

糖質制限食が消化管及び骨格筋機能に及ぼす影響の解明 —回復期の糖・タンパク質合成に着目して—

滋賀県立大学 東田 一彦

The Effect of Low Carbohydrate Diet on Small Intestine and Skeletal Muscle Function

by

Kazuhiko Higashida
University of Shiga Prefecture

ABSTRACT

It is reported that low carbohydrate diet blunts insulin secretion in response to glucose load via reduced SGLT1 in the small intestine. This adaptation may be a disadvantageous for athletes to recover muscle glycogen and protein synthesis after an exercise bout. The purpose of the present study is to examine the effects of low carbohydrate diet on muscle glycogen recovery and protein synthesis after an acute bout of exercise. Six-week old C57BL/6 male mice were trained by means of voluntary running wheel for 6 weeks, then divided into two groups, control diet (CON) and low carbohydrate diet (LC). The mice were fed respective diet for 2 weeks and continued running training. After 2-week diet intervention, all mice were subjected to 30-min treadmill running, then immediately after cessation of running, mice were administered glucose solution (2 g/kg body weight). Muscle and small intestine were dissected out 2 h after glucose administration. Muscle glycogen concentration and SGLT1 protein content in small intestine in the LC group were lower than those in CON group. However, phospho-p70S6K protein content did not differ between groups. These results suggest that a low carbohydrate diet feeding delays muscle glycogen recovery after an exercise bout.

要 旨

糖質制限食の摂取は小腸での糖質吸収速度を低下させる可能性が示唆されている。この適応は、運動後に素早く筋グリコーゲンを回復させるには不利に働く可能性が考えられる。本研究では、糖質制限食に適応したマウスの運動後の筋グリコーゲン回復とタンパク質合成について検討を行った。若年 C57BL/6 雄性マウスに対して 6 週間の運動トレーニングを負荷した後、CONTROL (CON) 群と低糖質 (Low carbohydrate: LC) 群に分けた。各群のマウスは、さらに 2 週間のトレーニングを実施しながら CON 食と LC 食を摂取した。飼育期間終了後、30 分のトレッドミルによる運動負荷を行い、運動終了直後にグルコース溶液 (2 g/kg 体重) を摂取させ、2 時間後に前脛骨筋と小腸を摘出した。筋グリコーゲンと小腸の SGLT1 (ナトリウム依存性グルコース輸送体) タンパク量は、CON 群において LC 群と比較して有意に高値を示した。一方、タンパク質合成の指標である p70S6K のリン酸化量は両群間で有意な差は認められなかった。以上から、2 週間の糖質制限食を摂取した場合、運動後の筋グリコーゲン回復が抑制される可能性が示唆された。

緒 言

いわゆる糖質制限食は、肥満者の減量だけでなく、現在では一般人においても手軽に体重を減らす食事方法として利用されている。さらに、近年ではメディアで多く取り上げられていることから、健康な一般人だけでなく体重管理を必要とするスポーツ選手も実施している。摂取する糖質量を減らすと、短期間に体重の低下が引き起こされるため、今後スポーツ選手の間でさらに広まる可能性が考えられる。一方で、糖質摂取量を制限することのデメリットについてはあまり研究が進んでいないのが現状である。

実験動物に対して糖質制限食を摂取させた先行研究では、僅か 2 週間の摂取であっても、小腸内腔からグルコースを取り込む役割をもつ SGLT1 タンパク質量が著しく低下することが報告されている。さらに、経口でグルコースを負荷した際のインスリン分泌が顕著に低下することも示されている¹⁾。この糖質制限食摂取に対する適応のメリットとしては、インスリン分泌が抑制されることで体脂肪の蓄積を抑える効果がある。一方、インスリンには摂取した糖を骨格筋に取り込んでグリコーゲンを合成する働きや、筋タンパク質の合成を高める効果がある。したがって、一定期間にわたって糖質制限食を摂取した場合に引き起こされる消化管の適応は、次の運動への準備期間である運動後の回復期における筋グリコーゲンの回復やタンパク質合成などを低下させる可能性が考えられる。

