

低グリコーゲン状態での運動トレーニングは認知機能の向上を高めるか

瀧本真己*

DOES EXERCISE TRAINING IN LOW GLYCOGEN CONDITION IMPROVE COGNITIVE FUNCTION?

Masaki Takimoto

Key words: cognitive function, glycogen, mitochondria, high intensity exercise, low carbohydrate.

緒言

糖尿病やアルツハイマー病による認知症患者の増加は深刻な社会問題となっており、認知症を予防・改善する方法の確立とその機序の解明が急務である。運動によって認知機能が改善・向上する研究報告が増えてきているが、効果的な運動の形式やタイミング、食事との相乗効果については一致した見解が得られておらず、十分な検討が必要である。

ニューロンはミトコンドリアによるエネルギー供給に大きく依存しており、脳のミトコンドリアは認知機能に重要な役割を果たしている³⁾。運動トレーニングは脳のミトコンドリアを増加させる可能性が報告されていることから^{2,7)}、脳のミトコンドリアを増加させる効果的な方法を検討することが重要である。骨格筋におけるミトコンドリア生合成を効果的に高める方法として、低グリコーゲン状態での運動が有効である可能性が報告された⁶⁾。脳においても同様の現象が起こる可能性があるが、これまでにこの観点で検討された研究はない。

そこで本研究では、脳内のグリコーゲン状態に着目して運動の順序や食事内容による介入をすることで認知機能をより向上させることができるか検討することとした。まず、脳内グリコーゲンを急性に低下させる一過性運動を検討した。次に、脳内グリコーゲン減少を伴う高強度運動を行ってから中強度運動を行うトレーニングと、中強度運動を行ってから脳内グリコーゲン減少を伴う高強度運動を行うトレーニングによる認知機能への影響を検討した。また、トレーニング介入と合わせて、糖質を制限する食事介入による影響も検討した。本研究では、低グリコーゲン状態での運動トレーニングが脳内のミトコンドリア発現をより増加させ、認知機能の向上効果を高めるという仮説を立て、これを検討することを目的とした。

方法

A. 実験動物

一過性運動実験には 5 週齢、トレーニング実験には 3 週齢雄性 Wister ラットを用いた。すべてのラットを室温 22℃、明暗サイクル 12 時間の環境で飼育した。実験期間中、水と食餌は自由摂取さ

* 京都先端科学大学健康医療学部 Faculty of Health and Medical Sciences, Kyoto University of Advanced Science, Kyoto, Japan.

せた。本研究の動物実験は、大阪体育大学の倫理委員会による審査・承認を得て実施された（承認番号：19-5）。

B. 一過性運動実験

一過性運動により脳内のグリコーゲンが急性に低下する運動方法を検討することとした。すべてのラットに水泳（錘をつけずに10分間の水泳）とトレッドミル運動（速度10~20 m/min, 傾斜0%での10分間トレッドミル走）の馴化を3日間実施した。1日の安静後、ラットを安静群、水泳群、ランニング群に分けた（各群 n = 6）。水泳群には、体重8%の錘をつけて、20秒間の水泳と10秒間の休憩を1セットとして14セット繰り返す高強度間欠性水泳運動（high intensity swimming; HIS）を負荷した。ランニング群には、トレッドミル装置を用いて、速度20 m/min, 傾斜8%の走運動を30分間実施する中強度持久性トレッドミル走（middle intensity endurance treadmill running; MET）を負荷した。各運動終了直後に、尾静脈から血液を採取した。更に、マイクロ波照射装置を用いてラット頭部にマイクロ波（5 kW, 1.7秒）を照射して屠殺した。海馬を採取し、-80℃で保存した。

C. 食餌とトレーニングによる介入実験

一過性運動実験と同様に、すべてのラットに水泳とトレッドミル運動の馴化を3日間実施した。1日の安静後、ラットを次の6群に分けた。通常食+安静（NC）群、通常食+水泳+ランニング群（NSR）、通常食+ランニング+水泳（NRS）群、低糖質食+安静（LC）群、低糖質食+水泳+ランニング（LSR）群、低糖質食+ランニング+水泳（LRS）群の6群に分け（各群 n = 8）、5週間の運動トレーニングと食事介入を行った。先行研究^{2,7)}では、8週間の運動トレーニングによって脳内のミトコンドリア生合成が増加しているが、本研究では屠殺に用いたマイクロ波照射装置に体重制限があり、5週間でその制限を超えてしまったため、運動トレーニング期間をそこで終了した。水泳+ランニングはHISの実施後にMETを実施し、ランニング+水泳はその逆順で実施し、4回/週の頻度で行った。食餌は、通常食群には糖質70%、蛋白質20%、脂質10%の試料（D12450J, Research Diets社）、低糖質食群には糖質20%、蛋

