

異なる脂肪酸組成の高脂肪食摂取が ラット骨格筋のミトコンドリア酵素活性および PGC-1 α 蛋白含量に及ぼす影響

東田一彦*・三上恵里*・園生智広**・樋口 満***・寺田 新****

Dietary Fatty Acids Influence Mitochondrial Enzyme Activities and PGC-1 α Protein Content in Rat Skeletal Muscle

Kazuhiko HIGASHIDA *, Eri MIKAMI *, Tomohiro SONOU **,
Mitsuru HIGUCHI *** and Shin TERADA ****

Abstract

The purposes of this study were 1) to examine whether fatty acid composition of the diet might affect mitochondrial enzyme activities in rat skeletal muscle, and 2) to assess the effects of the high-fat diets on skeletal muscle peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α) protein content, which is a key regulator of adaptive mitochondrial biogenesis. Four-week-old male Sprague-Dawley rats were fed for 30 days either a rodent chow (12% calorie from fat, CON group; n=5) or a high-fat diet (50% calorie from fat) containing lard (LARD group; n=5) or olive oil (OLIVE group; n=5). Citrate synthase (CS) and 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (3-HAD) activities in plantaris muscles were significantly higher in both LARD and OLIVE groups than CON group ($p < 0.05$). Furthermore, the 3-HAD activity in OLIVE group was significantly higher than that in LARD group ($p < 0.05$). PGC-1 α protein contents in epitrochlearis muscle were significantly higher in both LARD and OLIVE groups than CON group by 88 and 70%, respectively ($p < 0.05$). No significant difference in PGC-1 α protein content was observed between LARD and OLIVE groups. In conclusion, these results indicate that 1) olive oil, which consists mostly of unsaturated fatty acids, has more pronounced effects on the fatty acid oxidation enzyme activity in skeletal muscle, compared with lard enriched in saturated fatty acids, and 2) feeding high-fat diets increases transcription coactivator PGC-1 α protein content in rat skeletal muscle.

Key words: high-fat diet, mitochondrial enzyme, PGC-1 α , skeletal muscle, rat

* 早稲田大学大学院 スポーツ科学研究科

Graduate School of Sport Sciences, Waseda University

** 早稲田大学大学院 人間科学研究科

Graduate School of Human Sciences, Waseda University

*** 早稲田大学 スポーツ科学学術院

Faculty of Sport Sciences, Waseda University

**** 早稲田大学 先端科学・健康医療融合研究機構 生命医療工学研究所

Consolidated Research Institute for Advanced Science and Medical Care, Waseda University

I. 緒言

持久的なトレーニングにより、骨格筋のミトコンドリア酸化系酵素ならびに脂肪酸の β 酸化に関与する酵素群の活性が上昇する¹⁰。このことは、運動時の脂質利用の割合を増加させ、筋および肝グリコーゲンの節約、さらには持久的運動能力の改善に寄与していると考えられている¹¹。また、高脂肪食を数週間にわたって摂取することでも、持久的トレーニングと同様に骨格筋におけるミトコンドリアの酵素活性が増加することが知られている。Miller et al.¹⁷は、ラットを対象に5週間、高脂肪食を摂取させた場合、筋グリコーゲン濃度の低下にもかかわらず、ミトコンドリア酵素活性の上昇により、運動時のグリコーゲン利用が節約され、持久的運動能力が有意に増加することを報告している。先行研究の多くは^{16, 17, 20}、主に飽和脂肪酸を多く含むラードからなる高脂肪食を用いているが、最近では不飽和脂肪酸を多く含むオリーブ油と亜麻仁油からなる高脂肪食を摂取することでも骨格筋のミトコンドリアが増加することが報告されている⁹。しかしながら、それらの脂肪酸組成の違いがミトコンドリア新生に及ぼす影響について直接比較検討した研究は少なく、どのような脂肪酸組成の高脂肪食がミトコンドリア新生を引き起こす上で効果的なのかは必ずしも明らかではない。そこで、本研究では、ラットを対象に、飽和脂肪酸を多く含むラードと不飽和脂肪酸を多く含むオリーブ油からなる高脂肪食が骨格筋のミトコンドリア酵素活性に及ぼす影響について検討することを第一の目的とした。