そこで本研究では、2 週間の糖質制限食摂取が運動後の筋グリコーゲン回復および筋タンパク質合成に及ぼす影響を検討した。

1. 実験方法

1. 1 実験動物

6 週齢の C57BL/6 雄性マウスを用いた。マウスは 22-24°C に保たれた飼育室において 12 時間ごとの明暗サイクル環境下で個別に飼育した。1 週間の順化飼育中は、固形飼料 (CE-2, 日本クレア株式会社) と飲料水は自由摂取とした。本実験は滋賀県立大学が定める動物実験規定に従い、滋賀県立大学動物実験委員会の承認を経て実施した。

1. 2 運動トレーニングおよび食餌

予備飼育終了後、すべてのマウスのケージに回転ホイールを設置し、6 週間走行運動を行わせた。その後、マウスをコントロール食 (CON) 群 (n=7) と低糖質食 (LC) 群 (n=7) に体重が均等になるように分け、さらに 2 週間飼育した。食餌の組成

は表 1 に示した。

表 1 食餌組成

	(g/kg diet)	
	CON	LC
コーンスターチ	393.5	37.3
カゼイン	205.3	738.4
α -コーンスターチ	130.4	12.3
スクロース	86.8	33.2
大豆油	83.5	78.4
セルロース	50	50
ミネラルミックス (AIN-93G)	35	35
ビタミンミックス (AIN-93G)	10	10
L-システイン	3	3
重酒石酸コリン	2.5	2.5
ト-ブチルヒドロキノン	0.014	0.014

CON, control; LC, low-carbohydrate

1. 3 運動プロトコルおよびサンプル採取

運動負荷前日の 18 時に飼料を取り除き、一晩の絶食を行った。実験当日にマウスに対し 15 m/min の速度で 30 分間の走行運動を行わせた。運動終了直後にすべてのマウスに対し、体重 1 kg 当たり 2 g の割合でグルコース溶液を経口投与した。解剖までの間、すべてのマウスは飼育ケージで安静状態を保った。グルコース溶液投与前、15、30、60 分後に尾静脈から採血を行い、血漿インスリン濃度を測定した。投与から 2 時間後に、マウスを頸椎脱臼により屠殺し、腓腹筋を摘出し液体窒素で急速凍結させ、 -80°C で保存した。小腸は、3 等分にした中心部を切り取り、生理食塩水で洗った後、生理食塩水内で切り開いた。その後管腔側を削り取り、プロテアーゼ阻害剤を含む RIPA バッファー (20 mM Tris-HCl (pH7.5), 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl) に移して -80°C で保存した。

1. 4 ウェスタンブロッティング

腓腹筋はガラスホモジナイザーを用いて、プロテアーゼ阻害剤を含んだ RIPA バッファー中でホモジナイズした。2 度の凍結・融解後、遠心分離 (4°C , 15000 xg, 10 分) をした上清を回収し、タンパク質濃度を測定した。サンプルバッファー(ナ

カライテスク) と混和後、 95°C で 5 分間加熱した。10% のポリアクリルアミドゲルを用いてタンパク質を分離し、PVDF 膜に転写した。転写したメンブレンは 5%BSA 溶液で 1 時間ブロッキングした。その後、5%BSA 溶液で希釈した一次抗体 (SGLT1, GLUT4, phospho-p70S6K) に浸して、 4°C で一晩振盪した。翌日、1%スキムミルク溶液で 5000 倍希釈した二次抗体に浸し、室温で 1 時間振盪した。その後、化学発光試薬 (ThermoFisher) を用いて目的のタンパク質を検出した (Image Quant LAS 500, GE Healthcare Bio-Sciences)。検出したバンドは Image J を用いて定量化し、CON 群の平均値に対する相対値で示した。

1. 5 グリコーゲン濃度の測定

筋グリコーゲン濃度は、Lowry & Passoneau²⁾ の方法に基づいて分析を行った。

1. 6 統計解析

データは平均値 \pm 標準誤差で示し、群間の比較には t 検定を用いた。統計的有意水準は 5% 未満とした。

2. 結果

2. 1 筋グリコーゲン濃度

2 週間の低糖質食摂取が、運動後の筋グリコーゲン回復に及ぼす影響を検討した。30 分のトレッドミル運動終了直後にグルコース溶液投与し、投与から 2 時間後の骨格筋グリコーゲン回復量を測定した。その結果、CON 群と比較して LC 食群において有意に低値を示した (図 1)。

