

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 9 月 28 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22800062

研究課題名（和文） ヒストン修飾から見る運動の抗老化メカニズムの解析

研究課題名（英文） Analysis of anti-aging mechanism of exercise via histone modifications.

## 研究代表者

川上 恭司郎 (KYOJIRO KAWAKAMI)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・研究員

研究者番号：90589227

研究成果の概要（和文）：運動の抗老化メカニズムをヒストン修飾変化の観点から調べた。加齢および運動実験群のラットを調べた結果、腓腹筋のヒストン H3 の 4 番目リシンのジメチル化は加齢により減少した。運動による変化は調べた部位では見られなかった。腎臓のヒストン H3 では 9 番目リシンのアセチル化と 10 番目セリンのリン酸化の加齢による増加が見られた。腎臓の mRNA 発現量の加齢変化を調べたところ、炎症関連遺伝子の増加が見られ、その遺伝子近傍には 9 番目リシンのアセチル化が多く存在していることがわかった。

研究成果の概要（英文）：We analyzed anti-aging mechanism of exercise focused on histone modifications. We found dimethylation of histone H3 lysine 4 was decreased in rat gastrocnemius muscle. However, exercise didn't affect histone modifications. In rat kidney, histone H3 lysine 9 acetylation and serine 10 phosphorylation was increased with age. Moreover, inflammatory genes mRNA were increased with age, and histone H3 lysine 9 acetylation was presented in the vicinity of the gene transcription start site.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2011 年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：スポーツ科学

キーワード：ヒストン修飾、エピジェネティクス、老化、運動、アセチル化

## 1. 研究開始当初の背景

厚生労働省による調査で日本における死因は悪性新生物、心疾患、脳血管疾患でその約 60%を占めており、寿命はこれらの疾患と深くかかわっている。運動は疾患の予防・改善に有効であることはよく知られていて、疫学調査によると運動が死亡率に対して抑制的に働いていると報告されている。さらに体

力レベルと死亡率との関係を調べた報告では体力レベルが高い群ではがんや心疾患の死亡率が低くなっている。動物実験では回転ケージを用いた自発走行による運動群では平均寿命が約 10%非運動群より長くなることが報告されている。これらの結果は運動に寿命延長、つまり抗老化作用があることを示唆している。しかし、運動による抗老化メカ

ニズムにはいまだ不明な点が多い。

申請者は博士課程でエピジェネティクスという機構を学んだ。エピジェネティクスはヌクレオチド配列の変化を伴わないで長期にわたって遺伝子発現を調節するメカニズムで、DNA のメチル化やヒストン修飾が代表的なものである。

申請者はこの経験を活用し、発展させ運動の抗老化メカニズムをエピジェネティクスの観点から研究することを考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では運動の抗老化メカニズムを調べるため、ラットを用いた研究を行い、①加齢に伴い筋肉をはじめとした様々な組織中のヒストン修飾が変化するか、②運動によりその変化が影響を受けるか、③加齢及び運動によりどの遺伝子上にあるヒストンが変化しているのか、以上の3点を明らかにすることを目的とした。本研究により分子細胞生物学レベルでの運動の抗老化メカニズムの一因が明らかにできると考えた。

## 3. 研究の方法

- (1) 老齢ラット運動実験群に二ヶ月間 (23.5 → 25.5ヶ月齢)、週4回月、火、木、金に60分間/日のトレッドミル運動を行った。
- (2) 9, 27ヶ月齢の老若のラットを用いて、筋肉及びその他の組織中のヒストン化学修飾体の量が加齢に伴い変化するか否かを部位特異的ヒストン修飾抗体を使用したウエスタンブロット法を行った。
- (3) その加齢変化が運動により影響を受けるか否かを同様に調べた。
- (4) 定量PCRにより mRNA 発現の変化を調べた。
- (5) クロマチン免疫沈降-定量PCR (ChIP-qPCR) により mRNA 変化が見られた遺伝子の転写開始位置前後の領域を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 腓腹筋のヒストン修飾変化

