

令和 5 年 4 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21749

研究課題名（和文）骨格筋のミトコンドリアに運動経験を記憶させるための運動条件とその機序の究明

研究課題名（英文）Mechanism and exercise conditions for mitochondrial memory of exercise experience

研究代表者

増田 和実（Masuda, Kazumi）

金沢大学・人間科学系・教授

研究者番号：50323283

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では過去のトレーニング（TR）経験が、筋肥大のみならずミトコンドリアの適応性にも及ぶのかを検証した。被験動物にクライミングTR（RT）あるいはランニングTR（ET）を課した。TR後に脱TRとTRを再開する条件を設け、各時点での骨格筋を分析した。ET条件では、TR記憶の表現型として再TR後に筋線維が1度目のTRよりも肥大した。この時、タンパク質合成/分解に関わるHSPsの応答性も同様に变化した。なお、筋核数とミトコンドリアタンパク質発現との間に相関関係が得られたが、クロマチンのグローバル検証ではヒストン修飾の変化を検出できなかったためRNAseqとChIP解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋には筋記憶と称される機能、すなわち過去のトレーニング（TR）経験が骨格筋に保持され、再TR時の骨格筋適応を促進させることが示唆されている。こうした機構がミトコンドリア適応にも及ぶのかの科学的証拠は存在しない。骨格筋の収縮力と代謝能力の記憶メカニズムが明らかになれば、運動への応答性の個人差の分子メカニズム、運動で獲得した形質の保存と遺伝性の探求等、運動を切り口にした骨格筋のエピジェネティクス研究を進展させる可能性を持つ。さらに、運動のエピジェネティクス制御の解明は、人々の運動実施方法や習慣化を通じた健康増進や疾病予防に資するための基礎実験として、新たな細胞機能向上を提唱することとなる。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we examined whether past training (TR) experience affects not only muscle hypertrophy but also mitochondrial adaptability. Experimental animals carried out either climbing TR (RT) or running TR (ET). Skeletal muscle (m. plantaris) was analyzed at each time point under the conditions of after-TR, de-TR and after re-start of TR. In the ET condition, as a phenotype of TR memory, muscle fibers were hypertrophied after re-TR compared to the first TR. The responsiveness of HSPs involved in protein synthesis/degradation also changed as similar matter with muscle fiber CSA. Although a correlation was obtained between the number of myonuclei and mitochondrial protein expression, global validation of chromatin failed to detect changes in histone modifications, so RNAseq and ChIP analysis have been underway.

研究分野：スポーツ科学、体育、健康科学およびその関連分野

キーワード：運動 エピジェネティクス 記憶 骨格筋 ミトコンドリア

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本事業では骨格筋のタンパク質合成やミトコンドリア適応にトレーニング経験が記憶されるかについて検証することを目的とする。筋肥大応答に関する記憶性(トレーニング経験による適応促進)はしばしば研究報告が存在するところであるが、ミトコンドリアメモリーと呼べる現象、つまり、過去のトレーニングによって代謝的適応性に違いが生じるのか否かについては、その事象とともにその機序も不明である。また、どのような運動様式がミトコンドリアメモリーを強調するのか等、定性的な現象と原理がほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

運動トレーニング(Tr)によって獲得した骨格筋の適応は、Trを中止する(脱Tr)と時間経過とともに失われる。しかしながら、Tr再開時の骨格筋適応に過去のTr経験が影響することが報告されている。例えば、過去にレジスタンスTr(RT)経験がある状態で脱Tr後に同様のRTを行うと、再RT時の筋肥大応答やミトコンドリア適応が増強されることが示唆されている(Beiter et al. 2020)。このような現象は、『マッスルメモリー』や『エピジェネティックメモリー』と呼ばれている。一方、持久性Tr(ET)はRTよりも筋肥大や筋核の増加が起こりにくい反面、ミトコンドリア適応が顕著に生じる(Lavin et al. 2022)。つまり、ETでは主にエピジェネティック修飾によって骨格筋にET経験が保持され、RT同様、再ET時の骨格筋適応が変化する可能性がある。しかしながら、長期間の脱Tr期間後に再ETを行った骨格筋の適応については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、過去のTr経験が再Tr時の筋肥大やMito適応に及ぼす影響を運動様式別に検証するとともに、過去のTr経験が再Tr時の代謝適応を促すミトコンドリアメモリーと称せる事象が存在するか否かについて検討することを目的とした。