2. 2 血漿インスリン濃度

図 2A にグルコース溶液投与後 60 分後までの血漿インスリン濃度の変化を示した。また、60 分間の曲線下面積 (AUC) を図 2B に示した。LC 群の血漿インスリン AUC は CON 群と比較し

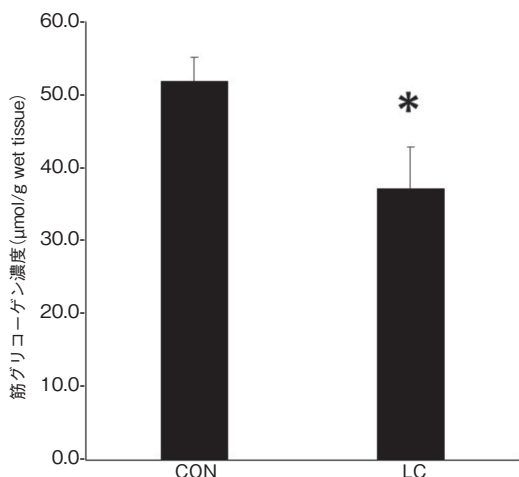


図1 運動後の筋グリコーゲン回復に及ぼす低糖質食摂取の影響
* p<0.05 vs CON

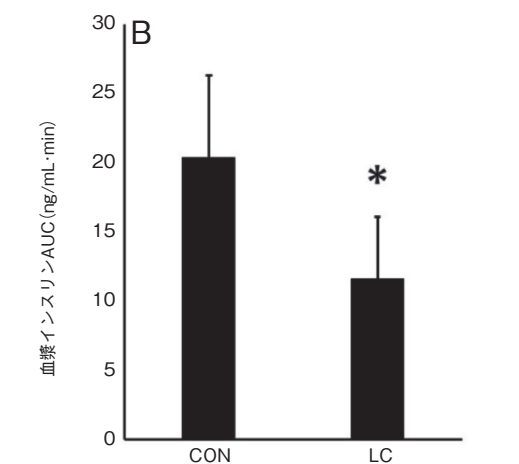
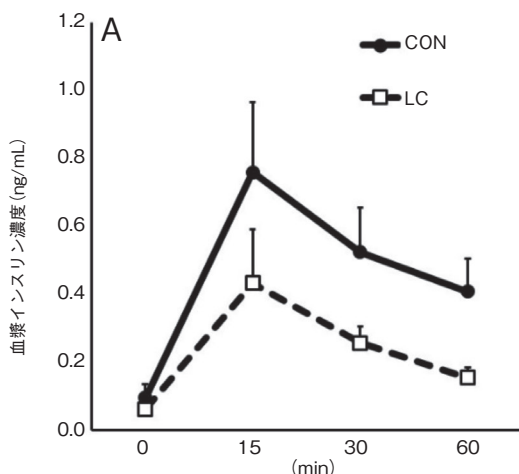


図2 低糖質食の摂取が回復期の血漿インスリン濃度に及ぼす影響
* p<0.05 vs CON

て有意に低い値であった。

2. 3 小腸 SGLT1 タンパク質量

先行研究では、運動トレーニングを行っていないマウスに対し2週間にわたり LC 食を摂取させることで小腸上皮細胞の SGLT1 タンパク質量が低下することが示されている¹⁾。本研究では8週間の運動トレーニングを行っているため、低糖質食摂取の影響が先行研究とは異なる可能性が考えられた。しかしながら、運動トレーニングを行った本研究においても、LC 群の SGLT1 タンパク質量は、CON 群と比較して低値を示した (図 3)。

