

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26506021

研究課題名(和文) エピジェネティクスで解明する宇宙環境におけるマッスルメモリー

研究課題名(英文) Muscle memory in space environment to be elucidated by epigenetics.

研究代表者

吉原 利典 (Yoshihara, Toshinori)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・特任助教

研究者番号：20722888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、長期間の運動刺激は筋の核内に記憶されることで、微小重力環境曝露による骨格筋萎縮の抑制に寄与するという仮説について検討した。8週間の運動不足は、暗期および明期における活動量を低下させ、ヒラメ筋におけるヒストンH3のK9トリメチル化を増加させたが、トレーニングの実施はK9のトリメチル化を抑制した。また、尾部懸垂による筋萎縮を誘導する前にトレーニングを行わせることによって、筋萎縮の誘導に関連した遺伝子の発現の増加を軽減させた。これは、長期間のトレーニングにより低いレベルで維持されたリジン残基9のトリメチル化がマッスルメモリーとして筋内に記憶されたことによると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to examine the effect of long-term exercise training and physical inactivity on hindlimb unloading-induced muscle atrophy in the rat soleus muscle. Our data reveals that long-term physical inactivity increases the trimethylation of lysine residue 9 of histone H3, whereas regular physical exercise training decreases it in the rat soleus muscle. Although exercise training didn't completely prevent hindlimb unloading-induced muscle atrophy, the trimethylation of lysine residue 9 of histone H3 and E3 ligase mRNA levels were downregulated by physical exercise training. These observations indicate that physical exercise training partly attenuates hindlimb unloading-induced disuse muscle atrophy in the rat soleus muscle. This might be mediated by downregulation of trimethylation of lysine residue 9 of histone H3 and muscle atrophy-related gene expression.

研究分野：骨格筋生化学

キーワード：微小重力環境 ヒストン修飾 遺伝子発現 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

宇宙飛行士が活動を行う宇宙空間は、微小重力、閉鎖空間、宇宙放射線環境に代表される過酷な環境であり、宇宙飛行士が直面する重大な問題の一つとして除負荷による骨格筋萎縮が挙げられる。

骨格筋は非常に可塑性に富んだ組織である。そのため、運動などにより筋に負荷をかけることで、それに応じて筋サイズの増大や筋力、代謝能力の向上が認められるが、微小重力環境への曝露などによる筋の不使用は、骨格筋に著しい萎縮を招来させる。実際に、日本人宇宙飛行士の下肢骨格筋量は1日の宇宙飛行で約1%も減少することが報告されている。したがって、このような微小重力環境曝露による骨格筋の負の適応を防ぎ、宇宙飛行士における健康問題を解決するためには、予め運動刺激に対して筋を適応させ、その形態や機能を維持することが重要である。

ところで、トレーニングによって得られた効果は、その中止によって容易に失われるが、再びトレーニングを開始すると速やかな応答が認められる。実際、若年女性における30週間の脱トレーニングは、過去20週間のレジスタントトレーニングによって増加した筋力や筋線維横断面積を低下させるが、再びトレーニングを行うと僅か6週間で同様の効果が得られる。このことから、骨格筋には適応する過程で運動刺激やトレーニング効果を何らかの形で筋内に記憶し、再び刺激が与えられた際に速やかに適応する仕組みが備わっていると考えられる。この筋の記憶の仕組みとして筋核や毛細血管数増加のような形態的な変化との関連が示されているものの、その分子メカニズムについては不明な点が多い。

