

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700655

研究課題名（和文）筋活動による脳機能の維持・亢進に関する脳タンパク質の網羅的解析

研究課題名（英文） Analysis of brain-protein profiles involved in the brain function which is preserved and enhanced by muscle activity.

研究代表者

尾家 慶彦 (OKE YOSHIHIKO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50396470

研究成果の概要（和文）：運動、特に下肢の筋活動は、肉体的な健康に対してだけでなく脳の認知機能にも大きな影響を与えることは一般に周知の事実である。筋活動が脳機能の維持や亢進に及ぼす影響を細胞レベルならびに分子レベルで追及することを目的とし本研究を行った。抗重力筋活動を抑制するために後肢懸垂を施したラットでは、記憶学習能力が低下する可能性があることが水迷路テストによって示唆された。また、記憶に関連する海馬におけるタンパク質の網羅的解析の結果、細胞保護、細胞死、神経新生、神経活動、神経回路形成に関するタンパク質の発現量ならびに修飾状況が変化していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：It is common knowledge that exercise, especially muscle activities of inferior limbs, can have an adverse effect on cognitive function of the brain. In this research, I investigated effects of muscle activities on cellular or molecular mechanism involved in maintaining and progress of the brain function. In order to inhibit the antigravitational muscle activities, I used hindlimb-suspended rats. The results from water maze test suggest that learning and memory capacity might be impaired by the hindlimb suspension. Furthermore, 2-dimensional electrophoresis revealed that the hindlimb suspension could alter the protein expression levels and/or the modification of proteins in the hippocampus, involved in cellular protection, cell death, neurogenesis, neural activities and formation of the neuronal circuit.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学，スポーツ科学

キーワード：運動とトレーニング，プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

ラットにおいて運動は脳機能（記憶力）を増進することが報告されていた。逆に、後肢懸垂によって筋活動を抑制したラットでは、脳内において栄養因子である BDNF や VEGF の発現量が減少し、海馬において神経新生が抑制されていることも報告されていた。また、所属研究室のこれまでの研究で、筋活動レベルの低下は感覚神経活動の抑制を招くことならびに脳蛋白質の発現を抑制するという結果を既に得ていた。しかしながら、筋活動による脳機能の維持・亢進には、実際に神経新生がどのように関係しているのかについても、神経新生以外に起こっている脳内イベントについても、筋活動によって引き起こされるどのような分子レベルでの反応が関与しているのかについても明らかにならなかった。

2. 研究の目的

筋活動が脳機能の維持や亢進に及ぼす影響を細胞レベルならびに分子レベルで追及することを最終目的とした。実験モデルとしては、後肢懸垂によって抗重力筋活動を抑制したラットを用い「筋活動抑制で機能が退化した脳での発現タンパク質の変化」と「退化した脳機能の回復時における脳発現タンパク質の変化」を網羅的に把握することを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、脳機能の維持・亢進の実験モデルとして、後肢懸垂を施して抗重力筋活動を抑制することによって脳機能を退化させたラットを使用した。「脳機能維持」についての調査は「14 日間の後肢懸垂による筋活動の抑制で機能が退化した脳」を対象とし、「脳機能亢進」については「14 日間の後肢懸垂後に 14 日間の歩行回復を行わせ、機能を一旦退化させたのちに回復させた脳」を調査対象

とした。

脳機能の評価は「迷路水槽を用いた記憶学習能力の測定」によって行った。まず、通常飼育ラットならびに後肢懸垂ラットに直線のコースを泳がせ、プラットホームにたどり着けば水迷路から助かることを覚えさせた。その後、同一の迷路水槽コースを用いて、2 分のインターバルをはさみながら連続して 4 回泳がせ、スタート地点からプラットホームにたどり着くまでに要する経路長の比較から記憶学習能力の評価を行った。

脳タンパク質の網羅的解析は、記憶に関連するとされている海馬のプロテオミクス解析を行った。通常飼育群と後肢懸垂群の海馬抽出液の 2 次元電気泳動ならびに CBB 染色を行い、タンパク質発現プロファイルの比較を目視によって行った。発現量に変化のあったスポットについて MS 解析を行い、タンパク質を同定した。同定したタンパク質にどのような変化が起こったのかを明らかにするためにウェスタンブロットヒング（一次元ならびに二次元）による評価を行った。

