

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：33604

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22824

研究課題名（和文）運動による遺伝子構造リセット効果の検証

研究課題名（英文）Investigation for exercise-induced histone turnover in skeletal muscle

研究代表者

河野 史倫（Kawnao, Fuminori）

松本大学・大学院 健康科学研究科・准教授

研究者番号：90346156

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,600,000円

研究成果の概要（和文）：運動によって骨格筋に誘発されるヒストンターンオーバーを直接計測し実証することを目的として本研究を実施した。H2B-GFPマウスを用いて筋核におけるヌクレオソームへのGFP取り込みを調べた結果、トレッドミル走運動4週目において顕著に取り込みが増加することが分かった。ヒストンターンオーバーが活性化した4週目では、2週目に比べ単発の運動に対する遺伝子応答性が顕著に亢進することも明らかとなった。運動によるヒストンターンオーバーの活性化はH2A-H2B特異的シャペロンのひとつであるSPT16の増加を伴うことも分かった。以上の結果から、運動による骨格筋線維のヒストンターンオーバー活性化が証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

習慣的な運動は骨格筋においてヒストンターンオーバーを活性化するという新たな運動効果を見出した。ヒストンターンオーバーは遺伝子構造をオープンにするだけでなく、集積したヒストン修飾をリセットすることも想定される。運動には遺伝子基盤を変化させ、骨格筋の適応力そのものを改善する役割があることを一般社会に提唱できる。

研究成果の概要（英文）：The present study performed the series of experiments to demonstrate exercise-induced histone turnover in skeletal muscle. The experiment using H2B-GFP mice showed that 4 weeks of running training enhanced the incorporation of H2B-GFP fusion protein into the nucleosomes of myonuclei. In this muscle, the response of gene expression to single bout of exercise was drastically enhanced compared to that at 2 weeks in which histone turnover was not activated. It was also demonstrated that myonuclear expression of H2A-H2B-specific chaperone SPT16 was upregulated in association with the activation of histone turnover. These results demonstrate that exercise training activates the histone turnover in skeletal muscle fibers.

研究分野：骨格筋生理学

キーワード：骨格筋 エピジェネティクス 運動 遺伝子応答 ヒストン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生涯を通じた生活活動の中でヒトは様々なライフスタイルを経験する。これらのライフスタイルは個体特有の身体特性を形成するだけでなく、将来における身体機能の適応力・変化性にも影響すると考えられる。運動効果の獲得効率や病気のなりにくさが個体によって異なる、いわゆる“個体差”が発生する原因にも過去のライフスタイル履歴が深く関わっていると考えられる。我々はラットを用いた先行研究において、長期間の走運動歴が将来の廃用性筋萎縮応答を抑制することを報告した。運動歴を有するラットの骨格筋では、廃用性筋萎縮の原因となる遺伝子発現が、筋不活動状態においても増加しなかった。さらにこれらの遺伝子領域では運動によりヌクレオソーム形成の低下が起こり、運動期間終了後に通常飼育に戻した場合、ヒストンバリエント H3.3 を取り込みヌクレオソーム形成量が戻ることも分かった。以上の研究結果から、過去のライフスタイルが遺伝子構造を変化させることで、その後の遺伝子の反応を変化させることが明らかになった。個体差の発生には、過去の運動歴が重要な要因とも言える。

2. 研究の目的

運動トレーニングによりヌクレオソーム形成量が低下し、トレーニングを止めた場合には新規ヒストンが挿入されることでヌクレオソーム形成量が戻るという現象から、運動がヒストンターンオーバー(=ヌクレオソームからヒストンを除去し、再取り込みすることで再びヌクレオソームを形成すること)を促進したと考えることができる。運動によってヌクレオソーム形成が低下することは、ヒストンターンオーバーが促進したことを示す根拠となるものの、直接的な証拠ではない。そこでヒストンターンオーバーを実際に測定し実証することを目的とし本研究を実施した。

