

博士論文

論文題目 運動後のタウリン摂取が回復期のエネルギー代謝に与える効果
Effects of oral taurine administration on energy metabolism
during post-exercise recovery phase

氏名 高橋 祐美子

—目次—

第1章 序論.....	1
第2章 運動後のタウリン摂取が回転ケージにおける自発走行距離に与える影響	
2-1 緒言.....	13
2-2 実験方法.....	14
2-3 結果.....	17
2-4 考察.....	23
2-5 まとめ.....	28
第3章 運動後のタウリン摂取が回復期のエネルギー代謝に与える影響	
3-1 緒言.....	30
3-2 実験方法.....	31
3-3 結果.....	34
3-4 考察.....	42
3-5 まとめ.....	46
第4章 運動後のタウリン摂取が回復期の骨格筋グリコーゲン濃度の上昇を亢進させたメカニズムの解明	
4-1 緒言.....	48
4-2 実験方法.....	48
4-3 結果.....	54
4-4 考察.....	64

4-5	まとめ.....	70
第5章	総合論議.....	72
	まとめ.....	81
	参考文献.....	84
	謝辞.....	98

略語一覧

アデノシン一リン酸 (adenosine monophosphate) : AMP

アデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate) : ATP

ジヒドロキシアセトンリン酸 (dihydroxyacetonephosphate) : DHAP

フルクトース 1, 6 ビスリン酸 (fructose 1, 6 bisphosphate) : F1, 6P

遊離脂肪酸 (free fatty acid) : FFA

グルコース輸送担体 4 (glucose transporter 4) : GLUT4

グリコーゲン合成酵素 (glycogen synthase) : GS

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (nicotinamide adenine dinucleotide) : NADH

ホスホフルクトキナーゼ (phosphofructokinase) : PFK

ピルビン酸脱水素酵素 (pyruvate dehydrogenase) : PDH

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) : SDS-PAGE

セリン (serine) : Ser

タウリン輸送担体 (taurine transporter) : TauT

スレオニン (threonine) : Thr

最大酸素摂取量 (maximal oxygen uptake) : $VO_2\text{max}$

第1章 序論

運動時の「疲労」

運動を続けているとパフォーマンスの低下、一般に「疲労」と呼ばれる現象がみられる。運動時の疲労とは、要求されるもしくは期待される力の発揮を維持できなくなった状態と定義されている (Edwards, 1981)。運動時の疲労は単独の要素によってもたらされるものではなく、中枢性および末梢性の様々な要素が複雑に影響を及ぼしあって起こると考えられている。運動時の疲労にはどのような要素が関わり、またどのようなメカニズムで疲労が起こるのかということについて、これまでにバイオメカニクスや神経科学、生理学、心理学など様々な分野で検討されてきた。一般に、骨格筋における疲労とは、収縮速度の低下と弛緩にかかる時間の延長がもたらされたり、発揮張力の低下がみられたりする状態と定義されている (Allen et al., 2008)。疲労に関わる要素のうち、骨格筋内で生じるものとしては、無機リン酸による筋小胞体の Ca^{2+} の放出や取り込みの低下、収縮時の膜電位変化に関わる K^{+} や Na^{+} 、 Cl^{-} などのイオンの濃度のバランスの変化、細胞内 pH の大幅な低下、骨格筋グリコーゲン貯蔵の枯渇、クレアチンリン酸の枯渇、活性酸素種の増加などが挙げられる (Allen et al., 2008)。また、体温上昇や脱水、血中グルコース濃度の低下といった、骨格筋外で生じる変化も疲労にかかわる (Ament and Verkerke, 2009)。これらの要素は、運動後の回復期には運動前の状態に戻っていくが、要素によって運動前と同等の状態に戻るまでにかかる時間は異なる。運動の条件や回復期の過ごし方にも左右されるが、例えば、骨格筋中のクレアチンリン酸濃度のように運動後に 10 分程度で安静時と同等のレベルに戻るものもあれば (Sahlin et al., 1979, Arnold et al., 1984)、骨格筋のグリコーゲン濃度のように安静時と同等

のレベルに戻るまで 24 時間程度かかるものもある (Kochan et al., 1979)。さらに、炎症性サイトカインの濃度など 2 日以上安静時と同等のレベルに戻らないものなどもある (Carmichael et al., 2005)。スポーツを行う際には、数日間連続して練習や試合をこなすことや一日のうちに数試合行わなければならないこともあり、疲労からの回復に十分な時間を確保できないことも多い。そのため、運動による疲労に関わる要素を検討して、疲労からの回復を促進する方法を探索することは、次に運動を行う際の疲労を防ぎ、パフォーマンスを保つために重要となる。

運動時の疲労とエネルギー代謝

運動時の疲労と密接な関係があると考えられている要素の一つに、骨格筋のグリコーゲンが挙げられる。1967 年の Bergstrom et al.による研究で、高炭水化物食を摂取して骨格筋グリコーゲン濃度が増加した群では、低炭水化物食摂取群と比較して運動持続可能時間が延長することが示された (Bergstrom et al., 1967)。その後もヒトを対象とした研究で、骨格筋グリコーゲン濃度が低い被験者では、持久的運動を行った際の運動持続可能時間の低下やサッカーでダッシュを行う際の走速度の低下など、パフォーマンスの低下を示す報告がなされている (Ahlborg et al., 1967, Balsom et al., 1999, Skein et al., 2012)。運動時に骨格筋のグリコーゲンが重要である理由の一つとして、エネルギー需要の観点からの理由が挙げられる。65%VO₂max 以上の強度の運動において、アデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate: ATP) 産生に最も多く利用される代謝基質の中は骨格筋グリコーゲンである (Romijn et al., 1993, van Loon et al., 2001)。持久的運動の代表格であるマラソンの運動強度は一般に 60-70%VO₂max に相当すると考えられている。そのため、ウォーキングなど低

強度で行う運動を除き、多くの運動において最も利用される代謝基質は骨格筋のグリコーゲンであると考えられる。さらに、グリコーゲンは骨格筋の興奮収縮連関の機能に影響を与えることも示唆されている。骨格筋のグリコーゲンは t-system の Na^+, K^+ -ATP アーゼや、筋小胞体からの Ca^{2+} の放出にかかわる Ca^{2+} -ATP アーゼへの ATP 供給に重要な役割を果たす可能性が示されている (Dutka and Lamb, 2007, Ortenblad et al., 2013)。実際に、摘出した骨格筋を用いた実験系で、グリコーゲン濃度が低い条件では骨格筋内の Ca^{2+} の取り込みや放出の抑制が起こり、発揮張力の低下や、骨格筋が弛緩する際にかかる時間が長くなることが報告されている (Chin and Allen, 1997, Duhamel et al., 2006a and 2006b, Ortenblad et al., 2011)。グリコーゲン分解の律速酵素であるホスホリラーゼが欠損し、骨格筋のグリコーゲンを利用できないマッカードル病患者は、運動の持続可能時間が短くなることから (Lewis and Haller, 1986)、運動を行う際には骨格筋のグリコーゲンを利用することが不可欠であるといえる。

運動時に骨格筋でグリコーゲンを利用することは必要不可欠なことであるが、骨格筋でのグリコーゲンの過剰な分解を抑え、グリコーゲン濃度を長時間維持することは、疲労を防ぐために有効である。運動時に骨格筋での過剰なグリコーゲン分解を抑える方法の一つに、脂質を利用した ATP 産生を高めることが挙げられる。運動時の脂質の酸化利用を亢進するための方法は、血中遊離脂肪酸濃度を高めて骨格筋への脂質の供給を高めることや、運動トレーニングが挙げられる。運動トレーニングによってミトコンドリアの容量の増加や脂肪酸代謝に関わるタンパク質の発現の増加がもたらされることは広く知られている (Holloszy and Coyle, 1984)。さらに、脂質代謝にかかわるタンパク質の発現

増加や酵素活性上昇まで至らない短期間のトレーニング（5 - 7日間）でも、運動時の脂質利用の亢進がもたらされ、骨格筋のグリコーゲン濃度の低下が抑制される（Green et al., 1992）。運動時に骨格筋での過剰なグリコーゲン分解を抑制することは、疲労を防ぐために非常に重要な適応であることが伺い知れる。

他に、運動を持続する上で重要な要素として、血中グルコース濃度の維持が挙げられる。脳が最も多く利用する代謝基質は血中のグルコースであることから（Pardridge, 1983）、血中グルコース濃度の低下は中枢の機能低下に繋がると考えられている。運動中にグルコースを与えて血中グルコース濃度の低下を抑えると、中枢性疲労の指標の一つである随意最大収縮時の発揮パワーの低下の抑制や主観的運動強度の上昇抑制、そして運動持続可能時間の延長がもたらされる（Coyle et al., 1983 and 1986, Burgess et al., 1991, Nybo, 2003）。運動時の血中グルコース濃度は肝臓からのグルコースの放出と骨格筋を中心とした組織でのグルコースの取り込みのバランスで決まる。また、骨格筋でのグルコース取り込みはグリコーゲン濃度が低い条件で高まる（Hespel and Richter, 1990）。そのため、骨格筋グリコーゲン濃度を高めた状態で運動にのぞむことや、運動時の骨格筋グリコーゲン濃度の低下を抑制することは、骨格筋の収縮機能の低下の抑制に加え、血中グルコース濃度の維持にも繋がると考えられる。

以上のことより、運動時の疲労を防ぐためには、運動前の骨格筋のグリコーゲン濃度を高めることや、運動時に骨格筋でのグリコーゲンの過剰な利用を抑制することが重要であるといえる。

運動による疲労からの回復とエネルギー代謝

運動後の回復期のエネルギー代謝を改善することは、疲労からの回復の促進

に繋がる。さらに、多くの競技において試合や練習など運動を連続して行う場面が多く存在することを考えると、運動後の回復期のエネルギー代謝を改善することは、次に運動を行う際の疲労の防止にも繋がる。運動による疲労からの回復について、エネルギー代謝の観点から行われた研究では、骨格筋のグリコーゲン濃度を上昇させることが最も優先すべき事項の一つであると考えられてきた。そのため、運動後の骨格筋グリコーゲン濃度の上昇をもたらす上で有用な栄養物質の探索が、これまでに多く行われてきた。

運動後の骨格筋グリコーゲン濃度の上昇は、骨格筋でのグリコーゲン合成とグリコーゲンの利用のバランスにより決まると考えられる。また、骨格筋のグリコーゲンの合成については、血中のインスリン濃度、骨格筋でのグルコースの取り込み量、骨格筋のグリコーゲン合成酵素 (glycogen synthase: GS) の活性化状態等が規定する主要な要素である (Fisher et al., 2002b) (Fig. 1)。

骨格筋でのグルコースの取り込みがグリコーゲン合成に与える影響は大きいと考えられている。運動終了後に炭水化物を摂取した際、血中グルコース濃度の上昇幅が小さい、すなわち骨格筋などの組織でのグルコース取り込み量が高い被験者ほど、骨格筋のグリコーゲン濃度が上昇するという傾向がみられている (Hickner et al., 1997)。また、運動後の炭水化物の摂取量と骨格筋でのグリコーゲン合成量との間に有意な正の相関関係がみられている (Jetjens and Jeukendrup, 2003, Burke et al., 2004)。骨格筋でのグルコース取り込み量を規定するものは、細胞膜上のグルコース輸送担体 4 (glucose transporter 4: GLUT4) の量であると考えられている。GLUT4 は通常、細胞内にプールされているが、運動刺激やインスリン刺激に応じて細胞内から細胞膜上に移動する (Lund et al., 1995, Hansen et al., 1998a)。骨格筋でのグルコース取り込み量

は細胞膜上の GLUT4 のタンパク質量に比例する (Lund et al., 1993, Derave et al., 1999) ことから、GLUT4 の細胞膜上への移動を亢進させることは、骨格筋でのグルコース取り込みを高め、グリコーゲン合成を亢進することに繋がる。骨格筋でのグルコースの取り込みを高めると考えられている栄養物質のひとつに、カフェインが挙げられる。カフェイン摂取によって運動後のグリコーゲン濃度が上昇し、この時カフェイン投与群では GLUT4 の細胞膜上への移動にかかわるカルモジュリン依存性キナーゼのリン酸化型 (活性化型) の割合が高まっていたとの報告がある (Pedersen et al., 2008)。他に、骨格筋でのグルコースの取り込みを高める方法として、血中インスリン濃度を高めることも有用である。インスリンは骨格筋でのグルコース取り込みを高めるだけでなく、GS の活性化にも関わるため、グリコーゲン合成に重要な役割を果たす。血中インスリン濃度を上昇させやすい食事は、運動後の回復期の骨格筋グリコーゲン濃度の上昇を促進することが報告されている (Burke et al., 1993)。運動後の血中インスリン濃度の上昇、骨格筋でのグルコースの取り込みの増加、そして骨格筋グリコーゲン濃度の上昇に繋がることを報告されている栄養物質には、アミノ酸やペプチド、タンパク質が挙げられる (Ivy et al., 2002)。運動後に炭水化物と併せてアミノ酸やペプチド、タンパク質を摂取することで、血中インスリン濃度の上昇 (Zawadzki et al., 1992, van Loon et al., 2000a) や骨格筋でのインスリンシグナル伝達に関わるタンパク質の活性化型の割合の上昇 (Morifuji et al., 2010)、そして骨格筋をはじめとした組織でのグルコース取り込みの増加がもたらされたことが報告されている (van Loon et al., 2000b)。エネルギー代謝の観点から運動後に摂取すべき栄養物質についてまとめた総説でも、運動後の骨格筋グリコーゲン合成に対するアミノ酸やペプチド、タンパ

ク質摂取の有用性を述べたものが多い (Jetjens and Jeukendrup, 2003, Millard-Stafford et al., 2008, Rodriguez et al., 2009, Beelen et al., 2010)。

運動後の骨格筋グリコーゲン濃度の上昇を促進するには、グリコーゲンのエネルギー産生への利用を抑えることも有効であると示唆されている。糖の酸化利用が高まる暑熱環境においたヒトでは室温環境においたヒトと比較して、運動後の骨格筋のグリコーゲン濃度の上昇が抑えられることが報告されている (Naperalsky et al., 2010)。また、酢酸やヒドロキシクエン酸といった糖の酸化利用の抑制をもたらす栄養物質を摂取することで、運動後の骨格筋グリコーゲン濃度の上昇が亢進されるとの報告もある (Fushimi et al., 2002, Waller et al., 2009, Cheng et al., 2012)。安静時においても、カルニチン投与によって糖の酸化利用の律速酵素であるピルビン酸脱水素酵素 (pyruvate dehydrogenase: PDH) の活性が抑えられた場合、グルコース注入を行った後の骨格筋グリコーゲン濃度が対照群と比較して高値を示す (Stephens et al., 2006)。

これらのことから、運動後の回復期の骨格筋では、グリコーゲン合成の促進と糖のエネルギー産生への利用の抑制のいずれか、または両方を行うことが、グリコーゲン濃度の上昇を促進させると考えられる。

「抗疲労効果」をもつ物質としてのタウリンの可能性

これまで数多くの栄養物質に関して、運動時の疲労の軽減や、運動による疲労からの回復の促進に有用であるか、検討されてきた。運動による疲労に効果をもたらすと考えられている栄養物質の一つに、タウリンが挙げられる。タウリンとは、水によくとける性質をもつアミノ酸に似た化合物である。生体内に

において、タウリンは中枢および末梢の多くの組織に存在する。タウリンの生合成はメチオニンやシステインを用いて行われ、生合成の律速酵素であるシステインデオキシゲナーゼは肝臓や脂肪組織、腎臓など (Tsuboyama-Kasaoka et al., 2006)、システインスルフィン酸デカルボキシラーゼは肝臓や腎臓に存在する (Park et al., 2002)。一方、マウスの骨格筋にこれらの酵素はほとんど存在しない。そのため、骨格筋に存在するタウリンは他の組織で生合成されたもの、もしくは食餌由来と考えられる。タウリンは細胞膜にあるタウリン輸送担体 (taurine transporter: TauT) によって、Na⁺や Cl⁻と共に細胞内に輸送される。ICR マウスでは、本研究と同様に MF 飼料を与えた条件で、骨格筋湿重量 1 g あたり 43 μmol のタウリンが含まれ、また血漿タウリン濃度は 310 μM であることが報告されている (Nakamura et al., 2006)。

タウリンは運動時の疲労を抑制する効果をもつことが示唆されている。運動前のタウリン摂取によって、ヒトやラットで持久的運動時の持続可能時間の延長やタイムトライアル時の成績の向上がもたらされたと報告されている (Dawson et al., 2002, Miyazaki et al., 2004, Balshaw et al., 2013)。また、TauT の発現が抑えられ、組織中タウリン濃度が低下しているマウスでは、運動持続可能時間が短くなったとの報告がある (Warskulat et al., 2004)。しかし、タウリンがどのような働きで運動時に「抗疲労効果」をもたらすのか、メカニズムについては不明な点が多い。さらに、運動による疲労からの回復に関してタウリン摂取の効果を検討した先行研究は、摘出筋の発揮張力に対する効果を検討した論文が 1 報あるのみである (Goodman et al., 2009)。運動後にタウリンを摂取した際に、回復期の生体内でもたらされる効果や、エネルギー代謝に対する効果は不明である。運動時には収縮骨格筋をはじめとした組織から、

浸透圧調節の過程でタウリンが放出されることが示唆されている (Cuisinier et al., 2002, Lang, 2007)。ヒトを対象とした研究で長時間運動後に尿中や血中のタウリン濃度の上昇がみられ (Refsum et al., 1979, Cuisinier et al., 2001 and 2002)、さらにラットを対象とした先行研究ではトレッドミル走行によって、骨格筋タウリン濃度の有意な低下がみられている (Matsuzaki et al., 2002, Yatabe et al., 2003 and 2009, Ishikura et al., 2011)。運動によって組織でのタウリン濃度が低下した際のタウリン摂取が、運動による疲労からの回復に効果をもたらす可能性がある。

タウリンは様々な生理的応答に関与すると考えられている。骨格筋の機能に関して、タウリンの効果として報告されているものは、骨格筋の興奮収縮連関の改善 (Huxtable and Bressler, 1973, Pierno et al., 1998, Bakker and Berg, 2002, Goodman et al., 2009) や細胞膜の保護作用 (Dawson et al., 2002, Zhang et al., 2004, Silva et al., 2011)、浸透圧調節 (Huxtable, 1992, Schaffer et al., 2000, Cuisinier et al., 2002) などが挙げられる。また、詳細なメカニズムに関しては不明な点も多いが、タウリンがエネルギー代謝に影響を与えるとの報告もある。タウリンは ATP 産生の基質として利用されることはなく、代謝に関わる酵素の活性を直接高めるという作用も報告されていないが、運動前のタウリン摂取が運動時の血中グルコース濃度の低下の抑制 (Kubota and Saotome, 1974, Ishikura et al., 2008) や脂質酸化の割合の増加 (Rutherford et al., 2010) をもたらしことが報告されている。加えて、安静時において、ラットやモルモットでタウリン摂取によって糖負荷試験時の組織でのグルコースの取り込みが高まったとの報告がある (Kulakowski and Maturo, 1984, Harada et al., 2004, Kaplan et al., 2004, Nandhini et al., 2005, Carmineiro

et al., 2009, Ribeiro et al., 2009) 。組織でのグルコースの取り込みは、グリコーゲン合成に大きな影響を与えるものである。これらの先行研究より、運動後のタウリン摂取が、脂質酸化の割合の増加や組織でのグルコースの取り込みの亢進など、回復期にエネルギー代謝の改善をもたらし、疲労からの回復を促進する可能性が考えられる。

本博士論文の構成

本研究では、運動による疲労からの回復を促進させうる栄養物質としてタウリンの可能性に着目し、運動後の回復期におけるタウリン摂取の効果についてエネルギー代謝を中心に検討した。実験動物はオスの ICR マウスを用いた。ラットを対象として、タウリンの投与量を変化させて摂取効果を検討した先行研究で、投与量が 500 mg/kg 体重であったとき、骨格筋中タウリン濃度や運動による筋損傷の指標となる物質の濃度の上昇に対して最も効果がみられたことから (Miyazaki et al., 2004, Yatabe et al., 2009) 、本研究でマウスに対するタウリンの投与量は 500 µg/g 体重とした。第 2 章では、運動による疲労からの回復の指標として、回転ケージにおける自発走行距離を用い、運動後のタウリン摂取が運動による疲労からの回復にもたらす効果を検討した。第 2 章での結果を踏まえ、第 3 章の実験 3-1 では運動後に飼料を自由摂取としながらマウスを安静に保ち、タウリン摂取が回復期の組織中の代謝基質濃度の変化に与える効果を検討した。また、実験 3-2 では、運動終了直後と 60 分後にマウスに対して一定量のグルコースを経口投与し、血中グルコース濃度や血中インスリン濃度の変化にタウリン摂取が与える効果を検討した。さらに第 4 章では、タウリン摂取が運動後の回復期に骨格筋グリコーゲン濃度の上昇を亢進したメカニズム

のさらなる解明を目指した。骨格筋の糖代謝に関わるタンパク質の量や活性の指標となるリン酸化型の割合、さらにメタボローム解析によって網羅的に代謝に関わる物質の濃度を測定し、タウリン摂取の効果を検討した。これらの結果を通して、疲労からの回復を促進して次の運動に備える上で、運動後の回復期に骨格筋のグリコーゲン濃度の上昇を図ることの重要性、さらに、骨格筋のグリコーゲン濃度の上昇に繋がるエネルギー代謝の改善について検討を行った。

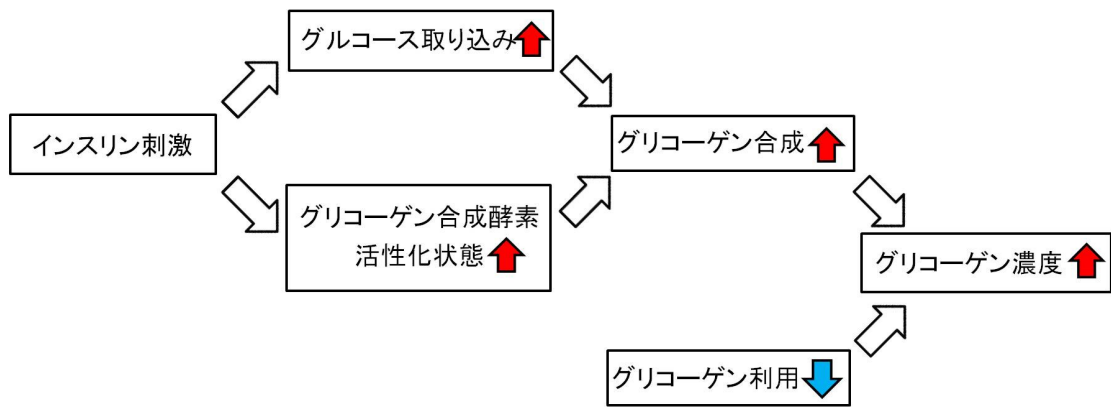


Fig. 1 骨格筋でグリコーゲン濃度の上昇をもたらされるメカニズムの概念図。

第2章 運動後のタウリン摂取が回転ケージにおける自発走行距離に与える影響

2-1 緒言

本研究では運動による疲労からの回復の指標として、回転ケージにおける自発走行距離を用いた。回転ケージにおける自発走行距離は、自発走行開始前に運動を行うことで安静条件と比較して有意に低下し、数日間かけて回復していくことが報告されている (Carmichael et al., 2005, Davis et al., 2007)。そのため、運動による疲労からの回復を示す指標として有用であると考えられる。回転ケージにおける自発走行距離を運動による疲労からの回復の指標として用いた先行研究は、いずれも筋損傷からの回復に焦点を当てたものであった (Carmichael et al., 2005, Davis et al., 2007, Netea et al., 2007)。しかし、回転ケージにおける自発走行に影響を与える要素は筋損傷だけではなく、末梢性および中枢性の様々な要素が影響を与える (Sherwin, 1998)。エネルギー代謝は自発走行に影響を与える要素の一つであると考えられている。その根拠としては、回転ケージでの自発走行距離と飼料摂食量との間に正の相関関係がみられることや (Koteja et al., 1999, Swallow et al., 2001)、自発走行距離の長いマウス同士を十数代かけあわせて産まれた系統のマウスは、骨格筋のグルコース取り込み能力が高いことが挙げられる (Dumke et al., 2001)。これらのことから、運動後の回転ケージにおける自発走行距離は、エネルギー代謝の観点からも、運動による疲労からの回復の指標として有用なものであると考えられる。