白質20%、脂質60%の試料（D12492, Research Diets社）を与えた。5週間後、認知機能テストを実施した後、マイクロ波照射装置にて屠殺し、海馬を採取して-80℃で保存した。

D. 認知機能テスト

認知機能テストは8方向放射状迷路を用いて実施した。トレーニング開始から4週後に迷路への馴化（すべてのアームに餌を置いて、5分間迷路の中に放置）を5日間実施した。最後のトレーニング日から3日間、認知機能テストを実施した。8つのアームのうち4つに餌を置き、ラットを迷路中央に入れて、すべての餌を取るまでに、餌のあるアームへの再侵入回数（短期記憶）と餌のないアームへの侵入回数（長期記憶）を記録した。

E. 脳グリコーゲンの分析

サンプルに0.3 M PCAを加えて破碎した。サンプル溶液とAG reagent（1 M NaAc, 10% BSA, 0.2 U/ml グルコアミラーゼ）を加えてTissue samplesとし、サンプル溶液とNaAc buffer（100 mM NaAc, 10% BSA）を加えてBlank samplesとした。90分間の反応後、遠心分離した上清にGlucose reagent（1 M tris HCl, 10% BSA, 0.1 M β -NADP, 0.5 M ATP, 0.5 M DTT, 1 M MgCl₂, 440 U/ml G6P, 57 U/ml HK）を加えて30分間反応させた。蛍光光度計を用いて蛍光強度を測定した。Tissue samplesからBlank samplesを引いた値をグリコーゲン濃度とした。

F. 脳内乳酸濃度

脳サンプルに3 M 過塩素酸を加えて破碎した溶液を遠心分離し、上清をKIK buffer（2 M KOH, 0.4 M KCL, 0.4 M imidazole）を加えてサンプル溶液とした。標準溶液とサンプル溶液に試薬（1 M glycine, 1 M hydrazine, 10 mM NAD）とLDHを加えた後、蛍光光度計を用いて蛍光強度を測定した。

G. 血中乳酸濃度、血中グリコーゲン濃度

尾静脈から採取した血液を簡易測定器（乳酸：ラクテートプロ、グルコース：グルテストセンサー）を用いて測定した。

H. サンプル調整と蛋白質発現

サンプル調整は先行研究と同様の方法で行った⁹⁾。溶解液にサンプルを加えて破碎した。緩衝液を加え、超遠心分離装置で遠心分離した。沈殿

物に緩衝液を加えて、再度破碎した。16% SDS を加え、遠心分離を行った後、上清をサンプル溶液として採取した。Lowry 法によりサンプル溶液の蛋白質濃度を測定し、濃度が1.0 mg/mlになるように調整した。

蛋白質発現はウエスタンブロッティング法を用いた⁹⁾。サンプル溶液中の蛋白質を電気泳動で分離し、メンブレンに転写した。メンブレンをブロッキングした後、1次抗体と一晚反応させた。1次抗体は、PGC-1 α (1:1000, Calbiochem)、COX

IV (1:1000, Cell Signaling)、MCT2 (1:3000, 東京大学八田研究室より寄贈)、GLUT3 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology)、GAPDH (1:1000, Cell Signaling) を使用した。1次抗体反応終了後、2次抗体 (1:2500, GE Healthcare) の反応を1時間行った。2次抗体反応終了後、ECL 試薬を用いて発光させ、写真フィルムに現像し、蛋白質を検出した。

1. 統計処理

すべてのデータは平均 \pm 標準誤差で示した。一過性運動実験における結果の比較には、一元配置分散分析を用い、交互作用が有意であった場合は、Tukey による多重比較を実施した。食餌とトレーニングによる介入実験において、グリコーゲン量と蛋白質発現の比較には二元配置分散分析 (食餌 \times トレーニング) を、認知機能テスト結果の比較には三元配置分散分析 (回数 \times 食餌 \times トレーニング) を用い、交互作用が有意であった場合は、

表 1. 一過性運動後の血中グルコース濃度と乳酸濃度
Table 1. Blood glucose and lactate levels after a single bout exercise.

| | Rest | Run | Swim |
|---------|-----------------|------------------|----------------------|
| Glucose | 7.39 \pm 0.12 | 8.69 \pm 0.32* | 7.74 \pm 0.40 |
| Lactate | 2.22 \pm 0.15 | 2.17 \pm 0.12 | 4.68 \pm 0.15** †† |

Values are means \pm SE (mmol/l, n = 5-6).