近年、ミトコンドリア系酵素の発現調節に関する研究が進み、Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α) と呼ばれる核内蛋白質がミトコンドリア新生において重要な役割を果たしているという知見が数多く報告されている^{4, 14, 19, 20}。PGC-1 α は転写補助因子であり、PPARs, Nuclear Respiratory Factor-1, -2 (NRF-1, NRF-2), Estrogen-Related Receptor α (ERR α) など多くの転写因子群と結合し、ミトコンドリア系酵素の mRNA 発現を促進していると考えられている^{4, 14, 19, 20}。また、一過性の運動や持久的なトレーニングにより、骨格筋の PGC-1 α 発現量が増加することが報告されており^{7, 25, 26, 27}、運動によるミトコンドリア新生のメカニズムにも PGC-1 α が関与している可能性が示唆されている。以上のことから、高脂肪食による骨格筋のミトコン

ドリア増加のメカニズムにおいても、PGC-1 α が関与している可能性が考えられる。最近、Garcia-Roves et al.⁹は、4週間の高脂肪食摂取では、PGC-1 α の mRNA の発現量が変化しないことを報告している。しかしながら、実際に転写活性化作用を有する PGC-1 α の蛋白含量が高脂肪食摂取により、どのように変化するのかは明らかとなっていない。そこで、本研究では、ミトコンドリアの新生に関与していると考えられている PGC-1 α の蛋白含量に及ぼす高脂肪食摂取の影響を検討することを第二の目的とした。

II. 方法

A. 実験動物および飼育条件

本実験では、体重が70~90gの4週齢の Sprague-Dawley (SD) 系雄ラット (日本クレア) 15匹を用いた。ラットは、室温25℃、湿度30%、午後9時~午前9時を暗期に設定した飼育室において、個別に飼育が可能なステンレス製ケージを使用し、1匹ずつ飼育した。予備飼育期間には、飼料として市販の粉末飼料 (CE-2: 日本クレア) と飲料として水道水を自由摂取させた。

予備飼育終了後、ラットを1) コントロール群 (CON 群: n=5)、2) ラード食群 (LARD 群: n=5)、3) オリーブ食群 (OLIVE 群: n=5) に、無作為に分けた。CON 群には、予備飼育期間に引き続き、粉末飼料 (CE-2: 日本クレア) を与えた。LARD 群と OLIVE 群には、エネルギー比で脂質の割合が全体の50%となるように設定し、それぞれラード (雪印乳業) もしくはオリーブ油 (味の素) とスクロース (三井製糖)、カゼイン (日本クレア)、ビタミン Mix (AIN mix 93, 日本農産工業)、ミネラル Mix (AIN mix 93G, 日本農産工業) を混合したものを摂取させた。ラードの脂肪酸組成は、飽和脂肪酸が41.4%、不飽和脂肪酸 (一価, 多価) が58.5%であり、一方、オリーブ油では、飽和および不飽和脂肪酸がそれぞれ、13.1%、86.9%である⁶。粉末飼料 (CE-2) の組成は、エネルギー比でタンパク質、脂質、糖質の割合が、それぞれ29%、12%、59%であった。一方、両高脂肪食の組成は、タンパク質、脂質、糖質がそれぞれエネルギー比で23%、50%、27%であった。飲料は水道水を用い、飲料、食餌ともに自由摂取とし、30日間飼育した。なお、本実験は、早稲田大学スポーツ科学部動物実験倫理

委員会の承認を得て行われた。

B. 組織の摘出および保存

30日間の飼育期間終了日の午後1時～3時に採血および組織試料の採取を行った。体重100gあたり5mgのペントバルビタールナトリウムを投与することによる完全麻酔下にて解剖を行った。解剖時には、心臓から血液を採取した後、骨格筋（足底筋、滑車上筋）および腹腔内脂肪を摘出した。採取した血液は、ベノジェットII血清分離用真空採血管（TERUMO）に移し、十分に放置した後、3000rpmで10分間遠心して血清を得た。副睾丸脂肪、腹膜後方脂肪、および腸間膜脂肪を摘出し、3つの合計脂肪量を電子天秤で測定し、腹腔内脂肪量とした。骨格筋サンプルは、液体窒素中で凍結し、分析まで -80°C のフリーザー中にて保存した。