本研究では、エネルギー代謝を改善して運動による疲労からの回復を促進させる可能性を持つ栄養物質として、タウリンに着目した。タウリンは ATP 産生の基質として利用されることはなく、また代謝に関わる酵素の活性を直接高め

るという作用も報告されていないが、エネルギー代謝に影響を与えるとの報告はいくつかなされている。例えば、運動前のタウリン摂取によって、ラットやヒトで運動時の血中グルコース濃度の低下が抑制されることや (Kubota and Saotome, 1974, Ishikura et al., 2008)、ヒトにおいて運動時の脂質酸化が高まることが報告されている (Rutherford et al., 2010)。運動後のタウリンの摂取が回復期にもたらす効果については、エネルギー代謝の分野に限らずほぼ検討されていないが、回復期のエネルギー代謝を改善する可能性も考えられる。そこで、本研究では運動後のタウリン摂取が回転ケージにおける自発走行距離に与える影響を検討した。さらに、自発走行距離と組織中の代謝基質濃度や飼料摂取量との関係を検討することで、運動後のタウリン摂取が回復期のエネルギー代謝に与える効果を検討することとした。

2-2 実験方法

実験動物

実験は飼育開始時に 6 週齢のオスの ICR 系マウスを用いて行った (CLEA Japan, Inc.)。実験環境に慣らすため、全てのマウスに対して、飼育室到着より 1 週間の予備飼育期間を設けた。飼料は MF 飼料を用いた (Oriental Yeast Co., Ltd.)。飼育時に MF 飼料を摂取させたマウスやラットにおいて、骨格筋中のタウリン濃度が生理学的範囲内の濃度であることが確認されている (Huxtable, 1992, Yatabe et al., 2003 and 2009, Nakamura et al., 2006)。飼料と水は自由摂取とした。飼育室は室温 23 °C に保ち、9 時から 21 時までを暗期、21 時から 9 時までを明期に設定した。全ての実験計画は、東京大学倫理委員会から倫理審査を受けて行なわれた。

回転ケージにおける自発走行運動とトレッドミル走行運動

実験は全て、マウスにおける活動期である暗期に行った。実験日の1週間前にあたる日より3日間、全てのマウスを回転車輪（直径20 cm、幅5 cm）がついたケージ（22 × 9 × 8 cm）に1匹ずつ入れて飼育し、回転車輪がついたケージに馴らした。この回転ケージは前後どちらに回転しても記録されるようになっており、またマウスがケージと回転車輪を自由に行き来することを可能とした。走行量は取りつけの計数機により記録し、回転数と車輪の直径より走行距離を算出した。3日間の走行距離および体重に群間差が出ないように、マウスをタウリン投与群（n = 5 - 7）と生理食塩水投与群（n = 5 - 7）の2群に分けた。また、実験当日の5日前より3日間、トレッドミル（MK-680, Muromachi Kikai Co., Inc.）上での走行運動への慣らしを目的として、数分間走行させた。投与物はタウリンの投与量が体重1 gあたり0.5 mgとなるよう調整したタウリン水溶液または生理食塩水とした。また、経口投与はゾンデを用いて、マウスの体重1 gあたり0.1 mlの溶液を投与した。

実験当日には、直前の食事による影響を防ぐため、トレッドミル走行開始の4時間前より絶食を行わせた。トレッドミル走行は毎分25 mの速さで90分間行わせた。トレッドミル走行終了直後にタウリン水溶液または生理食塩水の投与を行った。その後、マウスを回転車輪がついたケージに入れた。飼料と水は自由摂取とした。回転車輪がついたケージに入れてから6時間後まで30分ごとに回転数の記録を行った。回転車輪がついたケージに入れてから3、6時間後にマウスを頸椎脱臼にて屠殺し、開胸後採血した。さらに、肝臓および腓腹筋を摘出した。組織は摘出後すぐに液体窒素で凍結し、分析まで-80℃で保存し

た。自発走行時の飼料摂食量は、運動終了直後に与えた飼料重量と、3 時間または 6 時間の自発走行終了時にケージに残っていた飼料重量の差より求めた。

代謝基質濃度を測定するために、安静時 (n = 6) においても同様に組織を摘出した。また、トレッドミル走行を行わない条件でマウスにタウリン水溶液 (n = 6) または生理食塩水 (n = 6) の投与を行い、回転車輪がついたケージに入れた後、3 時間後まで 30 分ごとに回転数の記録を行った。

分析方法

血中グルコース濃度はグルテストセンサーエースを用いて測定した (Glutest Ace; Arkray Inc.)。血中遊離脂肪酸濃度は Wako NEFA C test kit を用いて測定した (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)。肝臓および腓腹筋のグリコーゲン濃度は Lo et al.の方法を用いて測定した (Lo et al., 1970)。

統計処理

各測定結果は平均値±標準誤差で表した。自発走行距離は繰り返しのある二元配置分散分析 (トレッドミル走行 × 時間、またはタウリン摂取 × 時間) を行い、post-hoc test として Bonferroni 法を用いた。なお、交互作用が認められた場合には、多重比較検定により有意差を検定した。トレッドミル走行前後および自発走行運動直後の代謝基質濃度については、それぞれの群内で一元配置分散分析を行い、post-hoc test として Tukey-Kramer 法を用いた。体重、摂食量、代謝基質濃度、飼料摂食量あたりの自発走行距離の投与群間の比較は、対応のない t 検定により行った。有意水準は $p < 0.05$ とした。

2-3 結果

体重変化および飼料摂食量

トレッドミル走行後に回転ケージ内で3時間（タウリン投与群: 36.8 ± 0.6 g、生理食塩水投与群: 37.0 ± 0.2 g）および6時間（タウリン投与群: 35.6 ± 0.5 g、生理食塩水投与群: 37.0 ± 0.7 g）自発走行運動を行わせた直後のマウスの体重について、いずれもタウリン投与群と生理食塩水投与群との間に有意な差はみられなかった。また、飼料摂食量に関しても、3時間（タウリン投与群: 1.3 ± 0.2 g、生理食塩水投与群: 1.6 ± 0.3 g）および6時間（タウリン投与群: 1.8 ± 0.2 g、生理食塩水投与群: 1.6 ± 0.2 g）自発走行運動直後の値について、両投与群間に差はみられなかった。

自発走行距離

自発走行運動開始から30分毎の自発走行距離について、タウリン投与群生理食塩水投与群いずれも、トレッドミル走行を行った条件ではトレッドミル走行を行わなかった条件と比較して、自発走行開始直後からの30分間の走行距離が有意に低値を示した（Figs. 2-1A and B, $p < 0.01$ ）。生理食塩水投与群では、トレッドミル走行を行った条件ではトレッドミル走行を行わなかった条件と比較して、自発走行運動開始より2時間30分後からの30分間の走行距離が有意に低値を示した（Fig. 2-1A, $p < 0.01$ ）。一方、タウリン投与群では、自発走行運動開始より1時間後からの30分間の走行距離について、トレッドミル走行を行った条件でトレッドミル走行を行わなかった条件と比較して有意に高値を示した（Fig. 2-1B, $p < 0.05$ ）。トレッドミル走行を行っていない条件での自発走行距離に関してはタウリン投与の主効果がみられず、いずれのタイムポ

イントにおいても両投与群間に有意差はみられなかった (Fig. 2-1C)。一方、トレッドミル走行を行った条件では、自発走行開始より 3 時間の走行距離について、タウリン投与の主効果がみられた (Fig. 2-1D, $p < 0.01$, $F(1, 72) = 13.95$)。また、トレッドミル走行終了より 3 時間後から 6 時間後までの自発走行距離についても、タウリン投与の主効果がみられた (Fig. 2-1D, $p < 0.01$, $F(1, 72) = 9.24$)。加えて、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、トレッドミル走行後の飼料摂食量 1 g あたりの自発走行距離が有意に高値を示した (Fig. 2-2, $p < 0.05$)。以上の結果より、トレッドミル走行は、その後の自発走行開始より 30 分間の走行距離を低下させることが示された。生理食塩水投与群では、自発走行開始より 2 時間 30 分後からの 30 分間の走行距離についても、トレッドミル走行によって有意に低下した。一方、タウリン投与群においては、自発走行開始より 30 分後以降、トレッドミル走行によって自発走行距離が低値を示すことがなく、逆にトレッドミル走行を行った条件よりも高値を示す時間帯もみられた。また、トレッドミル走行を行った条件では、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較してより長い距離を走行した。さらに、タウリン投与群では、飼料摂食量が生理食塩水投与群と同等であったにもかかわらず、より長い距離を走行していた。これらの結果から、タウリン投与が運動による疲労からの回復に効果をもたらしたことが示唆された。

組織中の代謝基質濃度

安静時とトレッドミル走行直後の組織中の代謝基質濃度を測定した結果、血中グルコース濃度 ($p < 0.01$)、腓腹筋グリコーゲン濃度 ($p < 0.05$)、肝臓グリコーゲン濃度 ($p < 0.01$) はいずれもトレッドミル走行直後の値が有意に低

値を示した。血中グルコース濃度に関しては、両投与群とも、自発走行開始より 3 時間後には安静時との差がみられなかった (Fig. 2-3A)。肝臓グリコーゲン濃度については両投与群とも、自発走行開始より 3 時間後には安静時との差がみられず、6 時間後においては安静時と比較して有意に高値を示した (Fig. 2-3B, $p < 0.01$)。腓腹筋グリコーゲン濃度については、両投与群ともに自発走行開始より 3 時間後において安静時と比較して有意に低値を示し ($p < 0.05$)、自発走行開始より 6 時間後においては安静時との差がみられなかった (Fig. 2-3C)。血中遊離脂肪酸濃度については、トレッドミル走行直後は安静時と比較し有意に高値を示し ($p < 0.05$)、両投与群とも自発走行開始より 3 時間後および 6 時間後には安静時との差がみられなかった (Fig. 2-3D)。血中グルコース濃度、腓腹筋および肝臓のグリコーゲン濃度、血中遊離脂肪酸濃度について、自発走行開始より 3 時間後と 6 時間後いずれも、タウリン投与群と生理食塩水投与群との間に有意な差はみられなかった。タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して自発的な走行距離が延長した、すなわち、走行によって多くのエネルギーを使っているにもかかわらず、骨格筋や肝臓のグリコーゲン濃度には生理食塩水投与群との差がみられなかった。

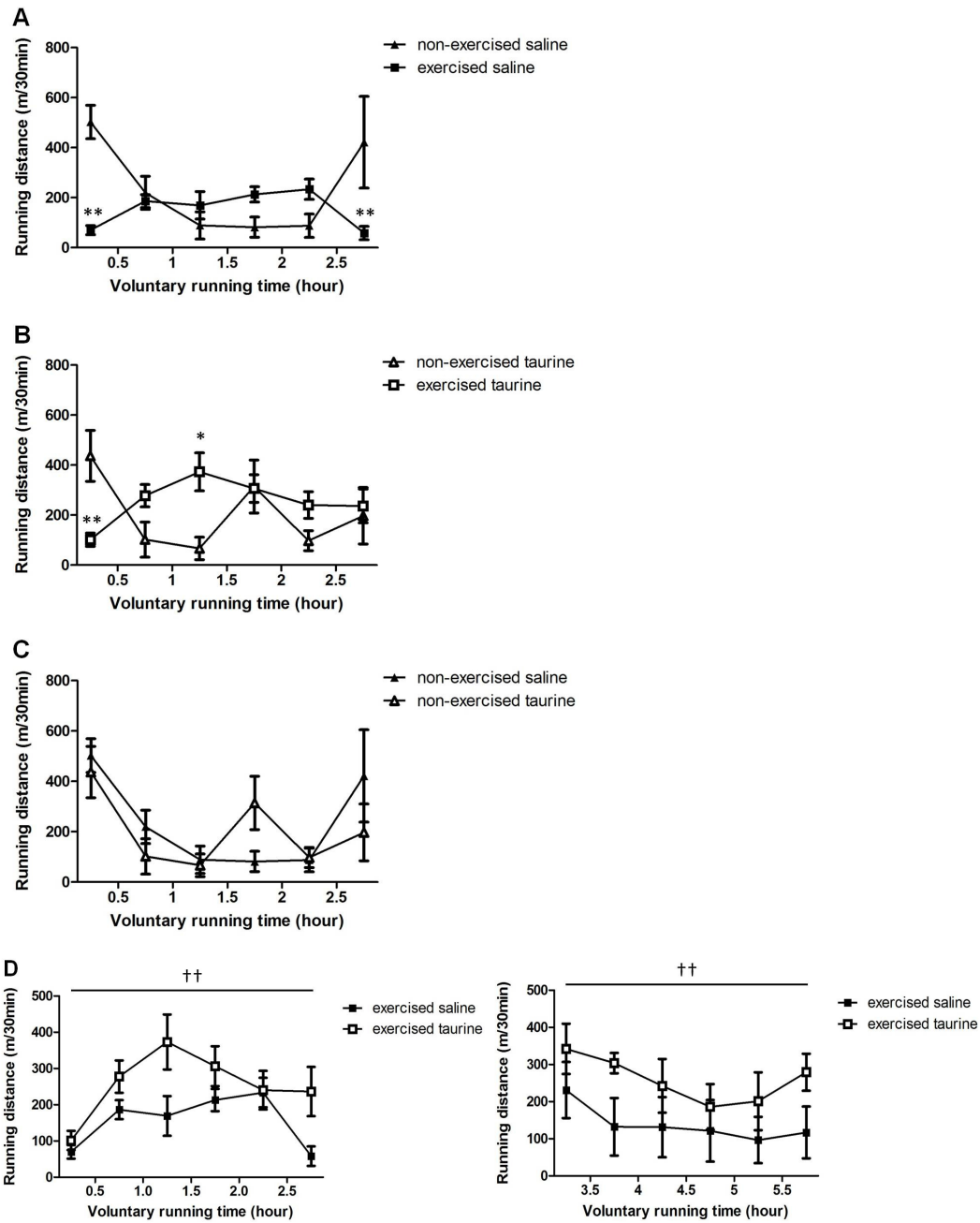


Fig. 2-1 トレッドミル走行後または安静に保った後のタウリン投与群 (A) および生理食塩水投与群 (B) の回転ケージにおける 30 分毎の自発的な走行距離。安静に保った後 (C) または毎分 25 m の速度で 90 分間のトレッドミル走行後 (D) のタウリン投与群および生理食塩水投与群の回転ケージにおける 30 分毎の自発的な走行距離。いずれのグラフも三角で示したプロットは安静に保った

後、四角で示したプロットは毎分 25 m の速度で 90 分間のトレッドミル走行後の自発走行距離を示す。また、白いプロットはタウリン投与群、黒いプロットは生理食塩水投与群の自発走行距離を示す。平均値 ± 標準誤差で表す。*, **: 同タイムポイントの安静群と比較して $p < 0.05$, $p < 0.01$ 、††: タウリン投与の主効果 ($p < 0.01$)。

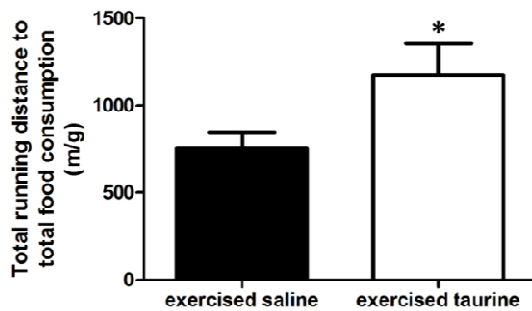


Fig. 2-2 毎分 25 m の速度で 90 分間のトレッドミル走行後の飼料摂食量 1 g あたりの総走行距離。白いバーはタウリン投与群、黒いバーは生理食塩水投与群の値を示す。*: 生理食塩水投与群と比較して $p < 0.05$ 。

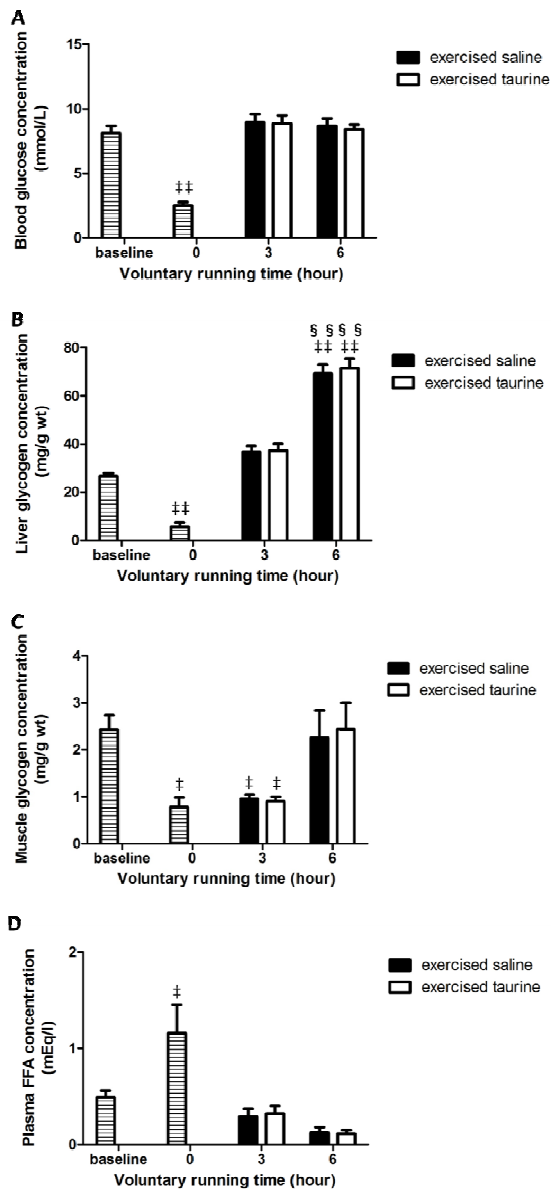


Fig. 2-3 トレッドミル走行前後および3, 6時間の回転ケージにおける自発走行終了直後の血中グルコース濃度 (A)、肝臓グリコーゲン濃度 (B)、腓腹筋グリコーゲン濃度 (C)、血中遊離脂肪酸濃度 (D)。いずれのグラフも白いバーはタウリン投与群、黒いバーは生理食塩水投与群の値を示す。†, ††: 運動前の値と比較して $p < 0.05$ および $p < 0.01$ 、§§: 3時間の自発走行終了直後と比較して $p < 0.01$ 。

2-4 考察

運動後および経口摂取後のタウリンの動態

マウスではタウリン経口摂取後の組織中タウリン濃度の経時的変化は測定されていない。ラットでは、 ^{35}S で放射性ラベルしたタウリン（投与量: 50 mg/kg 体重）を経口摂取した際、10 分以内に血液中に ^{35}S のシグナルが現れたことが報告されている（Iwata et al., 1978）。また、 ^{35}S で放射性ラベルしたタウリンを尾静脈に注射した際には15分以内に骨格筋に ^{35}S のシグナルが現れることが報告されている（Awapara, 1957）。これらの先行研究をあわせると、マウスにおいて経口摂取したタウリンは1時間以内に血流に乗って、骨格筋を含め全身に行きわたると考えられる。

運動開始により骨格筋での収縮活動がさかんになると、骨格筋中の代謝基質のモル濃度が高まり、浸透圧が増加すると考えられる。この時、骨格筋では浸透圧を一定に保つために、イオンやアミノ酸など様々な物質が放出される（Usher-Smith et al., 2009）。タウリンは浸透圧調節のために骨格筋から放出される物質の一つと考えられている（Cuisinier et al., 2002, Lang, 2007）。ICR マウスにおける運動前後の骨格筋タウリン濃度の変化はこれまで測定されていないが、ラットを対象とした先行研究では、毎分 25 m の速さで 60 分間または 100 分間のトレッドミル走行によって、骨格筋タウリン濃度の有意な低下がみられている（Matsuzaki et al., 2002, Yatabe et al., 2003 and 2009, Ishikura et al., 2011）。本研究で行ったトレッドミル走行（毎分 25 m の速さで 90 分間）によっても、マウスの骨格筋タウリン濃度は低下すると考えられる。タウリン摂取によって運動後の骨格筋でのタウリン濃度の回復が促進され、骨格筋の機能の回復に効果をもたらし、自発走行距離の延長に繋がった可能性がある。

MF 飼料のタウリン含有量は公表されていないが、標準的な飼料 (Purina 社製 Laboratory Rodent Diet 5001) のタウリンの含有量は 0.02% である。予備実験で、平均体重 35.2 ± 0.6 g のマウスの平均摂食量は 4.8 ± 0.1 g であった。よって、マウスの 1 日のタウリン摂取量は体重 1 g あたり 0.03 mg 程度と推定できる。体重 1 g あたり 0.5 mg のタウリン投与は 1 日の摂取量の 15-20 倍に相当する。また、自発走行時に飼料より摂取したタウリンの量は、本研究の結果より、3 時間自発走行を行ったマウスでは体重 1 g あたり 8 μ g 程度、6 時間自発走行を行ったマウスでは 10 μ g 程度と推定できる。タウリン投与群のタウリン摂取量は、生理食塩水投与群の 50 倍以上に相当する。

タウリン摂取がエネルギー代謝に与えた影響

運動時に最も重要なエネルギー代謝基質の一つは、骨格筋のグリコーゲンである。一定強度以上の運動時において最も多く使われるエネルギー代謝基質が骨格筋のグリコーゲンであることや (Romijn et al., 1993, van Loon et al., 2001)、骨格筋グリコーゲン濃度の低下が発揮張力の低下に繋がることなど (Chin and Allen, 1997, Duhamel et al., 2006a and 2006b, Ortenblad et al., 2011 and 2013)、複数の観点から、骨格筋のグリコーゲンが運動を行う際に重要であることが示唆されている。タウリン投与群で生理食塩水投与群と比較して、トレッドミル走行後の自発走行距離が高値を示した理由として、タウリン摂取によって運動後の骨格筋でのグリコーゲン合成が高まったためである可能性が考えられる。これまでの研究で、タウリンが骨格筋をはじめとした組織でのグルコースの取り込みやグリコーゲン合成を促進する可能性が示されている。

いくつかの先行研究を挙げると、タウリン摂取によって、Ⅱ型糖尿病モデルのラットで糖負荷試験時の血中グルコース濃度の上昇が抑制された、すなわち組織でのグルコースの取り込みが高まったとの報告がある (Harada et al., 2004, Nandhini et al., 2005)。また、健常なラットやモルモットにおいても同様な報告がされている (Kulakowski and Maturro, 1984, Kaplan et al., 2004, Carneiro et al., 2009, Ribeiro et al., 2009)。さらに、健常なラットにグルコースを投与した際には、タウリン投与群では非投与群と比較して、肝臓でのグリコーゲン濃度の有意な増加がみられている (Kulakowski and Maturro, 1984)。これらの先行研究より、運動後のタウリン投与によって肝臓や骨格筋でのグリコーゲン合成が亢進される可能性が考えられる。そのため、次章において、運動後のタウリン摂取が骨格筋グリコーゲン合成を亢進した可能性を検討した。

