

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：34310

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750312

研究課題名(和文)骨格筋組織の時計遺伝子発現リズムに基づく持久的運動トレーニング効果の検証

研究課題名(英文) Response and adaptation of skeletal muscle to endurance training based on circadian rhythms of clock gene expression.

研究代表者

高倉 久志 (Takakura, Hisashi)

同志社大学・スポーツ健康科学部・助教

研究者番号：20631914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア生合成に重要なPGC-1 β は時計遺伝子と相互作用しながら概日リズムを示す。また、運動を実施する時間帯によってPGC-1 β mRNAの応答は異なる。ミトコンドリアの増加にはPGC-1 β 発現量の増加を促す必要があるが、安静時のPGC-1 β mRNA発現がボトムを示す時間帯での運動がPGC-1 β mRNAを顕著に増加させるとともに、その時間帯における持久的運動トレーニングはミトコンドリア量の増加を助長した。運動を実施するタイミングの違いが、筋組織内のミトコンドリア生合成に影響を及ぼすことが示された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to determine whether exercise timing enhanced exercise training (TR)-induced increase in the levels of mitochondrial proteins in skeletal muscles. The treadmill TR for 9 weeks was conducted at two time points (TR@zeitgeber time 0 (ZT0) and TR@ZT10). Both of *per2* and *pgc-1 β* mRNA expression showed the highest level at ZT0 and lowest level at ZT10. Additionally, the rats underwent acute exercise at the same time points (Ex@ZT0 and Ex@ZT10). The TR significantly increased levels of the mitochondrial protein (COXIV) in the deep portion of gastrocnemius muscle. Moreover, COXIV level in the TR@ZT10 group increased significantly compared to those in the TR@ZT0 group. Indeed, *pgc-1 β* mRNA expression increased significantly immediately after acute exercise only at Ex@ZT10. The timing of TR influenced TR-induced adaptation. This differential adaptation might be caused by the differential PGC-1 β expression upon acute exercise.

研究分野：運動生理学・生化学

キーワード：時計遺伝子 骨格筋 転写因子 ミトコンドリア生合成 持久的トレーニング

1. 研究開始当初の背景

持久的運動トレーニング (TR) は骨格筋の有酸素性代謝能力を亢進させ、運動パフォーマンスの向上や代謝疾患の予防・改善をもたらす (Saltin & Gollnick 1983; Kraus et al. 2001)。この際、骨格筋組織内ではミトコンドリアの酸素利用能力が亢進するとともに、その酸素需要を満たすことができる酸素供給システムが構築される (例: 毛細血管密度の上昇や筋細胞内酸素運搬担体 (ミオグロビン; Mb) の増加など。Masuda et al., 2013, Takakura et al., 2010)。運動トレーニングによる適応や一過性運動による応答は、運動の様式や時間、強度、頻度に依存するだけではなく、遺伝子発現やホルモン分泌などにも修飾される。この2つの要因には概日リズムが見られ、そのリズム形成には時計遺伝子 (*bmal1*, *clock*, *per2*, *cry* など) が深く関与する。

時計遺伝子は、転写因子である CLOCK/BMAL タンパク質複合体と、CLOCK/BMAL タンパク質の働きを抑制する PERIOD/CRY タンパク質の相互作用を介して、24時間周期で様々な出力遺伝子の発現を修飾する (図1; 時計遺伝子ネットワーク)。骨格筋組織では200以上の遺伝子が概日リズムを有する (McCarthy et al., 2007)。また、主要時計遺伝子である *clock* の変異マウスでは、有酸素性代謝能力を規定するミトコンドリアタンパク質 (COXIV, Cytochrome c など) やその生合成に重要な転写因子 (PGC-1 α , Tfam) の発現量が低下する (Andrews et al., 2010)。つまり、時計遺伝子が代謝機能やそれに関する遺伝子発現に関与する可能性が強く示唆されている。我々は時計遺伝子である *bmal1* や *per2* の概日リズムの測定に加え、ミトコンドリアのマスタレギュレーターと言われる *pgc-1 α* も概日リズムを示すことを確認した。また、*pgc-1 α* の概日リズムは *per2* の発現リズムと同調していた。ミトコンドリアの増加には *pgc-1 α* の増加を促す必要があるため、TRの実施タイミングによって *pgc-1 α* 発現量が異なっているのであれば、TR効果 (ミトコンドリアタンパク質の増加) も異なるかもしれない。しかし、時計遺伝子の発現