加齢実験群 (9 と 27ヶ月齢) および運動実験群 (25.5ヶ月齢の運動群、非運動群) のラット腓腹筋の核から酸抽出によりヒストン画分を調製した。

ヒストン H3 の修飾体について解析を行った結果、ヒストン H3 の 4 番目のリシンのジメチル化 (H3K4me2) は加齢により減少した。9 番目のリシンのアセチル化 (H3K9ac)、10 番目のセリンのリン酸化 (H3S10ph)、9 番目のリシンのジ・トリメチル化 (H3K9me2, 3) には加齢による有意な変化は見られなかった。また、これら修飾には運動による影響は見られなかった (図 1)。

ヒストンのメチル化は修飾を受けるアミノ酸の位置によって転写活性化 (K4、K36、K79 など) および抑制 (K9、K27 など) と複雑な制御

を受けていることが知られている。加齢による H3K4me2 の変化は転写に影響を与えている可能性がある。

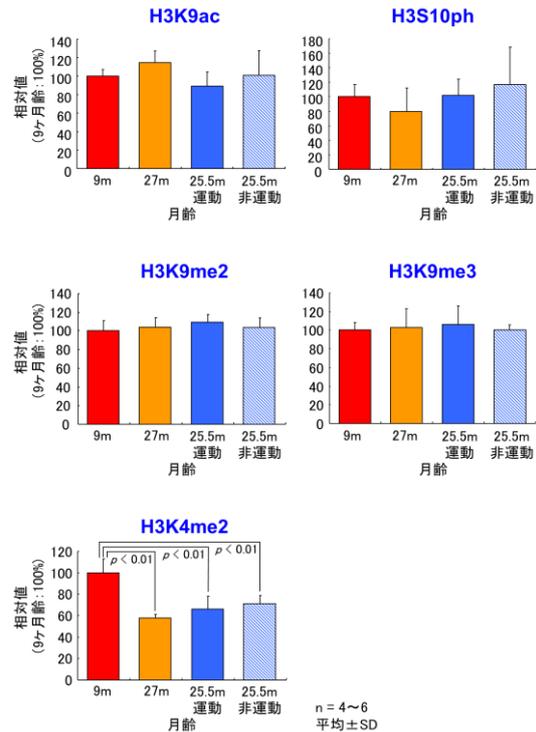


図 1 腓腹筋のヒストン修飾変化

### (2) 腎臓のヒストン修飾変化

加齢実験群 (9 と 27ヶ月齢) の腎臓よりヒストンを抽出し、ヒストン H3 を調べた結果、9 番目リシンのアセチル化 (H3K9ac) と 10 番目のセリンのリン酸化 (H3S10ph) の加齢による増加が見られた (図 2)。

ヒストンのアセチル化および 10 番目セリンのリン酸化は遺伝子発現制御に関わっており、加齢に伴う遺伝子発現変化への関与が考えられた。

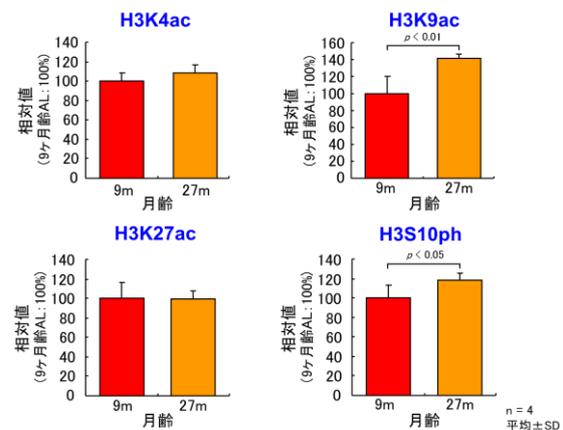


図 2 腎臓のヒストン修飾変化

### (3) 腎臓の mRNA 発現変化

ヒストン修飾と遺伝子発現の関連性を調べるために、腎臓の mRNA 発現量の加齢変化を調べた。その結果、抗酸化酵素ではカタラーゼの減少 (図 3 左下)、炎症関連遺伝子では Transforming growth factor beta1 (TGF- $\beta$ 1)、Tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ )、Interleukin-1 beta (IL1 $\beta$ ) の増加が見られた (図 4)。

