

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：82674

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700702

研究課題名(和文) 運動の抗老化メカニズムをタンパク質のアセチル化から探る

研究課題名(英文) Study of anti-aging mechanism of the exercise from protein acetylation

研究代表者

川上 恭司郎 (Kawakami, Kyojiro)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：90589227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：運動の抗老化メカニズムをタンパク質の変化から調べた。老齢ラットに2ヶ月間(23.5～25.5ヶ月齢)、週4回60分間/日のトレッドミル運動を行い、肝臓タンパク質の変化を解析した。

2D-DIGE(蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動解析)により、全スポット662個のうち運動で有意な変化が13個解析された(増加が10個、減少が3個)。しかし、それぞれのスポットの発現比が2倍以上のものはなく、個々のシグナル強度は弱いものであった。

一次元のウエスタンブロット解析により、アセチル化タンパク質量がミトコンドリア画分で加齢に伴い減少すること、老齢ラットの定期的運動により増加することを見出した

研究成果の概要(英文)：We studied anti-aging mechanism of exercise via protein acetylation. Aged rats were exercised on treadmill 60 min/day and 4 times per week, for 8 weeks. We analyzed changes of liver protein. 2D-DIGE (two-dimensional difference gel electrophoresis) showed 13 significantly changed protein spots (10 increased and 3 decreased) from a total of 662 spots. However, these spots were below two fold changes, and intensity of each spot was very weak. Protein acetylation of liver mitochondria decreased with age by western blot analysis with anti-acetyl lysine antibody, however, exercised rats increased acetylation of protein.

研究分野：総合分野

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：老化 運動 アセチル化 翻訳後修飾 健康長寿 アンチエイジング 抗老化

1. 研究開始当初の背景

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、死亡率に対しても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。

生体内のタンパク質はさまざまな翻訳後修飾を受け、その機能を調整していると考えられている。中でもリジンのアセチル化はヒストンをはじめとして、多くのタンパク質が基質となることが明らかになってきている。現在までに我々はラット肝臓でアセチル化タンパク質が加齢に伴い減少すること、動物実験において寿命延長効果が認められている長期食餌制限を行うことによりアセチル化タンパク質の増加を確認している。中でも食餌制限によりアセチル化タンパク質の変化が見られるのはその多くがミトコンドリアのタンパク質であり、ミトコンドリアは ATP 合成の場であることからタンパク質のアセチル化はエネルギー代謝系に深くかかわっていることを示唆している。また、ミトコンドリアは老化の原因の一つとして考えられている活性酸素の発生源であり、食餌制限における抗老化メカニズムの一つに活性酸素の発生の抑制が考えられている。ミトコンドリアタンパク質のアセチル化の変化は活性酸素の発生に関わる可能性がある。食餌制限と同様に運動もエネルギー代謝系に大きな影響を及ぼすと考えられ、タンパク質のアセチル化の変化を介してその抗老化作用を発揮している可能性が考えられた。

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、加齢に伴い肝臓、筋肉をはじめとした様々な組織中のアセチル化タンパク質が変化するか、定期的運動によりその変化が影響を受けるか、変化があるタンパク質は何であるか、以上の 3 点を明らかにすることを目的とする。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することができる考えた。

3. 研究の方法

(1) 老齢ラットの運動

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) 2D-DIGE (蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動) による解析

運動実験群 (25.5 ヶ月齢の運動群を 5 匹、非運動群を 6 匹) のラット肝臓から細胞破砕液を作製し、蛍光標識試薬 IC3-OSu, IC5-OSu を用いてタンパク質を蛍光標識した。蛍光標識は個々のサンプルを IC5、すべてのサンプルを等量で混ぜたサンプル (プールサンプル) を IC3 で標識し、混合後に二次元電気泳動を行なった。二次元電気泳動後、蛍光スキャナ Typhoon FLA 9500 にてタンパク質の展開画像を取得し、画像解析ソフト Progenesis SameSpots でプールサンプルの検出画像を基準としてゲル間でのマッチングを行い、個々のサンプルを比較解析した。