* $P < 0.05$ vs rest, ** $P < 0.01$ vs rest, †† $P < 0.01$ vs run.

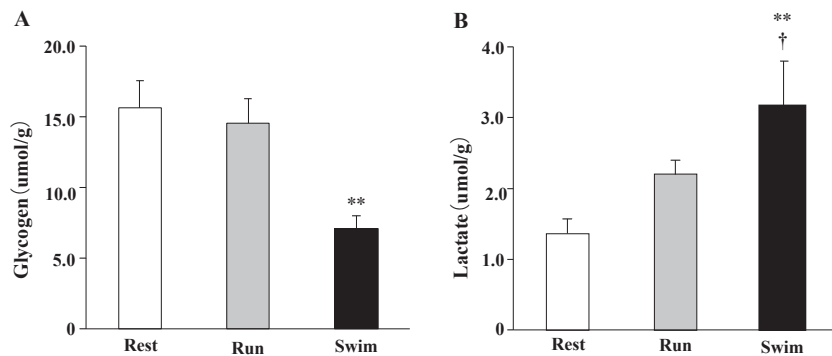


図 1. 一過性運動後の海馬におけるグリコーゲン量と乳酸濃度

Fig.1. Glycogen (A) and lactate (B) levels of hippocampus after a single bout exercise.

Values are means \pm SE (n = 5-6). ** $P < 0.01$ vs rest, † $P < 0.05$ vs run.

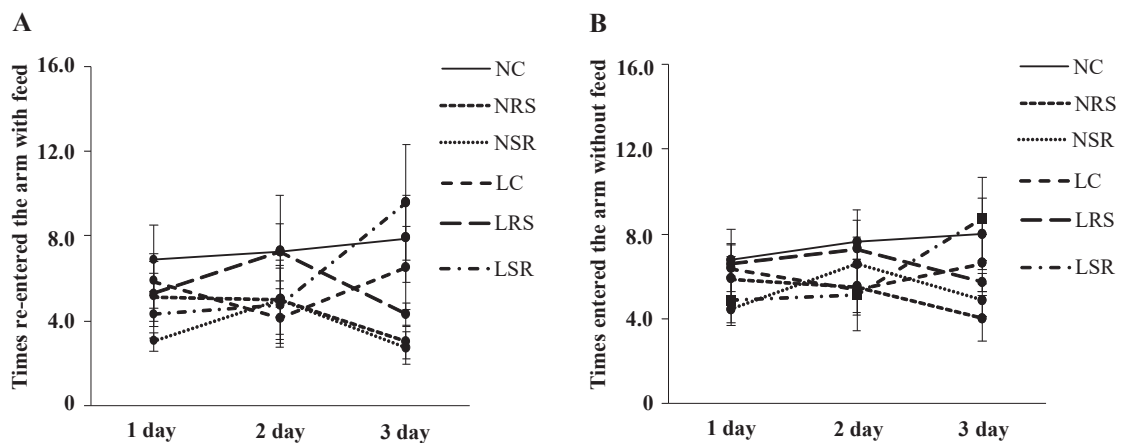


図 2. 食餌とトレーニング介入後の短期記憶(A)と長期記憶(B)

Fig.2. Short-term memory (A) and long-term memory (B) after diet and training intervention.

Values are means \pm SE (n = 7-8).

Bonferroni による多重比較を実施した。有意水準は 5 %未満とした。

結 果

A. 一過性運動後の血液と海馬の基質濃度変化

表 1 に一過性運動後の血中グルコースと乳酸濃度を示した。血中グルコース濃度は、ランニング直後に有意に増加したが、水泳直後は安静時と変わらなかった。一方で、血中乳酸濃度は、水泳直

後に増加したが、ランニング直後は安静時と変わらなかった。

図 1 に一過性運動後の海馬のグリコーゲン量と乳酸濃度を示した。海馬のグリコーゲン量は、水泳直後に有意に低下したが、ランニング直後は安静時と変わらなかった。また、海馬の乳酸濃度は、水泳直後に有意に増加したが、ランニング直後は安静時と変わらなかった。