近年、筋が運動刺激を記憶するメカニズムとして、生育環境や栄養などの環境要因によってDNA配列の変化を伴わない後天的なゲノム修飾(DNAのメチル化やヒストンのアセチル化など)によるエピジェネティクスな遺伝子発現調節機構が注目されている。これまで、申請者は代表的なエピジェネティクスであるヒストンの脱アセチル化を担う酵素が、10週間の持続的トレーニングによってラット骨格筋において発現が増加することを確認している。したがって、運動刺激や不活動刺激は、DNA配列の変化を伴わない遺伝子情報として筋に記憶(マッスルメモリー)され、その後の筋の適応、すなわち宇宙環境下でのトレーニング効果の獲得や筋萎縮の生じやすさに多大な影響を与える可能性が高いと考えられるが、これまで明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究は、運動刺激がDNA配列の変化を伴わない遺伝子情報として筋の核内に記憶(マッスルメモリー)されることで、無重力刺激に対する筋萎縮に関連した遺伝子の発

現パターンを変化させ、長期間の微小重力環境曝露による骨格筋萎縮の抑制に寄与するという仮説について検討することを目的として行った。具体的には、

(1)長期間のトレーニングや運動不足によって形成されたマッスルメモリーが、筋萎縮に関連した遺伝子の発現に及ぼす影響について検証した。

(2)長期間のトレーニングや運動不足によって形成されたマッスルメモリーが、その後誘発される筋萎縮の抑制に与える影響を分子レベルで検証した。

3. 研究の方法

(1)研究課題1

長期間のトレーニングや運動不足が筋萎縮に関連する遺伝子の発現パターンに与える影響を明らかにするために以下の検証を行った。

実験動物および実験デザイン

若齢のWistar系雄性ラット22匹を用いて、対照群(6匹)、運動不足群(8匹)、トレーニング群(8匹)の3群に分けた。

トレーニング刺激は、傾斜角度0°の動物用トレッドミルを用いて、走速度(18-30m/分)・走行時間(20-60分間)を段階的に漸増させることで、中等度の走運動を週5回の頻度で8週間実施した。また、運動不足刺激は、ラットを床面積が通常の半分程度の狭いケージで飼育することでラットの行動範囲を制限することにより、トレーニングと同様に8週間与えた。なお、飼育ケージ内におけるラットの活動量を自発運動量測定システム(スーパーメックス、室町機械株式会社)により測定した。

実験期間終了後、12時間の絶食条件で全てのラットから下肢骨格筋を摘出し、生化学的な分析を行った。

遺伝子発現解析

長期間のトレーニングや運動不足が筋萎縮に関連した遺伝子発現に与える影響を明らかにするため、筋萎縮特異的に働く遺伝子発現について検討する。具体的には、筋サンプルから総RNAを抽出し、Atrogin1やMuRF1ならびにGadd45等の筋萎縮に関わる指標のmRNA発現量を、定量的リアルタイム(RT)-PCR法により分析した。

ヒストン修飾解析

ヒストン修飾に関わる因子の分析には、申請者が確立させた分画抽出法を用い、骨格筋組織から核タンパク質を抽出し、ヒストン脱アセチル化酵素(Histone Deacetylase; HDAC)であるHDAC4のタンパク質発現量を分析した。

また、特異的なヒストン修飾抗体を用い、ウェスタンブロット法によりグローバルな

レベルでのヒストン修飾の変化について分析することで、半定量的にヒストン修飾状態を評価した。

(2) 研究課題 2

運動刺激または運動不足刺激を与えた後、筋萎縮を誘導した際に萎縮の程度や遺伝子発現が変化するか否かについて検証した。

実験動物および実験デザイン

研究課題 1 と同様の方法で 8 週間のトレーニングおよび運動不足を行わせた後に尾部懸垂モデルを用いて筋萎縮を誘導した。尾部懸垂には、Naito らの方法 (2000) を用い、1 週間程度ラットの尾部を釣り上げることにより後肢に負荷がかからないように調節した。この方法は、微小重力環境を模擬した動物モデルとして広く用いられている方法であり、宇宙環境をシミュレートした動物実験モデルである。