(3) 細胞分画によるアセチル化タンパク質の解析

若齢 (9 ヶ月齢) と老齢 (27 ヶ月齢) および運動、非運動のラット肝臓のサンプルを細胞分画法により細胞質、ミトコンドリア、核に分けて、それぞれのアセチル化タンパク質をアセチル化リジン抗体を使用してウエスタンブロット解析をした。

4. 研究成果

(1) 2D-DIGE による解析

運動群 5 匹、非運動群 6 匹のラット肝臓タンパク質について 2D-DIGE を行った。ゲル間のマッチングにはすべてのサンプルのプールサンプルを用いた。2D-DIGE により得られた画像の一例を図 1 に示す。個々のサンプルについて二次元電気泳動の画像を得たのち、Progenesis SameSpots により運動と非運動での差を解析した。

その結果、全スポット 662 個のうち運動で有意 (p-value 0.05) に変化が見られたタンパク質が 13 個解析された (運動による増加が 10 個、減少が 3 個)。しかし、それぞれのスポットの発現比が 2 倍以上のものはなく、個々のシグナル強度は弱いものであった。解析スポットの一覧およびその一例を図 2、図 3、表 1 に示す。

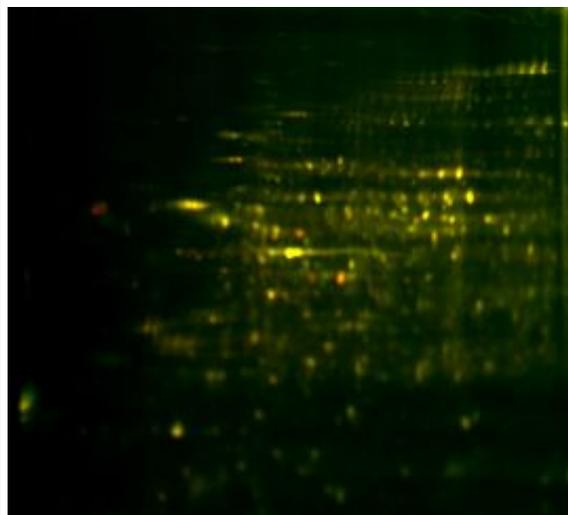


図 1. 2D-DIGE の一例

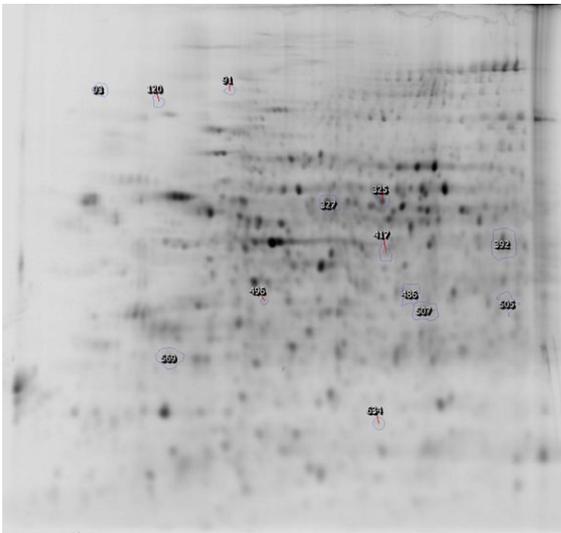


図 2. Progenesis SameSpots での解析図
有意差があるスポットに数字がついている。

スポットNo.	P値	Fold	Average Normalised Volumes	
			運動	非運動
569	0.002	1.2	0.872	1.013
93	0.008	1.7	0.558	0.926
486	0.025	1.2	0.973	1.143
634	0.025	1.2	0.836	0.990
325	0.025	1.3	1.306	1.026
507	0.027	1.3	0.821	1.091
417	0.03	1.2	0.945	1.101
327	0.031	1.2	1.212	0.990
91	0.033	1.2	0.897	1.102
496	0.033	1.5	0.672	0.990
392	0.043	1.1	1.151	1.016
120	0.043	1.2	0.878	1.039
505	0.046	1.2	0.994	1.160