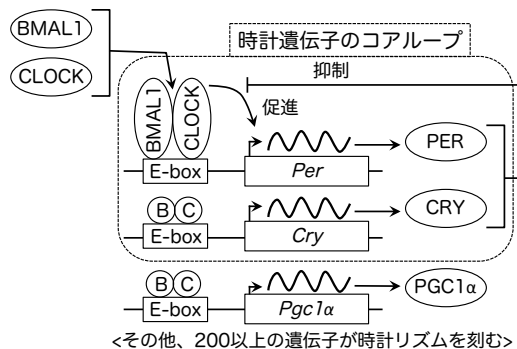


図1. 概日リズムを形成する分子機構
BMAL1/CLOCK複合体がプロモーター領域 (E-box) に結合し、*per*や*cry*といった時計遺伝子が発現する。同時に、*pgc1 α* などの代謝関連遺伝子も発現する。

リズムに基づく TR がトレーニング効果に違いを生じさせるかについては検討されていない。

一過性運動は *pgc-1 α* 発現量を増加させる。その増加は運動直後から始まり、数時間後にはピークを示し (Pilegaard et al., 2003)、タンパク質レベルにおいても運動後6時間目までにはピークを迎える (Terada et al., 2005)。PGC-1 α の過剰発現はミトコンドリアタンパク質や Mb を増加させることから (Lin et al., 2001)、運動刺激によって *pgc-1 α* を骨格筋に多く発現させることは TR による適応を促進させるのかもしれない。したがって、運動による *pgc-1 α* 発現量の増加が運動数時間後にピークを迎えることから、時計遺伝子による *pgc-1 α* 発現量のピーク時に合致するように運動を実施し、相加的に *pgc-1 α* 発現量を増加させることができれば、異なるタイミングの運動実施 (例: 時計遺伝子の発現量ボトム時) と比較し、TR 効果に違いが生じるかもしれない。

ところで、TR 期間 (10 週間) 中の総運動量は同一であるにもかかわらず、1日おきの1日2回 TR は1日1回 TR と比較して、TR 効果が促進される (運動継続時間の延伸やミトコンドリアタンパク質の増加促進; 図3, Hansen et al., 2005)。つまり、2日間で2回 TR すること (1日1回 TR を2日 or 2日間のいずれか1日のうちに TR を2回実施) を考えた場合に、その実施タイミングによって TR 効果が変わるとも言える。1日おきの1日2回 TR によって適応が促進される現象は、1回目の運動が標的 mRNA の発現を高め、2回目の運動は1回目で増加した mRNA から翻訳された転写因子を活性化させているということと説明できるかもしれない。仮にそうであれば、時計遺伝子の発現リズムに基づいた1回目と2回目の運動を設計すれば、TR の効果が更に促進されるかもしれない。しかし、このようなエビデンスは得られていない。

2. 研究の目的

時計遺伝子の発現リズムに基づく持久的運動トレーニングが有酸素性代謝能力に関わる因子に及ぼす応答や適応について検討すること、また時計遺伝子の発現リズムに基づいた1日おきの1日2回持久的運動トレーニングがミトコンドリア量の増加を促進するか否かを検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 時計遺伝子の発現リズムに基づいた持久的運動トレーニングが筋組織内のミトコンドリア生合成に及ぼす影響について

被験動物は Wistar 系雄性ラットとした。また、動物飼育室は 8:00 に点灯、20:00 に消灯の明暗条件とし、20:00 を zeitgeber time (ZT) 0、8:00 を ZT12 と表した。*pgc-1 α* の概日リズムと同調していた *per2* の発現

リズムがピークを示す時間帯 (TR@ZT0) とボトムを示す時間帯 (TR@ZT10) のそれぞれで9週間のTRを実施した(図2)。また、それぞれのTRの時間帯に対応する対照群 (Con@ZT0 もしくは Con@ZT10) も作成した。TRはトレッドミル運動とし、5日/週の頻度で実施した(走行速度: ~30 m/min, 走行時間: ~90 min, 傾斜: 5°)。TR開始前には、予備トレーニングを3日間行った。なお、各TR期間の終了時点において被験動物の週齢が15週齢となるようにTR群のトレーニング開始時期の週齢を調整した。