3. 研究の方法

A. 被験動物ならびにグルーピング

被験動物には7週齢のWistar系雄性ラットを用いた。ラットは室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、12時間の明暗周期(明期:5:00-17:00, 暗期:17:00-5:00)の環境下で飼育し、固形飼料(MF, オリエンタル酵母, 日本)と飲料水を自由摂取させた。実験には7週齢のWistar系雄性ラットを用い、無作為に6週間のレジスタンストレーニングまたは持久性トレーニングを課す群(RT群、ET群)、各Tr後に6週間の脱Trを課す群(RDT群、EDT群)、脱Tr後に再び各Trを課す群(RRT群、ERT群)に分類した。

B. レジスタンストレーニング(RT)

RTはLee et al. (2018)の方法を一部改変したラダークライミングTrを用いた。ハシゴは角度 85° 、高さ110 cm、ピッチ2 cmの規格で作製した。ラットに1週間の予備飼育期間内で3日間の順応期間を設け、その期間中は無負荷でハシゴに登らせた。袋の中に重りを入れたものを重荷とし、金属片を含む重荷をラット尾部のつけ根にエラスチックテープ(ニトリートEBテープ, ニトムズ, 日本)で固定した。体重と前回のRTまでの最大負荷のより重い方を1RMとし、1回目ではその30%1RMの重荷を用いた。2回目以降の負荷は段階的に引き上げた。各RTは5回のクライミング×3セットで構成されており、クライミング間に1 minの休憩、セット間に2 minの休憩を設けた。運動頻度は隔日とし、6週間実施した。なお、RRT群では最初のTr期間終了後

6週間の脱 Tr 期間を設け、その後6週間同様の Tr を課した。

C. 持久性トレーニング (ET)

ETはInoue et al. (2015)の方法を一部改変したトレッドミル走を用いた。ETはトレッドミル (KN-73-R10, 夏目製作所, 日本) を用いて、ラットに1週間の予備飼育期間内で3日間の順応期間を設けた後、1週間に5回の頻度で6週間実施した。最初の1週間は15 m/minの速度から始め、その後30 m/min、35 m/min、40 m/minと段階的に速度を上げ、一回あたり40 min~60 minのETを実施した。2週間目以降は最大速度を40 m/minに設定し、毎回60 minのETを実施した。なお、ERT群では最初のTr期間後6週間の脱Tr期間を設け、その後6週間同様のTrを課した。

D. 測定項目

各群の飼育期間終了48時間後に足底筋を摘出し、各種分析に供した。なお、対照群には各群と同週齢の非Trラットを用いた。免疫組織学的検出として筋サンプルの横断切片を作成し、一次抗体にRabbit anti-Laminin抗体およびMouse anti-Dystrophin抗体を用いてLamininとDystrophinを染色し、その後DAPIによって全核を染色した。顕微鏡画像(6枚/サンプル)から筋線維横断面積(mCSA)と筋核数を定量した。また、Heat shock proteins (HSPs: HSP72, HSP25)量、Mito関連タンパク質(COX-IV, MTCO2)量、ヒストン関連タンパク質(H3.3, H3K4me3, H3K27ac, H3K36ac, H3K79me3)量はウエスタンブロット法によって評価した。

4. 研究成果

本研究では、再Tr時の骨格筋の肥大やMito生合成に過去のTr経験が影響を及ぼすのかについて、2つの運動様式を用いて比較検討した。本研究で用いたRT様式は、Barone et al.