このことから、ヒストン修飾の加齢に伴う増加は炎症関連遺伝子の mRNA 発現増加と関連している可能性が考えられた。

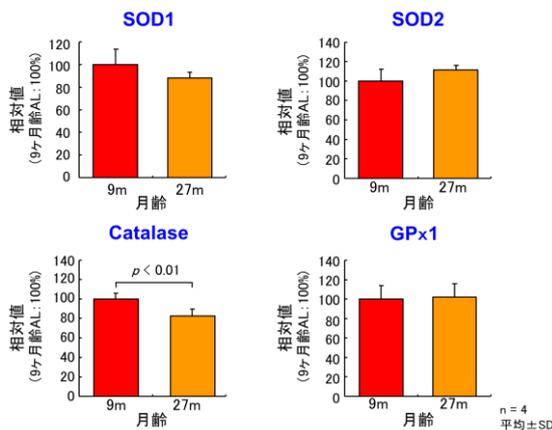


図 3 腎臓の抗酸化酵素 mRNA 発現

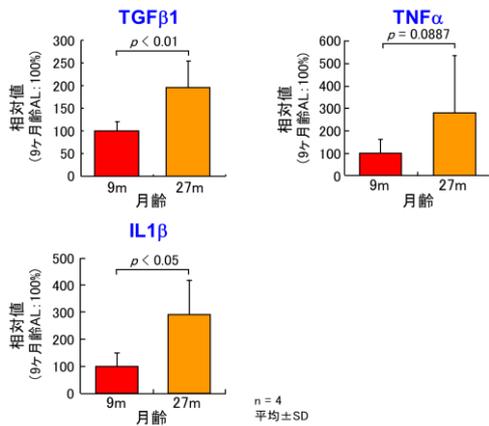


図 4 腎臓の炎症関連遺伝子 mRNA 発現

### (4) 腎臓の ChIP-qPCR

mRNA 発現量の加齢変化が見られた炎症関連遺伝子について ChIP-qPCR 解析を行い遺伝子のどの部位にアセチル化ヒストンが多く結合しているかを調べた。

加齢変化が見られていた H3K9ac の抗体を用いて免疫沈降したクロマチンから DNA を抽出し、qPCR 解析を行った。その結果、TGF1 $\beta$  では転写開始位置から約 1200bp 上流に、TNF $\alpha$  では約 150bp 上流と約 60bp 下流の領域

に有意差が見られた (図 5)。

これらのことから TGF- $\beta$ 1 と TNF $\alpha$  の加齢に伴う mRNA 発現増加には H3K9ac の増加が関与していることが示唆された。