ICR マウスの回転ケージでの自発走行時の平均速度は 10-20 m/min、最大速度は 20 - 30 m/min に達すると報告されている (Koteja et al., 1999)。ICR マウスの VO_{2max} における走速度は 31.7 m/min (1.9 km/h) であるとの報告より (Swallow et al., 1998)、回転ケージでの自発走行時の平均速度は ICR マウスにとって 30 - 60% VO_{2max} に相当する。このような強度で運動を行う際には、糖に加えて脂質をエネルギー源として利用することも重要となる (Romijn et al., 1993, van Loon et al., 2001)。さらに本研究では、トレッドミル走行によって、血中グルコース濃度や骨格筋および肝臓グリコーゲン濃度が有意に低下した。このように糖の貯蔵が低下している条件では、体内に貯蔵されている脂質への依存が高まると考えられる。タウリン摂取が脂質代謝を亢進する可能性を示す先行研究として、運動前の単回のタウリン摂取がヒトの持続的運動時の脂質の酸化利用を高めたとの報告がある (Rutherford et al., 2010)。また、ラ

ットから抽出した脂肪組織にタウリンを添加することで、トリグリセライドを遊離脂肪酸へと分解する時の重要な酵素である **protein kinase A** の活性が高まったとの報告がある (Pina-Zentella et al., 2012)。糖の貯蔵の低下をもたらすトレッドミル走行後に、飼料摂食量が同等であったにもかかわらず、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して自発走行距離が有意に高値を示した。これらの結果は、タウリン摂取によって体内に貯蔵されていた脂質の代謝が活性化されたことで、もたらされた可能性がある。

それぞれの投与群内で、回転ケージでの自発走行距離について、トレッドミル走行の有無による差を比較した結果、タウリン投与群と生理食塩水投与群いずれも、自発走行開始直後の 30 分間にはトレッドミル走行を行った群で自発走行距離が有意に低値を示した。しかし、自発走行開始より 30 分後からの 30 分間においては、両投与群ともトレッドミル走行による影響はみられなかった。トレッドミル走行終了から 30 分後以降において、自発走行距離がトレッドミル走行を行っていない条件と同等であった理由として、トレッドミル走行による脂肪分解の亢進が運動終了より 1・2 時間経過した時点でも続き、遊離脂肪酸の供給が多く行われていたためである可能性が考えられる。ヒトでは、運動終了後には安静時と比較して呼吸交換比が低値を示す、すなわち脂質の酸化が高まった状態になる (Bielinski et al., 1985, Maehlum et al., 1986)。また、この呼吸交換比の低下はヒトでは運動終了より 6 時間以上続いた (Bielinski et al., 1985, Maehlum et al., 1986)。そのため、本研究でも、トレッドミル走行による脂質酸化の亢進は数時間続いていた可能性が考えられる。さらに、興味深い結果として、タウリン投与群では自発走行開始より 1 時間後からの 30 分間、トレッドミル走行を行った群の自発走行距離がトレッドミル走行を行わな

かった群と比較して有意に高値を示した。タウリンが脂肪組織での脂質分解の亢進や運動時の脂質利用の亢進をもたらしたとの報告があることより (Rutherford et al., 2010, Pina-Zentella et al., 2012) 、トレッドミル走行に加えてタウリンを摂取することで脂肪分解がより亢進され、骨格筋への脂質の供給量が高まり、その結果、トレッドミル走行を行わなかった条件と比較して自発走行距離が有意に高値を示した可能性も考えられる。

タウリン摂取が影響を与えたと考えられる要素 (エネルギー代謝以外の要素)

タウリンはエネルギー代謝に限らず、様々な生理的応答に関わると考えられている。詳細なメカニズムについては不明な点も多いが、例えば、タウリンが Na^+ や Cl^- の細胞内外への流入および流出や、筋小胞体における Ca^{2+} の取り込みや貯蔵に関わるとの報告がある (Huxtable and Blessler, 1973, Bakker and Berg, 2002, Goodman et al., 2009) 。これらのイオンの出入りは、骨格筋の興奮収縮連関に関わるものである。実際に *in vitro* の実験系において、2週間タウリンを摂取したラットから摘出した骨格筋では、電気刺激時の張力の増加や (Bakker and Berg, 2002) 、長時間電気刺激を行った際の張力低下の抑制がみられている (Goodman et al., 2009) 。そのため、運動後のタウリン摂取が骨格筋の興奮収縮連関の改善をもたらし、生理食塩水投与群と比較して自発走行距離が高値を示した可能性がある。また、運動前のタウリン摂取によって、運動による筋損傷や細胞膜の損傷、酸化ストレスの指標となる物質の濃度の上昇が抑えられることも報告されている (Dawson et al., 2002, Zhang et al., 2004, Yatabe et al., 2009, Silva et al., 2011) 。タウリン摂取によって、自発走行時の骨格筋をはじめとした組織の細胞膜へのダメージが軽減され、自発走行距離

の増加に繋がった可能性も考えられる。さらに、タウリンは浸透圧調節にも関わることを示唆されている (Huxtable, 1992, Schaffer et al., 2000, Cuisinier et al., 2002, Lang, 2007)。運動時には、収縮骨格筋では吸水、非収縮骨格筋では脱水が起こる (Costill et al., 1976)。運動後に細胞体積の回復が起こる際の浸透圧の調節に、タウリンが関わった可能性も考えられる。

タウリンは脳や脊髄にも存在し、中枢神経系の生理的応答にも関与することが示唆されている (Huxtable, 1992, Foos and Wu, 2002)。また、タウリンの経口投与や尾静脈への注射を行った際、タウリンは脳血液関門を通過して脳に取り込まれることが示されている (Peck and Awapara, 1967, Minato et al., 1969)。しかし、ラットに ^{35}S で放射性ラベルしたタウリンを経口投与した際、大脳や小脳で ^{35}S のシグナルが認められたのは経口投与から 12 時間後以降であった (Iwata et al., 1978)。一方、本研究で、トレッドミル走行後のタウリン投与が回転ケージでの自発走行距離を高めるという結果は、経口投与から 3 時間以内に得られた。そのため、摂取したタウリンが中枢神経系に作用して自発走行距離を高めたという可能性は低いと考えられる。

2-5 まとめ

本研究では、運動による疲労からの回復の指標として回転ケージにおける自発走行距離を用い、90 分間のトレッドミル走行後のタウリン摂取が運動による疲労からの回復にもたらす効果を検討した。タウリン投与群と生理食塩水投与群いずれも、トレッドミル走行終了直後より 30 分間の自発走行距離は、トレッドミル走行を行わない条件での自発走行距離と比較して有意に低値を示した。すなわち、トレッドミル走行によって疲労がもたらされたことが確認された。

また、生理食塩水投与群では、自発走行開始より 2 時間 30 分後においても、トレッドミル走行を行った条件ではトレッドミル走行を行わない条件と比較して、自発走行距離が有意に低値を示した。一方、タウリン投与群では自発走行開始直後を除き、トレッドミル走行後の自発走行距離がトレッドミル走行を行わない条件での値と比較して低値を示した時間帯はなかった。逆に、自発走行開始より 1 時間後からの 30 分間において、タウリン投与群では、トレッドミル走行を行った条件での自発走行距離が、トレッドミル走行を行わない条件での自発走行距離よりも有意に高値を示した。トレッドミル走行を行わない条件での自発走行距離に関しては、タウリン投与群と生理食塩水投与群との間に差がみられなかった。一方、トレッドミル走行後の自発走行距離は、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、高値を示した。さらに、糖の貯蔵の大きな低下をもたらすトレッドミル走行後に、タウリン投与群では飼料摂食量 1 g あたりの自発走行距離が有意に高値を示した。そして、タウリン投与群では走行距離が延長した、すなわち、多くのエネルギーが使われていたにも関わらず、骨格筋や肝臓のグリコーゲン濃度に生理食塩水投与群との差がみられなかった。運動後のタウリン摂取が、骨格筋でのグリコーゲン合成をはじめとした回復期のエネルギー代謝を改善し、自発走行距離の延長をもたらした可能性が考えられる。

第3章 運動後のタウリン摂取が回復期のエネルギー代謝に与える影響

3-1 緒言

前章において、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、トレッドミル走行後の回転ケージでの自発走行距離が高値を示した。本章では、回転ケージでの自発走行距離に影響を与える因子の一つであるエネルギー代謝に焦点を絞り、運動後のタウリン摂取がもたらした効果を検討することとした。

運動時に最も重要なエネルギー代謝基質の一つは、骨格筋のグリコーゲンである。一定強度以上の運動時において最も多く使われるエネルギー代謝基質が骨格筋のグリコーゲンであることや (Romijn et al., 1993, van Loon et al., 2001)、骨格筋グリコーゲン濃度の低下が興奮収縮連関に影響を与えて発揮張力低下に繋がることなど (Chin and Allen, 1997, Duhamel et al., 2006a and 2006b, Ortenblad et al., 2011 and 2013)、複数の観点から骨格筋のグリコーゲンが運動を行う際に重要であることが示唆されている。そのため、運動後の回復期にエネルギー代謝を改善し、骨格筋のグリコーゲン濃度の上昇を促進することは、次に運動を行う際のパフォーマンスの向上に繋がると考えられる。

前章ではトレッドミル走行 (毎分 25 m の走速度で 90 分間) によって、血中グルコース濃度や腓腹筋および肝臓のグリコーゲン濃度が有意に低下した。糖の貯蔵の低下をもたらすトレッドミル走行の後、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して自発走行距離が有意に高値を示した。この時、タウリン投与群では自発走行距離の延長にともない、多くのエネルギーが使われたと考えられるにも関わらず、骨格筋や肝臓のグリコーゲン濃度については生理食塩水投与群との間に差がみられなかった。このことから、タウリン摂取によって運

動後の骨格筋や肝臓でのグリコーゲンの回復が亢進され、自発走行距離の増加がもたらされた可能性が考えられる。この仮説に関して、ラットやモルモットを対象とした研究で、タウリン摂取による組織でのグルコースの取り込みの亢進がみられている (Kulakowski and Maturro, 1984, Harada et al., 2004, Kaplan et al., 2004, Nandhini et al., 2005, Carneiro et al., 2009, Ribeiro et al., 2009)。また、安静に保ったラットにグルコースを投与した際、タウリン投与群では非投与群と比較して、肝臓のグリコーゲン濃度が高値を示すことが報告されている (Kulakowski and Maturro, 1984)。そこで、本研究では運動後にマウスを安静に保ち、回復期における組織中の代謝基質濃度変化にタウリン摂取が与える影響を検討した。実験 3-1 では前章と同様にトレッドミル走行後に飼料を自由摂取とし、運動後の組織中の代謝基質濃度を測定した。また、実験 3-2 では走行終了直後と 60 分後に一定量のグルコースを経口投与することでマウスの栄養摂取のタイミングを揃え、組織中の代謝基質濃度と血中インスリン濃度の測定を行い、タウリン摂取の効果を検討した。

3-2 実験方法

実験動物

実験は飼育開始時に 6 週齢のオスの ICR 系マウスを用いて行った (CLEA Japan, Inc.)。前章の実験と同様に、全てのマウスに対して 1 週間の予備飼育期間を設けた。水と MF 飼料 (Oriental Yeast Co., Ltd.) は自由摂取とした。予備飼育期間終了時に、体重に群間差が出ないように、マウスをタウリン摂取群 (n = 5 - 7) と生理食塩水投与群 (n = 5 - 7) の 2 群に分けた。飼育室は室温 23°C、9 時から 21 時までを暗期、21 時から 9 時までを明期に設定した。全ての実験

計画は、東京大学倫理委員会から倫理審査を受けて行なわれた。

トレッドミル走行運動

全ての実験はマウスにおける活動期である暗期に行った。また、実験当日の5日前より3日間、トレッドミル (MK-680, Muromachi Kikai Co., Inc.) 上での走行運動への慣らしを目的として、数分間のトレッドミル走行を行わせた。実験当日には、直前の食事による影響を防ぐため、トレッドミル走行開始の4時間前より絶食を行わせた。トレッドミル走行は毎分25 mの速さで90分間行わせた。投与物はゾンデを用いて経口投与した。

実験 3-1 運動後のタウリン摂取が回復期のエネルギー代謝に与える影響 (運動後に飼料を自由摂取とした条件)

マウスに対して、トレッドミル走行終了直後に生理食塩水 (0.9%) にタウリンを溶かした水溶液 (タウリンの投与量は体重1 gあたり0.5 mg) または生理食塩水を投与した。溶液の投与はゾンデを用いて、マウスの体重1 gあたり0.1 ml 経口投与した。その後、マウスを通常の個別飼育ケージに戻し、MF 飼料と水を自由摂取として安静に保った。トレッドミル走行終了直後、60分後、120分後にマウスを頸椎脱臼にて屠殺し、開胸後採血した。また、肝臓および前脛骨筋を摘出した。組織は摘出後すぐに液体窒素で凍結し、分析まで -80°C で保存した。飼料摂食量は、運動終了直後に与えた飼料重量と、運動終了より60分または120分後にケージに残っていた飼料重量の差より求めた。

実験 3-2 運動後のタウリン摂取が回復期のエネルギー代謝に与える影響 (運動

後の飼料摂取を制限し、グルコースを運動終了直後と初回の投与より 60 分後に経口投与した条件)

cross-over design により、5 匹のマウスに対して 1 週間の間隔を空けてタウリン投与条件、生理食塩水投与条件の実験をランダムに行わせた。マウスに対して、トレッドミル走行終了後および 60 分後に、グルコースとタウリンを溶かした水溶液（タウリンの投与量は体重 1 g あたり 0.5 mg となるように調整）、またはグルコースを生理食塩水に溶かした液を投与した。1 回のグルコース投与量が体重 1 g あたり 1 mg となるよう溶液を調整し、ゾンデを用いて、マウスの体重 1 g あたり 0.1 ml 経口投与した。1 回目の投与は運動終了より 5 分後に行い、また 2 回目の投与時には 1 回目と同一の溶液を投与した。投与後にはマウスを通常の飼育ケージに戻し、飼料や水を与えずに安静に保った。1 回目の投与直前、20 分後、60 分後（2 回目の投与直前）、80 分後（2 回目の投与より 20 分後）、120 分後に尾静脈より採血を行った。採取した血液は遠心分離を行い、血漿を液体窒素で凍結して分析まで -80°C で保存した。1 度目の実験より 1 週間後の 2 度目の実験日において、運動終了より 120 分後にマウスを頸椎脱臼にて屠殺し、血液、肝臓および前脛骨筋を摘出した。摘出した組織はすぐに液体窒素で凍結し、分析まで -80°C で保存した。

また、組織中の代謝基質濃度の測定のため、タウリン投与群と生理食塩水投与群における匹数がそれぞれ 6 になるよう、7 匹のマウスにグルコースを含むタウリン水溶液またはグルコースを含む生理食塩水をトレッドミル走行終了直後と 60 分後に投与し、運動終了より 120 分後に血液、肝臓および前脛骨筋を摘出した。摘出した組織はすぐに液体窒素で凍結し、分析まで -80°C で保存した。

組織中の基質およびホルモン濃度の分析方法

血中グルコース濃度はグルテストセンサーエースを用いて測定した (Glutest Ace; Arkray Inc.)。血中遊離脂肪酸濃度は Wako NEFA C test kit を用いて測定した (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)。血清中のインスリン濃度は Mouse Insulin ELISA Kit キットを用いて測定した (MercoDia AB)。肝臓および前脛骨筋のグリコーゲン濃度は Lo et al.の方法を用いて測定した (Lo et al., 1970)。

統計処理

各測定結果は平均値±標準誤差で表した。実験 3-1 において、トレッドミル走行前後および回復期の代謝基質濃度については一元配置分散分析を行い、post-hoc test として Tukey-Kramer 法を用いた。また、代謝基質濃度や体重、摂食量は対応のない t 検定を用いて、タウリン投与群と生理食塩水投与群間の比較を行った。実験 3-2 において、血中グルコース濃度および血中インスリン濃度は、繰り返しのある二元配置分散分析 (タウリン投与 × 時間) を行い、post-hoc test として Bonferroni 法を用いた。血中グルコース濃度および血中インスリン濃度の曲線下面積は、対応のある t 検定により投与群間の比較を行った。代謝基質濃度については対応のない t 検定により投与群間の比較を行った。有意水準は $p < 0.05$ とした。

3-3 結果

3-3-1 実験 3-1 (運動後に飼料を自由摂取とした条件)

体重変化および運動終了後の飼料摂食量

体重については、トレッドミル走行終了より 60 分後（タウリン投与群: 35.1 ± 0.5 g、生理食塩水投与群: 34.9 ± 0.7 g）および 120 分後（タウリン投与群: 35.9 ± 1.0 g、生理食塩水投与群: 37.0 ± 0.7 g）いずれも、両投与群間に有意な差はみられなかった。また、飼料摂食量に関しても、トレッドミル走行終了より 60 分後（タウリン投与群: 0.5 ± 0.1 g、生理食塩水投与群: 0.6 ± 0.1 g）および 120 分後（タウリン投与群: 1.0 ± 0.2 g、生理食塩水投与群: 1.2 ± 0.2 g）いずれも、両投与群間に有意な差はみられなかった。

組織中の代謝基質濃度

前脛骨筋グリコーゲン濃度は、安静時の値を 100%とすると運動直後の値は 40%であった (Fig. 3-1A)。運動終了より 60 分後の前脛骨筋グリコーゲン濃度に両投与群間に有意な差はみられなかった。一方、運動終了より 120 分後において、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、前脛骨筋グリコーゲン濃度が有意に高値を示した ($p < 0.05$)。また、運動終了より 120 分後において、タウリン投与群では安静時の値と比較して有意に高値を示した ($p < 0.05$)。運動終了直後の肝臓グリコーゲン濃度は安静時と比較し有意に低値を示した (Fig. 3-1B, $p < 0.05$)。運動終了より 60 分後の肝臓グリコーゲン濃度には安静時との間に有意差はみられなかったが、120 分後には両投与群とも安静時の値と比較して有意に高値を示した ($p < 0.01$)。肝臓グリコーゲン濃度について、運動終了より 60 分後と 120 分後いずれもタウリン投与群と生理食塩水投与群との間に有意な差はみられなかった。運動終了直後の血中グルコース濃度は安静時と比較し有意に低値を示した (Fig. 3-1C, $p < 0.01$)。運動終了より 60 分後において、両投与群ともに血中グルコース濃度は安静時の値と比較し有意に

高値を示した ($p < 0.05$)。一方、運動終了から 120 分後には、両投与群ともに、血中グルコース濃度に安静時との差はみられなかった。運動終了より 60 分後および 120 分後、いずれも血中グルコース濃度に投与群間の有意な差はみられなかった。運動終了直後の血中遊離脂肪酸濃度は安静時と比較して有意に高値を示し (Fig. 3-1D, $p < 0.05$)、また両投与群ともに、運動終了より 60 分後および 120 分後の血中遊離脂肪酸濃度には安静時と比較して有意差はみられなかった。運動終了より 60 分後の血中遊離脂肪酸濃度について、タウリン投与群で生理食塩水投与群と比較して有意に高値を示した ($p < 0.05$)。運動後のタウリン摂取によって、回復期の骨格筋のグリコーゲン合成が亢進されたこと、脂肪組織からの遊離脂肪酸の放出が促進されたことが示唆された。

3-3-2 実験 3-2 (運動後の飼料摂取を制限し、グルコースを運動終了直後と 60 分後に経口投与した条件)

運動後の血中グルコース濃度およびインスリン濃度

運動後の血中グルコース濃度については、運動終了後の 1 回目のグルコース投与より 20 分後、60 分後 (2 回目の投与直前)、80 分後、120 分後、いずれのタイムポイントにおいても両投与群間に有意な差はみられなかった (Fig. 3-2A)。運動後の 1 回目のグルコース投与より 60 分間の血中グルコース濃度曲線下面積について、タウリン投与群で生理食塩水投与群と比較して有意に低値を示した (Fig. 3-2B, $p < 0.01$)。運動後の 1 回目のグルコース投与より 120 分間の血中グルコース濃度曲線下面積については両投与群間に有意な差がみられなかった (Fig. 3-2C)。血中インスリン濃度についてはいずれのタイムポイントにおいても両投与群間に有意な差はみられず (Fig. 3-3A)、曲線下面積に

も両投与群間の有意な差はみられなかった (Figs. 3-3 B and C)。運動後のタウリン摂取は回復期の血中インスリン濃度には影響を与えなかったと考えられる。一方、運動後のタウリン摂取は骨格筋を中心とした組織でのグルコースの取り込みを亢進した可能性が示された。

運動終了より 120 分後の組織中の代謝基質濃度

タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、骨格筋グリコーゲン濃度が有意に高値を示した (Fig. 3-4A, $p < 0.05$)。肝臓グリコーゲン濃度 (Fig. 3-4B) および血中遊離脂肪酸濃度 (Fig. 3-4C) については、両投与群間に有意な差はみられなかった。いずれの組織中の代謝基質濃度についても、運動後に一定量のグルコースを同一のタイムポイントに経口投与した実験 3-2 において、運動後に飼料を自由摂取とした実験 3-1 と同様の結果が得られた。

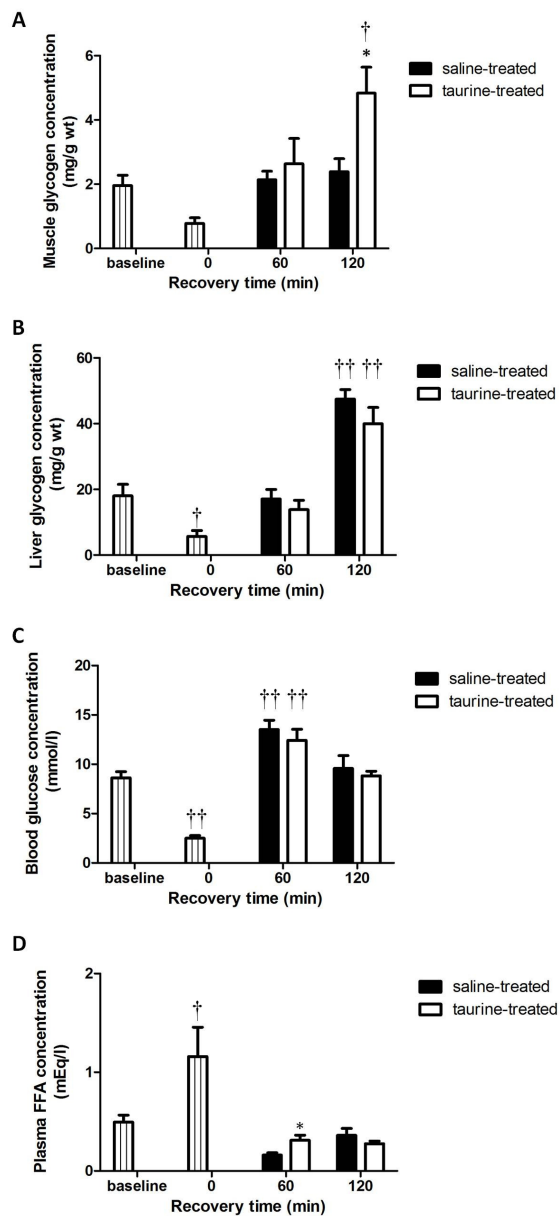


Fig. 3-1 トレッドミル走行前後および運動終了後 60 分後、120 分後の前脛骨筋グリコーゲン濃度 (A)、肝臓グリコーゲン濃度 (B)、血中グルコース濃度 (C)、血中遊離脂肪酸濃度 (D)。いずれのグラフも白いバーはタウリン投与群、黒いバーは生理食塩水投与群の値を示す。†, ††: 運動前の値と比較して $p < 0.05$ および $p < 0.01$ 、*: 生理食塩水投与群と比較して $p < 0.05$ 。