C. 骨格筋酵素活性

氷水中に浸したガラス製ホモジナイザーに骨格筋サンプル（足底筋）と9倍量のホモジナイズバッファ（175mM KCl, 10mM GSH, 2mM EDTA, pH7.4）を入れ、ホモジナイズした後、凍結・溶解を2度繰り返した。Citrate Synthase (CS) 活性測定には、ホモジネートをそのまま使用し、3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (3-HAD) 活性には、ホモジネートを700xgで10分間遠心して得られた上清を用いた。ミトコンドリア酸化系酵素の指標としてCS活性を、Srereの方法²⁰に従い測定した。また、ミトコンドリア β 酸化系酵素の指標として3-HAD活性をBass et al.の方法⁹に基づいて測定した。

D. PGC-1 α 蛋白含量

本研究では、足底筋と同様の筋線維組成（Type I fiber：～10%，Type II fiber：～90%）を示す滑車上筋²⁰をPGC-1 α 蛋白含量の分析に供した。氷水中に浸したガラス製ホモジナイザーに骨格筋サンプル（滑車上筋）を入れ、Protease inhibitor (SIGMA) を添加したホモジナイズバッファ（RIPA lysis buffer, Upstate）を加えてホモジナイズした。凍結・溶解を2度繰り返した後、700xgで10分間遠心し、上清を得た。タンパク濃度をBCA Protein Assay Kit (PIERCE) を用いて測定し、タンパク濃度が $3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるようにホモジナイズバッファと2-mercaptoethanolを含むSample buffer（和光純薬）

で調整した。その後、 95°C で5分間加温し、電気泳動用サンプルとした。

タンパク質は、Laemmli¹³の方法に基づき、7.5% Resolving gelおよび4% Stacking gelを用いたSDS-PAGE法により分離した。1レーンあたり $60\mu\text{g}$ のタンパク質サンプルをアプライし、サンプルがゲルの下端に達するまで100Vで通電した。

電気泳動終了後、速やかにゲルを取り出し、ウェット式プロットング装置（Bio-Rad）を用いて、100Vで90分間通電し、Poly Vinylidene DiFluoride (PVDF) メンブレン（Millipore）にタンパク質を転写した。転写したメンブレンは、10% (w/v) スキムミルク / Tris-Buffered Saline, 0.1% Tween 20 (TBS-T) を用いて1時間のブロッキング処理を行い、一次抗体反応（anti-PGC-1 α (Calbiochem)；5000倍希釈）を 4°C で一晩行った。翌朝、メンブレンをTBS-Tで洗浄し、二次抗体反応を（HRP-conjugated anti-rabbit IgG；10000倍希釈）室温で1時間行った。TBS-TおよびTBSで十分に洗浄した後、化学発光検出試薬（ECL reagent; Amersham Biosciences）と1分間反応させた。反応終了後、LAS-3000 (FUJIFILM) を用いて、抗原の検出を行った。得られたバンドをコンピュータに取り込んだ後、SIGMAGEL (STATCON) を用いて定量し、その値をコントロール群の平均値に対する相対値で表した。

E. 血清遊離脂肪酸濃度

血清遊離脂肪酸濃度の測定には、NEFA-C テストワコー（和光純薬）を用いた。

F. 統計処理

データは全て平均値 \pm 標準誤差で表した。統計はSigma Stat (Jandel Scientific) を用いて行った。3群間の比較には、一元配置の分散分析を用い、多重比較には、Fisher LSD法を用いた。

Ⅲ. 結果

A. 体重、腹腔内脂肪量、血清遊離脂肪酸濃度

Table 1 に体重、体重100gあたりの相対的な腹腔内脂肪量、および血清遊離脂肪酸濃度の結果を示した。体重は、LARD群がCON群およびOLIVE群に比べて有意に高い値を示した（LARD vs. CON： $p<0.05$, LARD vs. OLIVE： $p<0.01$ ）。CON群とOLIVE群の間には有意な差は認められなかった。

Table 1 Body weight, visceral fat mass, serum FFA concentration for rats fed either rat chow or the high-fat diets for 30 days.