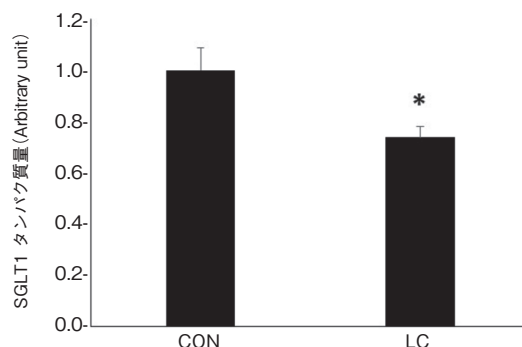


図3 小腸の SGLT1 タンパク質量に及ぼす低糖質食摂取の影響
* p<0.05 vs CON

2. 4 骨格筋 GLUT4 および p70S6K タンパク質量

骨格筋のグルコース輸送体 GLUT4 タンパク質量およびリボソーム p70S6K のリン酸化タンパク質量は両群間で差は認められなかった (図 4A, B)。

3. 考 察

運動中の主なエネルギー源は糖質と脂質であり、特に生体内における糖質の貯蔵量は限られているため、1日に数回の競技を行う場合は、運動で利用された筋グリコーゲンを速やかに回復させる必要がある。先行研究において、糖質含量が低い食餌を2週間摂取させた場合、小腸の糖輸送体

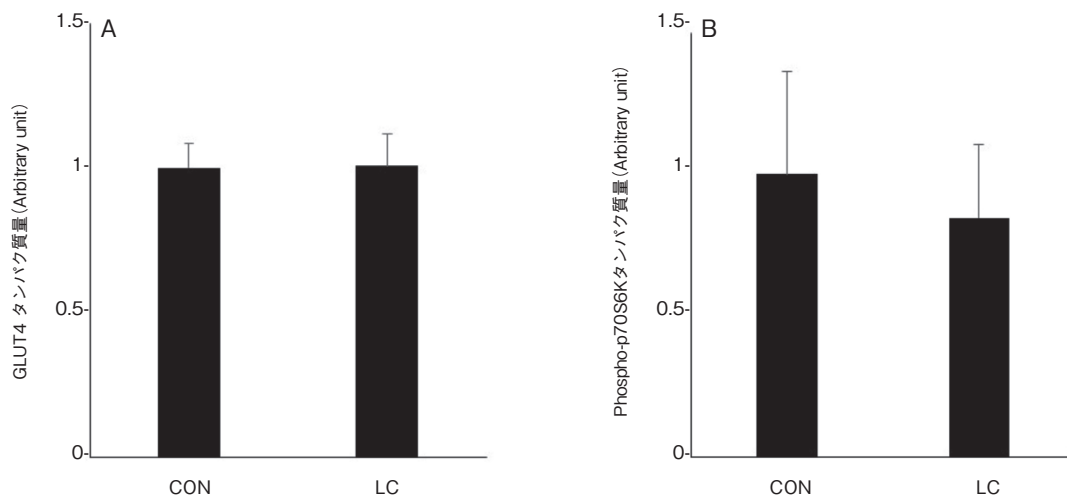


図4 低糖質食摂取が骨格筋のGLUT4およびp70S6Kのリン酸化タンパク質量に及ぼす影響

タンパク質 SGLT1 が著しく低下することが報告されている¹⁾。SGLT1 は小腸からの糖輸送速度を調節する因子であるため^{3,4)}、糖質制限食を長期間摂取した場合、SGLT1 が低下することで運動後の筋グリコーゲン回復の遅延を引き起こす可能性が考えられる。そこで本研究では、糖質制限食を摂取させたマウスにトレッドミルによる走行運動を負荷し、運動2時間後の筋グリコーゲンの回復速度を検討した。その結果、グルコース溶液投与2時間後の筋グリコーゲン量は、CON 群と比較して LC 群において低い値を示した (図 1)。骨格筋の GLUT4 は、グリコーゲンの材料となるグルコースの骨格筋細胞への取り込みにおいて重要な働きをするタンパク質である^{5,6)}。両群間で GLUT4 量に変化は認められなかったため、骨格筋の糖取り込み能には差はないと考えられる。一方、運動トレーニングを行っていても、2週間の糖質制限食を摂取することで小腸上皮細胞における SGLT1 タンパク質量は低下した。また、グルコース溶液投与から 60 分後までのインスリン分泌量は LC 群で有意に低値であった。そのため、LC 群において筋グリコーゲン量が低値を示したのは、SGLT1 タンパク質量の低下による小腸での糖質吸収低下とそれに伴うインスリン分泌の減