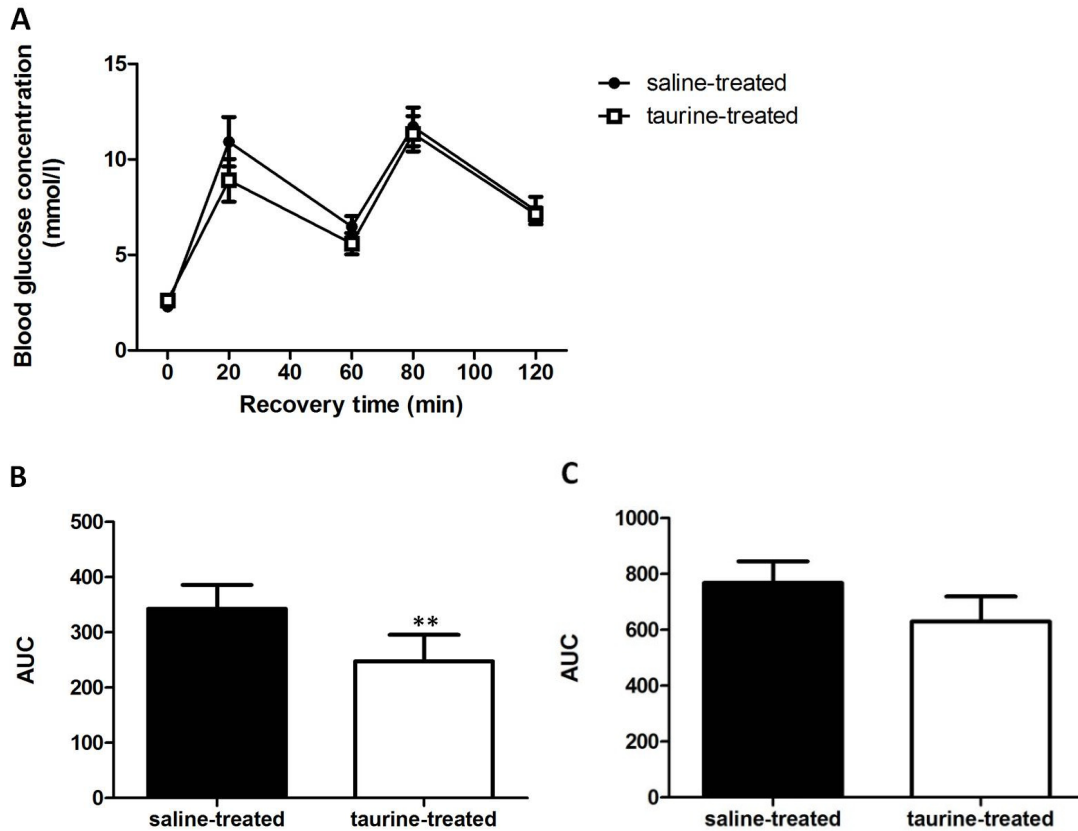


Fig. 3-2 (A) トレッドミル走行終了直後と初回の投与から 60 分後にグルコースを投与した際の 120 分間の血中グルコース濃度。トレッドミル走行終了直後のグルコース投与より 60 分間 (B) および走行終了直後のグルコース投与より 120 分間 (C) の血中グルコース濃度の曲線下面積。いずれのグラフも白いバーとプロットはタウリン投与群、黒いバーとプロットは生理食塩水投与群の値を示す。**: 生理食塩水投与群と比較して $p < 0.01$ 。

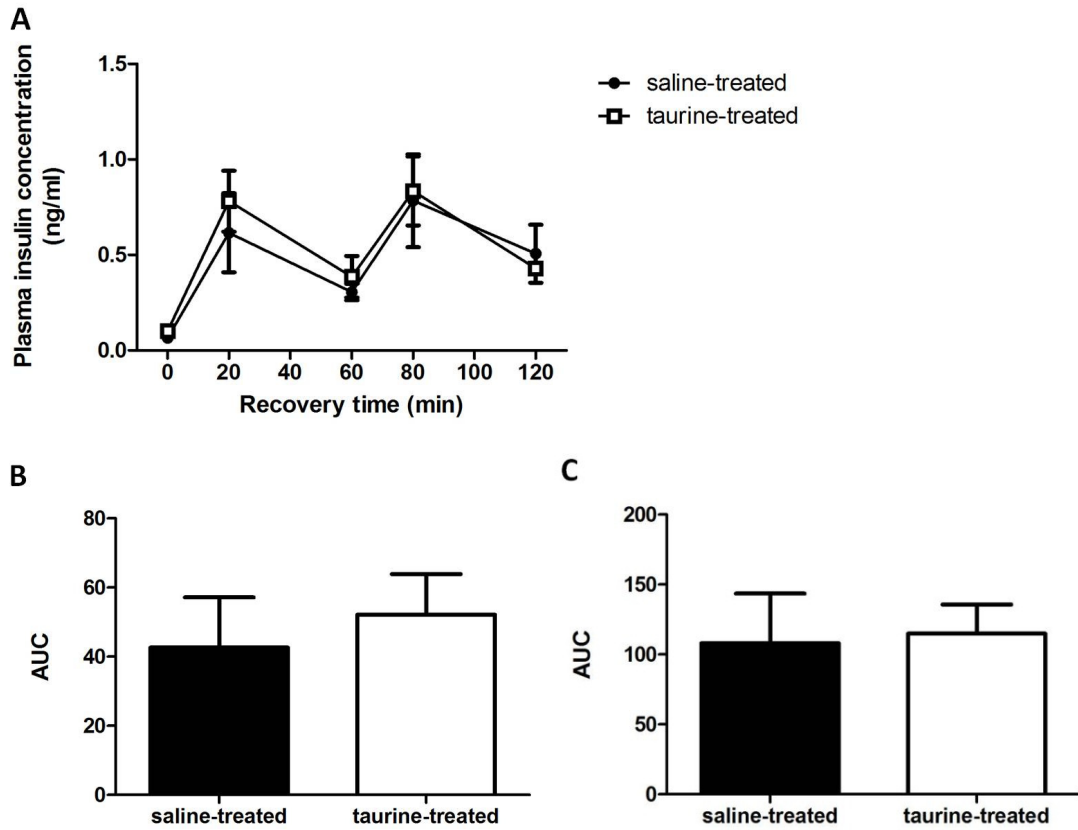


Fig. 3-3 (A) トレッドミル走行終了直後と初回の投与から 60 分後にグルコースを投与した際の 120 分間の血中インスリン濃度。トレッドミル走行終了直後のグルコース投与より 60 分間 (B) および走行終了直後のグルコース投与より 120 分間 (C) の血中インスリン濃度の曲線下面積。いずれのグラフも白いバーとプロットはタウリン投与群、黒いバーとプロットは生理食塩水投与群の値を示す。

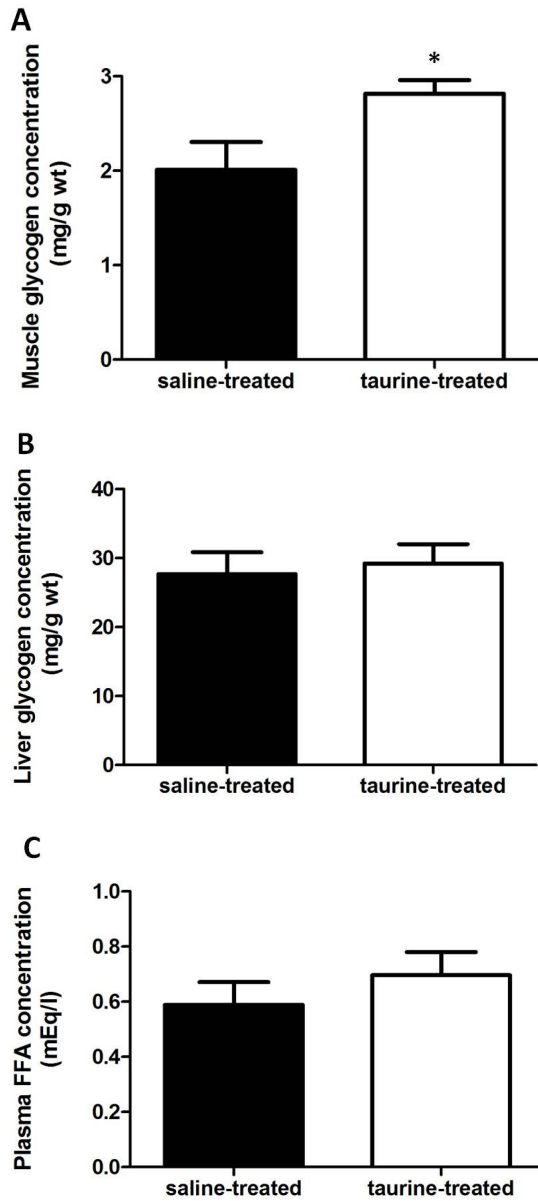


Fig. 3-4 トレッドミル走行終了直後と初回の投与から 60 分後にグルコースを投与した際の、トレッドミル走行終了より 120 分後の前脛骨筋グリコーゲン濃度 (A)、肝臓グリコーゲン濃度 (B)、および血中遊離脂肪酸濃度 (C)。いずれのグラフも白いバーはタウリン投与群、黒いバーは生理食塩水投与群の値を示す。*: 生理食塩水投与群と比較して $p < 0.05$ 。

3-4 考察

運動後の骨格筋グリコーゲン合成にタウリン摂取が与えた影響

第2章と同様に運動後の飼料摂取を自由とした実験 3-1 で、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、運動終了より 120 分後の骨格筋グリコーゲン濃度が有意に高値を示した。タウリン投与によって運動後の骨格筋グリコーゲン濃度の上昇が亢進されたことは、前章でタウリン投与によってトレッドミル走行後の自発走行距離が高値を示した要因の一つと考えられる。

骨格筋でのグリコーゲンの合成量を決定する一つの因子として、グルコースの取り込み量が挙げられる。先行研究で、安静時のタウリン摂取が組織でのグルコース取り込みを高めることが示唆されている。これらの先行研究では、タウリンが膵臓に作用してインスリン分泌を亢進したとの報告もあれば (Kaplan et al., 2004, Ribeiro et al., 2009)、血中インスリン濃度の上昇をともなわずに組織でのグルコースの取り込みを高めたとの報告もある (Kulakowski and Maturro, 1984, Harada et al., 2004)。実験 3-1 のように、運動後の飼料摂取を自由とした条件では、総摂食量が同等であっても、個体によって飼料を摂取したタイミングにも、一度に摂取する量にも差が生じる。そのため、タウリン摂取が血中グルコース濃度や血中インスリン濃度に与える影響を明らかにすることが難しい。そこで、実験 3-2 として、運動終了後と 60 分後に一定量のグルコースを経口投与し、タウリン摂取の効果を検討した。その結果、血中インスリン濃度に関してはタウリン投与群と生理食塩水投与群との間に有意な差が認められなかった。一方、タウリン投与群で生理食塩水投与群と比較して、運動終了直後のグルコース投与から 60 分間の血中グルコース濃度の曲線下面積が有意に低値を示した。本研究ではグルコースを経口投与し

たため、グルコース投与後の血中グルコース濃度の上昇には腸管の吸収などの要素も影響を与えるが、組織でのグルコースの取り込みも影響を与える要素の一つである。特に運動後にグルコースを投与した際の血中グルコース濃度の変化については、骨格筋でのグルコースの取り込みが与える影響が大きいと考えられる。その理由として、安静時に血中グルコースの80%が骨格筋で代謝されること (DeFronzo et al., 1985)、さらに運動によって骨格筋でのグルコースの取り込みが亢進されることが挙げられる (Garetto et al., 1984, Richter et al., 1984, Wallberg-Henriksson et al., 1988, Levenhagen et al., 2001)。タウリン投与群でグルコース経口投与後の血中グルコース濃度の上昇が抑えられたという結果は、骨格筋をはじめとした組織でのグルコース取り込みが高まったことによる可能性が考えられる。

運動によって骨格筋のグリコーゲン濃度を減らした後、炭水化物を多量に摂取すると、骨格筋のグリコーゲン濃度が運動前よりも高まる現象がみられる。この現象をグリコーゲンの超回復現象と呼ぶ。実験 3-2 で、運動終了 120 分後のタウリン投与群では、骨格筋グリコーゲンの超回復現象がみられた。骨格筋グリコーゲンの超回復現象は、運動によって submaximal なインスリン刺激時の骨格筋のグルコースの取り込みが亢進されること、すなわちインスリン感受性の亢進が関わっていると考えられている (Garetto et al., 1984, Richter et al., 1984, Cartee et al., 1989, Wallberg-Henriksson et al., 1988)。そのため、骨格筋でのグリコーゲン濃度の上昇を亢進して超回復を起こす上で、タウリン摂取が骨格筋でのインスリン感受性の亢進に効果をもたらした可能性も考えられる。

運動後の炭水化物の摂取量と骨格筋グリコーゲン合成量との間には正の相関

関係がみられる (Jetjens and Jeukendrup, 2003, Burke et al., 2004) 。また、これまでの研究の結果より、ヒトでは 1 時間ごとに体重 1 kg あたり 1-1.2 g の炭水化物を摂取すると骨格筋でのグリコーゲン合成が最大に達すると報告されている。そのため、運動後には、1 時間あたりの炭水化物の摂取量が体重 1 kg につき 1.2 g になるよう、炭水化物を 30 分おきに摂取することが推奨されている (Jetjens and Jeukendrup, 2003, Burke et al., 2004, Millard-Stafford et al., 2008, Beelen et al., 2010) 。実験 3-2 では、運動後 1 時間おきにグルコースを体重 1 g あたり 1.0 mg 投与した。したがって、骨格筋でのグリコーゲン合成量は最大に近いと考えられる。

タウリン摂取が運動後の脂質利用の亢進をもたらした可能性

タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、運動終了より 60 分後の血中遊離脂肪酸濃度が高値を示した。この結果は、ヒトにおいて運動前のタウリン摂取によって運動時の脂質酸化の割合が高まったとの報告や (Rutherford et al., 2010) 、ラットから摘出した脂肪細胞にタウリンを添加することで、トリグリセライドを遊離脂肪酸へと分解する際に働く酵素であるプロテインキナーゼ A の活性化に繋がったとの報告 (Pina-Zentella et al., 2012) を支持する結果であった。タウリン摂取によって脂肪分解が活性化され、血中遊離脂肪酸濃度が高値を示したと考えられる。血中遊離脂肪酸濃度は脂質の酸化利用に影響を与える。安静時の血中遊離脂肪酸濃度と脚部の骨格筋での遊離脂肪酸の取り込みとの間に、正の相関関係がみられている (Nielsen et al., 2004) 。さらに、安静時の血中遊離脂肪酸濃度と呼吸交換比の間には負の相関関係がみられ (Jensen et al., 2009) 、血中遊離脂肪酸濃度が高いと脂質の酸化利用が高ま

ることが示されている。そのため、運動後のタウリン摂取によって脂質利用が活性化され、骨格筋ではグリコーゲンをエネルギー産生に利用することが相対的に抑えられた可能性もある。運動後の糖の酸化利用と骨格筋グリコーゲン濃度との関係を示した研究はいくつかある。例えば、ヒトを対象とした研究で、糖の酸化利用が高まる暑熱環境で運動後の回復期を過ごした場合、骨格筋グリコーゲン濃度の上昇が抑制されたとの報告がある (Naperalsky et al., 2010)。逆に、糖の酸化利用を低下させる酢酸やヒドロキシクエン酸を摂取することで、ラットやウマで運動後の骨格筋グリコーゲン濃度の上昇が亢進されたとの報告がある (Fushimi et al., 2002, Waller et al., 2009, Cheng et al., 2012)。これらの結果より、運動後の糖の酸化利用を抑えることは、回復期の骨格筋グリコーゲン濃度を高める方法の一つであると言える。そのため、タウリン投与によって脂質の酸化利用が亢進され、糖が保存されたことで、骨格筋グリコーゲン濃度の上昇が亢進された可能性が考えられる。

ところで、ヘパリンや脂質の注入によって一過的に血中遊離脂肪酸濃度を上昇させると、骨格筋をはじめとした組織でのグルコースの取り込みは低下する (Schalch and Kipnis, 1965, Kelley et al., 1993, Roden et al., 1996, Griffin et al., 1999)。実験 3-1 の運動後の飼料を自由摂取とした条件で、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して運動終了より 60 分後の血中遊離脂肪酸濃度が有意に高値を示した。一方、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、運動終了より 120 分後の骨格筋グリコーゲン濃度が有意に高値を示した。さらに、実験 3-2 で、タウリン投与群では運動後にグルコースを投与した際の血中グルコース濃度の曲線下面積が低値を示し、骨格筋でのグルコース取り込みが高まった可能性が示唆された。一見矛盾した結果ではあるが、一過的な血

中遊離脂肪酸濃度の上昇がグルコースの取り込みの低下をもたらすとの結果は、血中遊離脂肪酸濃度が 1 - 3 mEq/L といった生理的範囲を超えた状態で報告されている (Schalch and Kipnis, 1965, Roden et al., 1996, Griffin et al., 1999) 。また、インスリン刺激時に、脂質注入によって血中遊離脂肪酸濃度を通常よりも約 0.5 mEq/L 高くした場合 (脂質注入条件での血中遊離脂肪酸濃度: 0.4 - 0.6 mEq/L) 、骨格筋でのグルコース取り込みに有意な差がみられたのはインスリン刺激開始から 3 時間以上経過してからである (Kelley et al., 1993) 。本研究での運動終了 60 分後における血中遊離脂肪酸濃度はタウリン投与群でも 0.3 ± 0.1 mEq/L であり、タウリン摂取による血中遊離脂肪酸濃度の上昇は、骨格筋をはじめとした組織でのグルコース取り込みには影響しないと考えられる。

3-5 まとめ

前章において、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、トレッドミル走行後の回転ケージにおける自発的な走行距離が有意に高値を示した。本章ではまず実験 3-1 として、トレッドミル走行後に飼料を自由摂取として安静に保ち、摘出した組織中の代謝基質濃度の測定を行った。その結果、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、運動終了より 120 分後の骨格筋のグリコーゲン濃度が有意に高値を示した。また、運動終了より 60 分後の血中遊離脂肪酸濃度もタウリン投与群で有意に高値を示した。タウリン摂取により骨格筋のグリコーゲン濃度の上昇がもたらされたメカニズムを解明するために、実験 3-2 では運動後に一定量のグルコースを同一のタイミングで投与し、タウリン摂取がエネルギー代謝にもたらした効果を検討した。その結果、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、運動終了から 60 分間の血中グルコ

ース濃度の曲線下面積が有意に低値を示した。骨格筋は安静時において血中に存在するグルコースの 80%を代謝する組織であり、さらに運動によって骨格筋のグルコースの取り込みは高まる。よって、タウリン摂取によって血中グルコース濃度の上昇が抑えられたという結果は、骨格筋でのグルコースの取り込みが亢進されたことによる可能性が考えられる。さらに、実験 3-2 でも実験 3-1 と同様に、運動終了から 120 分後の骨格筋グリコーゲン濃度がタウリン投与群で高値を示した。運動後のタウリン摂取は骨格筋でのグリコーゲン合成を亢進することが示唆された。

第4章 運動後のタウリン摂取が回復期の骨格筋グリコーゲン濃度の上昇を亢進させたメカニズムの解明

4-1 緒言

第2章では、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、トレッドミル走行後の回転ケージでの自発走行距離が有意に高値を示した。第2章の結果を踏まえ、第3章では運動後のタウリン摂取がグリコーゲン再合成をはじめとした回復期のエネルギー代謝を改善する可能性を検討した。その結果、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、運動後の骨格筋グリコーゲン濃度が有意に高値を示した。本章では運動後のタウリン摂取が骨格筋のグリコーゲン濃度を高めたメカニズムについて、さらなる解明を目指した。まず実験4-1として、運動終了直後と60分後にグルコースを投与して安静に保ち、運動終了より120分後に骨格筋を摘出した。この骨格筋を用いて、グリコーゲン濃度の測定、さらに代謝基質やアミノ酸、タウリン濃度について、メタボローム解析による網羅的な測定を行った。次に実験4-2において、前章の実験3-1と同様に運動後の飼料摂取を自由とした条件で摘出した骨格筋を用いて、糖代謝に関わるタンパク質の量や、活性の指標となるタンパク質のリン酸化状態を、ウェスタンブロット法により定量化した。さらに、実験4-3では運動終了直後にグルコースを投与し、60分後に摘出した骨格筋について、グルコースの取り込みやグリコーゲン合成に関わるシグナル伝達経路上のタンパク質のリン酸化状態をウェスタンブロット法により定量化した。

4-2. 実験方法

実験動物

実験は飼育開始時に 6 週齢のオスの ICR 系マウスを用いて行った (CLEA Japan, Inc.)。前章までの実験と同様に、全てのマウスに対して 1 週間の予備飼育期間を設けた。水と MF 飼料 (Oriental Yeast Co., Ltd.) は自由摂取とした。予備飼育期間終了時に、体重に群間差が出ないように、マウスをタウリン投与群 (n = 5 - 7) と生理食塩水投与群 (n = 5 - 7) の 2 群に分けた。飼育室は室温 23°C、9 時から 21 時までを暗期、21 時から 9 時までを明期に設定した。全ての実験計画は、東京大学倫理委員会から倫理審査を受けて行なわれた。

トレッドミル走行運動

全ての実験はマウスの活動期である暗期に行った。また、実験当日の 5 日前より 3 日間、トレッドミル (MK-680, Muromachi Kikai Co., Ltd.) 上での走行運動への慣らしを目的として、数分間のトレッドミル走行を行わせた。

実験当日には、直前の食事による影響を防ぐため、トレッドミル走行開始の 4 時間前より絶食を行わせた。トレッドミル走行は毎分 25 m の速さで 90 分間行わせた。いずれの実験も、投与物はゾンデを用いて経口投与した。

実験 4-1 運動後のタウリン摂取が回復期の骨格筋の代謝基質濃度に与える影響 (運動後の飼料摂取を制限し、グルコースを運動終了直後と初回の投与より 60 分後に経口投与した条件)

第 3 章にて行った実験 3-2 と同様である。トレッドミル走行終了後および 60 分後にグルコースとタウリンを溶かした水溶液 (タウリンの投与量は体重 1 g あたり 0.5 mg となるように調整) またはグルコースを生理食塩水に溶かした液を合計 2 回投与した。いずれの溶液もグルコースの投与量が体重 1 g あたり

1 mg となるように調整した。また、溶液はゾンデを用いて、マウスの体重 1 g あたり 0.1 ml 投与した。運動後にはマウスを通常の個別飼育ケージにて安静に保った。運動終了直後の 1 回目のグルコース溶液投与より 120 分後に頸椎脱臼にて安楽死させ、前脛骨筋を摘出した。摘出した前脛骨筋はすぐに液体窒素で凍結し、分析まで-80℃で保存した。前脛骨筋のグリコーゲン濃度の測定を行い、さらに反対側の前脛骨筋を用いて、CE-TOFMS によるメタボローム解析を行い、筋中の代謝基質やアミノ酸、タウリン濃度を測定した。

実験 4-2 運動後のタウリン摂取が回復期の骨格筋のエネルギー代謝に与える影響 (運動後に飼料を自由摂取とした条件)

第 3 章にて行った実験 3-1 と同様である。運動終了直後、マウスに対して、生理食塩水 (0.9%) にタウリンを溶かした水溶液 (タウリンの投与量は体重 1 g あたり 0.5 mg) または生理食塩水を投与した。溶液はゾンデを用いて、マウスの体重 1 g あたり 0.1 ml 経口投与した。運動後にはマウスを通常の個別飼育ケージにて安静に保ち、飼料と水は自由摂取とした。運動終了より 60 分後および 120 分後に頸椎脱臼にて安楽死させ、前脛骨筋を摘出した。摘出した前脛骨筋は液体窒素で凍結し、分析まで-80℃で保存した。その後、前脛骨筋の糖代謝にかかわるタンパク質量や、活性の指標となるリン酸化型タンパク質量について、ウェスタンブロット法により定量化した。