3. 研究の方法

ドキシサイクリン投与によりヒストン 2B (H2B) と緑色蛍光タンパク質 (GFP) の融合タンパク質を発現する遺伝子組み換えマウス (H2B-GFP マウス) を用いて研究を実施した。抗 GFP 抗体を用いたクロマチン免疫沈降により特定遺伝子領域における H2B-GFP のヌクレオソームへの取り込みを評価することで、ヒストンの置き換わり (ターンオーバー) を直接計測した。

1) 骨格筋線維における H2B-GFP 発現の検討

8 週齢の H2B-GFP マウスに 1 週間のドキシサイクリン投与を行い、前脛骨筋をサンプリングした。この筋サンプルから凍結横断切片を作成し、抗ジストロフィン抗体を用いた免疫組織化学染色を実施した。これらの染色像から筋線維内の核 (筋核) において H2B-GFP 発現が誘導されたかを評価した。また、低カルシウム筋弛緩液中で筋サンプルを解凍し、筋線維を単離して集め、筋線維のみのタンパク質抽出液を採取した。ウェスタンブロット解析により H2B-GFP 発現を定量し、同様の方法で全筋から採取したタンパク抽出液中の H2B-GFP 発現と比較した。

2) 運動トレーニングの影響

8 週齢の H2B-GFP マウスの 4 週間のトレッドミル走運動を実施した。運動は、15m/s で 1 日 30 分、週 5 日行った。運動期間開始と同時にドキシサイクリン投与も開始した。運動 1 週目、2 週目、3 週目に運動群と非運動群から前脛骨筋をサンプリングした。運動による急性の影響を排除するため、サンプリングは最後の運動から 3 日後とした。これらの筋サンプルから上述と同様の方法で筋線維を単離して集め、クロマチンを抽出し、クロマチン免疫沈降による解析を行った。解析対象とする遺伝子を選定するため、事前に急性運動実験を実施し、運動 2 時間後に発現増加する遺伝子または運動によって発現変化しない遺伝子を RNA シーケンシング解析により同定し、さらにその中から骨格筋機能に関わる遺伝子をそれぞれ 20 種ずつ選定した。

3) ミトコンドリア代謝亢進モデルを用いた検討

運動によって発現増加しミトコンドリア代謝を亢進するコア因子である PGC-1 β を骨格筋特異的に過剰発現するマウス (PGC-1 β Tg マウス) と H2B-GFP マウスを交配し、両方の遺伝子を保有するマウスを作出した。このマウスにドキシサイクリンを投与し、1 週目、2 週目、3 週目に前脛骨筋をサンプリングした。前項と同様にクロマチン免疫沈降による H2B-GFP の取り込み解析を行い、上記マウスと同腹から生まれた野生型マウスと比較した。

4) 遺伝子発現応答性の評価

8 週齢の C57BL/6J マウスを用いて 2 週間または 4 週間のトレッドミル走運動トレーニングを行った。運動条件は上述と同様とし、最後の運動から 3 日後に半数のマウスは 30 分間のトレッドミル走運動を実施し 2 時間後に前脛骨筋をサンプリングした。残り半数は運動せずに同タイミングでサンプリングを行った。これらの筋サンプルから総 RNA を抽出し、RNA シーケンシング解析を行った。また、タンパク質抽出液を採取し、ウェスタンブロット解析により 70kDa heat shock protein (HSP70) 発現を解析した。

5) ヒストンターンオーバーを活性化する要因の検討

8週齢の C57BL/6J マウスを用いてトレッドミル走運動トレーニングを行い、運動期間前、2週目、4週目に前脛骨筋をサンプリングした。これらの筋サンプルから凍結横断切片を作成し、ヒストンターンオーバーを引き起こす因子である SPT16 と SSRP1、遺伝子構造変化に寄与する可能性のあるヒストン (H3.3、H2A.Z、H3K9ac、H3K27ac、H3K27me3、H4K20me2) の筋核における発現量を組織化学的に解析した。