	CON	LARD	OLIVE
Body weight (g)	367±11	396±2*, \$\$	361±7
Visceral fat (g/100g body weight)	4.1±0.3	6.6±0.4***	6.0±0.3**
Serum FFA (mEq/l)	1.1±0.1	4.1±0.8*	3.6±1.1*

Values are mean±SEM. \$\$ indicates significant difference from OLIVE group at a level of $p < 0.01$. *, ** and *** indicate significant differences from CON group at levels of $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively. CON: control chow diet, LARD: lard-based high-fat diet, OLIVE: olive-based high-fat diet.

体重100gあたりの相対的な腹腔内脂肪量は、LARD群およびOLIVE群がCON群に比べて有意に高い値を示した (CON vs. LARD: $p < 0.001$, CON vs. OLIVE: $p < 0.01$). LARD群とOLIVE群の間に有意な差は認められなかった。

LARD群およびOLIVE群の血清遊離脂肪酸濃度は、それぞれCON群に比べて270%, 228%有意に高い値を示した ($p < 0.05$). LARD群とOLIVE群の間には有意な差は認められなかった。

B. 骨格筋CS活性

Figure 1に足底筋のCS活性の結果を示した。CON群に比べてLARD群とOLIVE群でそれぞれ18%, 17%有意に高い値を示していた ($p < 0.05$). LARD群とOLIVE群の間には有意な差は認められなかった。

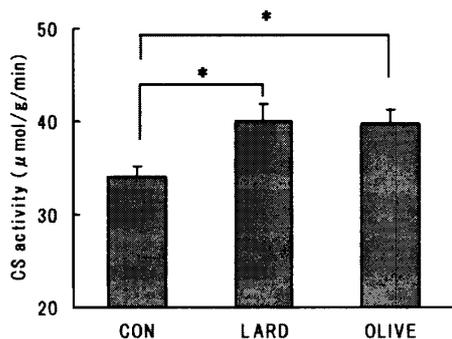


Figure 1 Effects of 30 days feeding lard- or olive-based high-fat diets on citrate synthase (CS) activities in rat plantaris muscle. Values are mean±SEM. * indicates significant difference at a level of $p < 0.05$. CON: control chow diet, LARD: lard-based high-fat diet, OLIVE: olive-based high-fat diet.

C. 骨格筋3-HAD活性

Figure 2に足底筋の3-HAD活性の結果を示した。CON群に比べてLARD群とOLIVE群でそれぞれ23%, 48%有意に高い値を示していた (CON vs. LARD: $p < 0.05$, CON vs. OLIVE: $p < 0.001$). さらに、OLIVE群の3-HAD活性は、LARD群に比べて有意に高い値であった ($p < 0.05$).

D. 骨格筋PGC-1α蛋白含量

Figure 3に滑車上筋におけるPGC-1α蛋白含量の結果を示した。CON群に比べ、LARD群およびOLIVE群で、それぞれ88%, 70%有意に高い値を示した (CON vs. LARD: $p < 0.01$, CON vs. OLIVE: $p < 0.05$). LARD群とOLIVE群の間には有意な差は認められなかった。

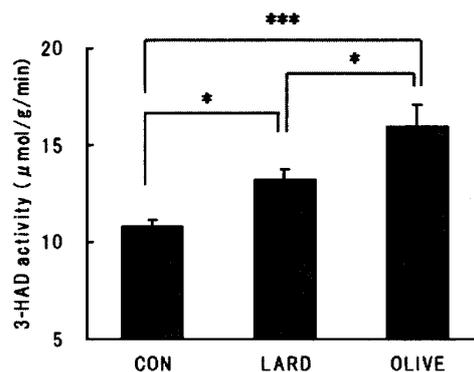


Figure 2 Effects of 30 days of feeding lard- or olive-based high-fat diets on 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (3-HAD) activities in rat plantaris muscle. Values are mean±SEM. * and *** indicate significant differences at levels of $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively. CON: control chow diet, LARD: lard-based high-fat diet, OLIVE: olive-based high-fat diet.