実験期間終了後、12 時間の絶食条件で尾部懸垂開始前、開始 3 日後、開始 7 日後に下肢骨格筋を摘出し、生化学的な分析を行った。

遺伝子発現およびヒストン修飾解析

筋萎縮誘導前のトレーニング刺激および運動不足刺激が筋萎縮に関連した遺伝子発現に与える影響を明らかにするため、筋萎縮特異的に働く Atrogin1 や MuRF1 ならびに Gadd45 の mRNA 発現量を RT-PCR 法により分析した。また、ヒストン H3 のリジン残基 9 (K9) のアセチル化およびトリメチル化修飾抗体を用いたウェスタンブロット法によりヒストン修飾状態を評価した。

4. 研究成果

(1) 研究課題 1

ラットの体重は週齢毎に増加したが ($p < 0.05$)、有意な交互作用が認められ、トレーニング群では体重の増加は緩やかであった ($p < 0.05$)。また、赤外線センサを用いて測定したラットの活動量は、いずれの群も明期と比較して暗期で有意に活動量は高値を示していたが、運動不足群の活動量は対照群およびトレーニング群と比較して有意に低値を示した ($p < 0.05$)。一方、対照群およびトレーニング群の間には有意な差は認められなかった。

ヒラメ筋重量には群間で有意な差は認められなかったが、ヒラメ筋相対筋重量は、トレーニング群と比較して運動不足群で有意に低値を示した ($p < 0.05$)。

また、長期間のトレーニングや運動不足後の安静時における Atrogin1、MuRF1 ならびに Gadd45 mRNA 発現量には群間で有意な差は認められなかった。

ウェスタンブロット法によるグローバルなレベルでのヒストン修飾解析を行った結果、アセチル化ヒストン H3 発現量には群間で有意な差は認められなかった。しかし、不

活動時において亢進するリジン残基 9 (K9) のトリメチル化は、対照群と比較して運動不足群で有意に高値を示したが ($p < 0.05$)、トレーニング群の K9 のトリメチル化は運動不足群と比較して有意に低値を示した ($p < 0.05$)。つまり、8 週間の運動不足はラットヒラメ筋のヒストン H3 における K9 のトリメチル化を増加させ、トレーニングの実施はその増加を抑制する可能性がある。

(2) 研究課題 2

ヒラメ筋の筋重量は、尾部懸垂により時間の経過に伴い有意に低下したが ($p < 0.05$)、尾部懸垂 3 日後においてはトレーニング群でのみその低下が軽減されていた。また尾部懸垂開始前、3 日後、7 日後のいずれにおいても対照群とトレーニング群と比較して運動不足群で有意に低値を示した ($p < 0.05$)。

核内における HDAC4 発現量には尾部懸垂による有意な主効果が認められ、3 日後で増加していたが、事前のトレーニングおよび運動不足の影響は認められなかった。また、核内における熱ショックタンパク質 (HSP) 72 発現量には条件による有意な主効果が認められ、トレーニング群の HSP72 発現量は、対照群および運動不足群と比較して尾部懸垂開始前、3 日後、7 日後のいずれにおいても有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

筋萎縮関連遺伝子である Atrogin-1、MuRF1 および Gadd45 mRNA 発現量は尾部懸垂により時間の経過とともに増加したが、8 週間の持続的なトレーニングを行わせることによって、その増加は有意に抑制された ($p < 0.05$)。

そこで、核タンパク質を分画抽出し、グローバルなレベルのヒストン修飾状態を評価した結果、リジン 9 残基のアセチル化状態に有意な変化は認められなかったが、リジン 9 残基のトリメチル化には条件による主効果が認められ、トレーニングにより有意に低値を示した ($p < 0.05$)。

以上のことから、8 週間の運動不足は、暗期および明期における活動量を低下させ、ラットヒラメ筋のヒストン H3 における K9 のトリメチル化を増加させたが、同期間のトレーニングの実施は K9 のトリメチル化を抑制する可能性がある。

また、宇宙環境をシミュレートした尾部懸垂による筋萎縮を誘導する前にトレーニングを行わせることによって、筋萎縮の誘導に関連した遺伝子の発現の増加を軽減させることが可能となる。これは、長期間のトレーニングにより低いレベルで維持されたリジン残基 9 のトリメチル化がマッスルメモリーとして筋内に記憶されたことによると考えられる。