B. 食餌とトレーニング介入後の認知機能、海馬のグリコーゲン量、蛋白質発現の変化

図 2 に認知機能テストの結果を示した。短期記憶と長期記憶は、交互作用と主効果は有意でなく、食餌とトレーニング介入による認知機能への影響は認められなかった。

図 3 に海馬のグリコーゲン量を示した。グリコーゲン量は、交互作用と主効果は有意でなく、食餌とトレーニング介入によるグリコーゲン量への影響は認められなかった。

図 4、5 にトレーニング実験終了後の海馬における蛋白質発現を示した。ミトコンドリア合成

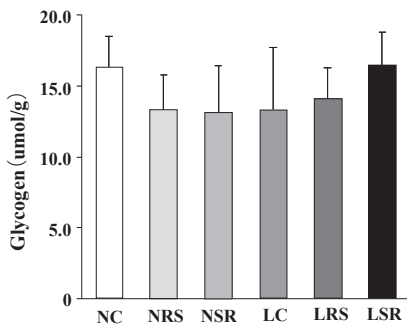


図 3. 食餌とトレーニング介入後の海馬のグリコーゲン量
Fig.3. Glycogen levels of hippocampus after diet and training intervention.
Values are means \pm SE (n = 7-8).

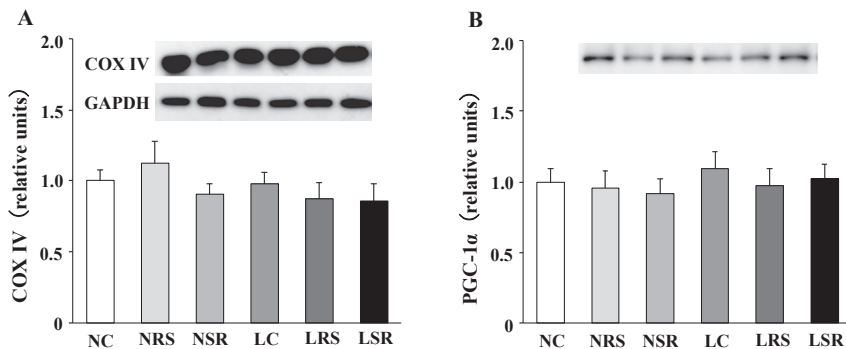


図 4. 食餌とトレーニング介入後の COX IV(A)と PGC-1α(B)発現
Fig.4. COX IV(A) and PGC-1α(B) expression after diet and training intervention.
Values are means \pm SE (n = 7-8).

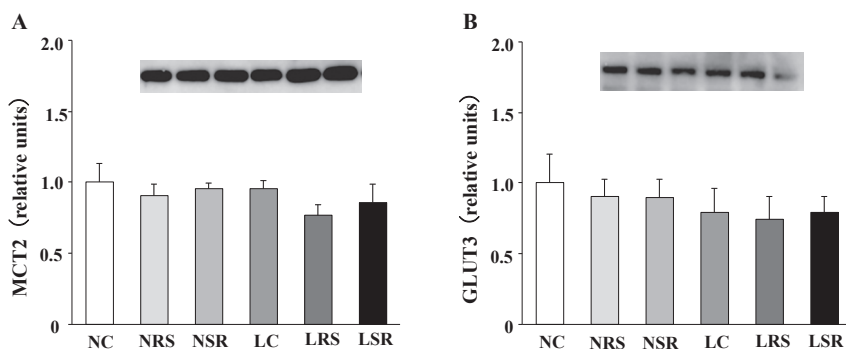


図 5. 食餌とトレーニング介入後の MCT2(A)と GLUT3(B)発現
Fig.5. MCT2(A) and GLUT3(B) expression after diet and training intervention.
Values are means \pm SE (n = 7-8).