IV. 論議

本研究の主な知見は、1) ラードに比べて、オリーブ油からなる高脂肪食の摂取は、骨格筋の脂肪酸 β 酸化系酵素の活性をより大きく増加させる、2) ミトコンドリア新生のメカニズムに関与していると考えられている転写補助因子 PGC-1 α の蛋白含量が骨格筋において高脂肪食摂取により増加する、という2点である。

長期間の高脂肪食摂取により、骨格筋のミトコンドリア系酵素の活性が増加することが数多くの研究により報告されている^{5,16,17,20}。本研究でも、30日間の両高脂肪食摂取により骨格筋 CS および 3-HAD 活性の上昇が認められた (Fig. 1, Fig. 2)。さらに、OLIVE 群の 3-HAD 活性は、LARD 群に比べて 20% 有意に高い値を示していた (Fig. 2)。以上の結果から、高脂肪食により骨格筋のミトコンドリア酵素活性が上昇するものの、飽和脂肪酸に比べ、オリーブ油のような不飽和脂肪酸を多く含む高脂肪食を摂取することで、脂肪酸 β 酸化に関与する酵素の活性がより大きく増加する可能性が示唆された。

脂肪酸代謝に関わる酵素の多くは、核内受容体 PPAR による発現調節を受けることが知られており^{3,8,21}、3-HAD もその標的遺伝子の一つである¹⁵。PPAR には α 、 δ (β)、 γ の3つのサブタイプが存在し^{3,8,21}、そのうち PPAR δ が骨格筋に多く発現していることが知られている²³。Garcia-Roves et al.⁹

は、高脂肪食摂取が、血中遊離脂肪酸濃度の上昇とそれに伴う PPAR δ の活性化を介して骨格筋のミトコンドリア新生を引き起こしている可能性を示唆している。本研究においても、解剖時の血清遊離脂肪酸濃度が CON 群に比べて両高脂肪食群で約 2 倍高い値を示していた (Table 1)。したがって、本研究で認められた両高脂肪食摂取による 3-HAD 活性の増加が、遊離脂肪酸濃度の上昇に伴う PPAR δ の活性化によって引き起こされた可能性が示唆される。ただし、LARD 群と OLIVE 群の遊離脂肪酸濃度に有意な差は認められなかった (Table 1)。したがって、足底筋における LARD 群と OLIVE 群の 3-HAD 活性の違いは遊離脂肪酸濃度以外の要因によると考えられる。さらに *in vitro* の実験系において、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸による PPAR δ 活性化作用には大きな違いは認められないことが報告されている^{8,30}。したがって、LARD 群と OLIVE 群では、血中の脂肪酸組成は大きく異なっていると考えられるものの、PPAR δ の活性化作用も同程度であった可能性が高い。骨格筋には、PPAR δ だけでなく、PPAR α も発現しており³、PPAR α は飽和脂肪酸に比べて、不飽和脂肪酸による活性化を受けやすいことが報告されている³。したがって、OLIVE 群では、PPAR δ だけでなく、PPAR α も活性化することができ、それにより 3-HAD 活性を LARD 群に比べてより大きく上昇させることができたのかもしれない。

3-HAD 活性とは異なり、ミトコンドリア酸化系酵素の指標である CS 活性は、両高脂肪食の摂取で同程度に増加していた (Fig. 1)。上述したように、高脂肪食摂取による骨格筋ミトコンドリア新生に PPAR δ が関与していることが示唆されている⁹。しかしながら、PPAR δ によって発現調節を受けている遺伝子群は主に、脂肪酸代謝に関与する酵素群であり^{3,8,21}、CS のような酸化系酵素の増加までも PPAR δ によって説明することは難しい。

近年、ミトコンドリア系酵素群の遺伝子発現調節を包括的に制御する分子として、PGC-1 α が発見された^{19,20}。PGC-1 α は、PPARs, NRFs, ERR α などの数多くの転写因子を活性化し、ミトコンドリア系酵素の発現調節を担っていることが報告されている^{4,14}。CS との関連においても、Wende et al.²⁸ は PGC-1 α が骨格筋に特異的に高発現するトランスジェニックマウスにおいて、Wild Type のマウスに比べて CS の mRNA 発現量が約 2 倍高い値を示すこ

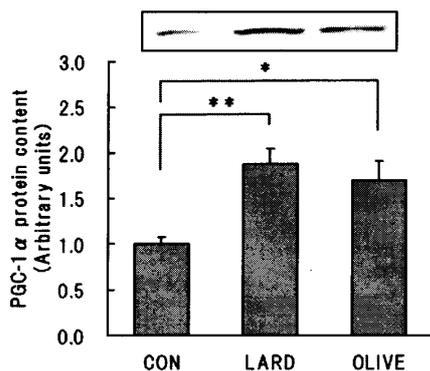


Figure 3 Effects of 30 days of feeding lard- or olive-based high-fat diets on PGC-1 α protein contents in rat epitrochlearis muscle. Values are mean \pm SEM. * and ** indicate significant differences at levels of $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively. CON: control chow diet, LARD: lard-based high-fat diet, OLIVE: olive-based high-fat diet.