(2009)やHarris et al. (2010)のRTプロトコルに基づいた。6週間のRTを実施した結果、RTでは挙上重量の上昇を認めたものの、RT群やRRT群の筋では下腿骨格筋のCSAには有意な増加が認められなかった(図1)。組織学的な観察では、太い筋線維の割合が増える傾向にあったが、組織全体でみる顕著な筋肥大を誘起できなかった。この点は動物モデルにおける筋肥大誘発運動モデルの再検討事項とする。

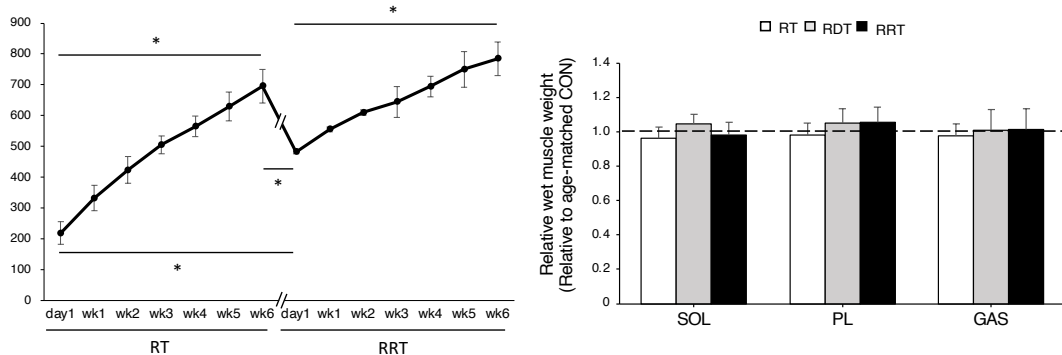


図1. RTによる最大挙上量の変化と筋重量の比較. RT期間中あるいはRRT期間中の挙上量は上昇したものの(単位:g, 左)、筋重量の有意な上昇は観察されなかった(右). 平均値±標準偏差, *: $p < 0.05$. (day1-wk6: $n = 18$, RRT day1-wk6: $n = 6$).

RTとは対照的に、ETを課したラット骨格筋(足底筋)では、EDT群の相対筋重量が有意に増加した($p < 0.05$). また、ETR群のmCSAは同週齢の対照群と比較して有意に高い値を示

し、1 度目の ET 後の肥大率よりも大きな筋肥大を誘引した ($p < 0.05$, 図 2)。また、ETR 群の筋核数は対照群と比較して有意に高い値を示した ($p < 0.05$, 図 2)。1 度目の ET では筋核数が有意に変化していないことから、ET では過去の Tr 経験が筋核数に依存しない記憶機構によって記憶され、再 Tr 時の骨格筋の肥大応答に影響を与えている可能性が示唆される。