少が原因と考えられる。本研究では、一日に数回の競技を行う場合を想定して、運動終了後2時間目という比較的早い段階での筋グリコーゲン量を測定した。さらに長時間の回復時間 (24 ~ 48 時間) では、LC 群においても CON 群と同程度まで筋グリコーゲン量が回復する可能性が考えられる。そのため、今後は運動終了からどの程度の時間にわたって糖質制限食によるグルコース吸収速度の低下が筋グリコーゲン回復に影響を及ぼすかを検証する必要がある。

p70S6K のリン酸化は、骨格筋タンパク質合成の主な指標であり、インスリンなどのホルモンやレジスタンス運動によって増加することが報告されている^{7,8)}。そのため、運動後にグルコース溶液を摂取することでインスリンが分泌され、リン酸化 p70S6K 量が増加すると考えられる。先行研究で、LC 食摂取により小腸での糖質吸収が制限されることでインスリン分泌が抑制されることが示されているため、本研究では、LC 群で p70S6K のリン酸化量が低下すると仮説を立てていた。しかしながら、糖質摂取2時間後の p70S6K リン酸化量に両群間で差は認められなかった (図 4B)。この要因としては、運動刺激によっても p70S6K のリン酸化が充進することから⁹⁾、直前に行った

30 分間のトレッドミル運動により, p70S6K のリン酸化タンパク量が増加したため, その後のインスリンによる増加が検出されなかった可能性が考えられる。また, 本研究では糖質摂取 2 時間後のみで検討を行っているが, 2 時間目よりも前, もしくは 2 時間後以降に p70S6K リン酸化のピークが認められる可能性が考えられる。そのため糖質制限食による回復期のタンパク質合成およびその指標となる p70S6K のリン酸化については, 今後は時間経過も含めて検討する必要がある。

本研究で用いた LC 食は高タンパク質食であった。そのため, 本研究で得られた結果は, 糖質含量が低いことだけではなく, タンパク質含量が高いことが影響している可能性が考えられる。今後の研究では, 糖質含量を低くし, タンパク含量を一定にした低糖質・高脂肪食を用いて本研究と同様の結果が得られるかを検討する必要がある。

4. 結 論

2 週間の低糖質食を摂取させると, 一過性の運動後の筋グリコーゲン回復に遅延を生じさせる可能性が示唆された。また, このグリコーゲン回復の遅延は, 主に小腸での糖質吸収速度の低下が関与していると考えられる。

謝 辞

本研究に対し助成を賜りました公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に厚く御礼申し上げます。また, 本研究の遂行にあたり多大なご助力をいただきました滋賀県立大学の中井直也教授, 沖村星香さんに深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Higashida K., Terada S., Li X., Inoue S., Iida N., Kitai S., Nakai N. Low-carbohydrate high-protein diet diminishes the insulin response to glucose load via suppression of SGLT-1 in mice, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* in press (2018)
- 2) Lowry O.H., Passoneau J.V. A flexible system of enzymatic analysis, Academic Press, New York (1972)
- 3) Gorboulev V., Schurmann A., Vallon V., et al. Na (+)-D-glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion, *Diabetes.*, 61 (1):187-96(2012)
- 4) Roder P.V., Geillinger K.E., Zietek T.S., et al., The role of SGLT1 and GLUT2 in intestinal glucose transport and sensing, *PLoS One.*, 9(2):e89977 (2014)
- 5) Holloszy J.O., Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity, *J. Appl. Physiol.*, (1985) 99(1):338-43(2005)
- 6) Krook A., Wallberg-Henriksson H., Zierath J.R., Sending the signal: molecular mechanisms regulating glucose uptake, *Med. Sci. Sports Exerc.*, 36(7):1212-7(2004)
- 7) Goodman C.A., Mabrey D.M., Frey J.W., Miu M.H., Schmidt E.K., Pierre P., Hornberger T.A., Novel insights into the regulation of skeletal muscle protein synthesis as revealed by a new nonradioactive in vivo technique, *FASEB J.*, 25(3):1028-39(2011)
- 8) 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.*, (1985) 123(4):710-716 (2017)
- 9) 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.*, 306(10):E1155-62 (2014)