とを報告している。本研究では、CON群に比べ、LARD群およびOLIVE群でPGC-1 α 蛋白含量がともに約2倍に増加しており (Fig. 3), その結果、両高脂肪食の摂取でCS活性が同程度に増加したという可能性が考えられる。

Garcia-Roves et al.⁵⁾は、4週間の高脂肪食摂取では、PGC-1 α のmRNAの発現量に変化しないことを報告している。彼らの研究では、PGC-1 α mRNAが測定されたのは、4週間の高脂肪食摂取が終了した時点であった。したがって、高脂肪食を長期間摂取することにより一度は増加したPGC-1 α mRNA発現量が、蛋白を十分に発現したことでフィードバックを受け分解し、4週間の時点では高脂肪食摂取前のレベルにまで回復したという可能性が考えられる。また、もう一つの可能性としては、PGC-1 α の蛋白発現調節において、脂肪酸は、mRNA合成の転写の過程を活性化するのではなく、翻訳の過程を活性化もしくは、PGC-1 α の蛋白を安定化し、PGC-1 α のmRNAの増加を伴わずに、PGC-1 α 蛋白含量を増加させたということも考えられる。これらの可能性を検証するためには、高脂肪食摂取によるPGC-1 α の蛋白含量およびmRNA発現量の経時的変化を観察する必要があるだろう。

Miller et al.¹⁷⁾が報告しているように、高脂肪食摂取は骨格筋のミトコンドリアを増やし、持久的運動能力を改善する可能性があることから、競技力向上を目的とした栄養学的手法として有効であるかもしれない。しかしながら、長期間の高脂肪食摂取は、内臓脂肪の蓄積や糖尿病、高脂血症などの生活習慣病を引き起こすことが知られている^{9,12)}。本研究においても、両高脂肪食によって体重あたりの腹腔内脂肪量の増加が認められた (Table 1)。今後は、内臓脂肪の増加を伴わないで骨格筋の脂肪酸代謝機能を向上することができる脂質摂取量や摂取期間を検討する研究が必要となるであろう。また、Power and Newsholme¹⁸⁾は、硬化ヤシ油、サフラワー油、イブニングプライムローズ油などに比べて、多価不飽和脂肪酸を多く含む魚油からなる高脂肪食を摂取することにより、ラットの骨格筋におけるMitochondrial Carnitine Palmitoyltransferase I (mCPT I) 活性が顕著に上昇することを報告している。したがって、今後、魚油などの様々な油脂の効果の検討も必要であろう。

以上、本研究をまとめると、飽和脂肪酸を多く含

むラードに比べ、不飽和脂肪酸が豊富なオリーブ油からなる高脂肪食を摂取することで、ミトコンドリアの脂肪酸酸化に関する酵素の活性がより顕著に増加する可能性が示唆された。また、高脂肪食を30日間摂取することにより、ミトコンドリア新生のメカニズムに関与していると考えられている転写補助因子PGC-1 α の蛋白含量が増加することが明らかとなった。

引用文献

- 1) Bass A, Brdiczka D, Eyer P, Hofer S, Pette D (1968) Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eur J Biochem* 10: 198-206
- 2) Delp MD, Duan C (1996) Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J Appl Physiol* 80: 261-270
- 3) Desvergne B, Wahli W (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20: 649-688
- 4) Finck BN, Kelly DP (2006) PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* 116: 615-622
- 5) Garcia-Roves P, Huss JM, Han DH, Hancock CR, Iglesias-Gutierrez E, Chen M, Holloszy JO (2007) Raising plasma fatty acid concentration induces increased biogenesis of mitochondria in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 10709-10713
- 6) 五明紀春, 長谷川恭子 (1993) アミノ酸&脂肪酸組成表 女子栄養大学出版社
- 7) Goto M, Terada S, Kato M, Katoh M, Yokozeki T, Tabata I, Shimokawa T (2000) cDNA Cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats. *Biochem Biophys Res Commun* 274: 350-354
- 8) Grimaldi PA. (2007) Peroxisome proliferator-activated receptors as sensors of fatty acids and derivatives. *Cell Mol Life Sci* 64: 2459-2464
- 9) 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
- 10) Holloszy JO, Booth FW (1976) Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu Rev Physiol* 38: 273-291.
- 11) Holloszy JO, Kohrt WM, Hansen PA (1998) The