実験 4-3 運動後のタウリン摂取が回復期の骨格筋のインスリンシグナル伝達系に与える影響 (運動後の飼料摂取を制限し、グルコースを運動終了直後に経口投与した条件)

トレッドミル走行終了後および 60 分後に、グルコースとタウリンを溶かした水溶液（タウリンの投与量は体重 1 g あたり 0.5 mg となるように調整）またはグルコースを生理食塩水に溶かした液を投与した。溶液はゾンデを用いて、マウスの体重 1 g あたり 0.1 ml 投与した。また、いずれの溶液もグルコースの投与量が体重 1 g あたり 0.8 mg となるように調製した。運動後にはマウスを通常の個別飼育ケージにて安静に保った。運動直後のグルコース溶液投与より 60 分後に頸椎脱臼にて安楽死させ、組織を摘出した。摘出した組織はすぐに液体窒素で凍結し、分析まで-80℃で保存した。その後、血中グルコース濃度、肝臓および前脛骨筋のグリコーゲン濃度の測定をおこなった。さらに、前脛骨筋の糖代謝にかかわるタンパク質量やリン酸化型タンパク質について、ウェスタンブロット法により定量化した。

組織中の基質の分析方法

血中グルコース濃度はグルテストセンサーエースを用いて測定した (Glutest Ace; Arkray Inc.)。肝臓および前脛骨筋のグリコーゲン濃度は Lo et al.の方法を用いて測定した (Lo et al., 1970)。

ウェスタンブロット法

サンプル調整

前脛骨筋 (~50 mg) を 1.5 ml のエッペンドルフチューブに移し、約 20 倍量 (~1000 μ l) の Lysis Buffer を加え、氷上でハンドホモジナイザー (Polytron 社製) を用いてホモジナイズした。Lysis Buffer の組成は 1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 50 mM NaF, 10 mM Sodium

β -glycerol Phosphate, 5 mM Sodium pyrophosphate, 2 mM DTT, 1 mM Na orthovanadate, 1 mM PMSF, 10 μ M/ml of each aprotinin, leupeptin, pepstatin A (pH = 7.5) である。ホモジナイズした溶液を震盪しながら氷上で 30 分間可溶化した後、4°C、1500 g で 15 分間遠心分離した。遠心後、注意深く上清を抽出し、Quick Start™ Bradford Dye Reagent 1x (Bio-Rad) を用いてタンパク質濃度を測定した。その後 Buffer 2 [1 mM EDTA, 10 mM 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol, pH = 7.4] で希釈し、タンパク質濃度を 10 μ g / 6.5 μ l に調製した。最後に、調製したサンプルを 95 °C で 5 分間加熱処理した。

ウェスタンブロット

調製したサンプルを SDS-PAGE (7.5-12% ポリアクリルアミド) を用いて 150 V で 60 分間電気泳動した。電気泳動終了後、ゲルを Transfer Buffer に浸し、PVDF メンブレン (Hybond-P, GE Healthcare Japan) に 100V で 75 分間トランスファーした。その後メンブレンを 5%のスキムミルク溶液 [20 mM Tris Base, 137 mM NaCl, 0.1 mM HCl, 0.1% (vol/vol) Tween 20, 5% (wt/vol) スキムミルク, pH = 7.5] で 1 時間氷上にてブロッキングした。その後 4°C の条件で一晩、1 次抗体と反応させた。1 次抗体反応後、TTBS 溶液 [20 mM Tris Base, 137 mM NaCl, 0.1 mM HCl, 0.1% (vol/vol) Tween 20, pH = 7.5] で 10 分間 \times 3 回洗浄した後、2 次抗体 Goat-anti-rabbit IgG (American Qualex) または Goat anti-mouse IgG (American Qualex) と室温で 1 時間反応させた。TTBS 溶液で 10 分間 \times 3 回洗浄した後、メンブレンを Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific) または ECL Prime Western

Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Japan) によって化学発光させ、Chemi Doc (Bio-Rad) で撮影した。写真は Quantity One に取り込み、バンドの濃淡を定量化した。本研究で用いた一次抗体は以下の通りである。

GLUT4 (07-1404, Millipore), PDH E1 α subunit (459400, Invitrogen), pPDH E1 α subunit Ser²⁹³ (ab92696, Abcam), GS (#3893, Cell Signaling Technology (CST)), pGS Ser⁶⁴¹ (#3891, CST), Akt (#9272, CST), pAkt Thr³⁰⁸ (#9275, CST), pAkt Ser⁴⁷³ (#9271, CST), pAS160 (#4288, CST)

CE-TOFMS によるメタボローム解析

前処理

前脛骨筋に 2100 μ l の 50%アセトニトリル水溶液 (v/v) (カチオン用 20 μ M 及びアニオン用 5 μ M 内部標準物質) を加え、冷却下にて卓上型破砕機 (bms, BMS-M10N21) を用いて破砕 (1,500 rpm, 120 秒 \times 5 回) した。組織破砕後、遠心分離 (2,300 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 5 分間) を行った。遠心分離後、上層を限外ろ過チューブ (ウルトラフリーMC PLHCC, HMT, 遠心式フィルターユニット 5 kDa) に 400 μ l \times 2 本移し取った。これを遠心 (9,100 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 120 分間) し、限外ろ過処理を行った。ろ液を乾固させ、再び 50 μ l の Milli-Q 水に溶解して測定を行った。

測定

前処理をした検体について、キャピラリー電気泳動 - 飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) のカチオンモード、アニオンモードによる測定を行った。装置は Agilent Technologies 社製の Agilent CE-TOFMS system を使い、50 μ m

× 80 cm の Fused Silica Capillary により検体中のそれぞれの物質を分離させた。サンプルの注入は 50 mbar により 25 秒かけて行った。カチオンモードでは CE の電圧は 27 kV、MS キャピラリーの電圧は 4000 V とし、アニオンモードでは CE の電圧は 27 kV、MS キャピラリーの電圧は 3500 V とした。スキャンのレンジは 50 - 1000 m/z で行い、CE-TOFMS で検出されたピークは、自動積分ソフトウェアの MasterHands ver.2.13.0.8.h (慶應義塾大学開発) を用いて自動抽出し、ピーク情報として質量電荷比 (m/z)、泳動時間 (MT) とピーク面積値を求めた。得られたピーク面積値は下記の式を用いて、相対面積値に変換した。また、これらのデータには Na⁺や K⁺などのアダクトイオン及び、脱水、脱アンモニウムなどのフラグメントイオンが含まれているので、これらの分子量関連イオンを削除した。精査したピークについて、m/z と MT の値をもとに、各試料間のピークの照合・整列化を行った。

相対面積値 = 目的ピークの面積値 / 内部標準物質の面積値 × 試料量

統計処理

各測定結果は平均値±標準誤差で表した。代謝基質濃度とタンパク質量については、対応のない t 検定によりタウリン投与群と生理食塩水投与群間の比較を行った。統計的に有意な相関関係については、Pearson の相関係数を算出した。有意水準は p < 0.05 とした。

4-3 結果

4-3-1 実験 4-1 (運動後の飼料摂取を制限し、グルコースを運動終了直後と運動

終了より 60 分後に経口投与した条件)

CE-TOFMS による前脛骨筋のメタボローム解析

運動終了直後と 60 分後にグルコースを体重 1 g あたり 1 mg 投与した後、運動終了から 120 分後に摘出した前脛骨筋において、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、グリコーゲン濃度が有意に高値を示した (タウリン投与群: 2.8 ± 0.1 mg/g 重量、生理食塩水投与群: 2.0 ± 0.3 mg/g 重量、 $p < 0.05$)。前脛骨筋中の代謝基質やアミノ酸濃度について、CE-TOFMS によるメタボローム解析を行った。骨格筋中のそれぞれの物質の濃度に関して、生理食塩水投与群における平均値を 1 としたときのタウリン投与群の相対値を求めた。そして、メタボローム解析によって得られた定量データを用いて、糖代謝を中心とした代謝物質 (解糖系/糖新生、ペントースリン酸経路、クエン酸回路) の経路図を描画した (Fig. 4-1)。その結果、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、解糖系の律速酵素であるホスホフルクトキナーゼ (phosphofructokinase, PFK) によって生じるフルクトース-1, 6-ビスリン酸 (fructose-1, 6-bisphosphate: F1, 6P) が有意に低値を示した (Fig. 4-1, $p < 0.01$)。また、代謝経路において F1, 6P の下流にあるジヒドロキシアセトンリン酸 (dihydroxyacetone phosphate: DHAP) も有意に低値を示した (Fig. 4-1, $p < 0.05$)。脂質代謝における中間代謝物については、*o*-アセチルカルニチンおよびカルニチンに関しては両投与群間に有意な差はみられず、その他の脂質中間代謝物はメタボローム解析における測定項目には含まれていなかった。糖および脂質の中間代謝物以外の物質で、タウリン投与群と生理食塩水投与群との間に有意な差がみられたものとして、アミノ酸の一種であるスレオニンがタウリン投与群で有意に低値を示した ($p < 0.05$)。一方、タウリン濃度については

両投与群間に有意な差がみられなかった。運動後のタウリン摂取によって骨格筋グリコーゲン濃度の上昇がみられ、またタウリン投与群の骨格筋では解糖系が抑制されていたことが示された。

4-3-2 実験 4-2 (運動後に飼料を自由摂取とした条件)

骨格筋中のエネルギー代謝にかかわるタンパク質量

運動後に飼料を自由摂取とした条件で、運動終了より 60 分後および 120 分後の骨格筋のエネルギー代謝にかかわるタンパク質量について、ウェスタンブロット法により定量化し、タウリン摂取の効果を検討した。グルコース輸送担体 4 (GLUT4) のタンパク質量に関しては、運動終了より 60 分後と 120 分後いずれも両投与群間に有意な差はみられなかった (Fig. 4-2A)。また、グリコーゲン合成酵素 (GS) について、活性制御に関わる部位である Ser⁶⁴¹ リン酸化型 (不活性化型) タンパク質量には、運動終了より 60 分後と 120 分後いずれも両投与群間に有意な差はみられなかった (Fig. 4-2B)。糖の酸化の律速酵素であるピルビン酸脱水素酵素 (PDH) について、活性制御に関わる部位である E1 α サブユニットの Ser²⁹³ リン酸化型 (不活性化型) タンパク質量は、運動終了より 60 分後においては両投与群間に有意な差はみられなかった (Fig. 4-2C)。しかし、運動終了より 120 分後において、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、PDH E1 α Ser²⁹³ リン酸化型タンパク質量が高値を示す傾向がみられた ($p = 0.07$)。また、運動終了より 120 分後の骨格筋グリコーゲン濃度と PDH E1 α Ser²⁹³ リン酸化型タンパク質量との間に有意な正の相関関係がみられた (Fig. 4-2D, 相関係数 $r = 0.8460$, $p < 0.01$)。これらの結果より、運動終了後の骨格筋では、PDH の不活性化がグリコーゲン濃度の上昇に影響を

与えることが示唆された。また、タウリン投与が PDH の不活性化に関与する可能性が示唆された。

4-3-3 実験 4-3 (運動後の飼料摂取を制限し、グルコースを運動終了直後に経口投与した条件)

組織中の代謝基質濃度

運動終了直後に体重 1 g あたり 0.8 mg のグルコースを経口投与し、60 分後に組織の摘出を行い、代謝基質濃度を測定した。その結果、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、血中グルコース濃度が有意に低値を示した (Fig. 4-3A, $p < 0.05$)。骨格筋グリコーゲン濃度と肝臓グリコーゲン濃度には両投与群間に有意な差はみられなかった (Figs. 4-3 B and C)。

骨格筋中のエネルギー代謝にかかわるタンパク質量

運動終了より 60 分後の骨格筋における、グルコースの取り込みやグリコーゲン合成に関わるタンパク質の活性の指標として、活性制御部位がリン酸化されているタンパク質量をウェスタンブロット法により定量化し、タウリン摂取の効果を検討した。測定項目は、インスリンシグナル伝達にかかわる因子の一つである Akt の Thr³⁰⁸ および Ser⁴⁷³ リン酸化型 (いずれも活性化型) タンパク質量、Akt の下流にありグルコース取り込みにかかわる AS160 の Thr⁶⁴² リン酸化型 (活性化型) タンパク質量、Akt の下流にある GS の Ser⁶⁴¹ リン酸化型 (不活性化型) タンパク質量とした。しかし、いずれの項目もタウリン投与群と生理食塩水投与群との間に有意な差はみられなかった (Fig. 4-4)。したがって、タウリン摂取による骨格筋でのグルコースの取り込み亢進は、インスリンシグ

ナル伝達経路の活性化以外のメカニズムによってもたらされたことが示唆された。

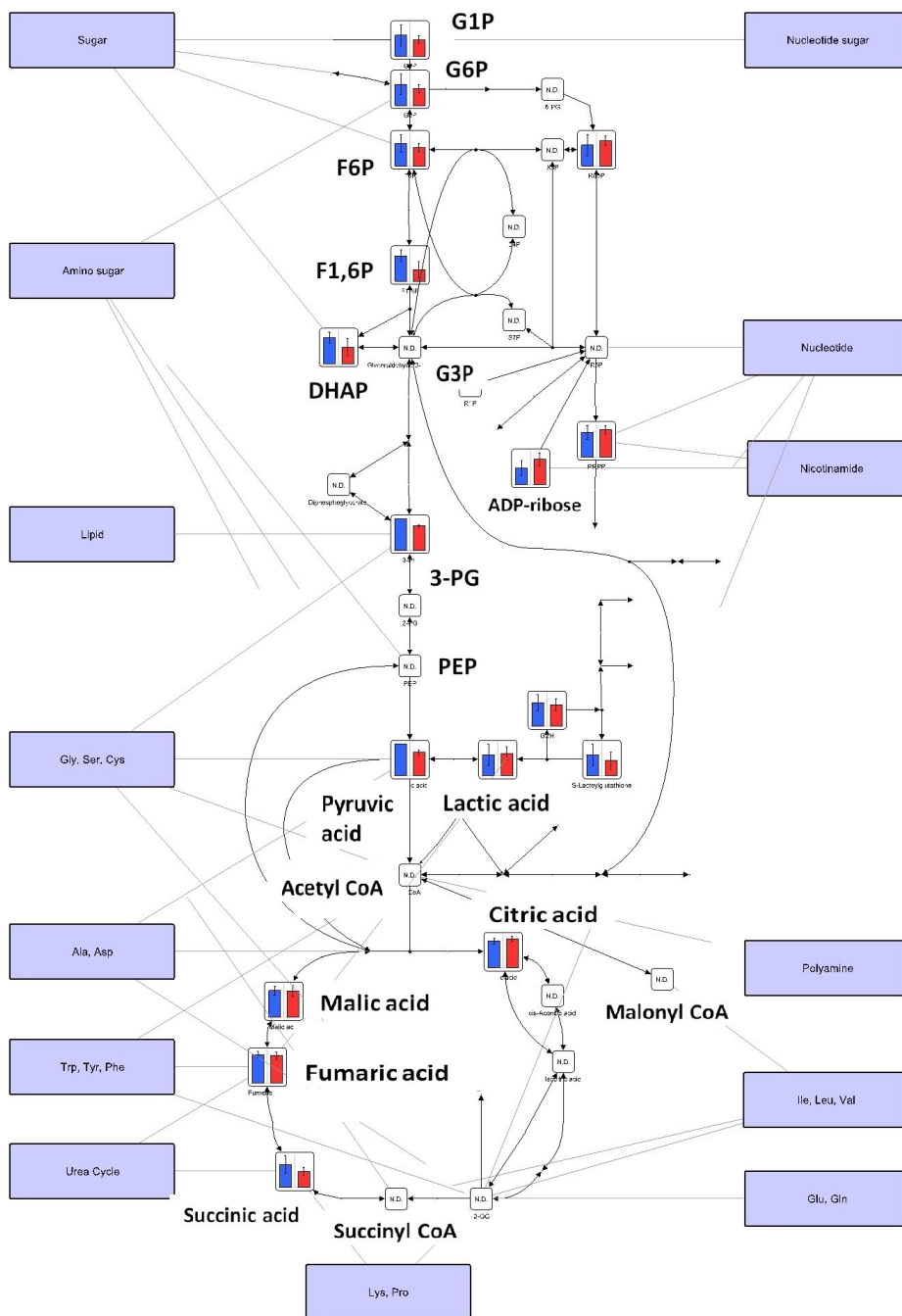


Fig. 4-1 運動終了より 120 分後の前脛骨筋における、糖代謝を中心とした代謝経路上（解糖系/糖新生、ペントースリン酸経路、クエン酸回路）の物質の定量データ。いずれの項目も生理食塩水投与群（青）の値の平均値を 1.0 として、タウリン投与群（赤）の値を相対的に表す。F1, 6P ($p < 0.01$) と DHAP ($p < 0.05$) について、群間に有意な差がみられた。

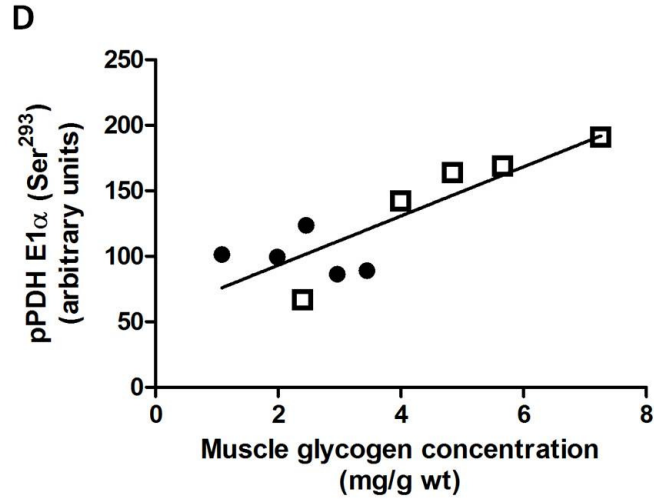


Fig. 4-2 運動後の飼料を自由摂取とした条件における、トレッドミル走行運動終了より 60 分後および 120 分後の前脛骨筋の GLUT4 (A) 、Ser⁶⁴¹リン酸化型 GS (B) 、Ser²⁹³リン酸化型 PDH E1α (C) のタンパク質量。いずれのグラフも、各タイムポイントにおける生理食塩水投与群の値を 100 として相対値で表す。(D) 前脛骨筋グリコーゲン濃度と Ser²⁹³リン酸化型 PDH E1αタンパク質量。相関係数 $r = 0.8460$ 、 $p < 0.01$ 。いずれのグラフも白いバーとプロットはタウリン投与群 (Taurine, T)、黒いバーとプロットは生理食塩水投与群 (Saline, S) の値を示す。

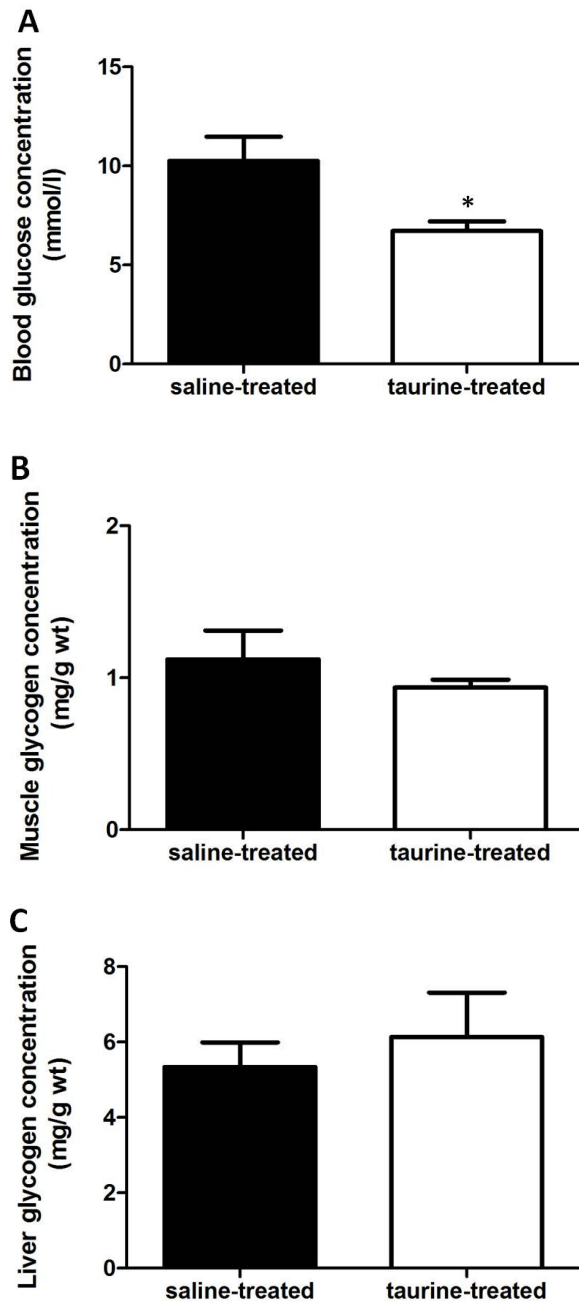


Fig. 4-3 トレッドミル走行終了直後にグルコース（体重 1 g あたり 0.8 mg）を経口投与し、60 分後の血中グルコース濃度 (A) 、前脛骨筋グリコーゲン濃度 (B) 、および肝臓グリコーゲン濃度 (C) 。いずれのグラフも白いバーはタウリン投与群、黒いバーは生理食塩水投与群の値を示す。*: 生理食塩水投与群と比較して $p < 0.05$ 。

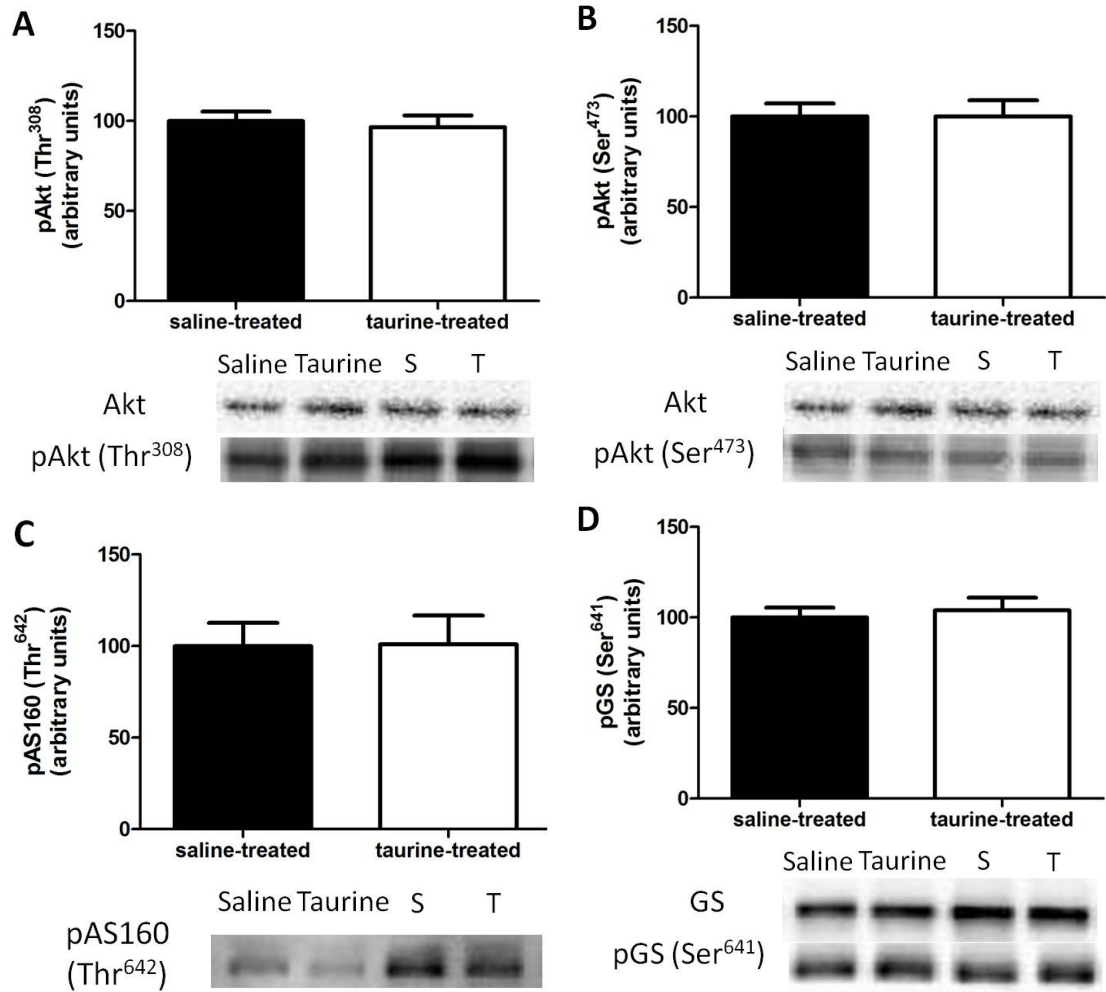


Fig. 4-4 トレッドミル走行終了直後にグルコース（体重 1 g あたり 0.8 mg）を経口投与し、60 分後の前脛骨筋における Thr³⁰⁸リン酸化型 Akt (A)、Ser⁴⁷³リン酸化型 Akt (B)、Thr⁶⁴²リン酸化型 AS160 (C)、および Ser⁶⁴¹リン酸化型 GS (D) のタンパク質量。いずれのグラフも生理食塩水投与群の値を 100 としたときの相対値を示す。白いバーはタウリン投与群 (Taurine, T)、黒いバーは生理食塩水投与群 (Saline, S) の値を示す。