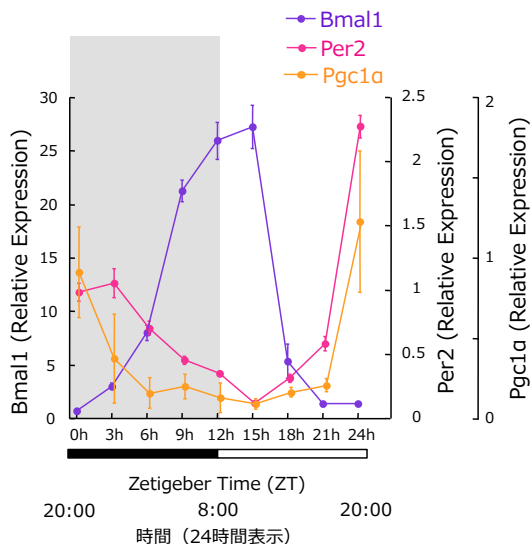


図2. Bmal1およびPer2, *pgc1a*の発現リズムについて。

最終のTR終了後48時間目に腓腹筋深層部位を摘出した。ウェスタンブローディング法によってミトコンドリアタンパク質であるCOXIVおよびCytochrome c、内在性コントロールとして α -tubulinを検出した。また、クエン酸合成酵素 (CS) activity を分光光度計にて測定した。

(2) 時計遺伝子の発現リズムに基づいた一過性持久的運動が筋組織内 *pgc-1a* の発現応答に及ぼす影響について

被験動物は Wistar 系雄性ラットとし、*pgc-1a* の概日リズムと同調していた *per2* 発現量がピークを示す時間帯 (Ex@ZT0) とボトムを示す時間帯 (Ex@ZT10) のそれぞれで一過性の持久的運動を実施した(走行速度: 17 m/min, 走行時間: 60 min, 傾斜: 5°)。また、それぞれの一過性運動を実施する時間帯に対応する対照群 (Con@ZT0 もしくは Con@ZT10) も作成した。一過性運動が終了した直後、3時間後、6時間後に腓腹筋深層部位を摘出し、real-time PCR をよって *pgc-1a* や *cs*, *cyto c* の mRNA 発現量を測定した。

(3) 時計遺伝子の発現リズムに基づいた1日おきの1日2回持久的運動トレーニングがミトコンドリア量の増加に及ぼす影響について

被験動物は Wistar 系雄性ラットとし、*pgc-1a* の概日リズムと同調していた *per2* 発現量がピークとボトムを示す時間帯のそれぞれで9週間TRを実施した。TR群は、1日1回TR群 (TR@ZT0 もしくは TR@ZT10) と1日おきの1日2回TR群 (2×TR@ZT0 もしくは 2×TR@ZT10) に分類した。1日2回TR群における1回目TRと2回目TRのインターバルは、運動に対するPGC-1 α の応答の特徴を鑑みて、3時間とした。最終のTR終了後48時間目に腓腹筋深層部位を摘出し、ミトコンドリア関連タンパク質 (Cytochrome c) と内在性コントロール (α -tubulin) の発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) 9週間のTRによっていずれのTR群もCon群と比較して、有意なミトコンドリア関連タンパク質 (Cytochrome c, COXIV) の増加やCS活性値の上昇が認められた。さらに、TR群間で比較したところ、*per2* と *pgc-1a* がそれぞれの発現量ボトムを示すタイミングで運動実施したTR@ZT10群がTR@ZT0群と比較して、有意なCOXIV発現量の増加およびCS活性値の上昇が認められた(図3)。以上のことから、運動実施タイミングの違いが骨格筋組織のミトコンドリア生合成に影響を及ぼす可能性が示唆された。

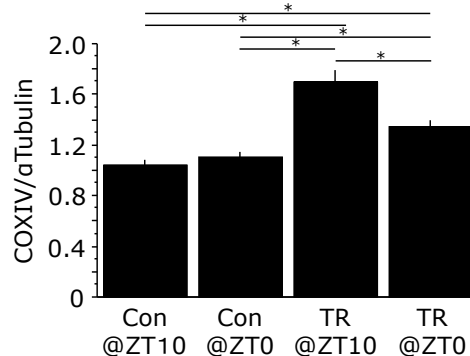


図3. 概日リズムに基づく9週間の持久的運動トレーニングがCOXIV発現量に及ぼす影響について。Mean \pm SE, n = 9-10 in each group, *: p < 0.05.