- regulation of carbohydrate and fat metabolism during and after exercise. *Front Biosci.* 3: D1011-D1027.
- 12) Kim JY, Nolte LA, Hansen PA, Han DH, Ferguson K, Thompson PA, Holloszy JO (2000) High-fat diet-induced muscle insulin resistance: relationship to visceral fat mass. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 279: R2057-R2065
 - 13) Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
 - 14) Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. (2005) Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.* 1: 361-370
 - 15) Marcus, SL, Miyata KS, Zhang B, Subramani S, Rachubinski RA, and Capone JP (1993) Diverse peroxisome proliferator-activated receptors bind to the peroxisome proliferator-responsive elements of the rat hydratase/dehydrogenase and fatty acyl-CoA oxidase genes but differentially induce expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5723-5727
 - 16) McAinch AJ, Lee JS, Bruce CR, Tunstall RJ, Hawley JA, Cameron-Smith D (2003) Dietary regulation of fat oxidative gene expression in different skeletal muscle fiber types. *Obes Res.* 11: 1471-1479
 - 17) Miller WC, Bryce GR, Conlee RK (1984) Adaptations to a high-fat diet that increase exercise endurance in male rats. *J Appl Physiol.* 56: 78-83
 - 18) Power GW, Newsholme EA (1997) Dietary fatty acids influence the activity and metabolic control of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I in rat heart and skeletal muscle. *J Nutr.* 127: 2142-2150
 - 19) Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell.* 1998 Mar 20; 92 (6): 829-39
Cell. 92: 829-839
 - 20) Rodnick KJ, Henriksen EJ, James DE, Holloszy JO (1992) Exercise training, glucose transporters, and glucose transport in rat skeletal muscles. *Am J Physiol.* 262: C9-14.
 - 21) Schoonjans, K, Staels B, and Auwerx J (1996) The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1302: 93-109
 - 22) Simi B, Sempore B, Mayet MH, Favier RJ (1991) Additive effects of training and high-fat diet on energy metabolism during exercise. *J Appl Physiol.* 71: 197-203
 - 23) Son C, Hosoda K, Matsuda J, Fujikura J, Yonemitsu S, Iwakura H, Masuzaki H, Ogawa Y, Hayashi T, Itoh H, Nishimura H, Inoue G, Yoshimasa Y, Yamori Y, Nakao K (2001) Up-regulation of uncoupling protein 3 gene expression by fatty acids and agonists for PPARs in L6 myotubes. *Endocrinology.* 142: 4189-4194
 - 24) Srere, PA. (1969) Citrate synthase. *Methods Enzymol* 13: 3-6
 - 25) Taylor EB, Lamb JD, Hurst RW, Chesser DG, Ellingson WJ, Greenwood LJ, Porter BB, Herway ST, Winder WW (2005) Endurance training increases skeletal muscle LKB 1 and PGC-1 α protein abundance: effects of time and intensity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 289: E960-E968
 - 26) Terada S, Goto M, Kato M, Kawanaka K, Shimokawa T, Tabata I (2002) Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 296: 350-354
 - 27) Terada S, Tabata I (2004) Effects of acute bouts of running and swimming exercise on PGC-1 α protein expression in rat epitrochlearis and soleus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 286: E208-E216
 - 28) Wende AR, Schaeffer PJ, Parker GJ, Zechner C, Han DH, Chen MM, Hancock CR, Lehman JJ, Huss JM, McClain DA, Holloszy JO, Kelly DP (2007) A role for the transcriptional coactivator PGC-1 α in muscle refueling. *J Biol Chem.* 282: 36642-36651
 - 29) Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelman G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell.* 98: 115-124
 - 30) Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG, Brown PJ, Sternbach DD, Lehmann JM, Wisely GB, Willson TM, Kliewer SA, Milburn MV (1999) Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell.* 3: 397-403
- (平成20年2月4日受付, 平成20年4月1日訂正,
平成20年5月9日受理)