4-4 考察

運動後に経口摂取したタウリンの動態

運動時の骨格筋では代謝が活発になり、クレアチンリン酸や ATP の分解による無機リン酸の生成や、解糖系による乳酸の生成が高まり、浸透圧を持つ物質の濃度が高まる。この時、浸透圧を一定に保つために、様々な物質が骨格筋より放出される (Usher-Smith et al., 2009)。タウリンは浸透圧調節のために骨格筋から放出される物質の一つであると考えられている (Cuisinier et al., 2002, Lang, 2007)。ラットでは本研究と同様なプロトコルのトレッドミル走行によって骨格筋タウリン濃度の低下がみられている (Matsuzaki et al., 2002, Yatabe et al., 2003 and 2009)。そのため、本研究でも運動後にはマウスの骨格筋タウリン濃度は低下していると考えられる。一方、運動後には骨格筋での代謝の亢進はみられなくなり、細胞内の浸透圧は運動前の状態に戻っていくと考えられる。運動後の骨格筋タウリン濃度の経時的変化を検討した先行研究はなく、運動終了より 120 分後の骨格筋タウリン濃度が運動直後と比較してどのような値を示すかは不明である。しかし、ヒトでは自転車運動終了より 6 時間にわたって、脚部の骨格筋でタウリンの取り込みが高まることが示されている (Levenhagen et al., 2001)。運動後のタウリン投与によって骨格筋により多くのタウリンが取り込まれる可能性がある。先行研究より、ラットにおいて経口摂取したタウリンは 15 分以内に血液中にあらわれ (Iwata et al., 1978)、また、尾静脈に ^{35}S で標識したタウリンを注入した場合、骨格筋において ^{35}S のシグナルが 10 分以内にみられることが報告されている (Awapara, 1957)。そのため、経口摂取したタウリンは 60 分以内には血流に乗って骨格筋にも到達すると考えられる。よって、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、運

動終了より 120 分後の骨格筋でタウリン濃度が高値を示すと考えた。しかし、タウリン投与による差はみられなかった。タウリンは血液中にも存在し、本研究と同様に MF 飼料を摂取している ICR マウスの血漿タウリン濃度は 310 μM であると報告されている (Nakamura et al., 2006)。したがって、生理食塩水投与群でも運動後の骨格筋でのタウリンの取り込みは起こると考えられる。加えて、タウリン輸送担体 (TauT) の活性は、細胞を低張液に浸した時、すなわち細胞内の浸透圧の上昇が必要でない時には低下することが報告されている (Han et al., 2006)。この先行研究の結果は、組織で必要以上のタウリンの取り込みは起こりにくいことを示唆している。タウリン投与によって運動後の骨格筋タウリン濃度の上昇が促進される可能性はあるが、骨格筋タウリン濃度の大幅な上昇は起こりにくいと考えられる。運動終了から 120 分経った時には生理食塩水投与群の骨格筋タウリン濃度がタウリン投与群の値に迫っていたため、投与群間の差がみられなかった可能性がある。

運動後のタウリン摂取が骨格筋のグリコーゲン合成にもたらした効果

前章において、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、運動終了より 120 分後の骨格筋のグリコーゲン濃度が有意に高値を示した。加えて、運動後に一定量のグルコースを投与した後、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して血中グルコース濃度の曲線下面積が有意に低値を示し、タウリン摂取によって骨格筋でのグルコースの取り込みが高まる可能性が示唆された。先行研究で、マウスにタウリンを注入することで、インスリン刺激時に、シグナル伝達に関わる因子の一つであるインスリン受容体のリン酸化 (活性化) がより高まったとの報告がある (Carneiro et al., 2009)。そこで、実験 4-3 で運

動終了直後のグルコース投与より 60 分後に前脛骨筋を摘出し、インスリンシグナル伝達に関わるタンパク質について、活性の指標となるリン酸化状態を定量化した。しかし、いずれの因子についてもタウリン摂取の効果はみられなかった。一方、運動終了より 60 分後の血中グルコース濃度は、タウリン投与群で生理食塩水投与群と比較して有意に低値を示し、実験 3-2 と同様に、タウリン摂取によって骨格筋でのグルコース取り込みが高まった可能性が示唆された。インスリン刺激時の骨格筋でのグルコースの取り込みは、運動や電気刺激による収縮によって高まる。一方この時、インスリン受容体や Akt をはじめ、インスリンシグナル伝達に関わる因子の活性やリン酸化状態について、運動および収縮を行うことでさらに高まる、ということは起こらなかったとの報告も多くある (Hansen et al., 1998a, Wojtaszewski et al., 2000, Fisher et al., 2002a, Hamada et al., 2006)。タウリンもインスリンシグナル伝達に関わるタンパク質のリン酸化状態には影響を与えずに、運動後の骨格筋でのグルコース取り込みを高める可能性があると考えられる。

運動後の骨格筋グリコーゲン合成量を規定する因子の一つに、グルコースの取り込みが挙げられる。骨格筋でのグルコースの取り込みは細胞膜にあるグルコース輸送担体 4 (GLUT4) によって行われる。トレーニングによって骨格筋の GLUT4 タンパク質量が高まると、非トレーニング群と比較して、運動後の回復期の骨格筋グリコーゲン濃度が高値を示す (Hickner et al., 1997, Nakatani et al., 1997)。よって、骨格筋の GLUT4 の総量は運動後の骨格筋のグリコーゲン濃度の上昇に影響を与える因子の一つと言える。加えて、運動後にみられるグリコーゲンの超回復現象には、運動によって骨格筋の GLUT4 タンパク質量の増加することが関わっている可能性が示唆されている (Ivy

and Kuo, 1998)。タウリン投与群では、運動終了より 120 分後の骨格筋で、グリコーゲン濃度が運動前の値と比較して有意に高値を示す超回復現象がみられた。運動による骨格筋の GLUT4 タンパク質量の増加は短時間で起こる適応であり、ラットでは運動終了より 1.5 時間後に増加がみられたとの報告もある (Kuo et al., 1999)。そのため、タウリン摂取が運動後の GLUT4 のタンパク質量の増加に影響を与え、その影響が運動終了から 60 分後や 120 分後にみられる可能性がある。しかし、実験 4-2 で前脛骨筋の GLUT4 タンパク質量を定量化した結果、運動終了より 60 分後および 120 分後いずれも、タウリン投与群と生理食塩水投与群との間に有意差はみられなかった。タウリン投与が運動後の骨格筋でのグリコーゲン合成を亢進し、超回復現象をもたらしたメカニズムとして、GLUT4 のタンパク質の総量を高めたことによる可能性は否定された。

他に、グルコースの取り込みやグリコーゲン合成に関わる要素の中で、タウリンが関与した可能性が考えられるものの一つに、細胞の浸透圧調節が挙げられる。骨格筋にインスリンが作用してグルコースの取り込みが高まる際には吸水が起こる。あわせて、浸透圧調節の一環として細胞内の陽イオン濃度が上昇する (Al-Habori et al., 1992)。タウリンは浸透圧調節の際に細胞内に取り込まれたり、細胞外に放出されたりする物質の一つである (Huxtable, 1992, Schaffer et al., 2000, Cuisinier et al., 2002, Lang, 2007)。タウリンがインスリン刺激による吸水が起こる際の浸透圧調節に関わることで、グリコーゲン濃度の上昇の亢進に関わった可能性も考えられる。タウリン投与が骨格筋のグリコーゲン濃度の上昇をもたらしたメカニズムとして、他に考えられるものは K^+ イオン濃度の調節がある。インスリン刺激時の浸透圧調節には、 K^+ の取り込みが重要な要素の一つと考えられている (Andres et al., 1962, Clausen and

Kohn, 1977)。インスリン刺激によって、細胞内への K^+ 取り込みに関わる Na^+/K^+ -ATP アーゼが活性化される (Sweeney and Klip, 1998)。しかし、タウリンが Na^+/K^+ -ATP アーゼを活性化させたとの報告はこれまでにない。一方で、タウリンはラットの骨格筋で ATP 依存性 K^+ チャンネルを阻害することが報告されている (Tricarico et al., 2000)。ATP 依存性 K^+ チャンネルは K^+ を細胞内から細胞外へ放出する際に働く。骨格筋の ATP 依存性 K^+ チャンネルの活性化に関わるサブユニットの SUR2 や Kir 6.2 を欠損しているマウスでは、グルコースの取り込みが高まることが報告され (Chutkow et al., 2001, Miki et al., 2002)、細胞で K^+ の放出を防ぐことはグルコースの取り込みの亢進に繋がることが示唆されている。そのため、タウリン摂取によって骨格筋でのタウリン濃度の回復が促進され、ATP 依存性 K^+ チャンネルの活性の抑制に繋がり、骨格筋でのグルコースの取り込みやグリコーゲン合成が促進された可能性がある。

運動後のタウリン摂取が骨格筋の解糖系および糖の酸化利用にもたらした効果

実験 4-1 でのメタボローム解析の結果、運動終了から 120 分後の骨格筋において、タウリン投与群では解糖系の代謝産物であるフルクトース 1,6 ビスリン酸 (F1, 6P) とジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) が有意に低値を示した。運動後のタウリン摂取による骨格筋での解糖系の抑制が、回復期のグリコーゲン濃度の上昇に繋がった可能性は高いと考えられる。解糖系の律速酵素であるホスホフルクトキナーゼ (PFK) はフルクトース 1 リン酸を F1, 6P へと反応させる酵素であり、また F1, 6P は DHAP に変換される。本研究で得られた結果は、タウリン摂取による骨格筋の PFK の抑制を示すものである。解糖系の律

速酵素である PFK は H^+ や AMP によって活性化され、ATP やクエン酸によって抑制される。しかし、メタボローム解析の結果、ATP や AMP、クエン酸 (Fig. 4-1 における Citric acid) に両投与群間の差はみられなかった。代謝基質濃度以外に、解糖系の制御に関する要素の中でタウリンが関わった可能性を持つものとして、浸透圧調節が考えられる。浸透圧の高い溶液に骨格筋を浸すと、クレアチンリン酸や ATP の分解の亢進、乳酸濃度の上昇、そしてグリコーゲン濃度の低下がみられる (Hayashi et al., 2000, Antolic et al., 2007)。乳酸は解糖系で生じた余剰なピルビン酸から生成される物質の一つである。骨格筋での乳酸濃度の上昇とグリコーゲン濃度の減少は、解糖系の亢進を反映している。高張液に浸した際に解糖系やクレアチンリン酸および ATP の分解が亢進される機序は解明されていないが、代謝基質の分解を亢進して細胞内の浸透圧を高める、もしくは浸透圧調節に関わるイオン輸送担体にエネルギーを供給するために起こると考えられている。運動によって血液の浸透圧は上昇する (Costill et al., 1976, Refsum et al., 1979, Cuisinier et al., 2002)。また、タウリンは骨格筋での浸透圧調節に関わることが示唆されている (Cuisinier et al., 2002, Lang, 2007)。これらのことから、タウリン摂取によって運動後の骨格筋での浸透圧調節が改善され、解糖系の亢進が抑えられた可能性が考えられる。

糖酸化の律速酵素であるピルビン酸脱水素酵素 (PDH) は、E1 α サブユニットがリン酸化されると活性が抑制され、脱リン酸化されると活性が上昇する。実験 4-2 で、活性制御に関わる部位の一つである Ser²⁹³ がリン酸化されている PDH E1 α のタンパク質量を、ウェスタンブロット法により定量化した。その結果、運動終了から 120 分後の骨格筋において、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、PDH E1 α Ser²⁹³ リン酸化型タンパク質量が高値を示す傾

向がみられた。また、運動終了から 120 分後の骨格筋において、PDH E1 α Ser²⁹³リン酸化型タンパク質量とグリコーゲン濃度間に正の相関関係がみられた。PDH をリン酸化する酵素の活性を高める物質として、NADH や、クエン酸回路の中間代謝物であるアセチル CoA が挙げられる。実験 4-1 のメタボローム解析の結果、運動終了から 120 分後の前脛骨筋の NADH 濃度には両投与群間に有意な差はみられず、アセチル CoA 濃度は測定できなかった (Fig. 4-1 における Acetyl CoA)。しかし、前章の実験 3-1 では運動終了 60 分後において、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、血中遊離脂肪酸濃度が有意に高値を示した。脂肪酸はミトコンドリアで酸化される際、アセチル CoA への変換を介する。さらに実験 4-1 で、運動終了から 120 分後の骨格筋において、タウリン投与群ではアセチル CoA の先駆体の一つであるスレオニンが有意に低値を示した。そのため、タウリン摂取によって血中遊離脂肪酸濃度の上昇やスレオニンのアセチル CoA への変換亢進がもたらされ、骨格筋でのアセチル CoA の供給が高まり、PDH のリン酸化、すなわち不活性化がもたらされた可能性も考えられる。先行研究で、カルニチン投与によって PDH の活性が抑えられた場合、グルコースの注入による骨格筋グリコーゲン濃度の増加が亢進されたとの報告がある (Stephens et al., 2006)。そのため、糖の酸化利用の抑制が運動後の骨格筋のグリコーゲン濃度の上昇に繋がった可能性が考えられる。

4-5 まとめ

運動後のタウリン投与によって、運動終了より 120 分後に骨格筋グリコーゲン濃度が生理食塩水投与群と比較して有意に高値を示した。本章ではタウリン摂取によって運動後の骨格筋グリコーゲン濃度の上昇が亢進されたメカニズム

の解明を目的として、骨格筋の代謝に関わる物質の濃度の測定や、ウェスタンブロット法による骨格筋での糖代謝にかかわるタンパク質の定量を行った。その結果、運動終了より 120 分後の骨格筋において、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、解糖系の律速酵素ホスホフルクトキナーゼの代謝産物であるフルクトース 1,6 ビスリン酸と、その下流にあるジヒドロキシアセトンリン酸が有意に低値を示した。加えて、タウリン投与群では、アセチル CoA の先駆体の一つであるスレオニンも低値を示した。さらに、運動終了より 120 分後の骨格筋において、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して PDH E1 α Ser²⁹³ リン酸化型（不活性化型）タンパク質量が高値を示す傾向にあった。加えて、運動終了より 120 分後の骨格筋では、PDH E1 α Ser²⁹³ リン酸化型タンパク質量とグリコーゲン濃度との間に有意な正の相関関係がみられた。一方で、骨格筋のインスリンシグナル伝達に関わるタンパク質について、活性の指標となるリン酸化状態にはタウリン投与の効果がみられなかった。これらの結果より、運動後のタウリン摂取によって、骨格筋での解糖系が抑制されたことが示され、また糖の酸化利用も抑えられる可能性が示唆された。運動後の糖の酸化利用の抑制が回復期の骨格筋グリコーゲン濃度の上昇に繋がったことが考えられる。さらに、運動後のタウリン摂取はインスリンシグナル伝達に関わるタンパク質のリン酸化以外の経路を介して、骨格筋でのグルコース取り込みやグリコーゲン合成を亢進した可能性が示唆された。

第5章 総合論議

疲労からの回復を促進することの重要性

本研究では運動による疲労からの回復を促進しうる栄養物質としてタウリンの可能性に着目して、運動後のタウリン摂取が回復期のエネルギー代謝に与える効果を検討した。疲労から回復することは競技大会におけるパフォーマンスの向上、トレーニング効果を得るための練習量や強度の維持、怪我の予防に繋がる。しかし、スポーツを行う人にとっては連続して運動を行う場面があり、疲労から十分に回復を行うことが難しいと考えられるケースも多々ある。例えば、学生の長期休暇中に行われる大会や、オリンピックやサッカーのワールドカップといった大会など、短期間に多くの試合をこなす場面は多い。いくつか例を挙げると、サッカーの全国高校選手権大会は12日間で6試合、バスケットボールの全国高校選手権大会は6日間連戦、自転車競技の最高峰のレースであるツール・ド・フランスは23日間で21レースを行う。競技大会期間中に限らず、運動を連続して行う機会は多くある。1997年に発表された「運動部活動の在り方に関する調査研究報告」によると、週当たりの活動日数が5日以上である運動部員の割合は中学生で89.9%、高校生で91.0%であった（文部科学省、1997）。時間的な制約が多い社会人であれば、まとまった時間を確保しやすく、かつ人数も揃いやすい休日に連日トレーニングを行うことも多くなると考えられる。そして、競技成績の向上を目指す人だけでなく、健康維持・増進を目指す人も高頻度でトレーニングを行うことがあると考えられる。健康維持・増進を図る上での運動の重要性は広く認知されつつあり、週1回以上運動を行う人の割合は上昇傾向にある（笹川スポーツ財団、2010）。さらに、2009年に厚生労働省より発表された「運動器の機能向上マニュアル」では、運動器の機能

向上を図るためには週 2 回以上運動を行うことが必要と記載されており、今後は多くの人で運動頻度が上昇していく可能性が考えられる。このように、多くの人にとって、運動を短い回復期間で行う場面があると考えられる。そのため、運動による疲労からの回復を促進する因子を探索することは、多くの人々の目標達成のために有用な知見を示すことに繋がると考えられる。

本研究の第 2 章では、90 分間のトレッドミル走行後に回転ケージ内でマウスを自由に走行させ、自発的な走行距離を運動による疲労からの回復の指標として、タウリン摂取の効果を検討した。トレッドミル走行直後には自発的な走行距離が低下し、運動による疲労がみられた。このように疲労をもたらす運動後において、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、自発的な走行距離が有意に高値を示した。このことは、タウリン摂取によって、運動による疲労からの回復が促進されたことを示す結果であると言える。

運動後の骨格筋グリコーゲン濃度の回復を促進することの重要性

1997 年に Chin and Allen は、摘出した骨格筋に 1 時間の回復期間をあけて 2 度、最大刺激下での強縮を行わせ、骨格筋グリコーゲン濃度の回復が発揮張力にもたらす効果を検討した。その結果、回復期間にグルコースを添加しなかった骨格筋ではグリコーゲン濃度が戻らず、発揮張力も初回の強縮時の 64% までしか回復しなかった。一方、回復期間にグルコースを添加し骨格筋グリコーゲン濃度を回復させた骨格筋では、2 回目の強縮時の発揮張力が初回の強縮時と同程度まで戻った (Chin and Allen, 1997)。筋収縮による疲労からの回復には、骨格筋グリコーゲン濃度の回復が重要であることが示された。また、摘出筋を用いたその後の研究でも、収縮前の骨格筋グリコーゲン濃度が高いほど発

揮張力の低下がおこるまで時間が長くなるという結果が得られている (Stephenson et al., 1999, Nielsen et al., 2009)。Stephenson et al. と Nielesen et al. の研究では、ATP やクレアチンリン酸の濃度を高く保ったバッファー内で摘出筋の収縮を行わせており、収縮に必要な高エネルギーリン酸化合物は十分に供給されていた。これらの先行研究は、骨格筋の収縮機能の低下は、高エネルギーリン酸化合物の濃度の低下によってではなく、骨格筋内のグリコーゲン貯蔵の低下によってもたらされることを示していると言える。したがって、運動による疲労からの回復を図る上で、骨格筋でのグリコーゲンの合成を促進することは必要不可欠であると言える。

第2章では、骨格筋グリコーゲン濃度の低下をもたらすトレッドミル走行の後、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、回転ケージでの自発走行距離が有意に高値を示した。さらに、第3章では、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、運動後に骨格筋グリコーゲン濃度が有意に高値を示した。タウリン摂取によって運動後のグリコーゲン濃度の回復が亢進されたことが、骨格筋の収縮を円滑に行う上で重要な役割を果たし、自発走行距離の延長に繋がったと考えられる。加えて、第3章において、タウリン投与群では血中遊離脂肪酸濃度が高値を示し、第4章ではタウリン投与によって骨格筋で解糖系や糖の酸化利用が抑えられることが示唆された。タウリン摂取によるこれらのエネルギー代謝の変化は、骨格筋グリコーゲン濃度の上昇を図る上で重要な役割を果たし、自発走行距離の延長に貢献したと考えられる。

運動後の疲労からの回復を促進する他のサプリメントとタウリンの比較

運動による疲労からの回復を図る上で、骨格筋で重要となることは、タンパ

ク質合成や筋損傷からの回復、およびグリコーゲン濃度の上昇である。運動後にこれらを活性化させるために摂取すべき栄養物質について、これまでも多く検討がなされ、総説もいくつか出されている (Jetjens and Jeukendrup, 2003, Millard-Stafford et al., 2008, Rodriguez et al., 2009, Beelen et al., 2010)。本研究では運動後の骨格筋グリコーゲンの回復を中心としたエネルギー代謝に対して、タウリンという栄養物質の摂取効果を検討した。

運動後に摂取することで骨格筋グリコーゲン濃度の上昇をもたらすことが報告されている栄養物質は、骨格筋でのグルコースの取り込みを亢進してグリコーゲン合成を促進する効果を期待されるものと、骨格筋での糖のエネルギー産生への利用を抑える効果を期待されるものに大別される。例えば、アミノ酸やペプチド、タンパク質は、血中のインスリン濃度の上昇 (Zawadzki et al., 1992, van Loon et al., 2000a) や骨格筋におけるインスリンシグナル伝達系の活性化をもたらす (Morifuji et al., 2010)、骨格筋のグルコース取り込みを高めて、運動後の骨格筋グリコーゲン合成を高めると報告されている (van Loon et al., 2000b, Ivy et al., 2002)。しかし、運動そのものによって骨格筋でのグルコース取り込みやグリコーゲン合成が十分に高まるためか、これらをさらに亢進させる可能性を持つ栄養物質は、アミノ酸やペプチド、タンパク質以外にはほとんどみつかっていない。運動後のカフェイン摂取が骨格筋グリコーゲン濃度の上昇をもたらす、その時、グルコース取り込みの亢進に関わるシグナル因子の一つである、カルモジュリン依存性キナーゼのリン酸化型 (活性化型) の割合の上昇がみられたとの報告がある (Pedersen et al., 2008)。しかし、運動後のカフェイン摂取が骨格筋でのグリコーゲン濃度の上昇をもたらしたとの報告はこの1報のみである。逆に、カフェイン摂取が運動後のグリコーゲン濃度に影