表 1. 差のあるスポットの一覧

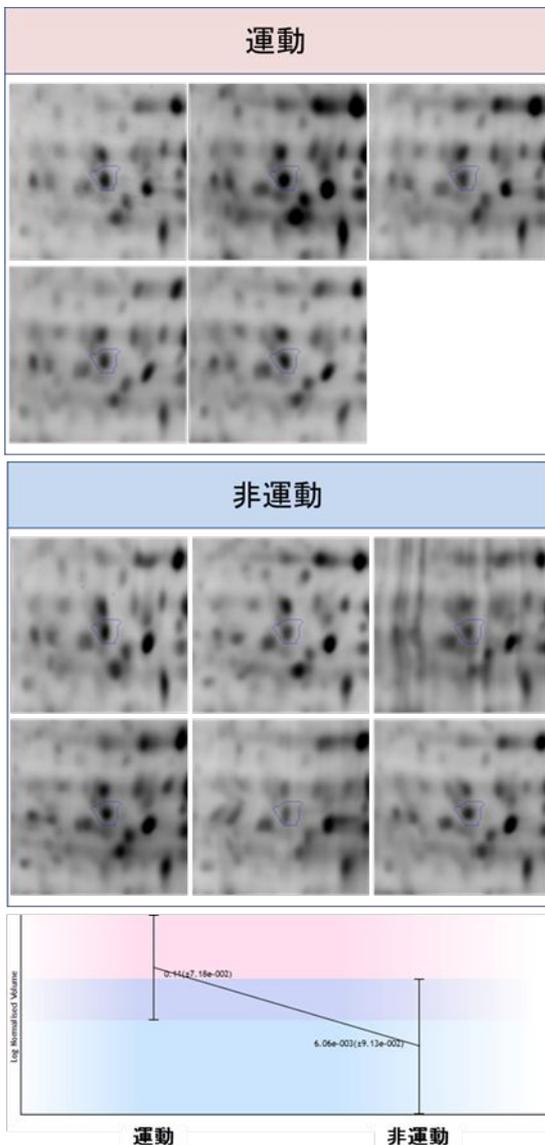


図 3. スポットの一例(スポット No. 325)

(2) アセチル化リジン抗体によるウエスタン プロット解析

一次元電気泳動 (SDS-PAGE) による分離を行いアセチル化リジン抗体によるウエスタンプロット解析を行った。サンプルはラット肝臓の若齢(9ヶ月齢)と老齢(27ヶ月齢)および前記の老齢ラット運動群、非運動群を使用した。

はじめに肝臓の破碎液を用いて、検討を行った。加齢よりにアセチル化タンパク質の減少が見られた(図 4 上)。運動による増加傾向が見られた(図 4 下)。

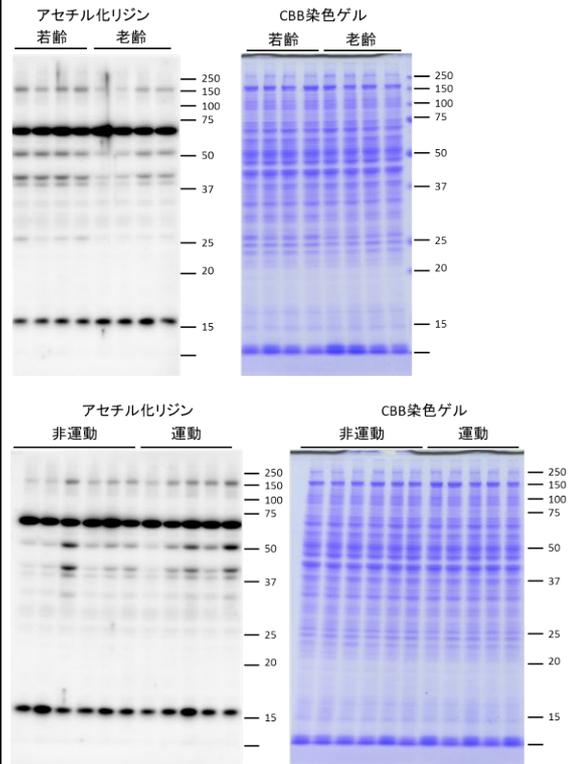


図 4. 肝臓破碎液のアセチル化タンパク質
(上: 加齢群、下: 運動群)