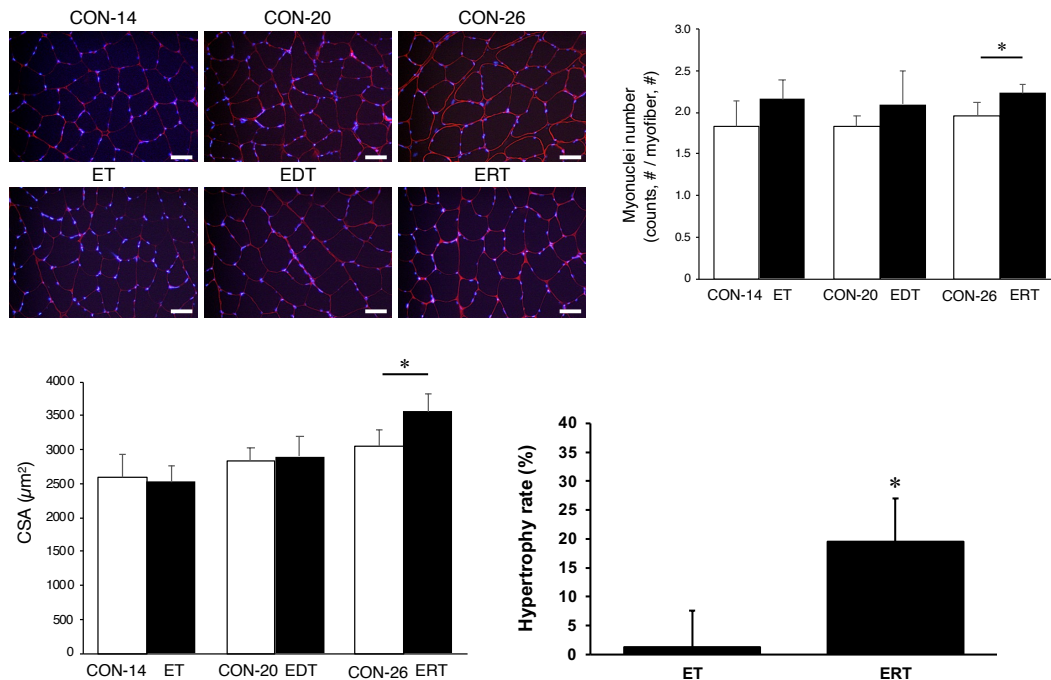


図 2. ET に伴う筋核数の変化. Dystrophin と DAPI による染色画像と ET に伴う PL における筋核数の変化 ($n = 4$ in each). ET に伴う CSA の変化 (Laminin による染色, $n = 6$ / CON-14, 20, 26, $n = 5$ / ET, EDT, $n = 4$ / ERT). 平均値 ± 標準偏差, *: $p < 0.05$. Scale bar = 50 μm .

ET によって高い発現誘導を示す因子の一つとして、HSP72 が挙げられる (Ohsawa and Kawano 2021, Shimizu and Kawano 2022)。また、一部の HSPs はタンパク質合成/分解に関わるシグナル因子と相互作用し、筋肥大応答に関与することが知られている (Fennel et al. 2022)。そこで、ET における過去の Tr 経験が再 Tr 時の骨格筋肥大応答を増強した機序を探るべく、再 Tr 時に HSPs の運動応答性が変化するか否かについて分析した。ウエスタンブロット法によって HSP72 と HSP25 の発現量を定量したところ、いずれも同週齢の対照群と比較して ET 群と ETR 群で高値を示し、さらに ETR 群の上昇率が ET 群よりも有意に高い値であった (図 3)。したがって、ET では過去の Tr 経験が再 Tr 時に一部の HSPs の応答性を亢進させ、骨格筋の筋肥大応答を増強した可能性が示唆される。

先に示したように Tr 経験が筋肥大応答に影響している可能性が推測される ET 群と ERT 群について、ミトコンドリア生合成の変化にも同様な Tr 経験が反映されるか否かについて分析した。核ゲノムにコードされるミトコンドリアタンパク質の代表として COX-IV のタンパク質発現量を定量した。ET 群と ERT 群において、それぞれの同週齢の対照群と比較して有意に高い値を示したものの、両者の増加の程度には有意差が認められなかった (図 4)。また、ミトコンドリアゲノムにコードされる MTCO2 の発現量も ET 群と ERT 群との間に有意差は認められなかった (図 4)。ミトコンドリア量の指標である両タンパク質の上昇の程度に違いを認めなかったことは、ミトコンドリア生合成の正の調節因子である PGC-1 α の発現量にも運動経験による上昇程度に差が生じなかったことから支持されるかも知れない。ただし、筋核数の多寡と COX-IV のタ

ンパク質発現量との間には有意な相関関係が認められている ($R = 0.68$, $r = 0.92$, $p < 0.05$)。以上のことは、過去の ET 経験は再 Tr 時のミトコンドリア適応、具体的はミトコンドリア合成の亢進に影響を与えない可能性を示唆する一方、筋核数の保持あるいは増加は Tr による核ゲノムにコードにされるミトコンドリアタンパク質の発現量を増やす、つまりミトコンドリアメモリーなる現象が存在し得る可能性を否定できない。本研究の運動条件は高強度の ET であったため、骨格筋の Mito 適応が再 Tr 時の初期～中期にかけて頭打ちになった可能性も推察されることから、運動プロトコルによる検証を含めた再検討が必要である。

