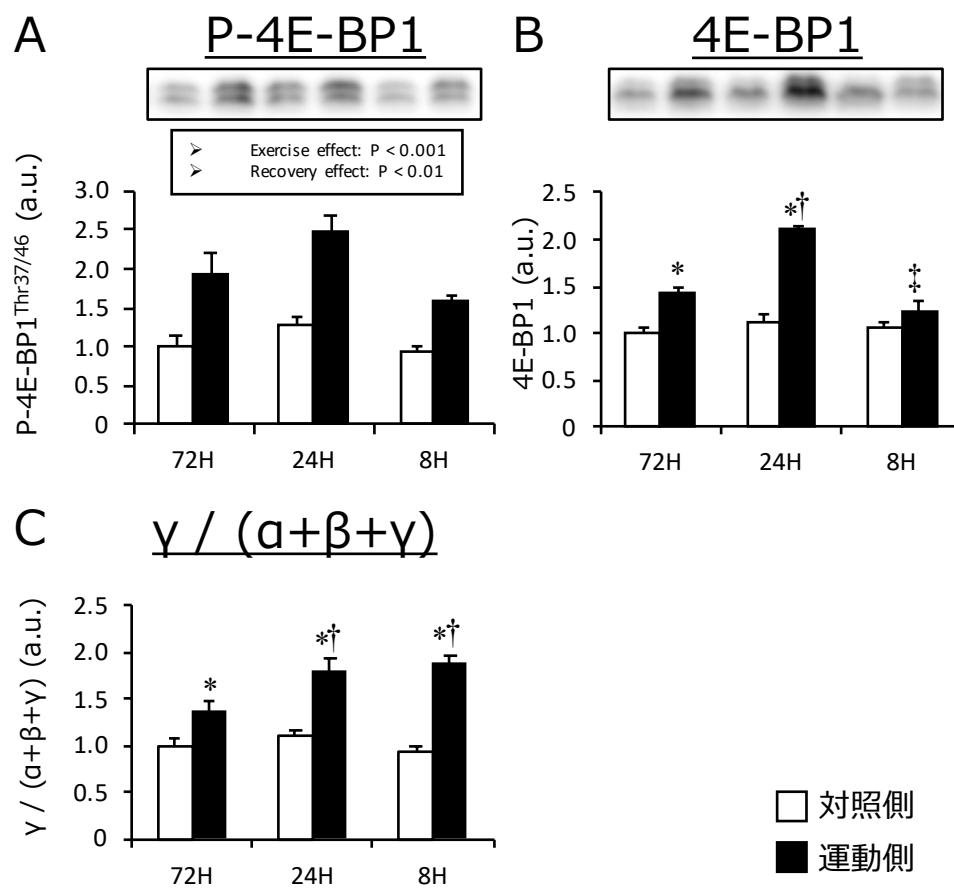


図3-6. mTORC1シグナル (2/2)

A : 4E-BP1のリン酸化型タンパク質発現量, B : 4E-BP1の総タンパク質発現量, C :  $\gamma$ アイソフォーム比。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示している。\* $P < 0.05$  対照側との有意差。† $P < 0.05$  同側の72H群との有意差。‡ $P < 0.05$  同側の24H群との有意差。

## unfolded protein response

これまでの結果から、回復時間を過剰に短縮した場合、mTOR シグナルの活性化は生じているにも関わらず、筋タンパク質合成は活性化されていないことが明らかとなった。この原因として、小胞体ストレスの亢進による eIF-2 $\alpha$  を介した翻訳抑制が関わっている可能性を考え、unfolded protein response の構成要素の一つである CHOP の発現量、さらに eIF-2 $\alpha$  のリン酸化型および総タンパク質量を測定した。

### CHOP (図 3-7)

CHOP の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、24H 群と 8H 群の運動側で対照側と比較して有意に高い値が示された。さらに、24H 群の運動側の発現量は 72H 群よりも有意に高い値を示した。また、8H 群の運動側の発現量は 72H 群・24H 群よりも有意に高い値を示した。

### eIF-2 $\alpha$ (図 3-7)

eIF-2 $\alpha$  のリン酸化型タンパク質の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。また、レジスタンス運動による主効果や回復時間による主効果も認められなかった。一方で、eIF-2 $\alpha$  の総タンパク質の発現量についても、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。また、レジスタンス運動による正の主効果が認められた。さらに回復時間による主効果も認められた。多重比較の結果、72H 群・24H 群と比較して、8H 群が有意に低値を示した。

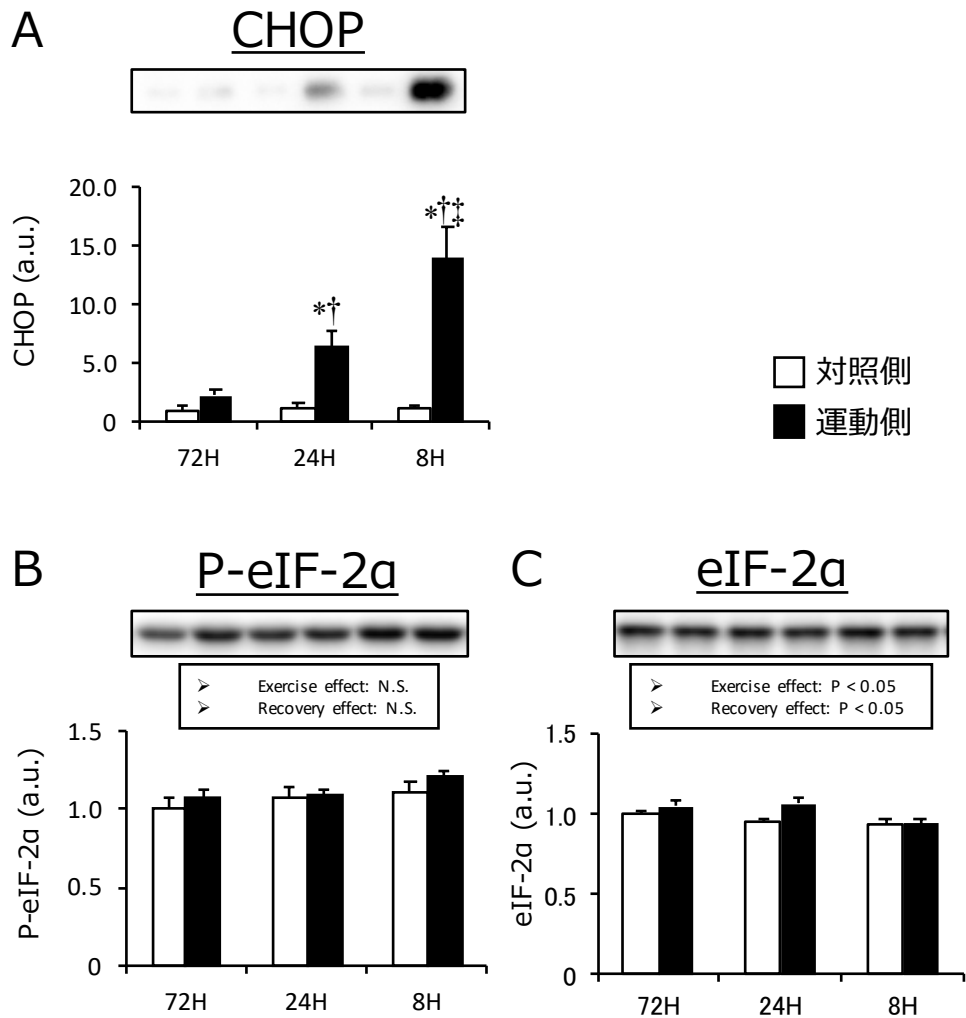


図3-7. Unfolded protein response

A : CHOPのタンパク質発現量, B : eIF-2αのリン酸化型タンパク質発現量, C : eIF-2αの総タンパク質発現量。データは平均値±標準誤差で示している。\*P < 0.05 対照側との有意差。†P < 0.05 同側の72H群との有意差。‡P < 0.05 同側の24H群との有意差。



### 酸化ストレス (図 3-8)

mTORC1 シグナル活性に依存しない筋タンパク質合成の活性化の抑制メカニズムとして、酸化ストレスに着目した。酸化ストレスの指標として、カルボニル化タンパク質量を測定したところ、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、8H 群の運動側でのみ対照側と比較して有意に高い値が示された。さらに、8H 群の運動側の発現量は、72H 群・24H 群よりも有意に高い値を示した。

## カルボニル化タンパク質

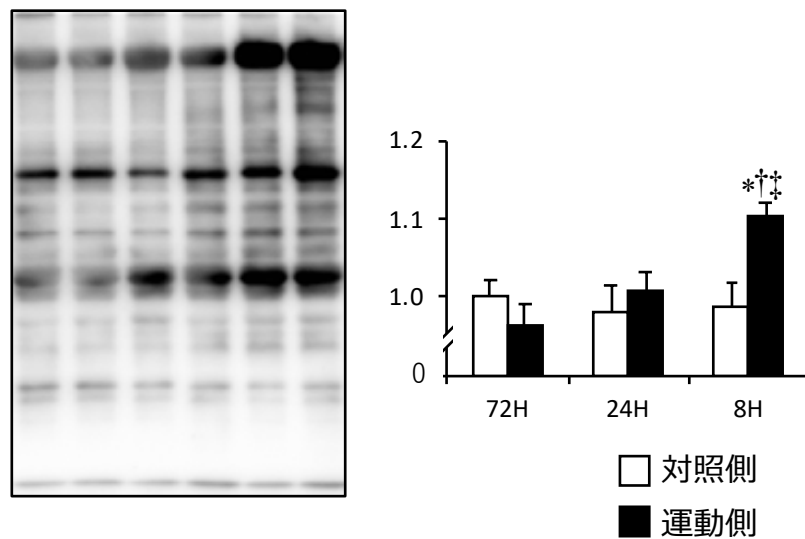


図3-8. 酸化ストレス

カルボニル化タンパク質発現量。データは平均値±標準誤差で示している。\* $P < 0.05$  対照側との有意差。† $P < 0.05$  同側の72H群との有意差。‡ $P < 0.05$  同側の24H群との有意差。

## リボソーム量

回復時間を過剰に短縮させた場合の筋タンパク質合成活性化の抑制メカニズムとして、リボソーム量の変化に着目し、リボソーム RNA・リボソームの転写因子である UBF について解析を行った。

### rRNA (図 3-9)

rRNA の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。一方で、レジスタンス運動による正の主効果が認められた。回復時間による主効果は認められなかった。

### UBF (図 3-9)

UBF のリン酸化型タンパク質の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、72H 群の運動側でのみ、対照側と比較して有意に高い値が示された。さらに、24H 群・8H 群の運動側の発現量は、72H 群よりも有意に低い値を示した。一方で、UBF の総タンパク質の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。また、レジスタンス運動による正の主効果は認められたが、回復時間による主効果は認められなかった。

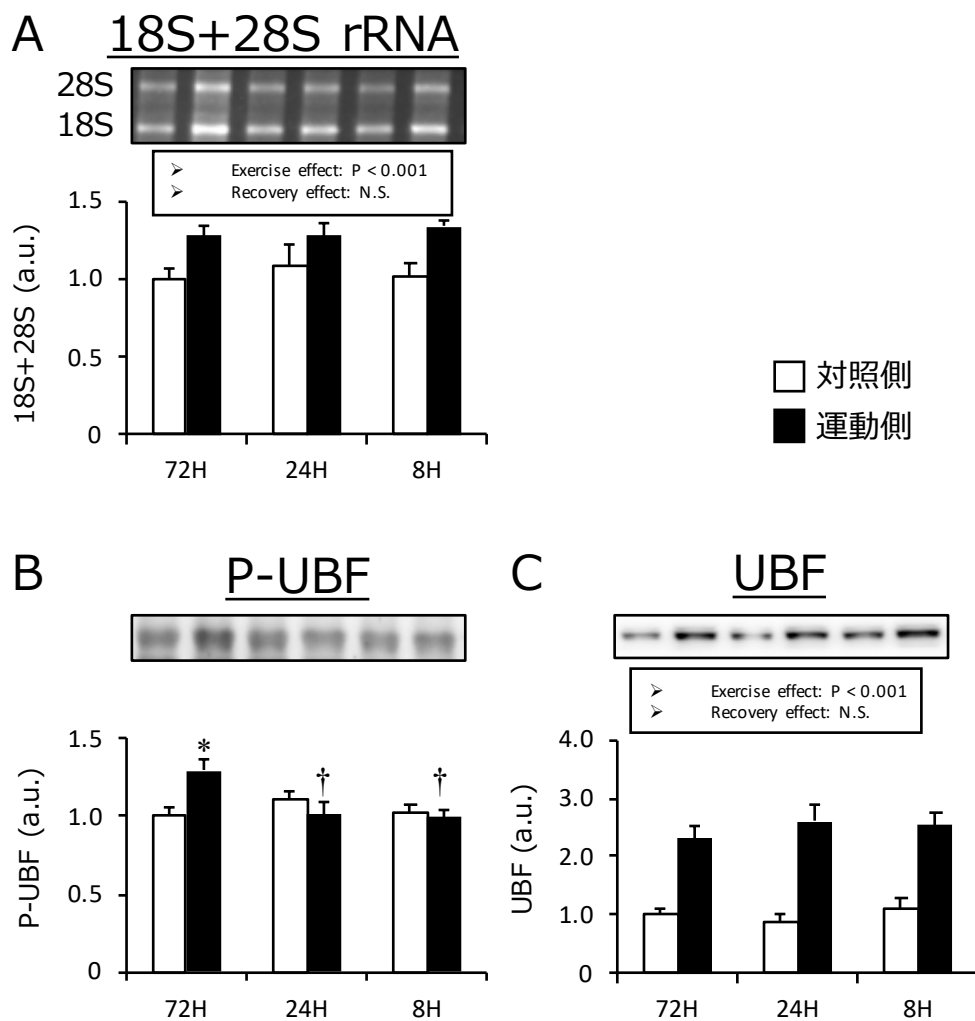


図3-9. リボソーム

A : 18S+28S rRNA発現量, B : UBFのリン酸化型タンパク質発現量, C : UBFの総タンパク質発現量。データは平均値±標準誤差で示している。\* $P < 0.05$  対照側との有意差。† $P < 0.05$  同側の72H群との有意差。‡ $P < 0.05$  同側の24H群との有意差。

## 考察

### 本実験における知見のまとめ

本実験では、セッション間の回復時間を短縮させた場合に、筋タンパク質合成およびその関連応答にどのような変化が生じるかを調べた。本研究により得られた主な所見は、以下の通りである：

1) 回復時間を極端に短縮させることにより、レジスタンス運動後の筋タンパク質合成の活性化が消失した、2) 回復時間の短縮に伴い、mTORC1 シグナルの活性化が亢進した、3) 回復時間の短縮に伴い、unfolded protein response は亢進したが、eIF-2 $\alpha$  のリン酸化は変化しなかった、4) 回復時間を極端に短縮させることにより、酸化ストレスの蓄積が生じた、5) 回復時間の変化によらず、リボソーム量は増加した。これらの所見は、回復時間の短縮させた場合でも、筋タンパク質合成応答は生じるが、過度に短縮させた場合には筋タンパク質合成応答を消失させ、筋肥大効果を消失させる可能性を示唆する。

### 回復時間と筋タンパク質合成

本実験において、回復時間を 24 時間まで短縮させた場合には、一般的な回復時間と変わらず筋タンパク質合成の活性化が生じていた（図 3-4）。従って、少なくとも筋タンパク質の合成応答については、回復時間を短縮させたとしても、通常と同程度の効果を得ることができると考えられる。一方で、回復時間を過剰に短縮させた場合には、筋タンパク質合成の活性化は生じなかった（図 3-4）。これは、筋タンパク質の同化応答が著しく阻害されていることを意味している。従って、少なくとも筋タンパク質合成の結果からは、回復時間を短縮させた場合にはレジスタンス運動効果獲得の早期化が期待されるが、過剰に短縮させた場合にはレジスタンス運動効果が消失することが考えられる。

### 回復時間と mTORC1 シグナル

mTORC1 シグナルは、先述の通り、レジスタンス運動における筋タンパク質合成応答を中心的に担うシグナルであると考えられてきた。従って、本実験においても、筋タンパク質合成の応答変化に対して mTORC1 シグナルの関与を考え、mTORC1 シグナル因子について解析を行った。その結果、rpS6 についてはプラトーに達している様相が伺えるも、Akt・p70S6K とともに回復時間の短縮に伴い、リン酸化が亢進していた（図 3-5, 3-6）。以上のことから、回復時間の短縮は mTORC1 シグナルの活性化を亢進させると考えられる。先行研究から、p70S6K のリン酸化型タンパク質の発現は、短い回復時間でレジスタンス運動を繰り返した場合にはリン酸化型タンパク質の蓄積が生じ、発現増加が生じるということが報告されている(25)。一方で Ogasawara らは、本研究で用いたものと同様のレジスタンス運動プロトコルにより、Akt のリン酸化型タンパク質の発現は運動後 6 時間以内で概ね消失するものの、p70S6K・rpS6 とともにリン酸化型タンパク質の発現は運動後 24 時間以上持続することを報告している(103)。従って、本研究においても、回復時間の短縮・回復時間の過剰な短縮により、タンパク質のリン酸化の蓄積が生じ、mTORC1 シグナルの活性化の亢進が生じたと考えられる。同時に、回復時間の過剰な短縮による筋タンパク質合成の活性化抑制には、mTORC1 シグナル活性の変化は関与しないと考えられる。

### 回復時間と unfolded protein response

先述の通り、unfolded protein response は小胞体ストレスの増大に応答して生じる反応であり、その主な役割はシャペロン産生と翻訳抑制による、小胞体ストレス蓄積の抑制である。先行研究から、レジスタンス運動を単回実施した場合に unfolded protein response が活性化することが明らかとなっている(106)。従って本研究においても、回復時間の短縮により unfolded protein response がより強く活性化され、翻訳抑制が生じることにより、タンパク質合成の活性化の抑制が生じている可能性を考え、解析を行った。その結果、unfolded protein response の中でシャペロン産生を担う系の上流因子の一つである CHOP の発現量は、回復時間の短縮に伴い増加していた。しかしながら、実際に翻