の指標として PGC-1 α と COX IV、乳酸とグルコースの輸送能力の指標として MCT2 と GLUT3 の蛋白質発現を検討した結果、相互作用と主効果は有意でなく、食餌とトレーニング介入による海馬のミトコンドリアと基質輸送蛋白質への影響は認められなかった。

考 察

一過性運動の結果から、本研究で用いた HIS は海馬のグリコーゲンを急性に分解し、乳酸を産生する運動であることが確かめられた。この結果は先行研究と一致していることから⁵⁾、HIS から MET の順序での運動は海馬のグリコーゲンが減少した状態で運動するという条件を満たしていたと考えられる。一方で、食餌とトレーニング介入後の海馬のグリコーゲンは群間に有意差がなく、食餌によって海馬のグリコーゲンが減少した状態にするという条件を満たしていなかった可能性が考えられる。骨格筋では、低糖質の食事とトレーニングを繰り返すとグリコーゲン量が減少することが報告されているが¹⁾、脳ではグリコーゲンの回復速度が骨格筋より速いため⁴⁾、低グリコーゲン状態を維持できなかった可能性がある。また、本研究の屠殺タイミングは最後のトレーニングの3日後であったため、その間に脳グリコーゲンが回復した可能性があり、食餌による低グリコーゲン状態に関しては今後の検討が必要である。したがって、本研究では少なくとも、運動の順序により生じた低グリコーゲン状態でのトレーニングを実施できたと考えられる。

本研究の運動トレーニングでは、海馬のミトコンドリア発現増加を促すことができなかった。低グリコーゲン状態での運動は、エネルギーストレスの指標である AMPK をより活性化し¹⁰⁾、骨格筋のミトコンドリア生合成を促すことが示唆されている⁶⁾。しかしながら、脳の場合、骨格筋と異なり、運動によってグリコーゲンが枯渇しないことが報告されている⁴⁾。したがって、本研究においても運動によって脳グリコーゲンが枯渇するまでに至っておらず、十分なエネルギーストレスを与えることができなかったため、ミトコンドリアが増加しなかった可能性が考えられる。今後はこ

の可能性を確かめるために、ミトコンドリア発現にかかわるシグナル伝達分子の詳細な検討が必要である。

本研究の運動トレーニングにより認知機能が向上しなかった理由として、ミトコンドリアが増加しなかったことに加え、基質輸送能力が高まらなかったことが考えられる。ミトコンドリアがエネルギーを供給するためにはエネルギー基質が必要であり、そのなかでも乳酸は記憶の形成に重要な役割を果たすことが報告されている⁸⁾。本研究ではニューロンにおける乳酸輸送担体である MCT2 とグルコース輸送担体である GLUT3 の蛋白質発現を検討したが、運動トレーニングにより増加しなかった。したがって、ミトコンドリア増加と基質輸送能力向上を促すことができなかったため、認知機能を高めることができなかった可能性が考えられる。

総 括

本研究で用いた低グリコーゲン状態での運動トレーニングでは、脳内のミトコンドリア発現を増加させ、認知機能を高めるという結果は得られなかった。

謝 辞

本研究は、公益財団法人明治安田厚生事業団による助成を賜り、実施しました。関係者の皆様に深く感謝申し上げます。また、本研究を実施するにあたりご協力をいただきました大阪体育大学浜田拓先生に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Costill D, et al. (1980): Nutrition for endurance sport: carbohydrate and fluid balance. *Int J Sports Med*, **1**, 2-14.
- 2) E L, et al. (2014): Effect of high-intensity exercise on aged mouse brain mitochondria, neurogenesis, and inflammation. *Neurobiol Aging*, **35**(11), 2574-2583.
- 3) Lejri I, et al. (2019): Mitochondria- and oxidative stress-targeting substances in cognitive decline-related disorders: from molecular mechanisms to clinical evidence. *Oxid Med Cell Longev*, **2019**, 9695412.
- 4) Matsui T, et al. (2011): Brain glycogen decreases during prolonged exercise. *J Physiol*, **589**(Pt 13), 3383-3393.
- 5) Matsui T, et al. (2015): Brain glycogen decreases during intense exercise without hypoglycemia: the possible involvement of serotonin. *Neurochem Res*, **40**, 1333-1340.

- 6) Psilander N, et al. (2013): Exercise with low glycogen increases PGC-1 α gene expression in human skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*, **113**, 951-963.
- 7) Steiner JL, et al. (2011): Exercise training increases mitochondrial biogenesis in the brain. *J Appl Physiol*, **111**(4), 1066-1071.
- 8) Suzuki A, et al. (2011): Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*, **144**(5), 810-823.
- 9) Takimoto M, et al. (2014): Acute exercise increases brain region-specific expression of MCT1, MCT2, MCT4, GLUT1, and COX IV proteins. *J Appl Physiol*, **116**(9), 1238-1250.
- 10) Yeo WK, et al. (2010): Acute signalling responses to intense endurance training commenced with low or normal muscle glycogen. *Exp Physiol*, **95**(2), 351-358.