より詳しい解析をするため細胞分画を行い、細胞質、ミトコンドリア、核の3種類の画分にしたものを作製し、破碎液の時と同様にアセチル化タンパク質をウエスタンブロット解析した。

その結果、細胞質では加齢によるアセチル化タンパク質の減少が見られ(図5上)、運動により多少の増加が見られた(図5下)。

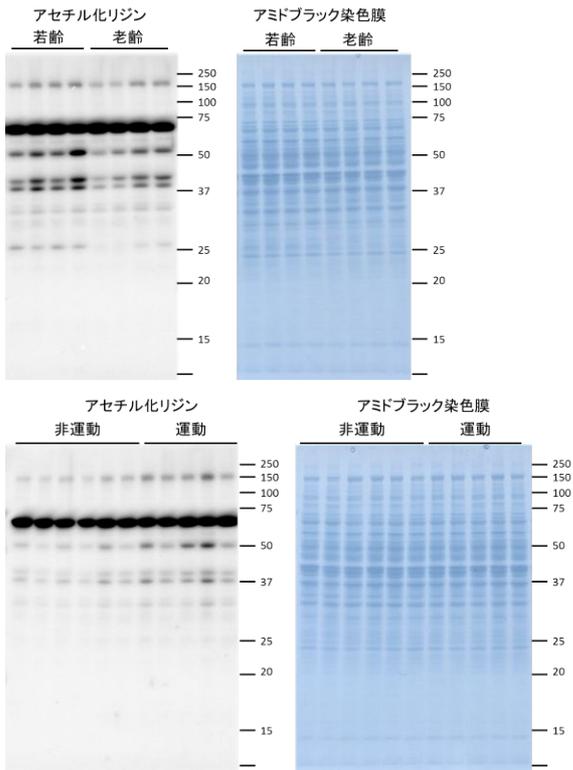


図5. 肝臓細胞質のアセチル化タンパク質 (上: 加齢群、下: 運動群)

ミトコンドリアでは加齢によるアセチル化タンパク質の減少が見られ(図6上)、運動により増加が見られた(図6下)。

核では加齢によるアセチル化タンパク質の減少傾向が見られた(図7上)。運動群では個体の差が大きく判別が不能であった(図7下)。

以上のように全体の傾向として加齢によりアセチル化タンパク質が減少し、運動により増加が見られた。特に顕著な差が見られたのはミトコンドリア画分であった。この結果は研究背景に記載のように定期的運動によるエネルギー代謝系の変化がATP合成の場であるミトコンドリアのタンパク質のアセチル化の変化を反映している可能性がある。