訳抑制を担う系の下流因子である eIF-2 $\alpha$  のリン酸化型タンパク質の発現量は、回復時間違いによる変化が認められなかった（図 3-7）。従って、unfolded protein response による訳抑制は、回復時間の極端な短縮による筋タンパク質合成活性化の抑制には関与しないと考えられる。一般的な小胞体ストレスの誘導剤である tunicamycin や thapsigargin を用いた場合には、シャペロン生成の系・訳抑制の系の両方が亢進する(31)。一方で、Ogborn らの報告においては、シャペロン生成の系は活性化されるものの、訳抑制の系は活性化されない(106)。これらのことから、レジスタンス運動によって、訳抑制の系に対する抑制が生じている可能性も考えられる。また、回復時間を短縮させた 24H 群においても CHOP の発現量が増加していることから、回復時間を短縮させた場合でも筋タンパク質合成は生じているものの、小胞体ストレス自体は増加しており、効率的な同化応答は阻害されている可能性も考えられる。

#### 回復時間と酸化ストレス

筋タンパク質合成の活性化を抑制する因子として、酸化ストレスに着目した。酸化ストレスは、酸化レベルと抗酸化レベルの不均衡により生じるストレスである(70)。先行研究において、長期的にレジスタンストレーニングを実施した場合、抗酸化容量が高まり、レジスタンス運動後の酸化ストレスが抑制されることが明らかとなっている(19, 125)。しかしながら、Haraguchi らにより、消耗性のレジスタンストレーニングにより、骨格筋中の酸化ストレスレベルが増加することが報告されている(55)。筋管細胞や他の細胞を対象とした先行研究において、酸化ストレスが eIF のフォームーションの阻害や eIF-2 $\alpha$  のリン酸化、mTORC1 シグナルの抑制など、様々な機構により、一般的な訳活性やタンパク質合成を抑制することが示されている(109, 110, 112, 128)。本研究においても、酸化ストレスの指標としてカルボニル化タンパク質の発現量を測定したところ、回復時間を過剰に短縮した 8H 群においてのみ、運動により発現量の増加が認められた（図 3-8）。この結果から、回復時間を過剰に短縮させてレジスタンス運動を繰り返した場合には、酸化ストレスの増加に特徴づけられるような消耗性の状態を惹起し、これが訳活性と筋タンパク質合成を阻害した可能性が考えられる。

## 回復時間とリボソーム量

筋タンパク質合成の活性化を抑制する因子として、リボソーム量に着目し、解析を行った。前述の通り、リボソームは細胞内のタンパク質合成装置であり、リボソームの量に決定される翻訳容量と、mTORC1 シグナルを始めとする様々な因子により決定される翻訳活性によって、タンパク質合成の活性は変化する。従って、本研究における回復時間の過剰な短縮による筋タンパク質合成の抑制にも、リボソーム量が関与している可能性が考えられる。UBF のリン酸化は、リボソーム生合成を担う因子の一つである(5)。UBF のリン酸化型タンパク質の発現量は、通常のリボソーム回復時間の場合のみで増加していた (図 3-9)。しかしながら、ヒトを対象とした先行研究で、2 ヶ月間のレジスタンストレーニングを行った後の安静期には UBF のリン酸化型タンパク質量の増大が生じているが、運動 1 時間後にはリン酸化型タンパク質量は減少し、トレーニング前と差がないことが報告されている(39)。このことから、3 セッション目の 6 時間後である本研究においては、リン酸化型タンパク質の発現増加が抑制されており、正確な比較が困難な時点であった可能性が考えられる。一方で、リボソーム量の指標として用いられる rRNA 量を測定したところ、回復時間の短縮によらず、運動によって増加していた (図 3-9)。これらのことから、少なくとも 72 時間から 8 時間までの回復期間であれば、リボソーム量は大きな差なく増加することが明らかとなり、回復時間の過剰な短縮に伴う筋タンパク質合成活性化の抑制に関与する可能性は低いことが示された。

## まとめ

以上のことから、同一のセッション数で、セッション間の回復時間を短縮させた場合 (72 時間から 24 時間) には、レジスタンス運動における筋タンパク質合成を中心的に担う mTORC1 シグナル活性化は高まるものの、実際の筋タンパク質合成の活性化の程度には差がないことが示された。加えて、unfolded protein response の一角を担う CHOP の発現増加なども生じることから、セッション当たりの運動効果は同等に得られるものの、小胞体ストレスの蓄積を生じさせていることが示された。このことから、回復時間の短縮は、長期的にレジスタンス運動を繰り返した場合には効果の早



期化を導くものの、単回当たりの運動効果はある程度非効率化していると考えられる。一方で、セッション間の回復時間を過剰に短縮させた場合（8 時間）には、mTORC1 シグナルの高い活性化が得られるものの、実際の筋タンパク質合成の活性化は生じないことが示された。さらにそのメカニズムとして、消耗性の運動による酸化ストレスの蓄積が関与している可能性が示された。このことから、回復時間の過剰な短縮は、レジスタンス運動の効果を消失させていると考えられる。

## 実験③：セッション間の回復時間の違いが、筋タンパク質分解系に与える影響の検討

### 緒言

骨格筋において、筋タンパク質の分解は合成とともに筋タンパク質代謝バランスの決定因子である。第 2 章において、短い回復時間でレジスタンス運動を繰り返した場合、筋タンパク質分解を中心に担う、ユビキチン・プロテアソーム系と、オートファジーが亢進していることが示された。しかしながら、その際のサンプリングポイントは最終セッションの終了後から 48 時間後であり、セッションの反復を終えた時期に相当する。従って、第 2 章で認められた現象は、長期的なレジスタンス運動の反復、並びに、レジスタンストレーニングにおける骨格筋の量的変化を担うプロセスにおいては、一時的かつ特定の時間点であったと考えられる。従って、運動反復・トレーニングのプロセスの最中に、回復時間の長短によって筋タンパク質分解系がどのような変化を生じるかを明らかにする必要がある。

第 3 章の実験②の結果から、レジスタンス運動を繰り返し実施する際、回復時間の短縮に伴い mTORC1 シグナルの活性が高くなることが明らかとなった。mTORC1 の上流に位置する Akt は、ユビキチンリガーゼの転写因子である FoxO の抑制因子として作用することが明らかとなっている(124)。一方で、FoxO は、オートファジーの活性化を担うことも明らかとなっている(122)。従って、mTORC1 シグナルの活性化が亢進する、短い回復時間のレジスタンス運動を繰り返し実施している最中には、Akt のリン酸化によって FoxO への抑制が生じ、ユビキチン・プロテアソーム系・オートファジーの双方が、抑制されている可能性が考えられる。

一方で、第 2 章の結果から、回復時間の違いによる AMPK のリン酸化の変化は認められなかったが、急性期には回復時間の短縮に伴いリン酸化が亢進している可能性が考えられる。先行研究から、AMPK のリン酸化は、FoxO の脱リン酸化を促進し、ユビキチン・プロテアソーム系を活性化させること(97, 100)、さらにオートファジーを活性化させることが明らかとなっている(122)。従っ

て、短い回復時間でレジスタンス運動を繰り返し実施している最中には、AMPK のリン酸化によってユビキチン・プロテアソーム系・オートファジーの活性化が生じている可能性も考えられる。

以上のことから、実験③では、回復時間の短縮に伴う筋タンパク質分解系と、それに関連する因子の変化を明らかにすることを目的とした。また、腓腹筋においても実験②とほぼ同様の応答が得られたため、本実験では対象を腓腹筋へと変更した。なお、絶食は顕著にオートファジーを活性化することが知られている。従って、本研究では絶食によるオートファジーへの影響を可能な限り排除するため、運動前の絶食時間を一晩から 3 時間へと短縮して検討を行った。

## 材料と方法

### 実験動物

第3章 実験①と同様。

### 実験プロトコル

マウスを無作為に、レジスタンス運動を72時間毎に行う群（72H群）、24時間毎に行う群（24H群）、8時間毎に行う群（8H群）に分類した。全ての動物に3セッションのレジスタンス運動を実施させた。なお、最終セッションの3時間前からは絶食とした。各群最終のレジスタンス運動から6時間後（全群のトレーニング中の評価を行うが、8H群では最終セッションから8時間以内にサンプリングをしなければならなかったため）に、イソフルラン吸入麻酔薬の投与下で頸椎脱臼により屠殺した（図3-10）。解析に用いるサンプルとして、腓腹筋を採取し、即座に液体窒素で凍結した後、-80°Cで保管した。

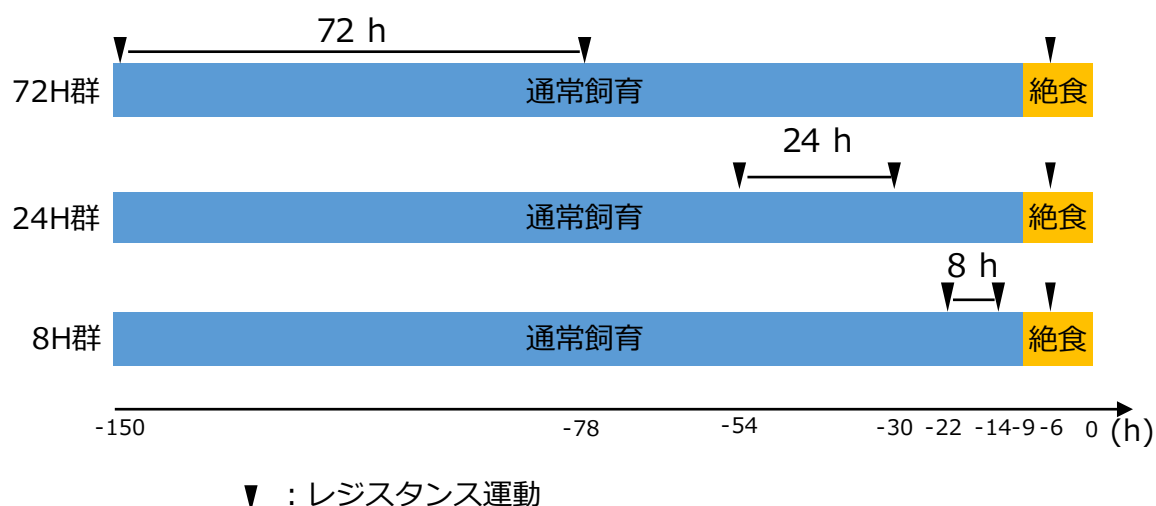


図3-10. 3章-実験③における実験プロトコル

### 筋収縮方法

骨格筋の収縮は、先行研究(103)を参考として実施した。イソフルランの吸入投与による麻酔下にて、各マウスの右脚下腿部を剃毛し、アルコール綿で拭いた。その後、マウスを伏臥位で右脚をプ

レートに足関節角度 90°で固定し、表面電極（ビトロード V，日本光電，日本）を腓腹筋外側部と内側部に貼付し、電気刺激装置（SEN-3301，日本光電，日本）とアイソレータ（SS-104J，日本光電，日本）に接続した。

### レジスタンス運動プロトコル

マウスの右腓腹筋に対して、電気刺激にて等尺性筋収縮を誘発した。先行研究を参考に(103)、全ての運動セッションにおいて、電気刺激による筋収縮を、3 秒間 10 回を 1 セットとし、3 分間の休息を設けて 5 セット実施した。電気刺激は 100 Hz にて行い、デュレーションは 500  $\mu$ s で実施した。

### ウエスタンブロッティング

第 2 章と同様。使用した一次抗体は表 3-3 の通り。

### 定量的リアルタイム PCR

第 2 章と同様。使用したプライマーは表 3-4 の通り。

### 筋グリコーゲン量

筋グリコーゲン量は、フェノール硫酸法により測定した。まず、筋サンプルを 30 % KOH 溶液にて 98 °C で溶解し、その後エタノールと混合した。4 °C にて 30 分間インキュベートし、860 g で 20 分間、4 °C にて遠心分離した。上清を捨て、沈殿物を乾燥し、蒸留水にて溶解後、5 % フェノール溶液・硫酸と混合し、室温にて 10 分間インキュベートした後、吸光度計 ( $\lambda = 490$  nm) を用いて吸光度を測定し、グルコース標準液の吸光度から得られた検量線を用いて骨格筋内のグリコーゲン濃度を算出した。

### 統計処理

第 3 章 実験②と同様。

表 3-3. 一次抗体リスト (実験③)

標的タンパク質	メーカー	型番	希釈
Ubiquitin	Cell Signaling Technology	#3933	1:1000
p-FoxO3a <sup>Ser253</sup>	Cell Signaling Technology	#9466	1:1000
t-FoxO3a	Cell Signaling Technology	#2497	1:1000
p-FoxO1 <sup>Ser256</sup>	Cell Signaling Technology	#84192	1:1000
t-FoxO1	Cell Signaling Technology	#2880	1:1000
LC3	Cell Signaling Technology	#2775	1:1000
p62	Medical & Biological Laboratory	PM045	1:1000
p-ULK1 <sup>Ser757</sup>	Cell Signaling Technology	#14202	1:1000
p-ULK1 <sup>Ser555</sup>	Cell Signaling Technology	#5869	1:1000
t-ULK1	Cell Signaling Technology	#8054	1:1000

表 3-4. プライマーリスト (実験③)

標的mRNA	Forward	Reverse
Atrogin-1 / MAFbx	TGAGCGACCTCAGCAGTTAC	TTCTCTTCTTGGCTGCGACG
MuRF-1 / Trim63	AGTGTCCATGTCTGGAGGTCGTTT	ACTGGAGCACTCCTGCTTGTAGAT
GAPDH	GTGAAGGTCGGTGTGAACG	ATTTGATGTTAGTGGGGTCTCG

## 結果

### ユビキチン・プロテアソーム系

主要な筋タンパク質分解系の一つとして、ユビキチン・プロテアソーム系について解析を行った。ユビキチン・プロテアソーム系の構成要素として、ユビキチン化タンパク質の発現量，ユビキチンリガーゼである Atrogin-1・MuRF-1 の mRNA 発現量，FoxO1・FoxO3a の脱リン酸化を測定した。

#### ユビキチン化タンパク質 (図 3-11)

ユビキチン化タンパク質の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、24H 群と 8H 群の運動側で対照側と比較して有意に高い値が示された。さらに、8H 群の運動側の発現量は 72H 群よりも有意に高い値を示した。

#### Atrogin-1 (図 3-11)

Atrogin-1 の mRNA の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。また、レジスタンス運動による負の主効果が認められた。回復時間による主効果は認められなかった。

#### MuRF-1 (図 3-11)

MuRF-1 の mRNA の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。また、レジスタンス運動による主効果は認められなかった。一方で、回復時間の短縮による主効果が認められたが、多重比較の結果、群間に有意差は認められなかった。

#### FoxO1 (図 3-12)

FoxO1 のリン酸化型タンパク質 (Ser256) の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。また、レジスタンス運動による負の主効果が認められた。一方で、

回復時間の短縮による主効果は認められなかった。FoxO1 の総タンパク質の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。また、レジスタンス運動や回復時間による主効果も認められなかった。一方で、FoxO1 のリン酸化率において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。さらに、レジスタンス運動や回復時間による主効果も認められなかった。

#### FoxO3a (図 3-13)

FoxO3a のリン酸化型タンパク質 (Ser253) の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。また、レジスタンス運動による正の主効果が認められた。一方で、回復時間の短縮による主効果は認められなかった。また、FoxO3a の総タンパク質の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、8H 群の運動側で、対照側と比較して有意に低い値が示された。さらに、8H 群の運動側において、72H 群よりも有意に低い値を示した。一方で、FoxO3a のリン酸化率において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。また、レジスタンス運動による正の主効果が認められた。一方で、回復時間の短縮による主効果は認められなかった。



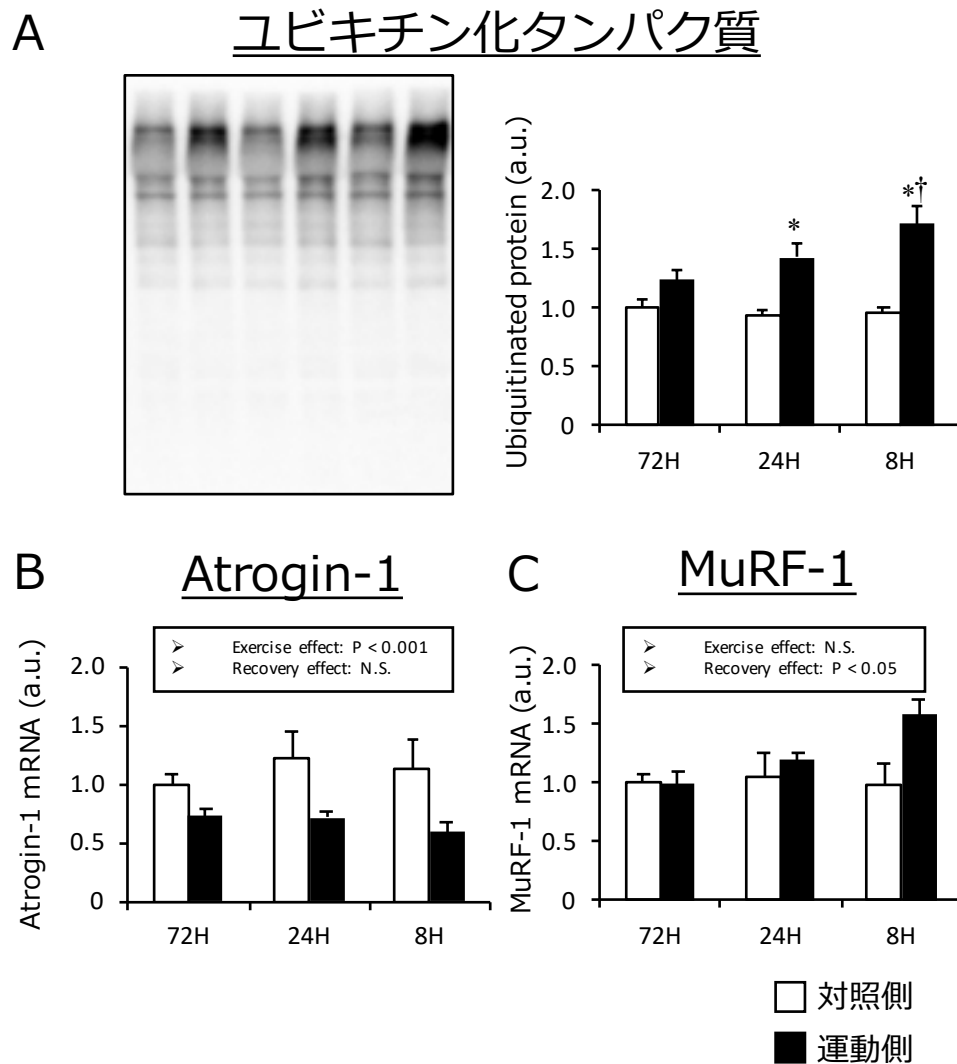


図3-11. ユビキチン・プロテアソーム系 (1/3)