(2) Ex@ZT10群の運動直後における *pgc-1a* や *cs* の mRNA 発現量は Con@ZT10群と比較して増加した一方で、Ex@ZT0群では運動による *pgc-1a* 発現量の増加が認められなかった(図4)。したがって、運動を実施する時間帯によって一過性運動がミトコンドリア生合成やそれに関わる因子に及ぼす影響が異なる可能性が示唆された。

(3) 安静時の *pgc-1a* 発現量がピークを示す時間帯である2×TR@ZT0群でのCytochrome c発現量はCon@ZT10群と比較して有意に増加し、TR@ZT0群と比較して増加傾向を示した。その一方で、安静時の *pgc-1a* 発現量がボトムを示す時間帯である2×TR@ZT10群とTR@ZT10で比較したところ、群間で差が認

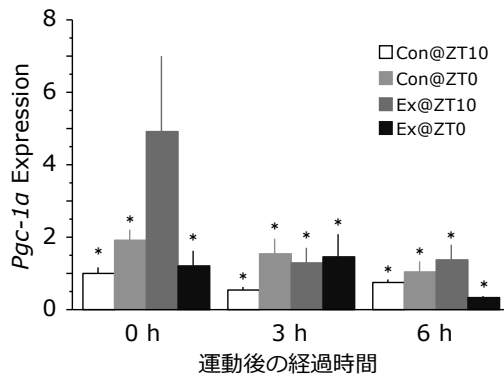


図4. 概日リズムに基づいた一過性運動に対する $pgc-1\alpha$ 発現量の経時的変化について.

Mean \pm SE, n = 6 in each group,
*: p < 0.05 .vs 0h at Ex@ZT10.

められなかった。以上の結果から、TR を実施する時間帯によっては、1 日おきの 1 日 2 回 TR が 1 日 1 回 TR と比較した際に、ミトコンドリア量の増加を助長する可能性が示唆された。

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 13 件)