4. 研究成果

（1）記憶学習能力の評価

通常飼育群でのプラットホームに到達するまでに要した経路長は、1 試行目と比較して 4 試行目では有意に減少した。しかしながら、後肢懸垂群では 1 試行目と 4 試行目の経路長には有意な差は見られなかった。この結果から、後肢懸垂を施すことによって迷路コースを記憶する能力が低下したと考えられる。

さらには、各試行回におけるスタート地点からプラットホームまでに要した経路長を、通常飼育群と後肢懸垂群において比較したところ、全ての試行回において後肢懸垂群では長い経路を要する傾向があった。この結果は、試行中に通過した経路を覚える能力が後肢懸垂群では劣っていることを示唆すると考えられる。

これらの結果から後肢懸垂によって記憶学習能力に悪影響が及ぼされることが示唆された。

(2) 海馬発現蛋白質の網羅的解析

目視による通常飼育群と後肢懸垂群の海馬抽出液の2次元電気泳動像の比較の結果、後肢懸垂群で発現量が増加したスポットが6つ、発現量が減少したスポットが4つ認められた。これらの発現量に差が見られたスポットのMS解析(PMF法)の結果、8種類のタンパク質が同定された。これらのタンパク質は、細胞保護、細胞死、神経新生、神経活動、神経回路形成に関する機能を有しており、これらの機能に異常をきたしている可能性が示唆された。

続いて、実験前群(Pre)、通常飼育14日群(Control 14 day 群)、後肢懸垂14日群(Suspension 群)、通常飼育28日群(Control 28 day 群)、後肢懸垂14日後通常飼育14日群(Recovery 群)の海馬抽出液を準備し、同定したスポットのうち、細胞死ならびに神経回路形成に関連する機能を持つ3種類のタンパク質についてウェスタンブロッティングを1次元電気泳動と2次元電気泳動共に行った。1次元ウェスタンブロッティングの結果、これら3種類のタンパク質の総発現量には変化がないことが分かった。しかしながら、2次元ウェスタンブロッティングの結果から、それぞれのタンパク質の等電点(pI)プロファイルが後肢懸垂によって影響を受けることが明らかとなった。これらのタンパク質のpIプロファイルの変化としては「①加齢に伴うpI変化が後肢懸垂中には一時的に止まるが、後肢懸垂解除後には再開するパターン」「②加齢に伴うpI変化が後肢懸垂によって抑制され、後肢懸垂解除後もはや変化しないパターン」「③加齢に伴うpI変化とは異なる変化が後肢懸垂によって引き起こされ、後肢懸垂解除後も全く異なるpI変化を続けるパターン」の3パターンがあることが分かった。

これらの結果から、幼少期における後肢懸垂は、海馬におけるタンパク質の修飾変化、

すなわちタンパク質の機能変化を恒久的に引き起こす可能性が示唆された。

以上、本研究の結果から、幼少期における抗重力筋活動の抑制は、海馬のタンパク質の修飾変化などを引き起こし、最終的には記憶学習能力の低下を招くことが示唆された。記憶学習能力の変化は生涯続くか否かについては今後更なる研究が必要とされるが、幼少期には抗重力筋活動を抑制しないよう留意することが重要であると考えられる。

(図等のデータについては、現在論文投稿準備中であるため、掲載しないこととさせていただきます。)

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)

[学会発表] (計4件)

- ① Y. Oke, F. Kawano, S. Nomura, T. Ohira, R. Fujita, N. Nakai and Y. Ohira, Effect of antigravity muscle activity on learning capacity and hippocampal protein expression in juvenile rats, *Experimental Biology 2010*, Anaheim, California, USA. (2010年4月25日). Poster session.
- ② Y. Oke, F. Kawano, T. Ohira, S. Nomura, M. Terada, N. Nakai and Y. Ohira, Effect of hindlimb suspension on learning capacity in juvenile rats, *The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences*, Kyoto, Japan. (2009年7月29日). Poster session.
- ③ 尾家慶彦, 河野史倫, 野村幸子, 大平宇志, 藤田諒, 大平充宣, 発育期ラットの記憶学習能力ならびに海馬蛋白質の発現

へ後肢懸垂が及ぼす影響, 第 55 回日本
宇宙航空環境医学会大会, (2009 年 11 月
13 日), 口頭発表.

- ④ 尾家慶彦, 河野史倫, 中井直也, 大平充
宣, 幼年期ラットにおける後肢懸垂が記
憶学習能力へ及ぼす影響, 第 64 回日本
体力医学会大会, (2009 年 9 月 18 日), 口
頭発表.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾家 慶彦 (OKE YOSHIHIKO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号 : 50396470