A : ユビキチン化タンパク質発現量, B : Atrogin-1 mRNA発現量, C : MuRF-1 mRNA発現量。データは平均値±標準誤差で示している。\* $P < 0.05$  対照側との有意差。† $P < 0.05$  同側の72H群との有意差。‡ $P < 0.05$  同側の24H群との有意差。

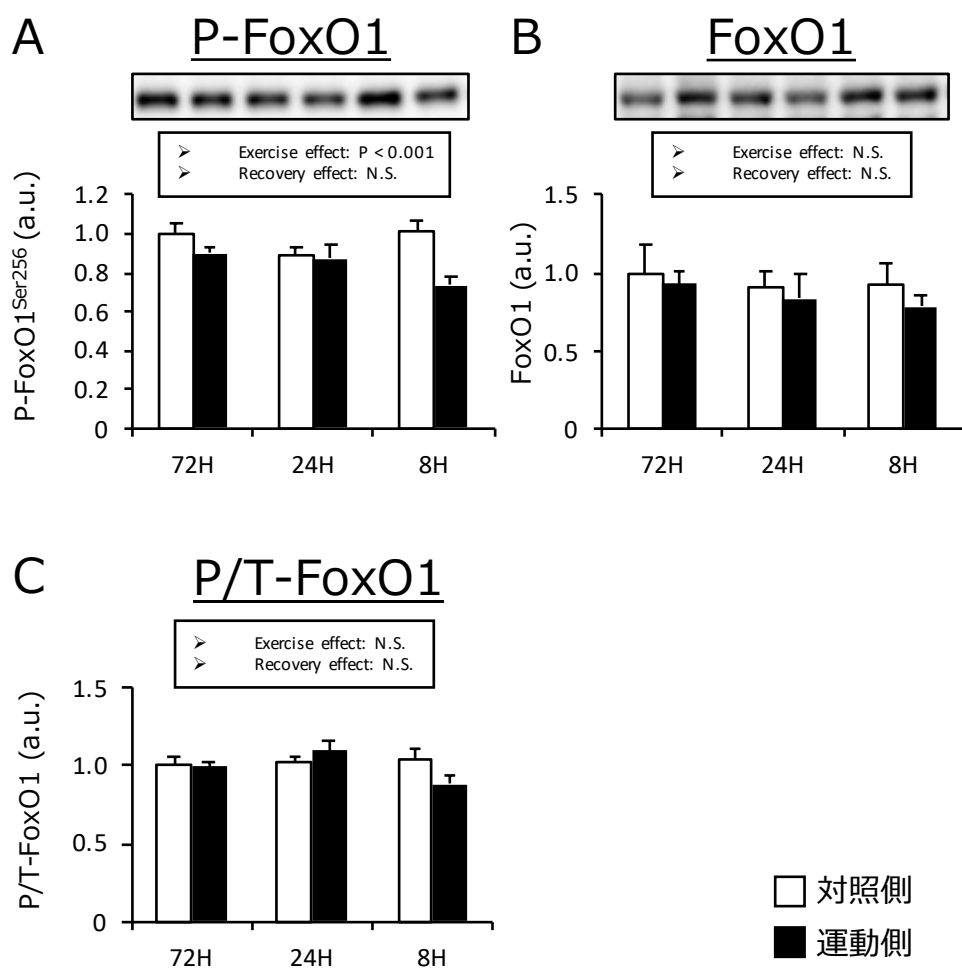


図3-12. ユビキチン・プロテアソーム系 (2/3)

A : FoxO1のリン酸化型タンパク質発現量, B : FoxO1の総タンパク質発現量, C : FoxO1のリン酸化率。データは平均値±標準誤差で示している。\* $P < 0.05$  対照側との有意差。† $P < 0.05$  同側の72H群との有意差。‡ $P < 0.05$  同側の24H群との有意差。

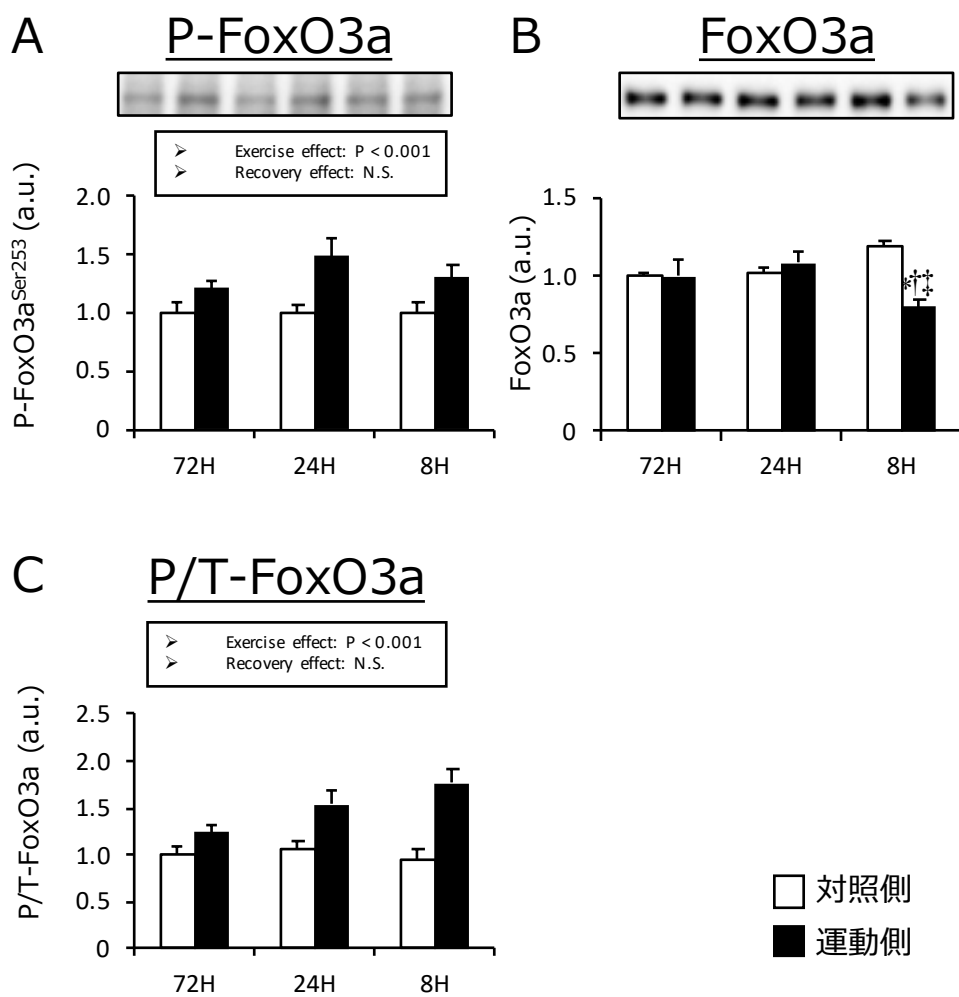


図3-13. ユビキチン・プロテアソーム系 (3/3)

A : FoxO1のリン酸化型タンパク質発現量, B : FoxO1の総タンパク質発現量, C : FoxO1のリン酸化率。データは平均値±標準誤差で示している。\* $P < 0.05$  対照側との有意差。† $P < 0.05$  同側の72H群との有意差。‡ $P < 0.05$  同側の24H群との有意差。

## オートファジー

主要な筋タンパク質分解系の一つとして、オートファジーについて解析を行った。オートファジーの構成要素として、オートファゴソーム形成の指標である LC3-I, LC3-II, p62 の発現量, オートファゴソーム形成の上流因子である ULK のリン酸化タンパク質・総タンパク質の発現量について測定を行った。

### LC3 (図 3-14)

LC3-I の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、全ての群において、運動側で対照側と比較して有意に高い値が認められた。さらに、8H 群の運動側において、72H 群・24H 群よりも有意に高い値を示した。一方で、LC3-II の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。また、レジスタンス運動による負の主効果が認められたが、回復時間の短縮による主効果は認められなかった。

### p62 (図 3-14)

p62 の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、全ての群において運動側で対照側と比較して有意に高い値が認められた。さらに、24H 群の運動側において、72H 群よりも有意に高い値を示した。また、8H 群の運動側において、72H 群よりも有意に高い値を示したものの、24H 群よりも有意に低い値を示した。

### ULK1 (図 3-15)

ULK1 のリン酸化型タンパク質 (Ser757) の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。一方で、レジスタンス運動による正の主効果は認められたが、回復時間の短縮による主効果は認められなかった。また、ULK1 の別サイトのリン酸化型タンパク質 (Ser555) の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。

一方で、レジスタンス運動による正の主効果は認められたが、回復時間の短縮による主効果は認められなかった。さらに、ULK1 の総タンパク質の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。一方で、レジスタンス運動による負の主効果は認められたが、回復時間の短縮による主効果は認められなかった。

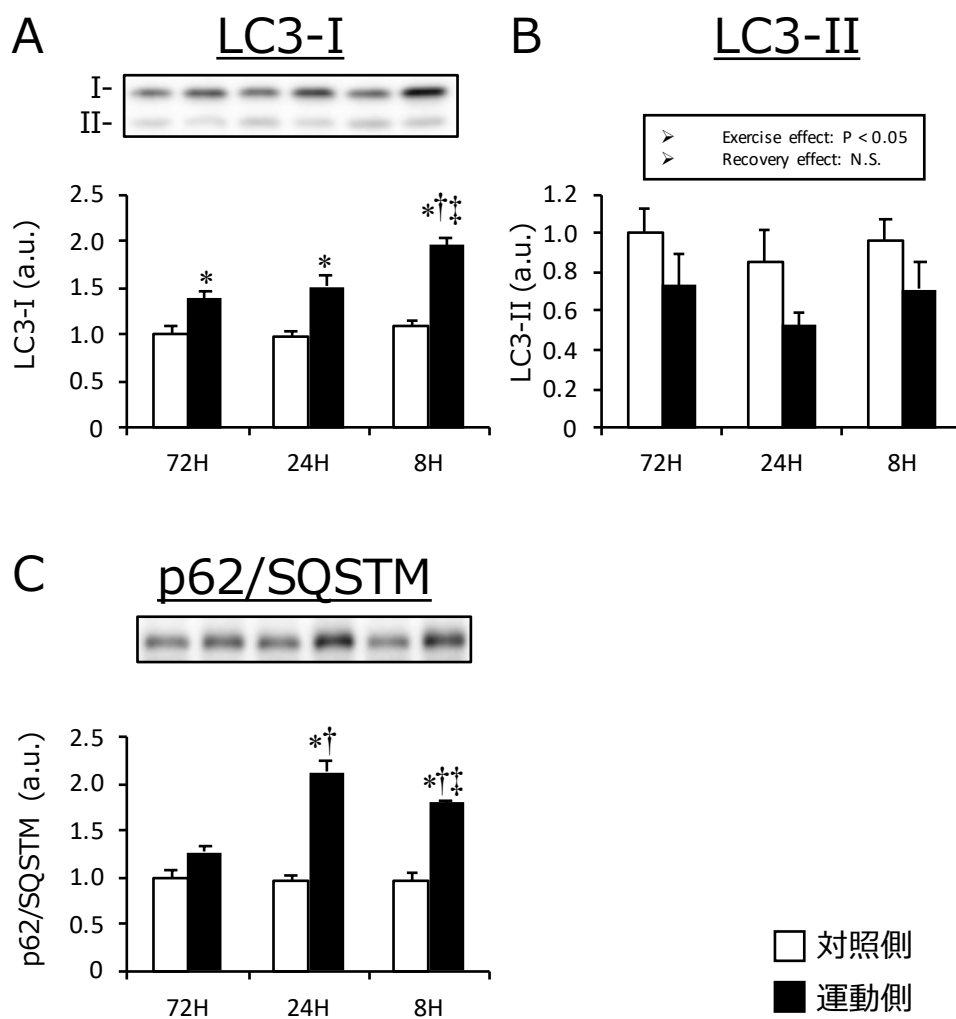


図3-14. オートファジー (1/2)

A : LC3-Iのタンパク質発現量, B : LC3-IIのタンパク質発現量, C : p62/SQSTMの総タンパク質発現量。データは平均値±標準誤差で示している。 $*P < 0.05$  対照側との有意差。 $\dagger P < 0.05$  同側の72H群との有意差。 $\ddagger P < 0.05$  同側の24H群との有意差。

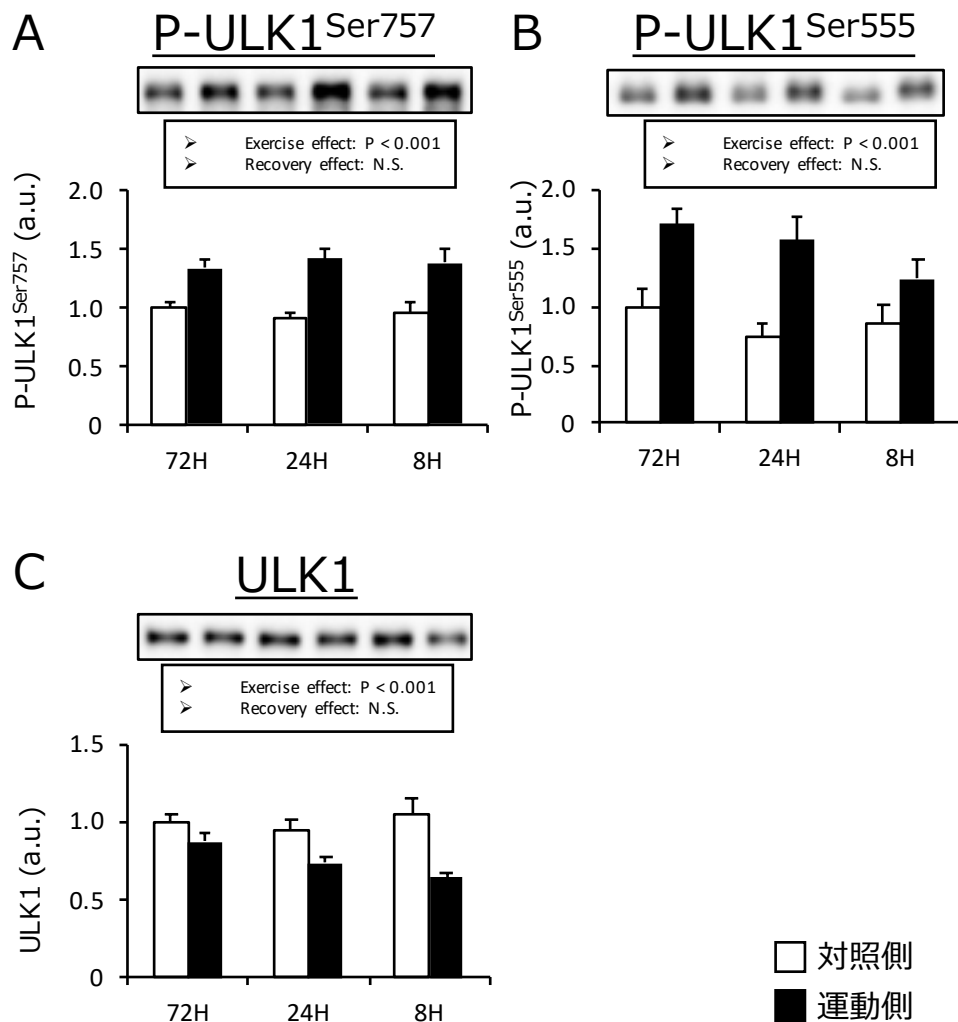


図3-15. オートファジー (2/2)

A : ULK1のリン酸化型タンパク質発現量 (Ser757) , B : ULK1のリン酸化型タンパク質発現量 (Ser555) , C : ULK1の総タンパク質発現量。データは平均値±標準誤差で示している。\* $P < 0.05$  対照側との有意差。† $P < 0.05$  同側の72H群との有意差。‡ $P < 0.05$  同側の24H群との有意差。

### AMPK (図 3-16)

ユビキチン・プロテアソーム系とオートファジーを活性化させる上流因子として、AMPK について解析を行った。AMPK のリン酸化型タンパク質 (Thr172) の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、24H 群と 8H 群の運動側において、対照側と比較して有意に高い値が示された。さらに、24H 群の運動側の発現量は 72H 群よりも有意に高い値を示した。また、8H 群の運動側の発現量は 72H 群・24H 群よりも有意に高い値を示した。一方で、AMPK の総タンパク質の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。一方で、レジスタンス運動や回復時間による主効果も認められなかった。

### 筋グリコーゲン (図 3-17)

AMPK のリン酸化を促す因子として、筋グリコーゲンについて解析を行った。腓腹筋中の筋グリコーゲン量 (筋湿重量当たりのグルコース量) において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。また、レジスタンス運動や回復時間による主効果も認められなかった。

### NF- $\kappa$ B (図 3-18)

ユビキチン・プロテアソーム系とオートファジーを活性化させる因子として、炎症反応のメディエーターである NF- $\kappa$ B について解析を行った。NF- $\kappa$ B の発現量において、レジスタンス運動と回復時間の間に交互作用は認められなかった。また、レジスタンス運動による主効果は認められなかった。一方で、回復時間による主効果は認められたが、多重比較の結果、群間に有意差は認められなかった。