- ① Takakura H, Kato H, Masuda S, Ueno D, Hieda M and Izawa T: RESPONSE AND ADAPTATION OF SKELETAL MUSCLE TO ENDURANCE TRAINING BASED ON CIRCADIAN RHYTHMS OF CLOCK GENE EXPRESSION. Intersociety Meeting: The Integrative Biology of Exercise VII. November 2-4, 2016. Phoenix (USA).
- ② Kato H, Takakura H, Hieda M, Ohira Y and Izawa T: EXERCISE TRAINING ALTERS EXPRESSION OF DEVELOPMENTAL GENES AND ADIPOGENIC POTENTIAL IN ADIPOCYTES AND ADIPOSE-DELIVERED STEM CELLS ISOLATED FROM SUBCUTANEOUS AND VISCERAL FAT DEPOTS. Intersociety Meeting: The Integrative Biology of Exercise VII. November 2-4, 2016. Phoenix (USA).
- ③ 加藤久詞, Minas Nalbandian, 高倉久志, 稗田睦子, 井澤鉄也: 皮下脂肪組織・内臓脂肪組織の発現遺伝子に及ぼす運動トレーニングの影響. 第 71 回日本体力医学会. 平成 28 年 9 月 23 日 岩手県民情報交流センター・盛岡地域交流センター市民文化ホール (岩手県・盛岡市) .
- ④ 稗田睦子, 高倉久志, 加藤久詞, 井澤鉄也: eNOS の日内変動と運動トレーニングの影響について. 第 71 回日本体力医学会. 平成 28 年 9 月 25 日 岩手県民情報交流センター・盛岡地域交流センター市民文化ホール (岩手県・盛岡市) .
- ⑤ 高倉久志, 上野大心, 加藤久詞, 増田慎也, 稗田睦子, 井澤鉄也: 時計遺伝子発現リズムに基づいた一過性運動が骨格筋の応答に及ぼす影響について. 第 71 回日本体力医学会. 平成 28 年 9 月 25 日 岩手県民情報交流センター・盛岡地域交流センター市民文化ホール (岩手県・盛岡市) .
- ⑥ 加藤久詞, 高倉久志, 井澤鉄也: 時計遺伝子 BMAL1 の発現リズムに基づいた運動トレーニングは脂肪分解反応に違いをもたらす. 第 24 回日本運動生理学会大会. 平成 28 年 7 月 24 日 熊本大学黒髪キャンパス (熊本県・熊本市) .
- ⑦ 高倉久志: 時計遺伝子発現リズムに基づいた運動実施タイミングの違いが骨格筋の応答および適応に及ぼす影響について. 第 8 回分子骨格筋代謝研究会. 平成 28 年 7 月 30 日 京都大学吉田南キャンパス (京都府・京都市) .
- ⑧ 高倉久志, 加藤久詞, 増田慎也, 上野大心, 和田理恵子, 柘植厚志, 奥野雄也, 浦崎僚大, 井澤鉄也: 時計遺伝子発現リズムに基づいた運動トレーニングがミトコンドリア生合成に及ぼす影響について. 京都滋賀体育学会第 145 回大会 (平成 28 年 3 月 13 日 同志社大学寒梅館 (京都府・京都市) .
- ⑨ 加藤久詞, 増田慎也, 高倉久志, 井澤鉄也: 脂肪組織における加齢に伴うホメオステック遺伝子の変化に及ぼす運動トレーニングの影響. 京都滋賀体育学会第 145 回大会 (平成 28 年 3 月 13 日 同志社大学寒梅館 (京都府・京都市) .
- ⑩ 高倉久志, 加藤久詞, 井澤鉄也: 時計遺伝子発現リズムに基づいた持続的運動トレーニングが骨格筋の有酸素性代謝能力に及ぼす影響について. シンポジウムテーマ「体内時計からみた体力医学」日本体力医学会第 30 回近畿地方会. 平成 28 年 2 月 20 日 大阪市立大学医学部 (大阪府・大阪市) .
- ⑪ 高倉久志, 加藤久詞, 増田慎也, 上野大心, 井澤鉄也: 時計遺伝子発現リズムに基づいた持続的運動トレーニングが骨格筋適応に及ぼす影響について. 第 70 回日本体力医学会. 平成 27 年 9 月 19 日 和歌山県民文化会館・ホテルアバローム紀の国 (和歌山県・和歌山市) .
- ⑫ 加藤久詞, 田中剛貴, 増田慎也, 高倉久志, 小笠原準悦, 櫻井拓也, 木崎節子, 大野秀樹, 井澤鉄也: 時計遺伝子の発現リズムに基づいた運動トレーニングが脂肪

分解反応に及ぼす影響. 平成27年9月19日 和歌山県民文化会館・ホテルアバローム紀の国（和歌山県・和歌山市）.

- ⑬ Takakura H, Kato H, Masuda S, Ueno D and Izawa T: EFFECT OF THE TIMING OF EXERCISE ON ENDURANCE TRAINING-INDUCED ADAPTATION IN SKELETAL MUSCLES. The 15th International Biochemistry of Exercise Conference. September 7-9, 2015. SaoPaulo (Brazil).

〔その他〕

受賞など

- ① 若手研究奨励賞, 京都滋賀体育学会第145回大会(京都府・京都市) 2016. 3.11., 受賞者: 高倉久志 他8名

6. 研究組織

(1)研究代表者

高倉 久志 (TAKAKURA, Hisashi)
同志社大学・スポーツ健康科学部・助教
研究者番号: 20631914

(2)研究分担者

(3)連携研究者

井澤 鉄也 (IZAWA, Tetsuya)
同志社大学・スポーツ健康科学部・教授
研究者番号: 70147495

増田 慎也 (MASUDA, Shinya)
京都医療センター臨床研究センター・糖尿病研究部・研究員
研究者番号: 80638403

稗田 睦子 (HIEDA, Mutsuko)
豊橋技術科学大学・総合教育院・准教授
研究者番号: 70707455

加藤 久詞 (KATOU, Hisashi)
同志社大学・スポーツ健康科学部・教授
研究者番号: 30780275

(4)研究協力者