しかしながら、本研究のトレーニング条件ではヒラメ筋重量の低下を完全に抑制するには至らなかったことから、最適なトレーニング条件や筋萎縮の抑制に関わるエピジェ

ネティクス制御機構について今後さらに検討を行っていく必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

Yoshihara T, Yamamoto Y, Shibaguchi T, Miyaji N, Kakigi R, Naito H, Goto K, Ohmori D, Yoshioka T, Sugiura T. Dietary astaxanthin supplementation attenuates disuse-induced muscle atrophy and myonuclear apoptosis in the rat soleus muscle. *J Physiol Sci.* 67(1), 181-190, 2017.

Yoshihara T, Kobayashi H, Kakigi R, Sugiura T, Naito H. Heat stress-induced phosphorylation of FoxO3a signalling in rat skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf).* 218(3), 178-187, 2016.

Yoshihara T, Machida S, Kurosaka Y, Kakigi R, Sugiura T, Naito H. Immobilization induces nuclear accumulation of HDAC4 in rat skeletal muscle. *J Physiol Sci.* 66(4):337-43.2016

Yoshihara T, Machida S, Naito H. Disuse-induced nuclear accumulation of histone deacetylase 4 in rat skeletal muscle. *Musculoskeletal Regeneration.* 2, e1368, 2016.

Yoshihara T, Sugiura T, Yamamoto Y, Shibaguchi T, Kakigi R, Naito H. The response of apoptotic and proteolytic systems to repeated heat stress in atrophied rat skeletal muscle. *Physiol Rep.* 3(10), e12597, 2015.

[学会発表](計 41 件)

Yoshihara T, Kakigi R, Tsuzuki T, Shuo-wen C, Natsume T, Takamine Y, Ichinoseki-Sekine N, Machida S, Sugiura T, Naito H. Physical inactivity-induced histone modification in rat soleus muscle. The American College of Sports Medicine 63th Annual Meeting, Boston, MA, USA, 2016 年 6 月.

吉原利典, 柿木亮, 都築孝允, 張碩文, 棗寿喜, 杉浦崇夫, 内藤久土. 若年期の運動習慣がラットヒラメ筋におけるヒストン修飾に及ぼす影響. 第 70 回日本体力医学会大会, 和歌山, 2015 年 9 月.

吉原利典, 柿木亮, 関根紀子, 高嶺由梨, 棗寿喜, 張碩文, 杉浦崇夫, 町田修一, 内藤久土. 若年期の運動経験はマウス腓腹筋におけるアセチル化ヒストン H3 発現を亢進させる. 第 23 回日本運動生理学会, 東京, 2015 年 7 月.

Yoshihara T, Machida S, Kurosaka Y, Kakigi R, Ichinoseki-Sekine N, Tsuzuki T, Takamine Y, Sugiura T, Naito H. Immobilization-induced rat skeletal muscle atrophy enhances histone modification through HDAC4. *Experimental Biology* 2015, Boston, MA, USA, 2015 年 3 月.

Yoshihara T, Kurosaka M, Kakigi R, Takamine Y, Machida S, Sugiura T, Naito H.

Alterations in HDACs expressions in response to endurance training in rat plantaris muscle. The American College of Sports Medicine 61th Annual Meeting, Orland, Florida, USA, 2014 年 5 月.

[図書](計 1 件)

内藤久土, 町田修一, **吉原利典**(分担執筆). ニュー運動生理学(I)Session5 運動と筋 - 4 骨格筋の肥大と萎縮, 真興交易(株)医書出版部, pp224-233, 2014.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉原 利典 (YOSHIHARA, Toshinori)
順天堂大学・スポーツ健康科学部 (COI プロジェクト室)・特任助教
研究者番号: 20722888

(2) 研究分担者

内藤 久土 (NAITO, Hisashi)
順天堂大学・スポーツ健康科学研究科・教授
研究者番号: 70188861