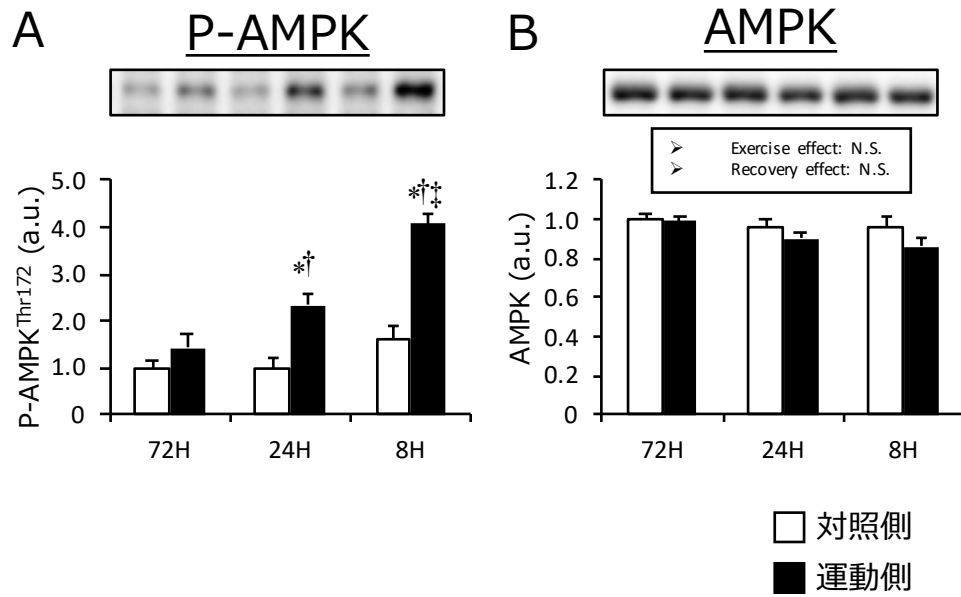


図3-16. AMPK

A : AMPKのリン酸化型タンパク質発現量, B : AMPKの総タンパク質発現量。データは平均値±標準誤差で示している。\*P < 0.05 対照側との有意差。†P < 0.05 同側の72H群との有意差。‡P < 0.05 同側の24H群との有意差。

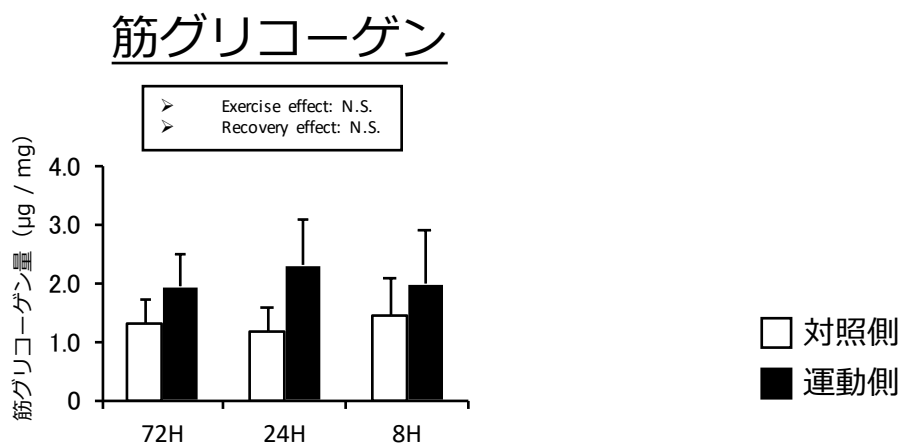
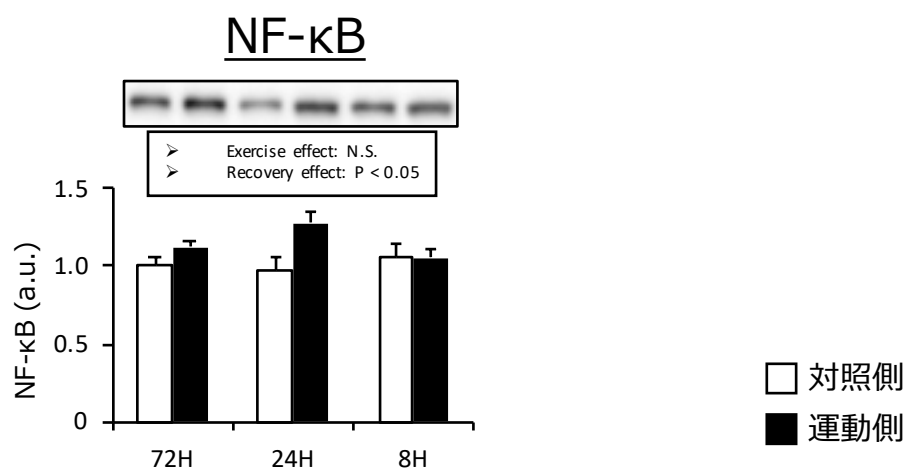


図3-17. 筋グリコーゲン

腓腹筋中の筋グリコーゲン量。データは平均値±標準誤差で示している。\*P < 0.05 対照側との有意差。†P < 0.05 同側の72H群との有意差。‡P < 0.05 同側の24H群との有意差。



**図3-18. NF-κB**

NF-κBのタンパク質発現量。データは平均値±標準誤差で示している。\*P < 0.05 対照側との有意差。†P < 0.05 同側の72H群との有意差。‡P < 0.05 同側の24H群との有意差。

## 考察

### 本実験における知見のまとめ

本実験では、セッション間の回復時間を短縮させた場合に、筋タンパク質分解系およびその関連応答にどのような変化が生じるかを調べた。本研究により得られた主な所見は、以下の通りである：1) 回復時間を極端に短縮させることにより、レジスタンス運動後の筋タンパク質のユビキチン化が亢進した、2) 回復時間の短縮に伴い、AMPK のリン酸化が亢進した。これらの所見は、回復時間を短縮した場合、筋タンパク質分解系が亢進し、筋肥大効果を減弱させる可能性を示唆する。

### 回復時間とユビキチン・プロテアソーム系

主要な筋タンパク質分解系の一つとして、ユビキチン・プロテアソーム系に含まれる因子について解析を行った。ユビキチン・プロテアソーム系の主な指標として用いられる、ユビキチン化タンパク質について測定した結果、回復時間の短縮による発現量の増加が認められた（図 3-11）。従って、運動セッションの繰り返しの最中にも筋タンパク質のユビキチン化が亢進することが明らかとなった。さらに、タンパク質のユビキチン化を促す筋特異的ユビキチンリガーゼである Atrogin-1 の mRNA の発現量を測定したところ、回復時間の短縮に関わらず発現量が減少する結果が得られた（図 3-11）。一方、もう一つの筋特異的ユビキチンリガーゼである MuRF-1 の mRNA 発現量を測定したところ、回復時間の短縮に伴う発現量の増加が認められた（図 3-11）。これらの結果から、セッションの繰り返し回復時間の短縮に伴う筋タンパク質のユビキチン化促進については、MuRF-1 の発現増加が関与している可能性が示唆された。ヒトを対象とした実験で、Mascher らは、レジスタンス運動を繰り返し実施した場合、1 回目から 2 回目にかけて、Atrogin-1 の mRNA 発現量が減少していくことを報告している(86)。一方で、同じ報告内で、MuRF-1 の発現量は運動により増加するが、その増加量は運動の繰り返しにより減少していくことを報告している(86)。これらのことから、Atrogin-1 の mRNA の発現量の変化は回復時間の違いに依存せず、運動によって減少すること、さらに MuRF-1 の発現量の増加量は、回復時間の短縮によって増加することが示唆される。

さらに、筋特異的ユビキチンリガーゼの転写因子である FoxO1・FoxO3a についても解析を行った。FoxO は、脱リン酸化されることで核内へと移行し、ユビキチンリガーゼの転写を促進する。従って、これらのリン酸化率について比較検討した。その結果、FoxO1 については運動の有無・回復時間の違いによる変化は認められなかった（図 3-12）。一方で、FoxO3a については、回復時間の違いによらず、運動によってリン酸化が亢進していた（図 3-13）。従って、少なくとも今回得られたデータからは、いずれの因子がユビキチンリガーゼの転写、並びに筋タンパク質のユビキチン化を亢進していたかは判断できない。現在まで、レジスタンス運動後の FoxO1 の変化についてはあまり報告がなされていない。一方で、先行研究から、単回のレジスタンス運動後の FoxO3a のリン酸化タンパク質の発現量は、運動直後から増加することが報告されている(4)。従って、少なくとも FoxO3a については、今回のタンパク質ユビキチン化には関与しない可能性が考えられ、FoxO1 の詳細な変化を今後解明していく必要があると考える。

#### 回復時間とオートファジー

もう一つの主要な筋タンパク質分解系として、オートファジーについて解析を行った。オートファゴソーム形成量と正の相関がある LC3-II の発現量は、回復時間に関わらず、運動により減少していた（図 3-14）。ヒトを対象とした先行研究において、単回のレジスタンス運動を行った後、LC3-II の発現量は運動後 3-24 時間の間は減少することが報告されている(44)。本研究におけるサンプリングの時間点は運動後 6 時間であることから、LC3-II については、全ての群において最終セッションの運動の影響を受け、発現量が減少していた可能性が考えられる。一方で、p62 は選択的オートファジーを行うために形成されたオートファゴソームと LC3 を結合させる基質として作用する(107)。本研究において、p62 の発現量は回復時間を短縮させた群において増加していた。従って、回復時間の短縮によって選択的オートファジーが亢進していた可能性が考えられる。回復時間を過剰に短縮させた場合には、p62 は増加しているものの、その発現量は回復時間を短縮させた場合よりも低かった（図 3-14）。このことから、選択的オートファジーが亢進しているが、その程度は回復時間を過剰に短縮することで減弱する可能性が示唆される。一方で、LC3 の結果も鑑みると、回

回復時間を過剰に短縮することでオートファゴソームの分解量が増加し、p62 が分解された可能性も示唆される。加えて、回復時間の違いに加え、総加入期間の違いによって、8 時間群では p62 を申請する時間が不十分であった可能性も考えられる。これらの点については今後より詳細に分析・考察を行う必要があるだろう。本実験ではさらに、オートファジーの系における上流因子である、ULK1 の活性化（リン酸化）について解析を行った。ULK はそのリン酸化サイトによって作用が大きく異なる。Ser757 残基は mTORC1 シグナルの下流に存在し、オートファゴソーム形成を抑制する作用を有する。しかし本研究において、回復時間の短縮に伴い mTORC1 シグナル活性は高まっているにも関わらず、ULK1 の Ser757 のリン酸化型タンパク質発現量は運動によって増加したのみであり、回復時間の違いによる変化は認められなかった（図 3-15）。従って、運動によるオートファジーへの抑制は生じていたものの、少なくとも最終セッションの 6 時間後という時点では、抑制の程度には差はないことが考えられる。一方で、Ser555 残基は AMPK 等の因子の下流に存在し、オートファゴソーム形成を促進する作用を有する。しかしながらこのリン酸化サイトについても同様に、運動による増加が認められたのみであり、回復時間の違いによる変化は認められなかった（図 3-15）。従って、少なくともこの時点においては、オートファジーの促進の程度にも差がないことが考えられる。以上のことから、レジスタンス運動を繰り返し実施した場合には、回復時間の違いによらずオートファゴソーム形成は減少するが、回復時間の短縮によって選択的オートファジーが活性化する可能性が示唆された。

## 回復時間と AMPK

回復時間の短縮に伴うユビキチン・プロテアソーム系及びオートファジーの亢進を誘導する上流因子として、細胞内のエネルギーセンサーである AMPK に着目し、解析を行った。本研究で用いたレジスタンス運動モデルでは、単回のレジスタンス運動後直後には AMPK のリン酸化型タンパク質（Thr172）の発現量が増加することが明らかとなっているが、一方で運動後 6 時間では既に通常状態に戻ることが明らかとなっている(102, 105)。一方で、先行研究において、短い回復時間（3 時間）でレジスタンス運動（ラットの足部への通電に対する逃避応答を用いたスクワット運動 10

回)を4回繰り返した3時間後に、AMPKのリン酸化型タンパク質(Thr172)の発現量が増加していることが報告されている(25)。本研究において、レジスタンス運動を3回繰り返した6時間後にAMPKのリン酸化型タンパク質の発現量を測定したところ、通常の回復時間であれば対照側との差異は認められなかったが、回復時間を短縮した場合、短縮に従って発現量が増加することが明らかとなった(図3-16)。従って、回復時間の短縮に伴う2つの分解系の亢進には、AMPKのリン酸化が関与している可能性が示唆された。しかしながら先行研究では、AMPKによるユビキチン・プロテアソーム系の活性化には、FoxOによるユビキチンリガーゼの転写促進を仲介すると考えられている。しかし上述の通り、本実験においてはFoxOの脱リン酸化は認められなかった。従って、回復時間の短縮に伴うユビキチン・プロテアソーム系の活性化の責任因子がAMPKであるか否かは、より詳細な検討が必要となろう。

一方で、本研究では回復時間の短縮に伴うAMPKのリン酸化の亢進メカニズムとして、筋グリコーゲンの減少が生じている可能性を考え、検討を行った。しかしながら、筋グリコーゲン量は、著明な変化は認められなかった(図3-17)。ヒトを対象とした先行研究において、筋グリコーゲンはレジスタンス運動直後には低下しているものの、回復に十分な栄養状態であれば2-6時間程度で元の状態へ回復することが報告されている(108)。運動3時間前からの絶食が筋グリコーゲンの回復をどの程度障害するかは明らかではないが、本研究において筋グリコーゲン量に差が認められなかったのは測定を行った時間が運動6時間後と、通常ならば回復が見込まれる時間が経過していたことが関与していると考えられる。一方で、本研究においても運動直後に測定を行えば、回復時間の短縮に伴い筋グリコーゲン量も減少している可能性は十分に存在する。この点をより詳細に解明するためにも、運動直後における検討を行う必要があると考える。

#### 回復時間とNF- $\kappa$ B

回復時間の短縮に伴うタンパク質のユビキチン化亢進のメカニズムとしてNF- $\kappa$ Bに着目し、解析を行った。NF- $\kappa$ Bは炎症反応のメディエーターとして知られる転写因子である(74)。一方で、ユビキチンリガーゼの転写にも関与することが明らかとなっている。先行研究では、NF- $\kappa$ Bの核内移

行を促す IKK を過剰発現させたマウスにおいて、主に MuRF-1 の発現を亢進させ、骨格筋萎縮が惹起されることが報告されている(18)。このように、NF- $\kappa$ B は Atrogin-1 の発現変化を伴わず、MuRF-1 の発現を増加させることでタンパク質のユビキチン化を促進することが考えられる。さらに、Coffey らの先行研究において、短い回復時間（3 時間）でレジスタンス運動を繰り返した場合に、IKK のリン酸化が亢進すること、炎症性サイトカインの一つである TNF- $\alpha$  の発現量が増加することが明らかとなっている(25)。従って、回復時間の短縮に伴い、NF- $\kappa$ B を通じて MuRF-1 の発現を促し、タンパク質のユビキチン化が亢進した可能性が考えられる。従って、本実験においても、NF- $\kappa$ B の発現量を測定した。しかしながら、NF- $\kappa$ B の発現量については、回復時間による著明な発現変化は認められなかった（図 3-18）。従って、少なくとも 3 回のレジスタンス運動間の回復時間の違いは、NF- $\kappa$ B の発現量には変化を与えないと考えられる。一方で、実際に活性化された NF- $\kappa$ B は核内へと移行することにより各種炎症性サイトカインやユビキチンリガーゼの発現増加を促す。よって、より詳細に NF- $\kappa$ B の関与の有無を明らかにするためにも、他の炎症性サイトカインの遺伝子発現や、核内の NF- $\kappa$ B の発現量などを今後検討する必要がある。

## まとめ

以上のことから、同一のセッション数で、セッション間の回復時間を短縮させた場合には、筋タンパク質のユビキチン化が亢進すること、オートファジーを活性化させる可能性が存在することが示された。さらに、これらのメカニズムとして、回復時間の短縮に伴う AMPK のリン酸化が関与している可能性が示唆された。これらのことから、回復時間の短縮は長期的にレジスタンス運動を繰り返した場合に効果の早期化が生じるものの、筋内のエネルギー不足が生じ、筋タンパク質分解系を軽度活性化させ、運動効果を非効率化していると考えられる。一方で、セッション間の回復時間を過剰に短縮させた場合には、筋内のエネルギー不足をより顕著化し、筋タンパク質分解系の活性化をより亢進させ、さらなる運動効果の非効率化を導くことが示された。このことから、レジスタンス運動間の回復時間の短縮は、レジスタンス運動の効果を減弱させていると考えられる。

### 第3章のまとめ

第3章では、レジスタンス運動を繰り返し実施する場合のセッション間の回復時間の違いが、急性的な応答に与える影響を検討した。その結果、回復時間を短縮させた場合には、筋タンパク質の合成そのものは通常のリcovery時間で実施した場合と変わらず生じるものの、筋タンパク質合成シグナルの活性に対しては非効率化し、さらに筋タンパク質分解系を亢進させることにより、単回当たりの運動効果を減弱させている可能性が示唆された。一方で、回復時間を過剰に短縮させた場合には、筋タンパク質合成シグナルが高度に活性化するにも関わらず筋タンパク質合成そのものが活性化されなくなり、さらに筋タンパク質分解系も高度に亢進し、単回当たりのレジスタンス運動効果が消失している、或いは負の効果が発生している可能性が示唆された。



## 第 4 章

### 統括論議

## 本研究で得られた知見のまとめ

本研究の主目的は、臨床現場における適切なレジスタンス運動の処方基礎を築くために、レジスタンス運動効果を規定する一因子である回復時間の違いによるレジスタンス運動効果の変化を明らかにするとともに、回復時間の過剰な短縮による運動効果の低減メカニズムを明らかにすることであった。以下に本研究で得られた知見をまとめる。

### 第1章

第1章ではレジスタンス運動による筋タンパク質制御に関わる機構や、回復時間に応じたレジスタンス運動効果の変化について、既存の知見や課題をまとめ、概説した。

### 第2章

第2章では、回復時間の違いによる骨格筋肥大効果の変化を明らかにするために、本来骨格筋肥大を惹起する回数のレジスタンス運動において、回復時間を短縮した際にどのような応答変化が生じるかを明らかにした。その結果、回復時間を短縮（72 時間から 24 時間へ）した場合、骨格筋肥大（筋湿重量、筋線維横断面積の増加）は通常のリcovery時間（72 時間）の場合と変わらず生じたが、分解系が軽度活性化（LC3-II の有意な発現量の増加）することが明らかとなった。一方で、回復時間を過剰に短縮（72 時間から 8 時間へ）した場合、骨格筋肥大は生じず、さらに筋タンパク質の分解系が活性化（タンパク質のユビキチン化の亢進、LC3-II の発現量の増加）することが明らかとなった。しかし同時に、筋タンパク質合成系シグナル（mTORC1 シグナル）の活性化も生じていた。

### 第3章

第3章では、実験のスケールダウンのために対象動物をマウスへと変更した。まず、マウスにおける単回のレジスタンス運動に対する応答を検討した。その結果、これまでにラットの実験で報告