響を与えなかったとの報告もある (Battram et al., 2004, Beelen et al., 2012) 。一方、骨格筋での糖のエネルギー産生への利用を抑える効果が期待される栄養物質には、酢酸やヒドロキシクエン酸が挙げられる。酢酸は生体内においてアセチル CoA に変換される。そのため、クエン酸回路の基質として、また糖の酸化利用の律速酵素であるピルビン酸脱水素酵素の不活性化に関わる物質として、糖の利用を抑制させると考えられている。実際にラットやウマにおいて、運動後の酢酸摂取によって、骨格筋グリコーゲン濃度の上昇が亢進されたことが報告されている (Fushimi et al., 2002, Waller et al., 2009) 。ヒドロキシクエン酸は脂質代謝を活性化させる物質であると考えられており、運動後に摂取することで呼吸商の低下、すなわち糖の酸化利用の抑制と骨格筋グリコーゲン濃度の上昇をもたらすことが報告されている (Cheng et al., 2012) 。

運動後の骨格筋グリコーゲン濃度の上昇をもたらす可能性をもつ栄養物質を検討したこれまでの研究は、骨格筋でのグリコーゲン合成の亢進をもたらす可能性、または糖のエネルギー産生への利用の抑制をもたらす可能性、どちらかに絞って摂取効果を検討するものが多かった。運動後の栄養摂取が、骨格筋でのグルコース取り込みの亢進と糖のエネルギー産生への利用の抑制の両方に効果をもたらす可能性を検討することは、他の先行研究では行われていない点である。また、運動後の骨格筋でグルコースの取り込みを高めてグリコーゲン合成を活性化すること、解糖系を抑制して糖を保存すること、この2つの要素に対してポジティブな効果をもたらすことは、タウリンという栄養物質がもつユニークな点であると言える。運動による疲労からの回復を促進するために、タウリンが回復期のエネルギー代謝を改善する上で有用な栄養物質として、これから多くの運動現場で使われていく可能性がある。

運動後の骨格筋グリコーゲン濃度の上昇を促進するための方法（運動後の栄養摂取以外）

本研究では、運動後の骨格筋グリコーゲン濃度の上昇をもたらす方法をみつけるため、運動後に炭水化物とともに摂取すべき栄養物質の探索を行った。運動後の骨格筋グリコーゲン濃度の上昇をもたらすためには、運動後の栄養摂取を工夫すること以外にも方法がある。

例えば、日々の食生活は運動後の骨格筋グリコーゲン合成に影響を与え得る要素の一つと考えられる。長期間の高脂肪食摂取は骨格筋をはじめとした組織でのグルコース取り込みの低下をもたらす (Han et al., 1997, Hansen et al., 1998a)。長期間の高脂肪食摂取によって運動後の骨格筋でのグルコースの取り込みやグリコーゲン濃度の上昇が抑えられることが、ラットを用いた先行研究でも報告されている (Tanaka et al., 2007)。加えて、近年では、高脂肪食摂取が短期間であっても、組織でのグルコースの取り込みが抑制されることが報告されている。具体的な例としては、56 時間の高脂肪食摂取によってグルコース投与時の血中グルコース濃度の曲線下面積が増加した、すなわち組織でのグルコースの取り込みが抑えられたとの報告や (Pehleman et al., 2005)、4 日間の高脂肪食摂取が骨格筋でのグルコースの取り込みを抑えたとの報告がある (Frosig et al., 2009)。我々もマウスを用いて、運動前の 3 日間高脂肪飼料（総カロリー中炭水化物由来のカロリーが 20%、脂質由来のカロリーが 57%）を摂取した群では、炭水化物の割合の高い MF 飼料（総カロリー中炭水化物由来のカロリーが 60%、脂質由来のカロリーが 13%）を摂取した群と比較して、運動後の骨格筋グリコーゲン濃度の上昇が有意に低下したとの結果を得た（高橋ら、

2013) 。そのため、運動前の食事内容は運動後の骨格筋のグリコーゲン合成に影響を与えると考えられる。

逆に、運動後の骨格筋でのグリコーゲン合成を抑制する要素としては、骨格筋の損傷が挙げられる。エキセントリックな収縮は筋損傷に繋がると考えられているが、膝の進展運動などエキセントリックな収縮を繰り返し行った際、自転車運動などエキセントリックな収縮を行う機会の少ない運動を行った場合と比較して、運動後の骨格筋グリコーゲン濃度の回復が遅れる (Costill et al., 1990, Widrick et al., 1992) 。そのため、運動時の骨格筋の損傷を抑えることは、運動後の骨格筋グリコーゲン濃度の上昇の亢進に繋がる可能性がある。運動前のタウリン摂取は、筋損傷や細胞膜の損傷、酸化ストレスの指標となる物質の濃度の上昇の抑制をもたらす (Dawson et al., 2002, Zhang et al., 2004, Yatabe et al., 2009, Silva et al., 2011) 。よって、運動前のタウリン摂取も、運動時の筋損傷を抑制することによって、回復期の骨格筋グリコーゲン濃度の上昇を促進させる可能性も考えられる。

本研究の成果をヒトに応用する上での課題

本研究では疲労からの回復を促進する可能性を持つ栄養物質としてタウリンに着目し、マウスを用いてタウリン摂取の効果を検討した。本研究の最終的な目的は、本研究で得られた知見をヒトに応用することである。運動後のタウリン摂取が回復期の骨格筋グリコーゲン濃度の上昇を促進するという研究成果について、ヒトでも同様の効果が得られるか検討することは、今後に向けた重要な課題の一つである。

タウリンの溶解度は 12 °C の水 100 ml あたり 15.5 g であり、水に比較的と

けやすい性質を持つ（大正富山医薬品、1997）。また、ヒトがタウリンを経口摂取した際、摂取から 30 分後には非摂取時と比較し血中タウリン濃度が有意に高値を示し、60 分程度でピークを迎える（Mero et al., 2008, Galloway et al., 2008）。タウリンは水に溶けやすく、経口摂取後の体内への吸収も早いことから、経口摂取に適した物質と考えられる。また、タウリンは骨格筋や神経、脳、血液といった様々な組織にもともと高濃度で存在する物質である。タウリンを多量に摂取した場合、余剰となったタウリンは代謝されることなくそのまま尿中や糞中に排泄される（Iwata et al., 1978, Sved et al., 2007）。そのため、タウリンが組織に過剰に蓄積することや他の物質に変換されることで副作用をもたらす、という可能性は考えにくい。タウリン摂取や組織中のタウリン濃度の上昇によるネガティブな効果は、動物種を問わずこれまでほとんど報告されていない。ヒトを対象としたこれまでの研究で最大の投与量である、体重 1 kg あたり 150 mg のタウリンを長期間摂取させた場合でも、副作用は報告されていない（Durelli et al., 1984, Shao and Hathcock, 2008）。一方、ラットを対象とした研究では、タウリン摂取によって下痢が起こったとの報告が 1 報ある（Dawson et al., 2002）。この研究では 3% タウリン水溶液を吸水瓶に入れ、ラットはいつでもタウリンを摂取できる環境におかれていた。タウリン水溶液の濃度が高いことが原因であるのか、一日中タウリンを摂取したことが原因であるのか、下痢が起こった原因については検討されていないが、本研究のようにタウリンを 1 日に数回与えるのみであれば副作用は起こりにくいと考えられる。

タウリンは運動時に浸透圧調節のために骨格筋から放出される物質の一つと考えられている（Cuisinier et al., 2002, Lang, 2007）。ラットを対象とした先行研究で、本研究と同様のトレッドミル走行によって、骨格筋タウリン濃度の

有意な低下がみられている (Matsuzaki et al., 2002, Yatabe et al., 2003 and 2009, Ishikura et al., 2011) 。ヒトを対象とした研究でも、長時間運動後に尿中や血中のタウリン濃度が上昇することは報告されており (Refsum et al., 1979, Cuisinier et al., 2001 and 2002) 、運動時にタウリンが骨格筋をはじめとした組織から放出されることが示唆されている。運動によって骨格筋でのタウリン濃度が低下した条件で、タウリン摂取がヒトでも運動後の回復期に効果をもたらす可能性がある。

本研究では体重 1 kg あたり 500 mg (体重 1 g あたり 0.5 mg) のタウリン投与によって運動後の回復期の骨格筋グリコーゲン濃度の上昇が亢進された。本研究でみられた、タウリン摂取によって回復期の糖のエネルギー産生への利用が抑制されたことを示唆する結果に関して、ヒトでも体重 1 kg あたり 22 mg のタウリン摂取が運動時の脂質の酸化利用を亢進することが報告されている (Rutherford et al., 2010) 。本研究では、ラットを対象とした他の研究でタウリン摂取の効果がみられている高めの投与量を採用したが、タウリンの投与量を減らした場合にも、運動後の糖の利用の抑制や、骨格筋のグリコーゲン濃度の上昇を亢進させるという結果が得られる可能性がある。

第 3 章において、運動終了より 120 分後、タウリン投与群の ICR マウスでは骨格筋グリコーゲン濃度が安静時の値の約 2 倍の値を示した。ヒトでも骨格筋グリコーゲン濃度の低下をもたらす運動後に高炭水化物食を摂取した場合、骨格筋グリコーゲン濃度は運動終了より 2 日後には安静時の約 1.5 倍、3 日後には安静時の約 2 倍の値を示すことが報告されている (Bergstrom and Hultman, 1966, Berstrom et al., 1967) 。よって、ヒトでも運動後に骨格筋グリコーゲン濃度が運動前と比較して約 2 倍程度に上昇することは、起こりうる。

まとめ

本博士論文では、運動による疲労からの回復を促進し、次の運動を行う際の疲労を予防する上で有用な栄養物質の探索を行った。疲労からの回復の促進をもたらす栄養物質としてタウリンが有用である可能性を考え、本研究では運動後のタウリン摂取が回復期に与える効果を検討した。本研究で得られた結果を Fig. 5-1 の概念図に表す。第2章では運動による疲労からの回復の指標として、回転ケージにおける自発走行距離を用い、走行距離と代謝基質濃度の変化に対してタウリン摂取が与える影響を検討した。その結果、組織中の糖の貯蔵の低下、および自発走行距離の有意な低下をもたらすトレッドミル走行後において、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、走行距離が有意に高値を示した。タウリンは骨格筋をはじめとした組織での様々な生理的機能に関わることが示唆されているため、タウリン摂取がトレッドミル走行後の自発走行距離の増加をもたらしたメカニズムには、複数の可能性が考えられる。その中で、本研究ではエネルギー代謝を中心とした観点より、運動後のタウリン摂取がもたらした効果について検討を行った。第3章では運動後にマウスを安静に保ち、組織中の代謝基質やホルモンの濃度を測定することで、タウリン摂取が運動後の回復期のエネルギー代謝にもたらした効果を検討した。その結果、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、運動後の回復期の骨格筋グリコーゲン濃度が有意に高値を示した。また、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、運動終了後にグルコースを経口投与した後の血中グルコース濃度の上昇が抑えられ、タウリン摂取によって骨格筋でのグルコースの取り込みが高まった可能性が示唆された。さらに、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、回復期の血中遊離脂肪酸濃度も高値を示した。タウリン摂取による

運動後の骨格筋グリコーゲン濃度の上昇の亢進は、骨格筋におけるグルコース取り込みの亢進や糖のエネルギー産生への利用の抑制など、複数のエネルギー代謝の要素を介してもたらされた可能性が考えられる。そこで、第4章では運動後のタウリン摂取がエネルギー代謝にもたらした効果の詳細を解明するため、骨格筋中のエネルギー代謝にかかわる物質についての網羅的なメタボローム解析、ウェスタンブロット法による骨格筋の糖代謝にかかわるタンパク質の定量化を行った。その結果、タウリン投与群では生理食塩水投与群と比較して、骨格筋中の解糖系の中間代謝物濃度が有意に低値を示し、糖の酸化利用の律速酵素であるPDHのリン酸化型（不活性化型）の割合が高値を示す傾向にあった。これらの結果より、運動後のタウリン摂取によって、骨格筋でグリコーゲンやグルコースのエネルギー産生への利用が抑えられたことが示された。タウリン摂取による運動後の骨格筋グリコーゲン濃度の上昇促進は、骨格筋でのグルコース取り込みの亢進と糖のエネルギー産生への利用の抑制、主としてこの2つの効果によりもたらされた可能性が考えられる。

骨格筋のグリコーゲン濃度を高めることは運動による疲労からの回復において重要なことであり、さらに、次に運動を行う際の疲労の防止にも繋がる。実際に、本研究では回復期の骨格筋のグリコーゲン濃度の上昇をもたらしたという結果とあわせて、タウリン摂取がトレッドミル走行後の回転ケージにおける自発走行距離の延長をもたらすという結果が得られた。運動後のタウリン摂取によって回復期の骨格筋グリコーゲン濃度がより高まり、そして、次に運動を行う際に、パフォーマンスの一つの指標となる自発走行距離が延長したという本研究の結果は、運動による疲労からの回復を促進し、次の運動に備える方法を考える上で、有用なものになっていくと考えられる。

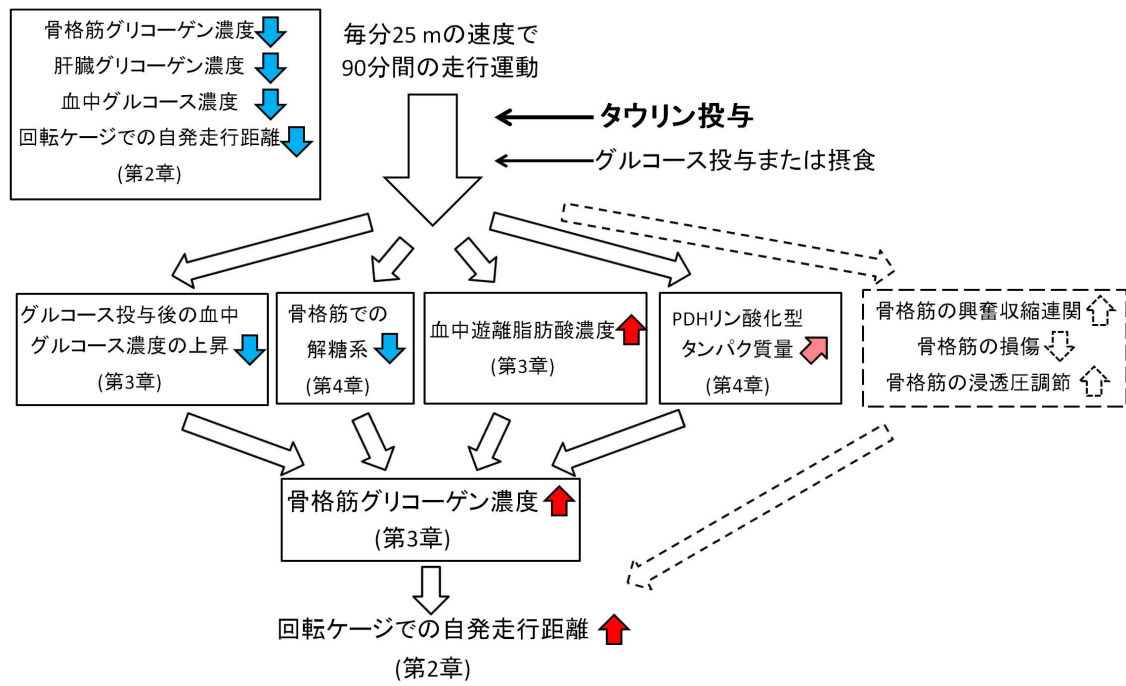


Fig. 5-1 運動後のタウリン摂取が運動による疲労からの回復にもたらした効果
 についての概念図

参考文献

1. Ahlborg B, Bergstrom J, Ekelund LG, and Hultman E. 1967. Muscle glycogen and muscle electrolytes during prolonged physical exercise. *Acta Physiol Scand* 70: 129-142.
2. Al-Habori M, Peak M, Thomas TH, and Agius L. 1992. The role of cell swelling in the stimulation of glycogen synthesis by insulin. *Biochem J* 282 : 789-796.
3. Allen DG, Lamb GD, and Westerblad H. 2008. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev* 88: 287-332.
4. Ament W and Verkerke GJ. 2009. Exercise and fatigue. *Sports Med* 39: 389-422.
5. Andres R, Baltzan MA, Cader G, and Zierler KL. 1962. Effect of insulin on carbohydrate metabolism and on potassium in the forearm of man. *J Clin Invest* 41: 108-115.
6. Arnold DL, Matthews PM, and Radda GK. 1984. Metabolic recovery after exercise and the assessment of mitochondrial function in vivo in human skeletal muscle by means of ³¹P NMR. *Magn Reson Med* 1: 307-315.
7. Antolic A, Harrison R, Farlinger C, Cermak NM, Peters SJ, LeBlanc P, Roy BD. 2007. Effect of extracellular osmolality on cell volume and resting metabolism in mammalian skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R1994-2000.
8. Awapara J. 1957. Absorption of injected taurine-S35 by rat organs. *J Biol Chem* 225: 877-882.
9. Bakker AJ and Berg HM. 2002. Effect of taurine on sarcoplasmic reticulum function and force in skinned fast-twitch skeletal muscle fibres of the rat. *J Physiol* 538: 185-194.
10. Balshaw TG, Bampouras TM, Barry TJ, and Sparks SA. 2013. The effect of acute taurine ingestion on 3-km running performance in trained middle-distance runners. *Amino Acids* 44: 555-561.
11. Balsom PD, Wood K, Olsson P, and Ekblom B. 1999. Carbohydrate intake and multiple sprint sports: with special reference to football (soccer). *Int J Sports Med* 20: 48-52.

12. Battram DS, Shearer J, Robinson D, and Graham TE. 2004. Caffeine ingestion does not impede the resynthesis of proglycogen and macroglycogen after prolonged exercise and carbohydrate supplementation in humans. *J Appl Physiol* 96: 943-950.
13. Beelen M, Burke LM, Gibala MJ, and van Loon L JC. 2010. Nutritional strategies to promote postexercise recovery. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 20: 515-532.
14. Beelen M, Kranenburg J, Senden JM, Kuipers H, and Loon LJ. 2012. Impact of caffeine and protein on postexercise muscle glycogen synthesis. *Med Sci Sports Exerc* 44: 692-700.
15. Bergstrom J and Hultman E. 1966. Muscle glycogen synthesis after exercise: an enhancing factor localized to the muscle cells in man. *Nature* 210: 309-310.
16. Bergstrom J, Hermansen L, Hultman E, and Saltin B. 1967. Diet, muscle glycogen and physical performance. *Acta Physiol Scand* 71: 140-150.
17. Bielinski R, Schutz Y, and Jequier E. 1985. Energy metabolism during the postexercise recovery in man. *Am J Clin Nutr* 42: 69-82.
18. Burgess ML, Robertson RJ, Davis JM, and Norris JM. 1991. RPE, blood glucose, and carbohydrate oxidation during exercise: effects of glucose feedings. *Med Sci Sports Exerc* 23: 353-359.
19. Burke LM, Collier GR, and Hargreaves M. 1993. Muscle glycogen storage after prolonged exercise: effect of the glycemic index of carbohydrate feedings. *J Appl Physiol* 75: 1019-1023.
20. Burke LM, Kiens B, and Ivy JL. 2004. Carbohydrates and fat for training and recovery. *J Sports Sci* 22: 15-30.
21. Carmichael MD, Davis JM, Murphy EA, Brown AS, Carson JA, Mayer E, and Ghaffar A. 2005. Recovery of running performance following muscle-damaging exercise: relationship to brain IL-1beta. *Brain Behav Immun* 19: 445-452.
22. Carneiro M, Latorraca Q, Araujo E, Beltra M, Oliveras MJ, Navarro M, Berna G, Bedoya FJ, Velloso LA, Soria B, and Martin F. 2009. Taurine supplementation modulates glucose homeostasis and islet function. *J Nutr Biochem* 20: 503-511.

23. Cartee GD, Young DA, Sleeper MD, Zierath J, Wallberg-Henriksson H, and Holloszy JO. 1989. Prolonged increase in insulin-stimulated glucose transport in muscle after exercise. *Am J Physiol* 256: E494-E499.
24. Cheng IS, Huang SW, Lu HC, Wu CL, Chu YC, Lee SD, Huang CY, and Kuo CH. 2012. Oral hydroxycitrate supplementation enhances glycogen synthesis in exercised human skeletal muscle. *Br J Nutr* 107: 1048-1055.
25. Chin ER and Allen DG. 1997. Effects of reduced muscle glycogen concentration on force, Ca²⁺ release and contractile protein function in intact mouse skeletal muscle. *J Physiol* 498: 17-29.
26. Chutkow WA, Samuel V, Hansen PA, Pu J, Valdivia CR, Makielski JC, and Burant CF. 2001. Disruption of Sur2-containing K (ATP) channels enhances insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11760-11764.
27. Clausen T and Kohn PG. 1977. The effect of insulin on the transport of sodium and potassium in rat soleus muscle. *J Physiol* 265: 19-42.
28. Costill DL, Cote R, and Fink W. 1976. Muscle water and electrolytes following varied levels of dehydration in man. *J Appl Physiol* 40: 6-11.
29. Costill DL, Pascoe DD, Fink WJ, Robergs RA, Barr SI, and Pearson D. 1990. Impaired muscle glycogen resynthesis after eccentric exercise. *J Appl Physiol* 69: 46-50.
30. Coyle EF, Hagberg JM, Hurley BF, Martin WH, Ehsani AA, and Holloszy JO. 1983. Carbohydrate feeding during prolonged strenuous exercise can delay fatigue. *J Appl Physiol* 55: 230-235.
31. Coyle EF, Coggan AR, Hemmert MK, and Ivy JL. 1986. Muscle glycogen utilization during prolonged strenuous exercise when fed carbohydrate. *J Appl Physiol* 61: 165-172.
32. Cuisinier C, Ward RJ, Francaux M, Sturbois X, and De Witte P. 2001. Changes in plasma and urinary taurine and amino acids in runners immediately and 24h after a marathon. *Amino Acids* 20: 13-23.
33. Cuisinier C, Michotte De Welle J, Verbeeck RK, Poortmans JR, Ward R, Sturbois X, and Francaux M. 2002. Role of taurine in osmoregulation during endurance exercise. *Eur J Appl Physiol* 87: 489-495.
34. Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD, Zielinski MR, Groschwitz CM, Brown AS, Gangemi JD, Ghaffar A, and Mayer EP. 2007. Curcumin

- effects on inflammation and performance recovery following eccentric exercise-induced muscle damage. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R2168-R2173.
35. Dawson Jr. R, Biasseti M, Messina S, and Dominy J. 2002. The cytoprotective role of taurine in exercise-induced muscle injury. *Amino Acids* 22: 309-324.
 36. DeFronzo RA, Gunnarsson R, Bjorkman O, Olsson M, and Wahren J. 1985. Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J Clin Invest* 76: 149-155.
 37. Derave W, Lund S, Holman GD, Wojtaszewski J, Pedersen O, and Richter EA. 1999. Contraction-stimulated muscle glucose transport and GLUT-4 surface content are dependent on glycogen content. *Am J Physiol* 277: E1103-1110.
 38. Duhamel TA, Green HJ, Perco JG, and Ouyang J. 2006a. Effects of prior exercise and a low-carbohydrate diet on muscle sarcoplasmic reticulum function during cycling in women. *J Appl Physiol* 101: 695-706.
 39. Duhamel TA, Perco JG, and Green HJ. 2006b. Manipulation of dietary carbohydrates after prolonged effort modifies muscle sarcoplasmic reticulum responses in exercising males. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: R1100-R1110.
 40. Dumke CL, Rhodes JS, Garland Jr. T, Maslowski E, Swallow JG, Wetter AC, and Cartee GD. 2001. Genetic selection of mice for high voluntary wheel running: effect on skeletal muscle glucose uptake. *J Appl Physiol* 91: 1289-1297.
 41. Durelli L, Mutani R, and Fassio F. 1983. The treatment of myotonia: evaluation of chronic oral taurine therapy. *Neurology* 33: 599-603.
 42. Dutka TL and Lamb GD. 2007. Na⁺-K⁺ pumps in the transverse tubular system of skeletal muscle fibers preferentially use ATP from glycolysis. *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C967-C977.
 43. Edwards RH. 1981. Human muscle function and fatigue. *Ciba Found Symp* 82: 1-18.
 44. Fisher JS, Gao J, Han DH, Holloszy JO, and Nolte LA. 2002a. Activation of AMP kinase enhances sensitivity of muscle glucose transport to insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E18-E23.