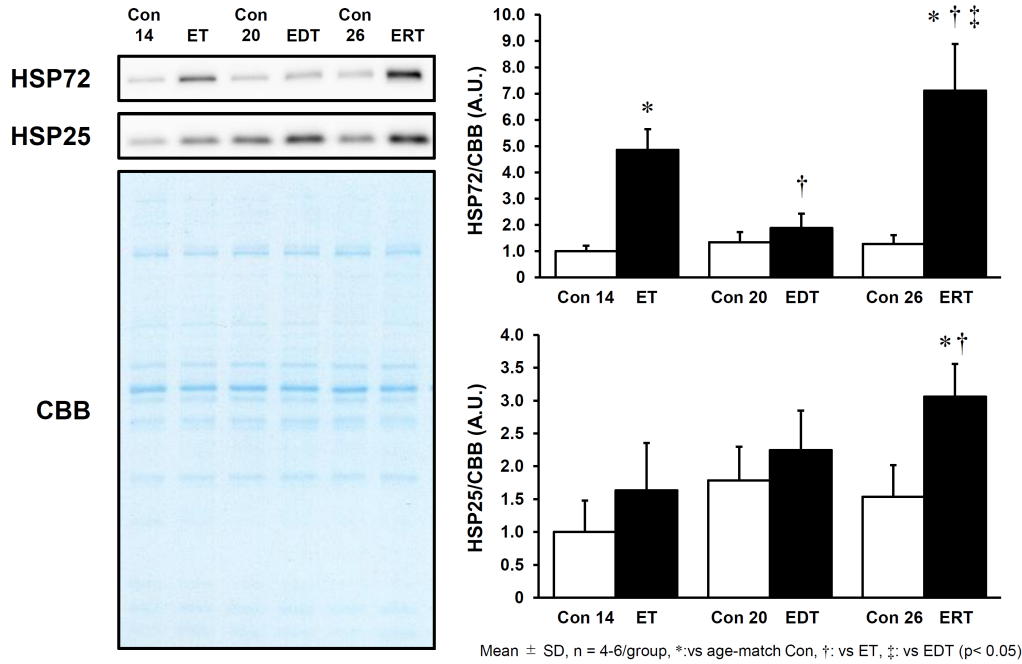


図 3. ET に伴う HSP72 と HSP25 発現量の変化 (足底筋). 左: ウェスタンブロットティングのメンブレン画像. 平均値±標準偏差 (n = 4-6/group).

最後に、エピジェネティクス制御の関与を明らかにするために、ET に伴うヒストン修飾の変化をウェスタンブロットティング法によって検証した。その結果、H3.3、H3K4me3、H3K27ac、H3K36ac および H3K79me3 いずれのタンパク質量も CON 群と比較して有意に変化しなかった。このことから、全クロマチンレベルでのグローバルな検証の限りにおいて、修飾ヒストンタンパク質発現量の変化は Tr によって生じないことが示唆された。しかしながら、特定の遺伝子の特定の遺伝子座にのみ起こるヒストン修飾が生じた場合、ウェスタンブロットティング法ではタンパク質レベルでその変化を検出できないケースがある。この点は手法の限界点であり、クロマチン領域のヒストン修飾に関するより詳細な検証には、ChIP による特定の遺伝子や遺伝子座に限定した分析が必要である。事実、Ohsawa et al. (2018) は、ラットに 8 週間の ET を課すと、対象群と比較してウェスタンブロットティング法で検討した総アセチル化 H3 タンパク質発現量は変化しないものの、ChIP によって標的遺伝子群 (10 個) の転写開始地点から 1 kbp 下流の遺伝子配列を検討すると総アセチル化 H3 分布は有意に増加することを報告している。現在、残りのサンプルを用いて、RNAseq と ChIP 解析を進めており、骨格筋合成や Mito 合成に関連するタンパク質の遺伝子座でのヒストン修飾を検証し、ET におけるエピジェネティックメモリーやミトコンドリアメモリーの存在可能性を明らかにしようとしている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 芝口翼, 野村祐太, 小間陸嗣, 野中雄大, 増田和実
2. 発表標題 過去の持久性トレーニング経験が再トレーニング時の筋肥大・ミトコンドリア適応に及ぼす影響
3. 学会等名 令和4年度北陸スポーツ・体育学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学運動生理学研究室Website http://exercisephysiol.com
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	芝口 翼 (Shibaguchi Tsubasa) (40785953)	金沢大学・GS教育系・講師 (13301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------