されているものと同様の応答（mTORC1 シグナルの活性化，筋タンパク質合成の活性化）が得られることが明らかとなった。

さらに、回復時間の短縮により急性的な筋タンパク質合成に生じる変化を明らかにするために、3 回のレジスタンス運動において、回復時間を短縮した際に、筋タンパク質合成および関連因子にどのような応答変化が生じるかを検討した。その結果、回復時間を短縮（72 時間から 24 時間へ）した場合、骨格筋タンパク質合成シグナルは活性化（mTORC1 シグナルの活性化）するが、筋タンパク質合成の活性化は変化しないことが明らかとなった。一方で、回復時間を過剰に短縮（72 時間から 8 時間へ）した場合、筋タンパク質合成シグナルはより活性化するにも関わらず、筋タンパク質合成の活性化は生じなくなることが明らかとなった。

第 3 章の後半では、回復時間の短縮により急性的な筋タンパク質分解に生じる変化を明らかにするために、3 回のレジスタンス運動において、回復時間を短縮した際に、筋タンパク質分解シグナルおよび関連因子にどのような応答変化が生じるかを検討した。その結果、回復時間の短縮（72 時間から 24 時間へ）した場合、筋タンパク質のユビキチン化が亢進すること、選択的オートファジーの基質の一つである p62 の発現量が増大することが明らかとなった。さらに、回復時間を過剰に短縮（72 時間から 8 時間へ）した場合、筋タンパク質のユビキチン化がさらに亢進することが明らかとなった。一方で、選択的オートファジーの基質の一つである p62 の発現量は増加するものの、回復時間を 24 時間とした場合よりはその増加が軽度であることが明らかとなった。

本研究により得られた上記の知見を、主に「長期的なトレーニングと短期的なトレーニングの間に生じる応答の差異」、「回復時間を短縮させた場合のレジスタンス運動応答の変化」、「回復時間を過剰に短縮させた場合のレジスタンス運動応答の変化」の 3 つに分類し、総合的に論議する。

## 長期的なトレーニングと短期的なトレーニングの間に生じる応答の差異

第2章と第3章の間に、材料・結果等が大きく異なる点、特に「動物種と対象筋」，「オートファジーに関連する応答」，「酸化ストレス応答」，「AMPKの応答」，「NF- $\kappa$ Bの応答」の差異について中心的に論議する。

### 動物種・対象筋の差異

本研究において、第2章ではSDラット、第3章では実験のスケールダウンや将来的な遺伝子操作技術の応用のため、C57BL/6Jマウスを用いて検討を行っている。これまでに、それぞれの動物種における著明な筋肥大抵抗性や筋萎縮抵抗性は報告されていない。さらに、実際に第3章において単回のレジスタンス運動に対するマウス骨格筋の応答を確認したところ、ラットを対象に、同じプロトコルのレジスタンス運動を行った先行研究(102)とほぼ同様の筋タンパク質合成シグナル・筋タンパク質合成の活性化が生じた。これらのことから、少なくとも本研究で中心的に観察した筋タンパク質代謝という観点では、顕著な差異は存在しないと考えられる。一方で、一般的に、ラットと比較してマウスでは絶食に対する抵抗性が弱く各種ガイドラインにおいても、マウスの絶食時間はラットよりも短く規定されているものが多い。特に、オートファジーは全身性の低栄養状態による影響を受けやすいが、本研究では、マウスを対象にオートファジーに関する検討を行う際、絶食時間を短縮させており、かつ絶食条件を整えた群間で比較検討を行っている。従って、絶食に対する影響についても、可能な限り動物種間の差異による影響を排除できていると考える。

さらに第3章ではC57BL/6Jマウスの前脛骨筋と腓腹筋を対象筋として用いている。マウスの腓腹筋の構成はMHC IIIdが10%、MHC IIbが90%であり、前脛骨筋はMHC IIIdが33%、MHC IIbが67%である(52)。マウス骨格筋における協同筋切除を行った先行研究において、筋タンパク質合成応答は、Type 2A > Type I > Type 2X > Type 2B と、速筋線維で弱いことが報告されている(48)。マウスの前脛骨筋・腓腹筋では何れも筋タンパク質合成の応答性が高い遅筋線維は含まれておらず、そ

の応答性の差異は大きくはないと考えられるが、筋タンパク質代謝の変化を評価する上で、留意しておくべきであろう。

### オートファジーに生じる応答の差異

第2章における18セッションのレジスタンストレーニングを行った48時間後には、回復時間の短縮に伴いオートファゴソーム形成が亢進していた(図2-8)。一方で、第3章における3セッションのレジスタンストレーニングを行った6時間後には、回復時間の違いによらず、運動によってオートファゴソーム形成は抑制されていた(図3-14)。先述の通り、ヒトを対象とした先行研究において、単回のレジスタンス運動は、運動後24時間までLC3-IIの発現量を減少させることが報告されている(44)。従って、これらの応答性の差異には、最終の運動セッションによる急性期的な影響を受けるか否かが関与している可能性が考えられる。一方で、本研究において、選択的オートファジーの基質として作用するp62の発現量も、2つの実験間で応答変化が認められた。第2章では回復時間の短縮に伴う発現量の増加が認められたが、第3章では回復時間短縮による発現増加、および過剰な短縮による発現増加の減弱が認められた。何れの実験においても、通常のリcovery時間でトレーニングを行った場合に比べて、回復時間を短縮・過剰に短縮した場合の方が高い発現量を示している点は共通しているが、この両群の間における発現の変化に差異が存在する。先行研究において、運動経験のない男性に単回のレジスタンス運動を行うと、p62の発現量は運動後3時間では変化がないが、24時間・48時間では有意に増加することが示されている。第3章における回復時間を過剰に短縮させた群では、3セッション終了後6時間では、初回セッションから22時間しか経過していない。従って、回復時間を過剰に短縮させた群では、p62の発現を増加させるのに十分な時間がなかったため、回復時間を短縮させた群の方が高い発現量を示した可能性が考えられる。一方で、オートファジー活性の正確な測定には、コルヒチン等のオートファゴソーム分解の阻害剤を投与し、阻害剤の有無によるLC3-II発現の変化を評価しなければならない。本研究におけるオートファジーの変化をより正確に評価するためにも、今後このような検討を行っていく必要があると考える。

## 酸化ストレスに生じる応答の差異

本研究において、18 セッションのレジスタンストレーニングを行った 48 時間後には、全ての群で酸化ストレスが増大しており、特に回復時間を短縮させた 24 時間群において、その増大は顕著であった（図 2-16）。一方で、3 セッションのレジスタンストレーニングを行った 6 時間後には、回復時間を過剰に短縮させた 8 時間群においてのみ、酸化ストレスが増大していた（図 3-8）。レジスタンス運動後の骨格筋内の酸化ストレスの動態は未だ詳細には明らかとなっていないが、前述の通り消耗性のレジスタンス運動を行うと運動終了後早期から筋内の酸化ストレスが増大するのに対して、ヒトを対象とした先行研究において、単回のレジスタンス運動を行うと、運動から 6 時間後には、血中の酸化ストレスレベルが上昇しており、24 時間経過した後も高い状態が維持されていることが報告されている(13)。従って、筋内と血中の酸化ストレスの動態の差異については議論の余地があるが、長期的な介入終了から全ての群において筋内の酸化ストレスが増大していたのは、48 時間では筋内の酸化ストレスが完全に消去されていなかったためであると考えられる。さらに、回復時間の短い群でより高い酸化ストレスが生じていたのは、酸化ストレスの消去が完了しない状態でレジスタンス運動を繰り返したことによる可能性が考えられる。一方で、短期的な介入終了から 6 時間後では、過剰に短い回復時間である 8 時間群においてのみ酸化ストレスの増大が認められたにも関わらず、長期的な介入終了から 48 時間後では、通常のリcovery時間の場合と酸化ストレスレベルは差がなかった。先行研究において、骨格筋が高い酸化ストレスに晒された場合、スーパーオキシドディスムターゼなどを始めとする抗酸化酵素の発現量が高まることが報告されている(64)。このことから、長期的に高度な酸化ストレスに晒されることにより、8 時間群では他の群よりも高い抗酸化酵素の発現が得られ、結果的に最終セッション終了後後 48 時間で、通常のリcovery時間である 72 時間群と差異がなくなる程度まで酸化ストレスが消去された可能性が考えられる。しかしながら本研究においては、セッション毎の酸化ストレスレベルの変化や、抗酸化酵素の発現の変化などについては検討していない。より詳細な変化を明らかにするためにも、これらの点については今後検討していく必要があると考える。

## AMPK に生じる応答の差異

本研究では、筋タンパク質分解系の活性化を惹起する主要な要因として、AMPK について検討を行った。本研究において、AMPK の総タンパク質発現量はいずれの介入においても変化が認められなかった。一方で、リン酸化型タンパク質発現量については、18 セッションのレジスタンストレーニングを行った 48 時間後には、回復時間の違いによらず運動によって増加しており（図 2-14）、3 セッションのレジスタンストレーニングを行った 6 時間後には、回復時間の短縮に伴い増加していた（図 3-16）。これらの応答性の違いについては、総介入期間と最終セッションからの経過時間が関与していると考えられる。第 3 章（実験③）における考察でも述べたが、3 セッション終了 6 時間後に回復時間の短縮に伴って AMPK のリン酸化型タンパク質発現量が増加していたことについては、3 セッション目の運動時の筋グリコーゲン量の違いが影響していると考えられる。しかしながら、第 2 章における長期的な介入実験では、サンプリングが最終セッションから 48 時間後であり、運動による筋グリコーゲンの減少に伴う、急性期的な AMPK のリン酸化はほぼ消失していると考えられる。ヒトを対象とした先行研究において、習慣的にレジスタンストレーニングを行っている男性は、行っていない者と比較して基礎状態の AMPK のリン酸化型タンパク質発現量には差がないことが報告されている(139)。一方で、老齢ラットを対象としたレジスタンストレーニングは、AMPK のリン酸化型タンパク質の発現量を増加させることが報告されている(81)。このことから、本研究において観察された、長期的にレジスタンストレーニングを行った場合に生じる AMPK のリン酸化型タンパク質発現量の増加は、動物のトレーニングモデル特有の変化である可能性が考えられる。しかしながらこの先行研究では、AMPK の総タンパク質発現量の増加も確認されており、本研究では AMPK の総タンパク質発現量には変化が認められないことから、このメカニズムによるか否かは議論の余地がある。AMPK のリン酸化型タンパク質発現量に影響を与えうる別の因子として、第 2 章の実験で設けた 12 時間という絶食時間の影響が考えられる。ラットを対象とした先行研究において、12 時間の絶食が骨格筋内の筋グリコーゲン量を有意に減少させることが報告されている(28)。長期的なレジスタンストレーニングと絶食について、先行研究においては検討がなさ

れていないが、本検討において観察された AMPK の変化については、これらの要素が関与している可能性がある。より明確なメカニズムを明らかにするためにも、さらに時間系の追加などを行い、詳細に検討を行っていく必要がある。

### NF- $\kappa$ B に生じる応答の差異

本研究では、筋タンパク質分解系の活性化を生じさせるもう一つの主要な要因として、炎症反応のメディエーターである NF- $\kappa$ B について検討を行った。18 セッションのレジスタンストレーニングを行った 48 時間後の NF- $\kappa$ B のタンパク質発現量は、回復時間の短縮に伴い増加していたが（図 2-17）、一方で 3 セッションのレジスタンス運動を行った 6 時間後には、著明な発現量の変化は認められなかった（図 3-18）。NF- $\kappa$ B は核内へ移行することで転写因子として作用する。先行研究において、レジスタンス運動は NF- $\kappa$ B の核内移行を促す IKK をリン酸化（活性化）させることが報告されている(25)。さらに、同じ先行研究で、レジスタンス運動を 3 時間毎に 4 回繰り返すと、炎症性サイトカインの一つである TNF- $\alpha$  の筋内発現量が増加することが示されている。これらのことから、本研究における 3 セッションのレジスタンス運動 6 時間後においては、回復時間の短縮に伴い、NF- $\kappa$ B の核内移行が促進されていた可能性が考えられる。また、核内へ移行した NF- $\kappa$ B は、様々な炎症性サイトカインの転写因子として作用するが、一方で一部の炎症性サイトカイン（TNF- $\alpha$ , IL-1 等）は NF- $\kappa$ B の転写因子として作用することが知られている(79)。従って、18 セッションのレジスタンストレーニングを行った 48 時間後に NF- $\kappa$ B のタンパク質発現量が回復時間の短縮に伴い増加していたのは、これらの炎症性サイトカインと NF- $\kappa$ B の相互転写が、回復時間の短縮に伴い高度に生じていたことによる可能性が考えられる。以上のことから、3 セッションのレジスタンストレーニングから 6 時間後には NF- $\kappa$ B の発現量には著明な変化が認められなかったものの、NF- $\kappa$ B を中心とする炎症反応が発生していた可能性が考えられる。より詳細な分解系の亢進メカニズムを明らかにするためにも、急性期の NF- $\kappa$ B の核内発現量や、炎症性サイトカインの発現などについて今後検討していく必要があると考える。



## 回復時間を短縮させた場合のレジスタンストレーニング応答の変化

第 1 章でまとめたように、レジスタンス運動と回復時間に関する研究は主にヒトを対象とした研究で行われてきた。しかし、先行研究で長期的な運動効果を見ている研究では、最も回復時間が短いもので週 4 回程度の実施であり、その際も発揮トルクや筋横断面積等の測定項目においてはほとんど通常の回復時間との比較では変化が認められていない。ここでは、これらの先行研究よりもさらに短い、24 時間という回復時間でレジスタンス運動を繰り返すことにより得られた本研究における知見をもとに、回復時間を短縮することにより生じる骨格筋のダイナミックな適応および合成・分解に関与する分子生物学的な適応の変化について論議する。

### 回復時間の短縮による筋力増大応答の変化

レジスタンストレーニングを実施することにより得られる主な効果として、最大発揮筋力の増大が挙げられる(104)。実際に本研究においても、通常の回復時間を設けてレジスタンス運動を 18 回実施することにより、各セッションにおける最大発揮トルクは緩徐に増加し、初回と最終回を比較すると 10%程度の増加が認められた(図 2-2)。さらに、回復時間を短縮させて同回数の運動を実施した場合にも、初回と最終回で 10%程度の増加が認められた(図 2-2)。これらの結果から、回復時間を短縮しても、通常の回復時間で実施した場合と遜色なく筋力増大が生じると考えられる。一方で、これらの事実、発揮トルクの測定を随時行い、適切な筋力発揮・筋力増大を得られているかを確認することで、オーバートレーニングを回避しつつ適切な筋力増大が得られる可能性を示唆している。臨床現場においては、筋力を測定する設備には Biodex などを始めとする大規模なものが用いられる一方で、握力計やハンドヘルドダイナモメーターなど、比較的小型のものも存在する。このようなものを使用し、簡易的であってもレジスタンス運動の際に筋力をなるべく高い頻度で測定し、レジスタンス運動の強度や容量を把握しておくことが、適切な運動効果を獲得するための礎となるかもしれない。

### 回復時間の短縮による筋肥大応答の変化

レジスタンス運動により得られるもう一つの主要な効果として、骨格筋肥大が挙げられる。本研究においても、通常のリcovery時間を設けてレジスタンス運動を 18 回実施することにより、骨格筋肥大（筋湿重量の増加，筋線維横断面積の増大）が惹起された（図 2-3）。さらに、リcovery時間を短縮させても同様に、骨格筋肥大が惹起された（図 2-3）。従って、リcovery時間を短縮しても、通常のリcovery時間で実施した場合と変わらず骨格筋肥大が生じると考えられる。さらに 3 セッション目の急性応答についても検討すると、筋タンパク質合成はリcovery時間の短縮によらず活性化されていた（図 3-4）。これらの事実は、リcovery時間を短縮しても、筋肥大効果には影響が生じないことを強く示唆する。本研究では、同一セッション数の中でリcovery時間を短縮した場合の効果を比較している。このため、本検討においてリcovery時間を短縮させた群は、レジスタンス運動を実施したトータルの介入期間が短いという事実を有している。これらの事実は、リcovery時間を短縮することで、通常のリcovery時間でトレーニングを実施した場合と同等の筋肥大効果を短期間で獲得できることを示唆しており、実際のトレーニング現場においても、リcovery時間を短縮してトレーニングを行うことで、トレーニング効果の早期化が期待できるものと考ええる。

### 回復時間の短縮に伴う筋タンパク質分解系の変化

本研究では、リcovery時間の短縮によるレジスタンス運動応答変化に寄与する因子として、骨格筋における主要な筋タンパク質分解系の一つであるユビキチン・プロテアソーム系について検討を行っている。第 2・3 章の検討結果から、レジスタンス運動後・運動の繰り返し中ともに、リcovery時間の短縮により、ユビキチン化タンパク質の発現量は増加していた（図 2-4, 3-11）。従って、リcovery時間の短縮は筋タンパク質のユビキチン化を亢進させることが示唆される。しかしながら、筋タンパク質のユビキチン化を促すユビキチンリガーゼについては、両実験とも、リcovery時間の短縮による変化は認められなかった（図 2-4, 3-11）。タンパク質のユビキチン化は、不要となり分解される必要のあるタンパク質を、26S プロテアソームによる分解の標的とするために行われる。しかし、実際にユビキチンリガーゼの発現量が増加していないにも関わらずユビキチン化タンパク質が増加し

ていたという事実は、回復時間の短縮が 26S プロテアソームの活性に対して 影響を及ぼした可能性を示唆する。一方で、上述の実験で解析を行った時間点は最終の運動から 48 時間後と 6 時間後の 2 点のみである。先行研究ではユビキチンリガーゼの発現増加は運動後 2 時間程度で観察されていることから(86)、より早期の時間点で検討を行うことで、この点を解明できると考えられる。