45. Fisher JS, Nolte LA, Kawanaka K, Han DH, Jones TE, and Holloszy JO. 2002b. Glucose transport rate and glycogen synthase activity both limit skeletal muscle glycogen accumulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E1214-E1221.
46. Foos TM and Wu JY. 2002. The role of taurine in the central nervous system and the modulation of intracellular calcium homeostasis. *Neurochem Res* 27: 21-26.
47. Frosig C, Roepstorff C, Brandt N, Maarbjerg SJ, Birk JB, Wojtaszewski JF, Richter EA, and Kiens B. 2009. Reduced malonyl-CoA content in recovery from exercise correlates with improved insulin-stimulated glucose uptake in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E787-E795.
48. Fushimi T, Tayama K, Fukaya M, Kitakoshi K, Nakai N, Tsukamoto Y, and Sato Y. 2002. The efficacy of acetic acid for glycogen repletion in rat skeletal muscle after exercise. *Int J Sports Med* 23: 218-222.
49. Galloway SD, Talanian JL, Shoveller AK, Heigenhauser GJ, and Spriet LL. 2008. Seven days of oral taurine supplementation does not increase muscle taurine content or alter substrate metabolism during prolonged exercise in humans. *J Appl Physiol* 105: 643-651.
50. Garetto LP, Richter EA, Goodman MN, and Ruderman NB. 1984. Enhanced muscle glucose metabolism after exercise in the rat: the two phases. *Am J Physiol* 246: E471-E475.
51. Goodman CA, Horvath D, Stathis C, Mori T, Croft K, Murphy RM, and Hayes A. 2009. Taurine supplementation increases skeletal muscle force production and protects muscle function during and after high-frequency in vitro stimulation. *J Appl Physiol* 107: 144-154.
52. Green HJ, Helyar R, Ball Burnett M, Kowalchuk N, Symon S, and Farrance B. 1992. Metabolic adaptations to training precede changes in muscle mitochondrial capacity. *J Appl Physiol* 72: 484-491.
53. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, and Shulman GI. 1999. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48: 1270-1274.
54. Hamada T, Arias EB, and Cartee GD. 2006. Increased submaximal insulin-stimulated glucose uptake in mouse skeletal muscle after

treadmill exercise. *J Appl Physiol* 101: 1368-1376.

55. Han DH, Hansen PA, Host HH, and Holloszy JO. 1997. Insulin resistance of muscle glucose transport in rats fed a high-fat diet: a reevaluation. *Diabetes* 46: 1761-1767.
56. Han X, Patters AB, Jones DP, Zelikovic I, Chesney RW. 2006. The taurine transporter: mechanisms of regulation. *Acta Physiol (Oxf)* 187: 61-73.
57. Hansen PA, Nolte LA, Chen MM, and Holloszy JO. 1998a. Increased GLUT-4 translocation mediates enhanced insulin sensitivity of muscle glucose transport after exercise. *J Appl Physiol* 85: 1218-1222.
58. Hansen PA, Han DH, Marshall BA, Nolte LA, Chen MM, Mueckler M, and Holloszy JO. 1998b. A high fat diet impairs stimulation of glucose transport in muscle. Functional evaluation of potential mechanisms. *J Biol Chem* 273: 26157-26163.
59. Harada N, Ninomiya C, Osako Y, Morishima M, Mawatari K, Takahashi A, and Nakaya Y. 2004. Taurine alters respiratory gas exchange and nutrient metabolism in type 2 diabetic rats. *Obes Res* 12: 1077-1084.
60. Hayashi T, Hirshman MF, Fujii N, Habinowski SA, Witters LA, Goodyear LJ. 2000. Metabolic stress and altered glucose transport: activation of AMP-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism. *Diabetes* 49: 527-531.
61. Hespel P and Richter EA. 1990. Glucose uptake and transport in contracting, perfused rat muscle with different pre-contraction glycogen concentrations. *J Physiol* 427: 347-359.
62. Hickner RC, Fisher JS, Hansen PA, Racette SB, Mier CM, and Turner MJ, Holloszy JO. 1997. Muscle glycogen accumulation after endurance exercise in trained and untrained individuals. *J Appl Physiol* 83: 897-903.
63. Holloszy JO and Coyle EF. 1984. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J Appl Physiol* 56: 831-838.
64. Huxtable R and Bressler R. 1973. Effect of taurine on a muscle intracellular membrane. *Biochim Biophys Acta* 323: 573-583.
65. Huxtable RJ. 1992. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 72:

101-163.

66. Ishikura K, Miyagawa S, Yatabe Y, Takekoshi K, and Omori H. 2008. Effect of taurine supplementation on blood glucose concentration during prolonged exercise. *Jpn J Phys Fitness Sports Med* 57: 475-484.
67. Ishikura K, Miyazaki T, Ra SG, Endo S, Nakamura Y, Matsuzaka T, Miyakawa S, and Ohmori H. 2011. Effect of taurine supplementation on the alterations in amino acid content in skeletal muscle with exercise in rat. *J Sports Sci Med* 10: 306-314.
68. Ivy JL and Kuo CH. 1998. Regulation of GLUT4 protein and glycogen synthase during muscle glycogen synthesis after exercise. *Acta Physiol Scand* 162: 295-304.
69. Ivy JL, Goforth Jr. HW, Damon BM, McCauley TR, Parsons EC, and Price TB. 2002. Early postexercise muscle glycogen recovery is enhanced with a carbohydrate-protein supplement. *J Appl Physiol* 93: 1337-1344.
70. Iwata H, Kuriyama K, Aoyagi T, and Nozu T. 1978. Absorption, distribution and excretion of ³⁵S-aurine in rats. *Ouyou Yakuri* 16: 179-187.
71. Jensen MD, Bajnarek J, Lee SY, Nielsen S, and Koutsari C. 2009. Relationship between postabsorptive respiratory exchange ratio and plasma free fatty acid concentrations. *J Lipid Res* 50: 1863-1869.
72. Jentjens R and Jeukendrup A. 2003. Determinants of post-exercise glycogen synthesis during short-term recovery. *Sports Med* 33: 117-144.
73. Kaplan B, Karabay G, Zagyapan RD, Ozer C, Sayan H, and Duyar I. 2004. Effects of taurine in glucose and taurine administration. *Amino Acids* 27: 327-333.
74. Kelley DE, Mokan M, Simoneau JA, and Mandarino LJ. 1993. Interaction between glucose and free fatty acid metabolism in human skeletal muscle. *J Clin Invest* 92: 91-98.
75. Kochan RG, Lamb DR, Lutz SA, Perrill CV, Reimann EM, and Schlender KK. 1979. Glycogen synthase activation in human skeletal muscle: effects of diet and exercise. *Am J Physiol* 236: E660-E666.
76. 厚生労働省. 2009. 運動器の機能向上マニュアル (改訂版).
77. Koteja P, Swallow JG, Carter PA, and Garland Jr. T. 1999. Energy cost of wheel running in house mice: implications for coadaptation of

locomotion and energy budgets. *Physiol Biochem Zool* 72: 238-249.

78. Kubota K and Saotome H. 1974. Effects of taurine on inhibition of the fall on blood glucose level of exercised mice and endurance of exercised mice. *Ouyou Yakuri* 8: 887-894.
79. Kulakowski EC and Mauro J. 1984. Hypoglycemic properties of taurine: not mediated by enhanced insulin release. *Biochem Pharmacol* 33: 2835-2838.
80. Kuo CH, Browning KS, and Ivy JL. 1999. Regulation of GLUT4 protein expression and glycogen storage after prolonged exercise. *Acta Physiol Scand* 165: 193-201.
81. Lang F. 2007. Mechanisms and significance of cell volume regulation. *J Am Coll Nutr* 26: 613S-623S
82. Levenhagen DK, Gresham JD, Carlson MG, Maron DJ, Borel MJ, and Flakoll PJ. 2001. Postexercise nutrient intake timing in humans is critical to recovery of leg glucose and protein homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E982-E993.
83. Lewis SF and Haller RG. 1986. The pathophysiology of McArdle's disease: clues to regulation in exercise and fatigue. *J Appl Physiol* 61: 391-401.
84. Lo S, Russell JC, and Taylor AW. 1970. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol* 28: 234-236.
85. Lund S, Holman GD, Schmitz O, and Pedersen O. 1993. Glut 4 content in the plasma membrane of rat skeletal muscle: comparative studies of the subcellular fractionation method and the exofacial photolabelling technique using ATB-BMPA. *FEBS Lett* 330: 312-318.
86. Lund S, Holman GD, Schmitz O, and Pedersen O. 1995. Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5817-5821.
87. Maehlum S, Grandmontagne M, Newsholme EA, and Sejersted OM. 1986. Magnitude and duration of excess postexercise oxygen consumption in healthy young subjects. *Metabolism* 35: 425-429.
88. Matsuzaki Y, Miyazaki T, Miyakawa S, Bouscarel B, Ikegami T, and Tanaka N. 2002. Decreased taurine concentration in skeletal muscles after exercise for various durations. *Med Sci Sports Exerc* 34: 793-797.

89. Mero A, Leikas A, Rinkinen N, Huhta P, Hulmi JJ, Pitkanen H, and Knuutinen J. 2008. Effect of strength training session on plasma amino acid concentration following oral ingestion of arginine or taurine in men. *Amino Acids* 35: 99-106.
90. Miki T, Minami K, Zhang L, Morita M, Gono T, Shiuchi T, Minokoshi Y, Renaud JM, and Seino S. 2002. ATP-sensitive potassium channels participate in glucose uptake in skeletal muscle and adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E1178-E1184.
91. Millard-Stafford M, Childers WL, Conger SA, Kampfer AJ, and Rahnert JA. 2008. Recovery nutrition: timing and composition after endurance exercise. *Curr Sports Med Rep* 7: 193-201.
92. Minato A, Hirose S, Ogiso T, Uda K, and Takigawa Y. 1969. Distribution of radioactivity after administration of taurine-³⁵S in rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 17: 1498-1504.
93. Miyazaki T, Matsuzaki Y, Ikegami T, Miyakawa S, Doy M, Tanaka N and Bouscarel B. 2004. Optimal and effective oral dose of taurine to prolong exercise performance in rat. *Amino Acids* 27: 291-298.
94. 文部科学省.1997. 運動部活動の在り方に関する調査研究報告.
95. Morifuji M, Kanda A, Koga J, Kawanaka K, and Higuchi M. 2010. Post-exercise carbohydrate plus whey protein hydrolysates supplementation increases skeletal muscle glycogen level in rats. *Amino Acids* 38: 1109-1115.
96. Nakamura H, Yatsuki J, and Ubuka T. 2006. Production of hypotaurine, taurine and sulfate in rats and mice injected with L-cysteinesulfinate. *Amino Acids* 31: 27-33.
97. Nakatani A, Han DH, Hansen PA, Nolte LA, Host HH, Hickner RC, and Holloszy JO. 1997. Effect of endurance exercise training on muscle glycogen supercompensation in rats. *J Appl Physiol* 82: 711-715.
98. Nandhini AT, Thirunavukkarasu V, and Anuradha CV. 2005. Taurine modifies insulin signaling enzymes in the fructose-fed insulin resistant rats. *Diabetes Metab* 31: 337-344.
99. Naperalsky M, Ruby B, and Slivka D. 2010. Environmental temperature and glycogen resynthesis. *Int J Sports Med* 31: 561-566.
100. Netea MG, Kullberg BJ, Vonk AG, Verschueren I, Joosten LA, and van

- der Meer JW. 2007. Increased voluntary exercise in mice deficient for tumour necrosis factor- α and lymphotoxin- α . *Eur J Clin Invest* 37: 737-741.
101. Nielsen S, Guo Z, Johnson CM, Hensrud DD, and Jensen MD. 2004. Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest* 113: 1582-1588.
102. Nielsen J, Schroder HD, Rix CG, and Ortenblad N. 2009. Distinct effects of subcellular glycogen localization on tetanic relaxation time and endurance in mechanically skinned rat skeletal muscle fibres. *J Physiol* 587: 3679-3690.
103. Nybo L. 2003. CNS fatigue and prolonged exercise: effect of glucose supplementation. *Med Sci Sports Exerc* 35: 589-594.
104. Ortenblad N, Nielsen J, Saltin B, and Holmberg HC. 2011. Role of glycogen availability in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} kinetics in human skeletal muscle. *J Physiol* 589: 711-725.
105. Ortenblad N, Westerblad H, and Nielsen J. 2013. Muscle glycogen stores and fatigue. *J Physiol* 591: 4405-4413.
106. Pardridge WM. 1983. Brain metabolism: a perspective from the blood-brain barrier. *Physiol Rev* 63: 1481-1535.
107. Park E, Park SY, Wang C, Xu J, LaFauci G, and Schuller-Levis G. 2002. Cloning of murine cysteine sulfinic acid decarboxylase and its mRNA expression in murine tissues. *Biochim Biophys Acta* 1574: 403-406.
108. Peck Jr. EJ and Awapara J. 1967. Formation of taurine and isethionic acid in rat brain. *Biochim Biophys Acta* 141: 499-506.
109. Pedersen DJ, Lessard SJ, Coffey VG, Churchley EG, Wootton AM, Ng T, Watt MJ, and Hawley JA. 2008. High rates of muscle glycogen resynthesis after exhaustive exercise when carbohydrate is coingested with caffeine. *J Appl Physiol* 105: 7-13.
110. Pehleman TL, Peters SJ, Heigenhauser GJ, and Spriet LL. 2005. Enzymatic regulation of glucose disposal in human skeletal muscle after a high-fat, low-carbohydrate diet. *J Appl Physiol* 98: 100-107.
111. Pierno S, De Luca A, Camerino C, Huxtable RJ, and Camerino DC. 1998. Chronic administration of taurine to aged rats improves the electrical and contractile properties of skeletal muscle fibers. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 1183-1190.

112. Pina-Zentella G, de la Rosa Cuevas G, Vazquez-Meza H, Pina E, and de Pina MZ. 2012. Taurine in adipocytes prevents insulin-mediated H₂O₂ generation and activates Pka and lipolysis. *Amino Acids* 42: 1927-1935.
113. Refsum HE, Gjessing LR, and Stromme SB. 1979. Changes in plasma amino acid distribution and urine amino acids excretion during prolonged heavy exercise. *Scand J Clin Lab Invest* 39: 407-413.
114. Ribeiro RA, Bonfleur ML, Amaral AG, Vanzela EC, Rocco SA, Boschero AC, and Carneiro EM. 2009. Taurine supplementation enhances nutrient-induced insulin secretion in pancreatic mice islets. *Diabetes Metab Res Rev* 25: 370-379.
115. Richter EA, Garetto LP, Goodman MN, and Ruderman NB. 1984. Enhanced muscle glucose metabolism after exercise: modulation by local factors. *Am J Physiol* 246: E476-E482.
116. Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, and Shulman GI. 1996. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 97: 2859-2865.
117. Rodriguez NR, Di Marco NM, and Langley S. 2009. American College of Sports Medicine position stand. Nutrition and athletic performance. *Med Sci Sports Exerc* 41: 709-731.
118. Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Gastaldelli A, Horowitz JF, Endert E, and Wolfe RR. 1993. Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am J Physiol* 265: E380-E391.
119. Rutherford JA, Spriet LL, and Stellingwerff T. 2010. The effect of acute taurine ingestion on endurance performance and metabolism in well-trained cyclists. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 20: 322-329.
120. Sahlin K, Harris RC, and Hultman E. 1979. Resynthesis of creatine phosphate in human muscle after exercise in relation to intramuscular pH and availability of oxygen. *Scand J Clin Lab Invest* 39: 551-558.
121. 笹川スポーツ財団. 2010. スポーツ活動に関する全国調査.
122. Schaffer S, Takahashi K, and Azuma J. 2000. Role of osmoregulation in the actions of taurine. *Amino Acids* 19: 527-546.
123. Schalch DS and Kipnis DM. 1965. Abnormalities in carbohydrate tolerance associated with elevated plasma nonesterified fatty acids. *J Clin Invest* 44: 2010-2020.

124. Shao A and Hathcock JN. 2008. Risk assessment for the amino acids taurine, L-glutamine and L-arginine. *Regul Toxicol Pharmacol* 50: 376-399.
125. Sherwin CM. 1998. Voluntary wheel running: a review and novel interpretation. *Anim Behav* 56: 11-27.
126. Silva LA, Silveira PC, Ronsani MM, Souza PS, Scheffer D, Vieira LC, Benetti M, De Souza CT, and Pinho RA. 2011. Taurine supplementation decreases oxidative stress in skeletal muscle after eccentric exercise. *Cell Biochem Funct* 29: 43-49.
127. Skein M, Duffield R, Kelly BT, and Marino FE. 2012. The effects of carbohydrate intake and muscle glycogen content on self-paced intermittent-sprint exercise despite no knowledge of carbohydrate manipulation. *Eur J Appl Physiol* 112: 2859-2870.
128. Stephens FB, Constantin-Teodosiu D, Laithwaite D, Simpson EJ, and Greenhaff PL. 2006. An acute increase in skeletal muscle carnitine content alters fuel metabolism in resting human skeletal muscle. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 5013-5018.
129. Stephenson DG, Nguyen LT, and Stephenson GM. 1999. Glycogen content and excitation-contraction coupling in mechanically skinned muscle fibres of the cane toad. *J Physiol* 519 1: 177-187.
130. Sved DW, Godsey JL, Ledyard SL, Mahoney AP, Stetson PL, Ho S, Myers NR, Resnis P, and Renwick AG. 2007. Absorption, tissue distribution, metabolism and elimination of taurine given orally to rats. *Amino Acids* 32: 459-466.
131. Swallow JG, Garland T Jr, Carter PA, Zhan WZ, and Sieck GC. 1998. Effects of voluntary activity and genetic selection on aerobic capacity in house mice (*Mus domesticus*). *J Appl Physiol* 84: 69-76.
132. Swallow JG, Koteja P, Carter PA, and Garland Jr. T. 2001. Food consumption and body composition in mice selected for high wheel-running activity. *J Comp Physiol B* 171: 651-659
133. Sweeney G and Klip A. 1998. Regulation of the Na⁺/K⁺-ATPase by insulin: why and how? *Mol Cell Biochem* 182: 121-133.
134. 大正富山医薬品株式会社. 2007. タウリン散 98%「大正」医薬品インタビューフォーム (改訂第5版).

135. 高橋祐美子, 松永裕, 田村優樹, 八田秀雄. 2013. 3 日間の高脂肪食摂取は運動後の骨格筋グリコーゲン合成を抑制する. 体力科学 62 (印刷中)
136. Tanaka S, Hayashi T, Toyoda T, Hamada T, Shimizu Y, Hirata M, Ebihara K, Masuzaki H, Hosoda K, Fushiki T, and Nakao K. 2007. High-fat diet impairs the effects of a single bout of endurance exercise on glucose transport and insulin sensitivity in rat skeletal muscle. *Metabolism* 56: 1719-1728.
137. Tricarico D, Barbieri M, and Camerino DC. 2000. Taurine blocks ATP-sensitive potassium channels of rat skeletal muscle fibres interfering with the sulphonylurea receptor. *Br J Pharmacol* 130: 827-834.
138. Tsuboyama-Kasaoka N, Shozawa C, Sano K, Kamei Y, Kasaoka S, Hosokawa Y, Ezaki O. 2006. Taurine (2-aminoethanesulfonic acid) deficiency creates a vicious circle promoting obesity. *Endocrinology* 147: 3276-3284.
139. Usher-Smith JA, Huang CL, and Fraser JA. 2009. Control of cell volume in skeletal muscle. *Biol Rev Camb Philos Soc* 84: 143-159.
140. van Loon LJ, Saris WH, Verhagen H, and Wagenmakers AJ. 2000a. Plasma insulin responses after ingestion of different amino acid or protein mixtures with carbohydrate. *Am J Clin Nutr* 72: 96-105.
141. van Loon LJ, Saris WH, Kruijshoop M, and Wagenmakers AJ. 2000b. Maximizing postexercise muscle glycogen synthesis: carbohydrate supplementation and the application of amino acid or protein hydrolysate mixtures. *Am J Clin Nutr* 72: 106-111.
142. van Loon LJ, Greenhaff PL, Constantin-Teodosiu D, Saris WH, and Wagenmakers AJ. 2001. The effects of increasing exercise intensity on muscle fuel utilisation in humans. *J Physiol* 536: 295-304.
143. Wallberg-Henriksson H, Constable SH, Young DA, and Holloszy JO. 1988. Glucose transport into rat skeletal muscle: interaction between exercise and insulin. *J Appl Physiol* 65: 909-913.
144. Waller AP, Geor RJ, Spriet LL, Heigenhauser GJ, and Lindinger MI. 2009. Oral acetate supplementation after prolonged moderate intensity exercise enhances early muscle glycogen resynthesis in horses. *Exp Physiol* 94: 888-898.
145. Warskulat U, Flogel U, Jacoby C, Hartwig HG, Thewissen M, Merx MW, Molojavyi A, Heller Stilb B, Schrader J, and Haussinger D. 2004.

Taurine transporter knockout depletes muscle taurine levels and results in severe skeletal muscle impairment but leaves cardiac function uncompromised. *FASEB J* 18: 577-579.

146. Widrick JJ, Costill DL, McConell GK, Anderson DE, Pearson DR, and Zachwieja JJ. 1992. Time course of glycogen accumulation after eccentric exercise. *J Appl Physiol* 72: 1999-2004.
147. Wojtaszewski JF, Hansen BF, Gade, Kiens B, Markuns JF, Goodyear LJ, and Richter EA. 2000. Insulin signaling and insulin sensitivity after exercise in human skeletal muscle. *Diabetes* 49: 325-331.
148. Yatabe Y, Miyakawa S, Miyazaki T, Matsuzaki Y, and Ochiai N. 2003. Effects of taurine administration in rat skeletal muscles on exercise. *J Orthop Sci* 8: 415-419.
149. Yatabe Y, Miyakawa S, Ohmori H, Mishima H, and Adachi T. 2009. Effects of taurine administration on exercise. *Adv Exp Med Biol* 643: 245-252.
150. Zawadzki KM, Yaspelkis 3rd BB, and Ivy JL. 1992. Carbohydrate-protein complex increases the rate of muscle glycogen storage after exercise. *J Appl Physiol* 72: 1854-1859.
151. Zhang M, Izumi I, Kagamimori S, Sokejima S, Yamagami T, and Liu Z, and Qi B. 2004. Role of taurine supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress in healthy young men. *Amino Acids* 26: 203-207.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始丁寧にご指導して頂きました八田秀雄教授に心から感謝いたします。

また、研究の推進にあたり、ご助言やご協力をいただいた八田研究室の皆様、寺田新准教授に御礼申し上げます。

さらに、公私にわたり励まし支えてくださった身体運動科学研究室の同期に感謝いたします。

最後に、家族に深く感謝いたします。