今後、腎臓の運動やその他組織の加齢・運動による影響をヒストン修飾の面から調べていきたいと考えている。

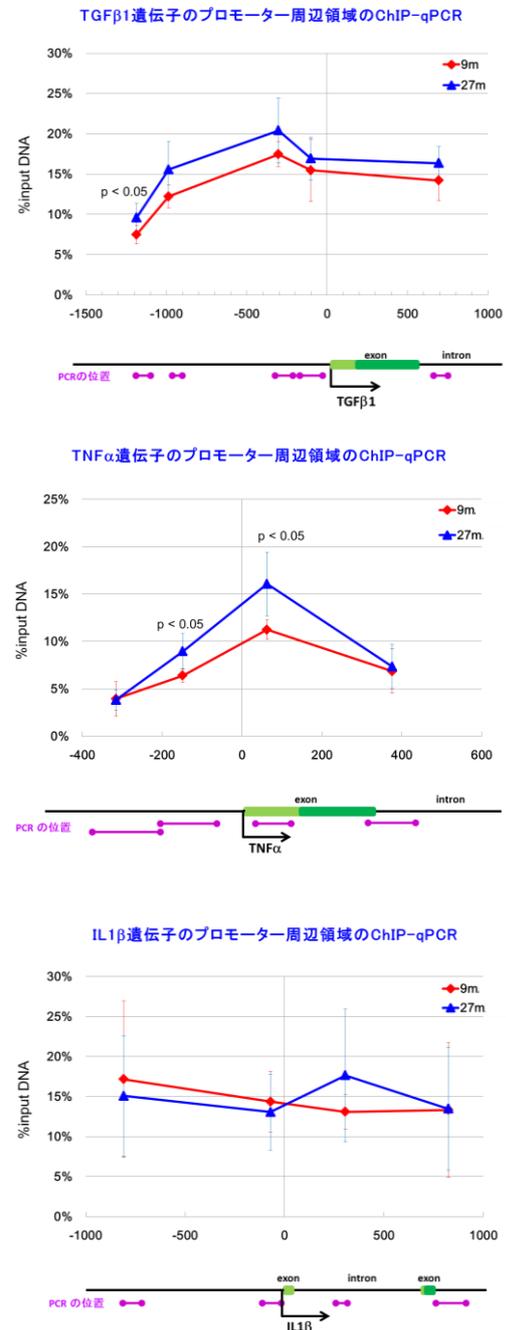


図 5 腎臓の ChIP-qPCR 解析 (H3K9ac)

### 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2件)

① Kawakami K.、Nakamura A.、Goto S.、Dietary restriction increases site-specific histone H3 acetylation in rat liver: Possible modulation by sirtuins.、Biochemical and Biophysical Research Communications、418、2012、836-840

② Nakamura A.、Kawakami K.、Kametani F.、Nakamoto H.、Goto S.、Biological significance of protein Modifications in aging and calorie restriction.、Annals of the New York Academy of Sciences、査読有、1197、2010、33-39

〔学会発表〕(計7件)

① Kawakami K.、Nakamura A.、Goto S.、Effects of aging and dietary restriction on histone H3 modifications in rat liver.、The 10th Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing Research、2011.7.14-15、癌研究所(東京都)

② 川上恭司郎、中本英子、後藤佐多良、ラット筋肉のヒストン修飾体に対する加齢および運動の影響.、第34回日本基礎老化学会大会、2011.6.15-17、東京

③ 川上恭司郎、中村明宏、後藤佐多良、ラット肝臓の NAD 依存性脱アセチル化酵素 Sirt1, 6 に対する加齢と長期食餌制限の影響.、第5回日本エピジェネティクス研究会年会、2011.5.19-20、熊本

④ 川上恭司郎、中村明宏、後藤佐多良、ラット肝臓 Sirt1, 6 発現量および NAD/NADH 比に対する加齢と長期食餌制限の影響、日本薬学会第131年会、2011.3.28-31、静岡

⑤ Kawakami K.、Nakamura A.、Nakamoto H.、Goto S.、Age-related changes of histone H3 modification and effects of lifelong dietary restriction in rat liver、2010 Spring Conference of the Korean Society for Gerontology and 10th Korea-Japan Gerontologist Joint Meeting、2010.7.1、KRIBB, DaeJeon, (韓国)

⑥ 川上恭司郎、中村明宏、後藤佐多良、ラット肝臓のヒストン H3 修飾体に対する加齢および長期食餌制限の影響、第33回日本基礎老化学会、2010.6.17-18、名古屋

⑦ 川上恭司郎、中村明宏、後藤佐多良、加齢および長期食餌制限によるラット肝臓ヒストン修飾の変化、第4回日本エピジェネティクス研究会年会、2010.5.28-29、鳥取

〔その他〕

ホームページ等

<http://kyojiro.com>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川上 恭司郎 (KYOJIRO KAWAKAMI)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・研究員

研究者番号：90589227