4. 研究成果

1) 骨格筋線維における H2B-GFP 発現の検討

ドキシサイクリン投与したマウスの前脛骨筋では、GFP 蛍光が強い核が多数認められたが、これらは筋核ではなかった。筋核における GFP 蛍光は組織化学解析レベルでは確認できなかった。単離した筋線維におけるウェスタンブロット解析の結果、全筋に比べて少ないものの、筋線維においても H2B-GFP の発現誘導が確認された。したがって、ヒストンターンオーバーの計測には筋線維のみを単離して解析を行う必要があることが分かった。

2) 運動トレーニングの影響

運動によって発現応答する遺伝子座では、運動期間中徐々に H2B-GFP の取り込みが増加し、4週目において非運動群と有意差が認められた。この結果から、運動によって骨格筋線維でヒストンターンオーバーが引き起こされることが実証された。非運動群の H2B-GFP 分布はほぼバックグラウンドレベルであり、運動無しではヒストンターンオーバーは起こらないことも分かった。同時にヒストンバリエーション H3.3 の分布を調べた結果、運動 4週目において劇的な分布量の低下が起こっていることも明らかとなった。これらの結果は、ヒストンターンオーバーによってヌクレオソーム形成量が低下する、つまり、クロマチン構造がオープンになったことを示した。驚くべきことに、このようなヒストンターンオーバーを含む遺伝子構造変化は、運動に応答しない遺伝子群においても同様に誘発された。

3) ミトコンドリア代謝亢進モデルを用いた検討

前項で用いた標的遺伝子を PGC-1^{-b} Tg マウスにおいて高発現、変化なし、低発現に再分類し、クロマチン免疫沈降による解析を行った。その結果、4週間のドキシサイクリン投与では顕著なヒストンターンオーバーの促進は起こらなかったが、PGC-1^{-b} Tg マウスにおいて高発現する遺伝子座においては野生型との間に主効果のみが検出された。したがって、ミトコンドリア代謝の亢進はヒストンターンオーバーの引き金にはならないが、転写活性そのものはヒストンターンオーバーを促進する要因になることが分かった。

4) 遺伝子発現応答性の評価

2週間運動したマウスでは 124 種の遺伝子が運動に対して有意に発現増加したが、4週間運動したマウスでは 213 種に増加した。さらに発現応答の程度も 2週目に比べ 4週目では約 2 倍に拡大した。運動に対して応答しない遺伝子群は、いずれの時点においても運動による遺伝子応答は引き起こされなかった。以上の結果から、ヒストンターンオーバーが活性化している 4週目において特に顕著な遺伝子応答の亢進が起こっていることが明らかとなった。

5) ヒストンターンオーバーを活性化する要因の検討

運動 2週目および 4週目において筋核 SPT16 に運動前に比べ有意な発現増加が認められた。SSRP1 には運動による変化は見られなかった。各ヒストンの発現強度においては、H3.3、H3K27me3、H4K20me2 で 4週目のみで運動前と比べ有意に発現強度が増加した。ヒストンターンオーバーの活性化には、H2A-H2B シャペロンである SPT16 だけでなく、ヒストン修飾変化も関与していることが示唆された。しかしながら、H3K27me3 や H4K20me2 のようなヘテロクロマチン形成を誘導する修飾がなぜヒストンターンオーバー活性化と同時に増加しているのか、詳細については不明である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Ohsawa Ikumi, Kawano Fuminori | 4. 巻 35 |
| 2. 論文標題 Chronic exercise training activates histone turnover in mouse skeletal muscle fibers | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 The FASEB Journal | 6. 最初と最後の頁 e21453 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202002027RR | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔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 河野 史倫 |
| 2. 発表標題 慢性運動は筋核のヒストンターンオーバーを活性化する |
| 3. 学会等名 第8回骨格筋生物学研究会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|