本研究では、回復時間の短縮に伴う変化として、もう一つの主要な筋タンパク質分解系であるオートファジーについても検討を行っている。第 2 章の検討結果から、18 回のレジスタンス運動から 48 時間後に、オートファゴソーム形成の指標となる LC3-II の発現量が増加しており、さらに選択的オートファジーにおける基質となる p62 の発現量も増加していた (図 2-8)。一方で、3 回のレジスタンス運動から 6 時間後には、LC3-II の発現量は通常のリハビリ時間の場合と変化なく減少していたが、p62 の発現量は増加していた (図 3-14)。これらの事実は、選択性の有無に差異はあるが、回復時間を短縮させた場合、トレーニング終了後にはオートファゴソーム形成が亢進するものの、トレーニング中には通常のリハビリ時間の場合と同様に抑制される可能性を示唆する。一方で、トレーニング後の LC3-II の発現量は回復時間の短縮に伴い増加しているものの、その差は極めて軽微である。これらの事実は、回復時間の短縮はオートファジーの系を活性化させるものの、その影響は高度ではない可能性を示唆する。通常、筋の収縮タンパク質の分解には主にユビキチン・プロテアソーム系が動員されるのに対し(23, 26, 38, 67, 113)、オートファジーは細胞そのものの質を保つために動員される(92)。このことから、回復時間の短縮は、収縮タンパク質に対して中心的に影響を及ぼし、細胞の質自体にはあまり影響を及ぼさないのかもしれない。これらの分解系の動員が、回復時間の短縮にはどのような目的でなされているのかについては、さらなる研究の余地があろう。

さらに本研究では、これらの分解系の亢進を及ぼしうる因子についても検討を行っている。分解系を亢進し得る因子として本研究では、炎症反応のメディエーターである NF- $\kappa$ B と、エネルギーセンサーである AMPK に着目した。これらの因子は、何れも回復時間の短縮に伴う動員が疑われる因子であった。例えば、NF- $\kappa$ B については、短い回復時間でレジスタンス運動を繰り返すことにより、その活性化因子である IKKB がリン酸化すること(25)、さらに単回のレジスタンス運動を実

施すると、筋内の ATP が AMP へと変換され、AMPK がリン酸化すること(105)などが明らかとなっており、本研究における回復時間の短縮が、これらの因子を動員させる可能性は極めて高い。実際にトレーニング後には回復時間の短縮により、NF- $\kappa$ B の発現量が増加しており（図 2-17）、さらにトレーニング中には、回復時間の短縮により AMPK のリン酸化が亢進していた（図 3-16）。これらの結果は、回復時間の短縮させることにより、炎症反応や筋内エネルギー回復の不足が生じ、NF- $\kappa$ B の発現増加や活性化、AMPK のリン酸化を通じて、筋タンパク質分解系を亢進させたと解釈される。

#### 回復時間の短縮による影響のまとめと臨床への意義

上述したような知見と解釈から、回復時間の短縮は、炎症反応の発生や筋内エネルギーの不足などを通じて筋タンパク質分解系を亢進させ、筋肥大効果を抑制する可能性があるものの、総じてセッション当たりの筋肥大効果に著明な変化は与えず、効果の早期化を導くことが示唆された（図 4-1）。一方で、本研究で認められた炎症反応の発生が、実際にヒトが経験した場合にどの程度パフォーマンスに影響を及ぼすのかは明らかでない。また、回復時間の短縮により惹起される、筋内の低エネルギー状態によるパフォーマンスの低下も予想される。さらに、本研究で用いたレジスタンス運動は、3 秒の最大等尺性収縮を 50 回繰り返すという内容である。実際のスポーツ現場においては、レジスタンス運動は主に動的収縮（短縮性＋伸張性収縮）を中心としてプログラムされており、より高い強度および容量で実施されることが多い。従って、実際にスポーツ現場で回復時間を短縮して運動を繰り返した場合には、より高度な悪影響が生じる可能性が考えられる。この観点から、筋肥大効果の早期化のために回復時間を短縮するには、極めて慎重に適応を考える必要があろう。

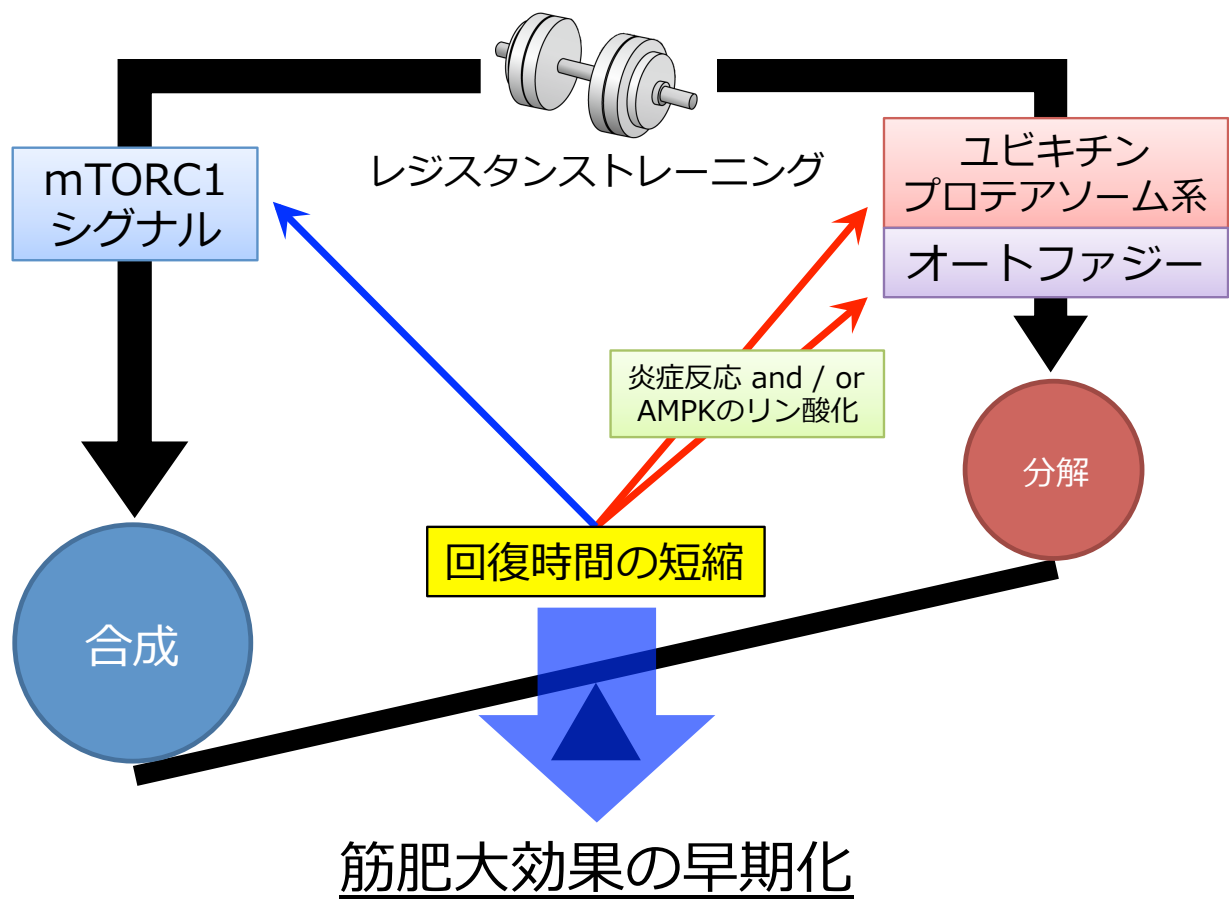


図4-1. 回復時間の短縮によるトレーニング応答の変化

## 回復時間を過剰に短縮させた場合のレジスタンストレーニング応答の変化

第 1 章でまとめたように、レジスタンス運動により惹起されるオーバートレーニングに関する研究は極めて少ない。その背景として、オーバートレーニングに関する研究が少ないことに加えて、レジスタンス運動の研究はヒトを対象としたものが中心であり、オーバートレーニングに関する研究は倫理的観点からも困難であったことがあげられる。さらに、実験動物を用いた先行研究内においても、レジスタンス運動としての性質のみを有しているかは不透明な点が多かった。ここでは、電気刺激による強制的な筋収縮を用いることで持久性の影響を排除し、より統制の取れた実験系を用いることでこの課題を克服し、8 時間という過剰に短い回復時間でレジスタンス運動を繰り返すことにより得られた本研究における知見をもとに、回復時間を短縮することにより生じる骨格筋のダイナミックな適応および合成・分解に関与する分子生物学的な適応の変化について論議する。

### 回復時間の過剰な短縮による筋力増大応答の変化

先述の通り、回復時間を 24 時間まで短縮するのみでは、通常のリcovery時間と変わらず緩徐な最大発揮トルクの増大が認められた (図 2-2)。一方で、回復時間を過剰に短縮させ、8 時間とした場合には、最大発揮トルクはセッション毎に減少し、7 セッション目以降には初回のおよそ 60% で定常状態となっていた (図 2-2)。これらの事実は、回復時間を過剰に短縮した場合には、通常であれば得られるはずの筋力増大応答が消失し、さらには最大発揮トルクを減弱させるという負の影響を与えると考えられる。加えて、セッションの経過に伴い発揮トルクが減弱しているという事実は、実験動物において回復時間を 8 時間まで短縮させることにより、オーバートレーニングが誘導されたことを示唆する。通常、最大発揮筋力の増大には骨格筋内の収縮タンパク質の増加が重要であるが、減弱には筋内のカルシウムイオン濃度や ATP 量など、様々な要因が関与する。本研究において、18 セッションのレジスタンス運動後、回復時間を過剰に短縮しても、筋湿重量の減少は生じなかったことから、恐らく収縮タンパク質の著明な減少は生じていないと考えられる。さらに、筋内のカルシウムイオン濃度は収縮終了後速やかに元に戻ることが知られており、この影響も少ないも

のと考えられる。本研究において、細胞内のエネルギーセンサーである AMPK のリン酸化型タンパク質の発現量は、3 セッションのレジスタンス運動における回復時間の過剰な短縮により、著しい増加を見せた。このことから、最大発揮トルクの低減には、骨格筋内のエネルギー不足が関与した可能性が示唆される。骨格筋内のエネルギー量の低下は、レジスタンス運動を行う際の、疲労困憊に至る反復回数や最大挙上重量に直結する。従って、このような点に留意することが、実際にスポーツ現場でレジスタンス運動を実施する際のオーバートレーニング防止につながるかもしれない。

### 回復時間の過剰な短縮による筋肥大応答の変化

本研究において、回復時間の過剰な短縮により、レジスタンス運動により得られるもう一つの主要な効果である骨格筋肥大効果が消失した（図 2-3）。そのメカニズムとして、各セッションにおける筋タンパク質合成効果の減弱を疑い、第 3 章において、急性応答を検証したところ、回復時間の過剰な短縮により、筋タンパク質合成の活性化は消失していた（図 3-4）。従って、回復時間の過剰な短縮による骨格筋肥大効果の減弱には、レジスタンス運動による筋タンパク質合成効果の減弱が大きく関与していると考えられる。一方で、筋タンパク質合成の活性化は消失しているのに対し、上流に位置する mTORC1 シグナルは高い活性化状態にあった（図 3-5）。近年、mTORC1 シグナルに関する研究は急速な発展を遂げているが、その役割は未だ未解明な点が多い。mTORC1 シグナルをラパマイシンによる抑制したにも関わらずレジスタンス運動によって筋タンパク質合成が増加する報告が存在するのに対し(103)、本研究の第 3 章における知見のように、mTORC1 シグナルの活性化が生じているにも関わらず実際の筋タンパク質合成が生じていない報告も存在する(65)。後者の場合、その多くは eIF 等を始めとする翻訳開始因子の関与が考察されるが、特にレジスタンス運動における適応において、その真偽は未だ明らかではない。これまで mTORC1 シグナルは、骨格筋肥大において中心的な役割を担うと考えられてきた。しかし近年、先述した研究のように、mTORC1 シグナルと実際の筋タンパク質合成が必ずしも一致しない例が示されており、mTORC1 シグナルが筋タンパク質合成の絶対的な制御因子ではない可能性が示唆されている。本研究はそれらの研究と同様に mTORC1 シグナルと筋タンパク質合成が一致しない一例を示すものであり、骨

格筋における既存の mTORC1 シグナルの理解に修正を迫る知見となることが期待される。一方で、筋タンパク質合成における mTORC1 シグナルの役割に議論の余地は残るものの、mTORC1 シグナル活性と筋タンパク質合成が密接な関係にあることは事実である。従って、本研究における mTORC1 シグナルの活性と実際の筋タンパク質合成の不一致を解消することで、効果を維持した、極めて短い回復時間でレジスタンストレーニングを実現できる可能性を示唆している。mTORC1 シグナルの役割をより詳細に解明することに加えて、このような新規のトレーニング戦略を構築していくためにも、今後より詳細なメカニズムの解明に取り組んでいきたい。

### 回復時間の過剰な短縮に伴う筋タンパク質分解系の変化

本研究では、回復時間の過剰な短縮に伴う筋タンパク質代謝の変化をより詳細に明らかにするため、筋タンパク質分解系についても検討を行った。まず、ユビキチン・プロテアソーム系については、第 2・3 章の結果から、レジスタンストレーニング後・トレーニング中ともに、回復時間の過剰な短縮によりユビキチン化タンパク質の発現量が著しく増加することが示された（図 2-4, 3-11）。従って、回復時間の過剰な短縮は、筋タンパク質のユビキチン化を高度に亢進させることが示唆される。しかしながら、レジスタンス運動後と繰り返し中では、その上流因子の変化に差異が存在する。第 2 章における検討では、18 セッション終了から 48 時間後に、ユビキチンリガーゼである Atrogin-1・MuRF-1 とともに mRNA の発現量が著しく増加していたが、第 3 章における検討では、3 セッション終了から 6 時間後に、MuRF-1 の mRNA 発現量がやや増加している傾向が認められるに留まっており、Atrogin-1 に至っては運動によって mRNA 発現量が減少していた（図 2-4, 3-11）。これらの差異は、これら 2 つのフェイズにおける筋タンパク質のユビキチン化の機序が異なることを示唆している。実際に、それぞれで検討した上流因子の変化にも違いが存在した。例えば、第 2 章における 18 セッション終了から 48 時間後では、上流因子としては炎症反応の発生の可能性が高く（図 2-17）、一方で第 3 章における 3 セッション終了から 6 時間後では、エネルギー欠乏に伴う AMPK のリン酸化が関与している可能性が示唆された（図 3-16）。これらのことから、ユビキチン・プロテアソーム系の亢進が筋肥大効果の低下に関与しており、将来的な検討で、分解系を



抑制させることで筋肥大効果を高める介入をするのであれば、フェイズ毎に異なる介入方法を構築する必要性が考えられる。

さらに、本研究ではオートファジーについても検討を行っており、こちらについてもフェイズ毎の応答性の差異が見出されている。18 セッション終了から 48 時間後には、オートファゴソーム形成の指標となる LC3-II の発現量が著しく増加しており、選択的オートファジーの基質となる p62 の発現量も高度に増加していた（図 2-8）。一方で、3 セッション終了から 6 時間後では、LC3-II の発現量は運動により減少していた（図 3-14）。先行研究において、単回のレジスタンス運動後、24 時間以内は LC3-II の発現量が減少することが報告されている(44)。従って、トレーニング中のオートファゴソーム形成については、運動による急性的な抑制を受けており、回復時間の過剰な短縮による影響は顕著には生じていない可能性が考えられる。しかしながら、同じ時間点において、p62 の発現量は顕著に増加していた（図 3-14）。従って、オートファゴソーム形成そのものは抑制を受けているが、オートファジーの中でも選択的オートファジーの比率が増加している可能性が考えられる。以上のことから、回復時間の過剰な短縮は、トレーニング終了後にはオートファジーを高度に活性化させるが、トレーニング中には、回復時間の過剰な短縮によらず、レジスタンス運動による急性的な適応の中で抑制が生じている可能性が考えられる。しかしながら、先述の通り、オートファジーの詳細な理解においては、阻害剤を用いた介入が不可欠である。上述したような点に加えて、オートファジーにおける応答変化を生じさせるもう一つの要因として、総介入期間の違いが挙げられる。選択的オートファジーは、障害されたミトコンドリアや核、小胞体等が対象となる。これらは様々なストレス因子によって障害を受けるが、特に第 3 章 実験③においては、回復時間を過剰に短縮させた場合にはサンプリングの時点を考慮しても初めの運動から 22 時間しか経過していない。そのために、オートファジーの対象となるほどまでの障害が、この時間では生じなかった可能性が考えられる。これらの点を含めて、回復時間の過剰な短縮による影響を詳細に解明していくためにも、リソソームによるオートファゴソーム分解の阻害剤を用いた検討や、総介入期間を統一した検討などを行っていく必要があると考える。

一方で、本研究では回復時間を過剰に短縮させた場合に、トレーニング中の合成の抑制・トレーニング中・終了後の筋タンパク質分解の亢進が生じているにも関わらず、筋萎縮は生じていない。この理由として、分解系においてタンパク質のユビキチン化やオートファゴソーム形成の亢進は認められたものの、26S プロテアソームやリソソームによる分解は生じていなかった、あるいは今回トレーニング中の時間点として測定を行った最終セッションから 6 時間後という時間点においてのみタンパク質合成の活性化が抑制されており、運動直後や 6 時間後以降などでは合成の活性化が生じていた可能性等が考えられる。従って、筋タンパク質分解そのものに関する解析や、さらなる時間点の追加などにより、この骨格筋の量的変化に関するメカニズムがより詳細に解明されと考える。

#### 回復時間の過剰な短縮による影響のまとめと臨床への意義

上述したような知見と解釈から、回復時間の過剰な短縮はオーバートレーニングを惹起し、レジスタンス運動による筋タンパク質合成効果を消失させるとともに、炎症反応や筋内エネルギーの不足などを高度に発生させ、筋タンパク質分解系を高度に亢進させること筋肥大効果を阻害していることが示唆された（図 4-2）。本研究は実験動物モデルを用いた検討である。実験動物モデルにおけるレジスタンス運動による効果とヒトが実際にレジスタンス運動を行った場合に得られる効果は、筋タンパク質合成・分解の挙動に少し違いがある（動物モデルの方がやや運動応答が短い）が、基本的な適応は同様に生じる。従って、ヒトを対象とした場合に 8 時間よりも長い回復期間でもオーバートレーニングに至る可能性は考えられるが、その差異の応答変化としては本研究にて観察された変化が生じる可能性が高い。このような動物実験とヒト生体を対象とした実験の溝を埋めるためにも、回復時間の過剰な短縮による適応についてさらなる検討を行い、ヒトを対象とした研究を行っていく必要があると考える。また、上述したように本研究では、セッション数を統一したために、群ごとに総介入期間が異なる。この点が本研究のリミテーションの一つであり、回復時間とレジスタンス運動効果に関するより詳細なエビデンスを確立するためにも、将来的に介入期間を統一した検討も行う必要があると考える。一方で、本研究は長らく解明されていなかったレジ