今後、運動によりアセチル化を受けるタンパク質が何であるかを質量分析により同定していきたいと考えている。

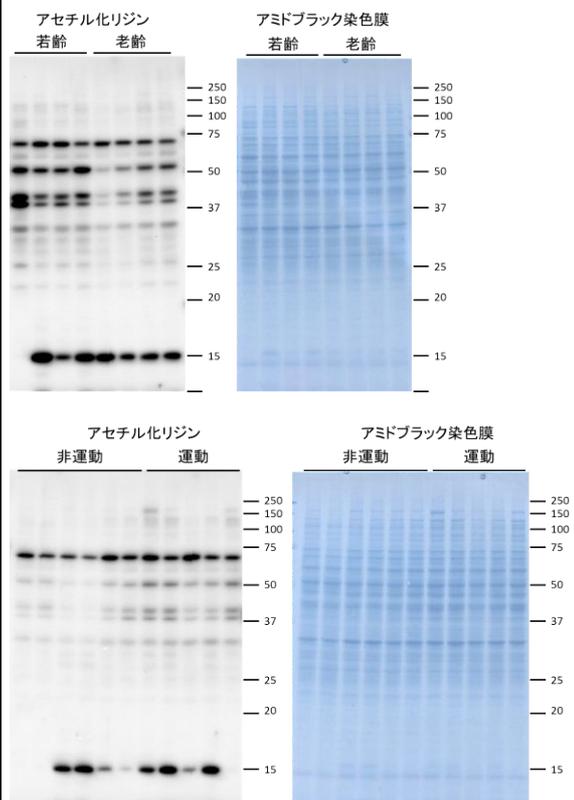


図6. 肝臓ミトコンドリアのアセチル化タンパク質 (上: 加齢群、下: 運動群)

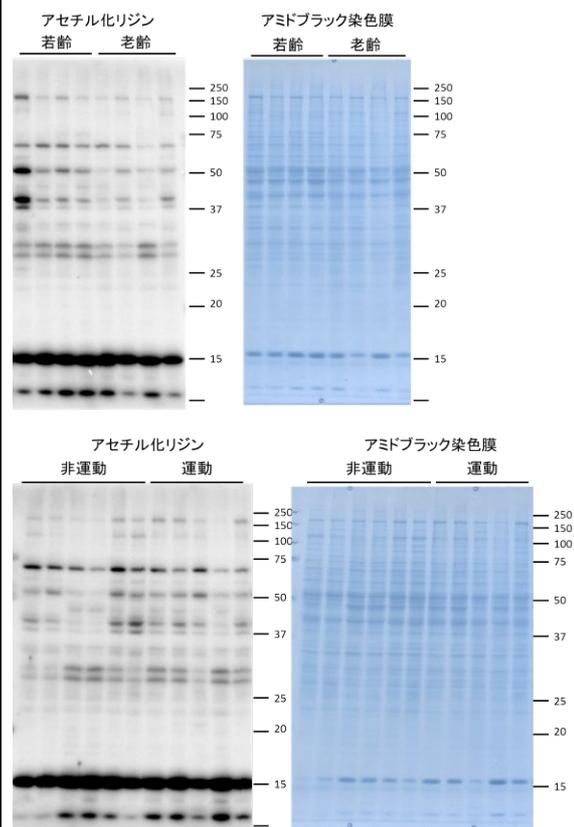


図7. 肝臓核のアセチル化タンパク質 (上: 加齢群、下: 運動群)

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 1 件)

Nakamura A, Kawakami K, Kametani F and Goto S: Dietary Restriction Increases Protein Acetylation in the Livers of Aged Rats. Gerontology 59: 542-548, 2013. 査読有
doi: 10.1159/000354087

〔学会発表〕(計 4 件)

Kawakami K, Nakamoto H, Katamoto S, Goto S: Effects of aging and lifelong dietary restriction on histone modifications and gene expression in rat kidney. The 20th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics, Seoul, Korea, 2013. 6. 23-27

川上恭司郎, 中本英子, 形本静夫, 後藤佐多良: 老化とエピジェネティクス: 加齢と食餌制限によるラット腎臓のヒストン修飾および遺伝子発現変化. 第 36 回日本基礎老化学会大会, 大阪, 2013. 6. 4-6

川上恭司郎, 中本英子, 形本静夫, 後藤佐多良: ラット腎臓におけるヒストン修飾および遺伝子発現に対する加齢と長期食餌制限の影響. 第 85 回日本生化学会大会, 福岡, 2012. 12. 14-16

川上恭司郎, 中村明宏, 形本静夫, 後藤佐多良: ラット腎臓のヒストン修飾に対する加齢と長期食餌制限の影響. 第 6 回日本エピジェネティクス研究会年会, 東京, 2012. 5. 14-15

〔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 (KAWAKAMI, Kyojiro)
東京都健康長寿医療センター研究所・研究員
研究者番号: 9058922