スタンストレーニングにおける回復時間の過剰な短縮に伴う筋タンパク質代謝の変化とそのメカニズムの一端を明らかにし、オーバートレーニングの病態を明らかとするとともに、回復時間を操作することでもたらされる負の効果を示す研究であり、臨床現場における適切なレジスタンス運動処方における基礎を築く知見であると考ええる。

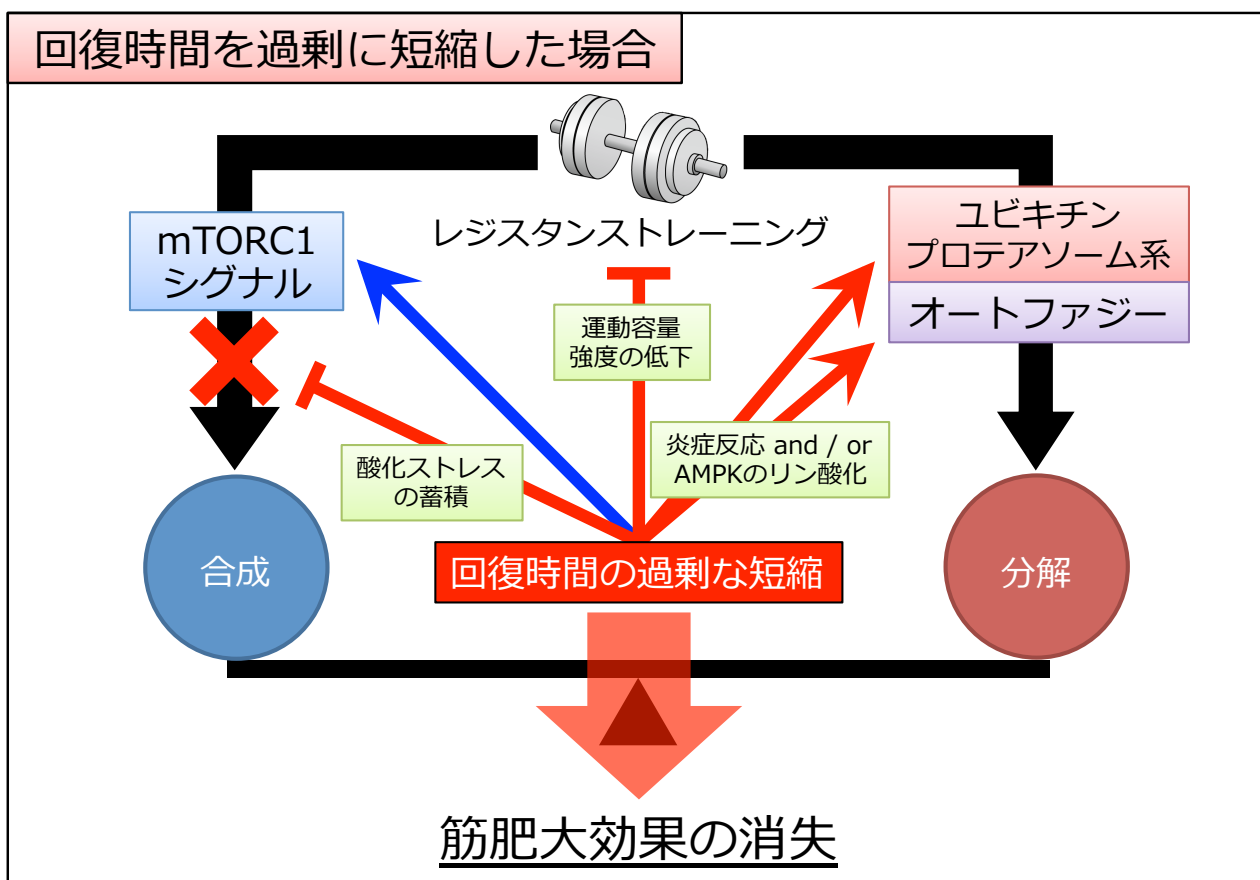
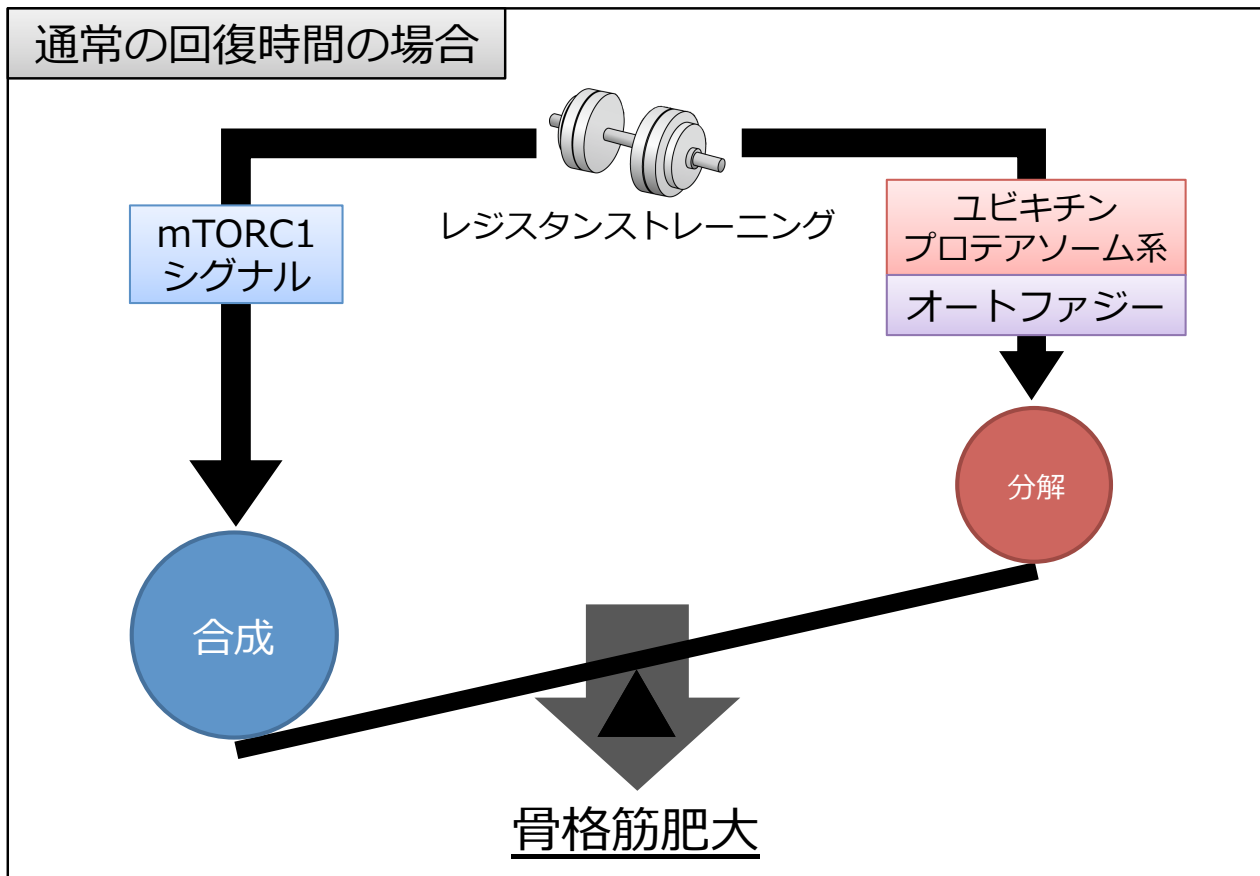


図4-2. 回復時間の過剰な短縮によるトレーニング応答の変化

## 結語

本研究の主目的は、セッション間の回復時間の違いがレジスタンス運動効果に与える影響を明らかにすることであった。

回復時間の短縮は、分解系を軽度に進ませ、セッションあたりの運動効果を減弱させる可能性が示唆されるものの、レジスタンストレーニングによる筋肥大効果を早期化させることが明らかとなった。

回復時間の過剰な短縮は、レジスタンストレーニングによる筋肥大効果を消失させることが明らかとなった。そのメカニズムとして、レジスタンス運動による筋タンパク質合成の活性化が消失すること、筋タンパク質分解系が高度に進捗することが関与している可能性が示唆された。

レジスタンストレーニングは、スポーツ・リハビリテーションの現場で広く用いられている。しかし、レジスタンストレーニングによる適応に関する科学的根拠は十分ではない。本研究は、主要なレジスタンストレーニングによる効果を決定する因子である、回復時間を変化させた場合に生じる適応を明らかとし、スポーツ・リハビリテーションの現場における適切なレジスタンス運動プログラム作成のための基礎的な科学的根拠を提供する。

## 引用文献

1. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. *Med Sci Sports Exerc.* 2009; 41(3): 687-708.
2. Aagaard P, Andersen JL, Dyhre-Poulsen P, Leffers AM, Wagner A, Magnusson SP, Halkjær-Kristensen J, Simonsen EB. A mechanism for increased contractile strength of human pennate muscle in response to strength training: changes in muscle architecture. *J Physiol.* 2001; 534(2): 613-623.
3. Ambrosio F, Fitzgerald GK, Ferrari R, Distefano G, Carvell G. A murine model of muscle training by neuromuscular electrical stimulation. *J Vis Exp.* 2012; (63): e3914.
4. Ato S, Makanae Y, Kido K, Sase K, Yoshii N, Fujita S. The effect of different acute muscle contraction regimens on the expression of muscle proteolytic signaling proteins and genes. *Physiol Rep.* 2017; 5(15): e13364.
5. Ayrault O, Andrique L, Fauvin D, Eymin B, Gazzeri S, Seite P. Human tumor suppressor p14ARF negatively regulates rRNA transcription and inhibits UBF1 transcription factor phosphorylation. *Oncogene.* 2006; 25(58): 7577-7586.
6. Baar K, Nader G, Bodine S. Resistance exercise, muscle loading/unloading and the control of muscle mass. *Essays biochem.* 2006; 42: 61-74.
7. Baehr LM, Furlow JD, Bodine SC. Muscle sparing in muscle RING finger 1 null mice: response to synthetic glucocorticoids. *J Physiol.* 2011; 589(Pt 19): 4759-4776.
8. Bar-Peled L, Schweitzer LD, Zoncu R, Sabatini DM. Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell.* 2012;150(6):1196-1208.
9. Bdolah Y, Segal A, Tanksale P, Karumanchi SA, Lecker SH. Atrophy-related ubiquitin ligases atrogin-1 and MuRF-1 are associated with uterine smooth muscle involution in the postpartum period. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 292(2): R971-R976.
10. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* 2000; 2(6): 326-332.
11. Blommaert EF, Luiken JJ, Blommaert PJ, van Woerkom GM, Meijer AJ. Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 1995; 270(5): 2320-2326.
12. Bloomer RJ, Falvo MJ, Fry AC, Schilling BK, Smith WA, Moore CA. Oxidative stress response in trained men following repeated squats or sprints. *Med Sci Sports Exerc.* 2006; 38(8): 1436-1442.
13. Bloomer RJ, Goldfarb AH, Wideman L, McKenzie MJ, Consitt LA. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J Strength Cond Res.* 2005;19(2):276-285.
14. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science.* 2001; 294(5547): 1704-1708.
15. Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E, Witters LA, Ellisen LW, Kaelin WG, Jr. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev.* 2004; 18(23): 2893-2904.

16. Burd NA, Holwerda AM, Selby KC, West DW, Staples AW, Cain NE, Cashaback JG, Potvin JR, Baker SK, Phillips SM. Resistance exercise volume affects myofibrillar protein synthesis and anabolic signalling molecule phosphorylation in young men. *J Physiol*. 2010; 588(Pt 16): 3119-3130.
17. Burt J, Wilson R, Willardson J. A comparison of once versus twice per week training on leg press strength in women. *J Phys Fit Sports Med*. 2007; 47(1): 13.
18. Cai D, Frantz JD, Tawa NE, Melendez PA, Oh B-C, Lidov HG, Hasselgren P-O, Frontera WR, Lee J, Glass DJ. IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell*. 2004; 119(2): 285-298.
19. Çakir-Atabek H, Demir S, PinarbaSili RD, Gündüz N. Effects of different resistance training intensity on indices of oxidative stress. *J Strength Cond Res*. 2010; 24(9): 2491-2497.
20. Cao SS, Kaufman RJ. Unfolded protein response. *Curr Biol*. 2012; 22(16): R622-R626.
21. Carroll TJ, Abernethy PJ, Logan PA, Barber M, McEniery MT. Resistance training frequency: strength and myosin heavy chain responses to two and three bouts per week. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1998; 78(3): 270-275.
22. Chan EY. mTORC1 phosphorylates the ULK1-mAtg13-FIP200 autophagy regulatory complex. *Sci Signal*. 2009; 2(84): pe51.
23. Clarke BA, Drujan D, Willis MS, Murphy LO, Corpina RA, Burova E, Rakhilin SV, Stitt TN, Patterson C, Latres E, Glass DJ. The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab*. 2007; 6(5): 376-385.
24. Cleland PJ, Appleby GJ, Rattigan S, Clark MG. Exercise-induced translocation of protein kinase C and production of diacylglycerol and phosphatidic acid in rat skeletal muscle in vivo. Relationship to changes in glucose transport. *J Biol Chem*. 1989; 264(30): 17704-17711.
25. Coffey VG, Reeder DW, Lancaster GI, Yeo WK, Febbraio MA, Yaspelkis BB, 3rd, Hawley JA. Effect of high-frequency resistance exercise on adaptive responses in skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc*. 2007; 39(12): 2135-2144.
26. Cohen S, Brault JJ, Gygi SP, Glass DJ, Valenzuela DM, Gartner C, Latres E, Goldberg AL. During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *J Cell Biol*. 2009; 185(6): 1083-1095.
27. Cong H, Sun L, Liu C, Tien P. Inhibition of atrogin-1/MAFbx expression by adenovirus-delivered small hairpin RNAs attenuates muscle atrophy in fasting mice. *Hum Gene Ther*. 2011;22(3):313-324.
28. Conlee R, Rennie M, Winder WW. Skeletal muscle glycogen content: diurnal variation and effects of fasting. *Am J Physiol*. 1976;231(2):614-618.
29. Csibi A, Cornille K, Leibovitch MP, Poupon A, Tintignac LA, Sanchez AM, Leibovitch SA. The translation regulatory subunit eIF3f controls the kinase-dependent mTOR signaling required for muscle differentiation and hypertrophy in mouse. *PLoS One*. 2010;5(2):e8994.
30. Cureton KJ, Collins MA, Hill DW, McElhannon FM, Jr. Muscle hypertrophy in men and women. *Med Sci Sports Exerc*. 1988; 20(4): 338-344.
31. Deldicque L, Bertrand L, Patton A, Francaux M, Baar K. ER stress induces anabolic resistance in muscle cells through PKB-induced blockade of mTORC1. *PLoS One*. 2011; 6(6): e20993.

32. Dennis MD, Coleman CS, Berg A, Jefferson LS, Kimball SR. REDD1 enhances protein phosphatase 2A-mediated dephosphorylation of Akt to repress mTORC1 signaling. *Sci signaling*. 2014;7(335):ra68.
33. DeYoung MP, Horak P, Sofer A, Sgroi D, Ellisen LW. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev*. 2008;22(2):239-251.
34. DiFrancisco-Donoghue J, Werner W, Douris PC. Comparison of once-weekly and twice-weekly strength training in older adults. *Br J Sports Med*. 2007; 41(1): 19-22.
35. Dimauro I, Pearson T, Caporossi D, Jackson MJ. A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue. *BMC Res Notes*. 2012; 5(1): 513.
36. Drummond MJ, Dreyer HC, Fry CS, Glynn EL, Rasmussen BB. Nutritional and contractile regulation of human skeletal muscle protein synthesis and mTORC1 signaling *J Appl Physiol*. 2009; 106(4): 1374-1384.
37. Ferguson G, Mothe-Satney I, Lawrence JC, Jr. Ser-64 and Ser-111 in PHAS-I are dispensable for insulin-stimulated dissociation from eIF4E. *J Biol Chem*. 2003; 278(48): 47459-47465.
38. Fielitz J, Kim MS, Shelton JM, Latif S, Spencer JA, Glass DJ, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle RING finger 1 and 3. *J Clin Invest*. 2007; 117(9): 2486-2495.
39. Figueiredo VC, Caldow MK, Massie V, Markworth JF, Cameron-Smith D, Blazevich AJ. Ribosome biogenesis adaptation in resistance training-induced human skeletal muscle hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015; 309(1): E72-E83.
40. Fry AC, Kraemer WJ. Resistance exercise overtraining and overreaching. *Sports Med*. 1997; 23(2): 106-129.
41. Fry AC, Kraemer WJ, Ramsey LT. Pituitary-adrenal-gonadal responses to high-intensity resistance exercise overtraining *J Appl Physiol*. 1998; 85(6): 2352-2359.
42. Fry AC, Kraemer WJ, Van Borselen F, Lynch JM, Triplett NT, Koziris LP, Fleck SJ. Catecholamine responses to short-term high-intensity resistance exercise overtraining. *J Appl Physiol*. 1994; 77(2): 941-946.
43. Fry AC, Schilling BK, Weiss LW, Chiu LZ. beta2-Adrenergic receptor downregulation and performance decrements during high-intensity resistance exercise overtraining. *J Appl Physiol*. 2006; 101(6): 1664-1672.
44. Fry CS, Drummond MJ, Glynn EL, Dickinson JM, Gundermann DM, Timmerman KL, Walker DK, Volpi E, Rasmussen BB. Skeletal muscle autophagy and protein breakdown following resistance exercise are similar in younger and older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2013; 68(5): 599-607.
45. Gibala MJ, MacDougall JD, Tarnopolsky MA, Stauber WT, Elorriaga A. Changes in human skeletal muscle ultrastructure and force production after acute resistance exercise *J Appl Physiol*. 1995; 78(2): 702-708.
46. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(25): 14440-14445.



47. Goodman CA, Hornberger TA. Measuring protein synthesis with SUNSET: a valid alternative to traditional techniques? *Exerc Sport Sci Rev*. 2013; 41(2): 107-115.
48. Goodman CA, Kotecki JA, Jacobs BL, Hornberger TA. Muscle fiber type-dependent differences in the regulation of protein synthesis. *PLoS One*. 2012;7(5):e37890.
49. Goodman CA, Mabrey DM, Frey JW, Miu MH, Schmidt EK, Pierre P, Hornberger TA. Novel insights into the regulation of skeletal muscle protein synthesis as revealed by a new nonradioactive in vivo technique. *FASEB J*. 2011; 25(3): 1028-1039.
50. Green DR, Levine B. To be or not to be? How selective autophagy and cell death govern cell fate. *Cell*. 2014;157(1):65-75.
51. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2008; 30(2): 214-226.
52. Härmäläinen N, Pette D. The histochemical profiles of fast fiber types IIB, IID, and IIA in skeletal muscles of mouse, rat, and rabbit. *J Histochem Cytochem*. 1993;41(5):733-743.
53. Hamilton DL, Philp A, MacKenzie MG, Patton A, Towler MC, Gallagher IJ, Bodine SC, Baar K. Molecular brakes regulating mTORC1 activation in skeletal muscle following synergist ablation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014;307(4):E365-E373.
54. Hara K, Yonezawa K, Weng QP, Kozlowski MT, Belham C, Avruch J. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J Biol Chem*. 1998;273(23):14484-14494.
55. Haraguchi FK, Silva ME, Neves LX, dos Santos RC, Pedrosa ML. Whey protein precludes lipid and protein oxidation and improves body weight gain in resistance-exercised rats. *Eur J Nutr*. 2011; 50(5): 331-339.
56. He C, Klionsky DJ. Analyzing autophagy in zebrafish. *Autophagy*. 2010;6(5):642-644.
57. Hickson RC, Hidaka K, Foster C. Skeletal muscle fiber type, resistance training, and strength-related performance. *Med Sci Sports Exerc*. 1994;26(5):593-598.
58. Hornberger TA, Sukhija KB, Chien S. Regulation of mTOR by mechanically induced signaling events in skeletal muscle. *Cell cycle*. 2006;5(13):1391-1396.
59. Huang H, Tindall DJ. Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci*. 2007; 120(Pt 15): 2479-2487.
60. Hulmi JJ, Tannerstedt J, Selänne H, Kainulainen H, Kovanen V, Mero AA. Resistance exercise with whey protein ingestion affects mTOR signaling pathway and myostatin in men. *J Appl Physiol*. 2009; 106(5): 1720-1729.
61. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*. 2002; 4(9): 648-657.
62. Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*. 2003;115(5):577-590.
63. Kamei Y, Miura S, Suzuki M, Kai Y, Mizukami J, Taniguchi T, Mochida K, Hata T, Matsuda J, Aburatani H, Nishino I, Ezaki O. Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal

muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *J Biol Chem*. 2004;279(39):41114-41123.

64. Kanazashi M, Okumura Y, Al-Nassan S, Murakami S, Kondo H, Nagatomo F, Fujita N, Ishihara A, Roy R, Fujino H. Protective effects of astaxanthin on capillary regression in atrophied soleus muscle of rats. *Acta Physiol*. 2013;207(2):405-415.
65. Kato H, Suzuki H, Mimura M, Inoue Y, Sugita M, Suzuki K, Kobayashi H. Leucine-enriched essential amino acids attenuate muscle soreness and improve muscle protein synthesis after eccentric contractions in rats. *Amino Acids*. 2015; 47(6): 1193-1201.
66. Kaufman RJ. Regulation of mRNA translation by protein folding in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci*. 2004; 29(3): 152-158.
67. Kedar V, McDonough H, Arya R, Li HH, Rockman HA, Patterson C. Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(52): 18135-18140.
68. Kosek DJ, Kim J-s, Petrella JK, Cross JM, Bamman MM. Efficacy of 3 days/wk resistance training on myofiber hypertrophy and myogenic mechanisms in young vs. older adults. *J Appl Physiol*. 2006; 101(2): 531-544.
69. Kraemer WJ, Fleck SJ, Evans WJ. Strength and power training: physiological mechanisms of adaptation. *Exerc Sport Sci Rev*. 1996; 24(1): 363-398.
70. Kregel KC, Zhang HJ. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007; 292(1): R18-R36.
71. Krisan AD, Collins DE, Crain AM, Kwong CC, Singh MK, Bernard JR, Yaspelkis BB, 3rd. Resistance training enhances components of the insulin signaling cascade in normal and high-fat-fed rodent skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2004; 96(5): 1691-1700.
72. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012; 149(2): 274-293.
73. Lee SW, Dai G, Hu Z, Wang X, Du J, Mitch WE. Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15(6): 1537-1545.
74. Li H, Malhotra S, Kumar A. Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy. *J Mol Med*. 2008; 86(10): 1113-1126.
75. Li Y-P, Chen Y, Li AS, Reid MB. Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003; 285(4): C806-C812.
76. Liao P, Zhou J, Ji LL, Zhang Y. Eccentric contraction induces inflammatory responses in rat skeletal muscle: role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010; 298(3): R599-R607.
77. Lira VA, Okutsu M, Zhang M, Greene NP, Laker RC, Breen DS, Hoehn KL, Yan Z. Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance. *FASEB J*. 2013; 27(10): 4184-4193.

78. Liu CM, Yang Z, Liu CW, Wang R, Tien P, Dale R, Sun LQ. Effect of RNA oligonucleotide targeting Foxo-1 on muscle growth in normal and cancer cachexia mice. *Cancer Gene Ther.* 2007; 14(12): 945-952.
79. Liu SF, Malik AB. NF- $\kappa$ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006; 290(4): L622-L645.
80. Lokireddy S, Wijesoma IW, Sze SK, McFarlane C, Kambadur R, Sharma M. Identification of atrogen-1-targeted proteins during the myostatin-induced skeletal muscle wasting. *Am J Physiol Cell physiol.* 2012; 303(5): C512-C529.
81. Luo L, Lu A-M, Wang Y, Hong A, Chen Y, Hu J, Li X, Qin Z-H. Chronic resistance training activates autophagy and reduces apoptosis of muscle cells by modulating IGF-1 and its receptors, Akt/mTOR and Akt/FOXO3a signaling in aged rats. *Exp Gerontol.* 2013;48(4):427-436.
82. Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell.* 2005; 121(2): 179-193.
83. Malhotra JD, Miao H, Zhang K, Wolfson A, Pennathur S, Pipe SW, Kaufman RJ. Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(47): 18525-18530.
84. Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell.* 2002;10(1):151-162.
85. Mao K, Klionsky DJ. AMPK activates autophagy by phosphorylating ULK1. *Circ Res.* 2011; 108(7): 787-788.
86. Mascher H, Tannerstedt J, Brink-Elfegoun T, Ekblom B, Gustafsson T, Blomstrand E. Repeated resistance exercise training induces different changes in mRNA expression of MAFbx and MuRF-1 in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 294(1): E43-E51.
87. Massaly N, Frances B, Mouldous L. Roles of the ubiquitin proteasome system in the effects of drugs of abuse. *Front Mol Neurosci.* 2014;7:99.
88. McClung JM, Judge AR, Powers SK, Yan Z. p38 MAPK links oxidative stress to autophagy-related gene expression in cachectic muscle wasting. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010; 298(3): C542-C549.
89. McLESTER JR, Bishop E, Guilliams M. Comparison of 1 Day and 3 Days Per Week of Equal-Volume Resistance Training in Experienced Subjects. *J Strength Cond Res.* 2000; 14(3): 273-281.
90. Michaut A, Pousson M, Millet G, Belleville J, Van Hoecke J. Maximal voluntary eccentric, isometric and concentric torque recovery following a concentric isokinetic exercise. *Int J Sports Med.* 2003; 24(01): 51-56.
91. Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy.* 2007; 3(6): 542-545.
92. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011; 27: 107-132.

93. Mofarrahi M, Sigala I, Guo Y, Godin R, Davis EC, Petrof B, Sandri M, Burelle Y, Hussain SN. Autophagy and skeletal muscles in sepsis. *PLoS one*. 2012;7(10):e47265.
94. Mothe-Satney I, Yang D, Fadden P, Haystead TA, Lawrence JC, Jr. Multiple mechanisms control phosphorylation of PHAS-I in five (S/T)P sites that govern translational repression. *Mol Cell Biol*. 2000; 20(10): 3558-3567.
95. Murlasits Z, Reed J, Wells K. Effect of resistance training frequency on physiological adaptations in older adults. *J Exerc Sci Fit*. 2012; 10(1): 28-32.
96. Nakada S, Ogasawara R, Kawada S, Maekawa T, Ishii N. Correlation between ribosome biogenesis and the magnitude of hypertrophy in overloaded skeletal muscle. *PLoS one*. 2016; 11(1): e0147284.
97. Nakashima K, Yakabe Y. AMPK activation stimulates myofibrillar protein degradation and expression of atrophy-related ubiquitin ligases by increasing FOXO transcription factors in C2C12 myotubes. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007; 71(7): 1650-1656.
98. Nicoll JX, Fry AC, Galpin AJ, Sterczala AJ, Thomason DB, Moore CA, Weiss LW, Chiu LZ. Changes in resting mitogen-activated protein kinases following resistance exercise overreaching and overtraining. *Eur J Appl Physiol*. 2016; 116(11-12): 2401-2413.
99. Nosaka K, Newton M. Difference in the magnitude of muscle damage between maximal and submaximal eccentric loading. *J Strength Cond Res*. 2002; 16(2): 202-208.
100. Nystrom GJ, Lang CH. Sepsis and AMPK Activation by AICAR Differentially Regulate FoxO-1, -3 and -4 mRNA in Striated Muscle. *Int J Clin Exp Med*. 2008; 1(1): 50-63.
101. O'Neil TK, Duffy LR, Frey JW, Hornberger TA. The role of phosphoinositide 3-kinase and phosphatidic acid in the regulation of mammalian target of rapamycin following eccentric contractions. *J Physiol*. 2009; 587(Pt 14): 3691-3701.
102. Ogasawara R, Arihara Y, Takegaki J, Nakazato K, Ishii N. Relationship between exercise volume and muscle protein synthesis in a rat model of resistance exercise *J Appl Physiol*. 2017; 123(4): 710-716.
103. Ogasawara R, Fujita S, Hornberger TA, Kitaoka Y, Makanae Y, Nakazato K, Naokata I. The role of mTOR signalling in the regulation of skeletal muscle mass in a rodent model of resistance exercise. *Sci Rep*. 2016; 6: 31142.
104. Ogasawara R, Kobayashi K, Tsutaki A, Lee K, Abe T, Fujita S, Nakazato K, Ishii N. mTOR signaling response to resistance exercise is altered by chronic resistance training and detraining in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2013; 114(7): 934-940.
105. Ogasawara R, Sato K, Matsutani K, Nakazato K, Fujita S. The order of concurrent endurance and resistance exercise modifies mTOR signaling and protein synthesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014; 306(10): E1155-E1162.
106. Ogborn DI, McKay BR, Crane JD, Parise G, Tarnopolsky MA. The unfolded protein response is triggered following a single, unaccustomed resistance-exercise bout. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014; 307(6): R664-R669.
107. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*. 2007; 282(33): 24131-24145.

108. Pascoe DD, Costill DL, Fink WJ, Robergs RA, Zachwieja JJ. Glycogen resynthesis in skeletal muscle following resistive exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 1993;25(3):349-354.
109. Patel J, McLeod LE, Vries RG, Flynn A, Wang X, Proud CG. Cellular stresses profoundly inhibit protein synthesis and modulate the states of phosphorylation of multiple translation factors. *FEBS J.* 2002; 269(12): 3076-3085.
110. Pham FH, Sugden PH, Clerk A. Regulation of protein kinase B and 4E-BP1 by oxidative stress in cardiac myocytes. *Circ Res.* 2000; 86(12): 1252-1258.
111. Phillips SM, Tipton KD, Aarsland A, Wolf SE, Wolfe RR. Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. *The American journal of physiology. Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1997; 273(1 Pt 1): E99-E107.
112. Pierre N, Barbé C, Gilson H, Deldicque L, Raymackers J-M, Francaux M. Activation of ER stress by hydrogen peroxide in C2C12 myotubes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 450(1): 459-463.
113. Polge C, Heng AE, Jarzaguet M, Ventadour S, Claustre A, Combaret L, Bechet D, Matondo M, Uttenweiler-Joseph S, Monsarrat B, Attaix D, Taillandier D. Muscle actin is polyubiquitinated in vitro and in vivo and targeted for breakdown by the E3 ligase MuRF1. *FASEB J.* 2011; 25(11): 3790-3802.
114. Potter CJ, Pedraza LG, Xu T. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol.* 2002; 4(9): 658-665.
115. Powers SK, Kavazis AN, DeRuisseau KC. Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005; 288(2): R337-R344.
116. Pullen N, Thomas G. The modular phosphorylation and activation of p70s6k. *FEBS Lett.* 1997; 410(1): 78-82.
117. Reiling JH, Hafen E. The hypoxia-induced paralogs Scylla and Charybdis inhibit growth by down-regulating S6K activity upstream of TSC in Drosophila. *Genes Dev.* 2004; 18(23): 2879-2892.
118. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8(7): 519-529.
119. Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(37): 13489-13494.
120. Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell.* 2010; 141(2): 290-303.
121. Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, Carr SA, Sabatini DM. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell.* 2007; 25(6): 903-915.
122. Sanchez AM, Csibi A, Raibon A, Cornille K, Gay S, Bernardi H, Candau R. AMPK promotes skeletal muscle autophagy through activation of forkhead FoxO3a and interaction with Ulk1. *J Cell Biochem.* 2012; 113(2): 695-710.

123. Sandri M. Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013; 45(10): 2121-2129.
124. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell.* 2004; 117(3): 399-412.
125. Scheffer DL, Silva LA, Tromm CB, da Rosa GL, Silveira PC, de Souza CT, Latini A, Pinho RA. Impact of different resistance training protocols on muscular oxidative stress parameters. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2012; 37(6): 1239-1246.
126. Schroder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. . *Mutat Res.* 2005; 569(1-2):29-63.
127. Serra R, Saavedra F, de Salles BF, Dias MR, Costa PB, Alves H, Simão R. The effects of resistance training frequency on strength gains. *J Exerc Physiol Online.* 2015; 18(1): 37-45.
128. Shenton D, Smirnova JB, Selley JN, Carroll K, Hubbard SJ, Pavitt GD, Ashe MP, Grant CM. Global translational responses to oxidative stress impact upon multiple levels of protein synthesis *J Biol Chem.* 2006; 281(39): 29011-29021.
129. Smith LL. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? *Med Sci Sports Exerc.* 2000; 32(2): 317.
130. Song H, Nakazato K, Nakajima H. Effect of increased excursion of the ankle on the severity of acute eccentric contraction-induced strain injury in the gastrocnemius. *Am J Sports Med.* 2004; 32(5): 1263-1269.
131. Souza RWA, Aguiar AF, Vechetti-Júnior IJ, Piedade WP, Campos GER, Dal-Pai-Silva M. Resistance Training With Excessive Training Load and Insufficient Recovery Alters Skeletal Muscle Mass–Related Protein Expression. *J Strength Cond Res.* 2014; 28(8): 2338-2345.
132. Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyva Y, Kline WO, Gonzalez M, Yancopoulos GD, Glass DJ. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell.* 2004; 14(3): 395-403.
133. Taaffe DR, Pruitt L, Pyka G, Guido D, Marcus R. Comparative effects of high- and low-intensity resistance training on thigh muscle strength, fiber area, and tissue composition in elderly women. *Clin Physiol.* 1996; 16(4): 381-392.
134. Thedieck K, Polak P, Kim ML, Molle KD, Cohen A, Jeno P, Arrieumerlou C, Hall MN. PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis. *PLoS one.* 2007;2(11):e1217.
135. Tintignac LA, Lagirand J, Batonnet S, Sirri V, Leibovitch MP, Leibovitch SA. Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *J Biol Chem.* 2005;280(4):2847-2856.
136. Tipton KD, Elliott TA, Cree MG, Wolf SE, Sanford AP, Wolfe RR. Ingestion of casein and whey proteins result in muscle anabolism after resistance exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2004; 36(12): 2073-2081.
137. Valenzuela PL, de Melo Aroeira AE, Torrella JR, de la Villa P. The effect of high-frequency neuromuscular electrical stimulation training on skeletal muscle properties in mice. *Arc Biol Sci.* 2017; 69(3): 391-397.

138. Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol.* 2007; 9(3): 316-323.
139. Vissing K, McGee S, Farup J, Kjølhede T, Vendelbo M, Jessen N. Differentiated mTOR but not AMPK signaling after strength vs endurance exercise in training-accustomed individuals. *Scand J Med Sci Sports.* 2013;23(3):355-366.
140. Wang L, Harris TE, Roth RA, Lawrence JC, Jr. PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J Biol Chem.* 2007; 282(27): 20036-20044.
141. Witard OC, Jackman SR, Breen L, Smith K, Selby A, Tipton KD. Myofibrillar muscle protein synthesis rates subsequent to a meal in response to increasing doses of whey protein at rest and after resistance exercise. *Am J Clin Nutr.* 2014; 99(1): 86-95.

## 関連論文

本博士論文は、下記の生理学専門誌に掲載された原著論文を基に、改訂・加筆したものである。

1. Takegaki J, Ogasawara R, Tamura Y, Takagi R, Arihara Y, Tsutaki A, Nakazato K, Ishii N. Repeated bouts of resistance exercise with short recovery periods activates mTOR signaling, but not protein synthesis, in mouse skeletal muscle. *Physiol Rep*. 2017; 5(22): e13515.



## 謝辞

本論文を作成するにあたり、ご指導を賜りました東京大学大学院 総合文化研究科 石井 直方 教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究においてご指導を賜りました名古屋工業大学大学院 生命・応用科学専攻 小笠原 理紀 准教授、日本体育大学大学院 体育科学研究科 中里 浩一 教授に心から感謝の意を表します。また、本稿の作成に際してご高閲賜りました東京大学大学院 総合文化研究科 八田 秀雄 教授、福井 尚志 教授、柳原 大 准教授、寺田 新 准教授に心から感謝の意を評します。さらに、本研究においてご助力を賜りました日本学術振興会 特別研究員 田村 優樹さん、日本体育大学大学院 健康科学・スポーツ医科学系 蔦木 新 助教、研究に際しご協力頂いた石井研究室・中里研究室の皆様心から御礼申し上げます。