

2008年度 修士論文

身体運動・トレーニングにより骨格筋で
発現する新規タンパク質の探索に関する研究

A study on exploring novel exercise-training induced protein
in rat skeletal muscle

早稲田大学 大学院スポーツ科学研究科

スポーツ科学専攻 身体科学研究領域

5007A066-6

山口 航

Yamaguchi, Wataru

研究指導教員： 樋口 満 教授

身体運動・トレーニングにより骨格筋で発現する新規タンパク質の探索に関する研究

身体運動科学研究領域

5007A066-6 山口 航

研究指導教員： 樋口 満 教授

【緒言】

身体運動・トレーニングにより、骨格筋では様々な適応が起こることが知られている。これは、主に運動・筋収縮に関係する様々なシグナルを介して最終的に生理学的機能をもつ分子、主にタンパク質の発現を高めていることが考えられる。しかしながら、それぞれの分子メカニズムには不明な点が多い。

これまで、そのメカニズムを解明しようとする研究が数多くなされてきたが、酵素活性など一つの機能に注目し、それを担うタンパク質を単離精製した後、そのタンパク質の部分アミノ酸配列をもとに遺伝子をクローニングする解析を基盤とした、個々の研究の積み重ねであった。一方で近年、ゲノム配列と質量分析を基盤とし、細胞に含まれるタンパク質を一度に網羅的に解析する方法に脚光を浴びるようになった。その代表的な手法がプロテオーム解析(proteome analysis)である。この手法により、時間・組織・種といった様々な変化要因による多くのタンパク質の発現変動を網羅的かつ定量的に検出することが可能である。

運動トレーニングによるタンパク質の発現には、運動によるシグナルの程度が影響を与えることが知られている。したがって本研究では、最新のプロテオーム解析技術(2D-DIGE)を用い、高い強度のトレーニングと低い強度のトレーニング後に発現するタンパク質を同定し、その差を見ることで、身体運動・トレーニングによる骨格筋のタンパク質発現の機序解明の一助とすることを目的とした。

【方法】

対象動物としてSD系雄性ラットを各実験にそれぞれコントロール群とトレーニング群に無作為に分けた。研究課題1では、低強度トレーニングのモデルとして無負荷で3時間の水泳運動を45分の休憩を挟んで2セット行う(計6時間)低強度・長時間水泳運動トレーニング(LIT)を行った。研究課題2では、高強度トレーニングのモデルとして体重の14~15%の錘を装着して20秒の水泳運動を10秒の休憩を挟んで14セット行う(計4分40秒)高強度・短時間水泳運動トレーニング(HIT)を行った。研究課題3では、さらに高強度高容量トレーニングのモデルとして研究課題2で用いたHITの運動を1日6回行う(計28分)高頻度・高強度・短時間水泳運動トレーニング(HIT6)を行った。トレーニングは5日間連続して行い、翌日(18時間後)に速筋線維優位である前肢滑車上筋(epitrochlearis)を摘出し、可溶性タンパク質を得た。次に、

2D-DIGEによって骨格筋で発現変動するタンパク質を解析し、興味あるタンパク質スポットを質量分析(MALDI-TOF/MS)によって同定した。

【結果・議論】

研究課題1では、プロテオーム解析により有意に1.3倍以上発現が増減したスポットが22個存在し(Fig. 1)、19個のタンパク質を同定した。研究課題2では、有意に発現が増減したスポットが13個存在し、13個すべてのタンパク質を同定した。研究課題3では、有意に発現が増減したスポットが18個存在し、9個のタンパク質を同定した。これらの実験結果をTable 1.にまとめた。

1) LIT、さらにHITでも数多くのミトコンドリア系酵素の発現が増加した。このうち、共通して発現増加したタンパク質はATPsyn β 、OGDH、m-MDHの3種類であった。これまで運動との関連で報告のないタンパク質(ATPsyn α , NDUFS1, -2, UQCRC1)が同定された。またNDUFS1,-2はHITでのみ増加するなど、運動様式の違いによる特異的な発現増加も観察された。これらの結果より、高強度トレーニングにより骨格筋の有酸素性代謝能の改善に関係の深いミトコンドリアタンパク質が発現増加することが明らかになった。筋グリコーゲンの分解過程の酵素であるglycogen phosphorylaseがHITでのみ発現減少した。これは、高い強度の運動中に乳酸産生の最初の段階の酵素活性を低くすることで疲労と関係の深い乳酸産生量を低下させるという高強度トレーニングによる適応かもしれない。2) ストレスタンパク質に関して高強度トレーニングに関する先行研究で既に報告されているようにHITでgrp 75が、HIT6で α B-crystallinが発現増加した。3) 収縮系タンパク質に関して、速筋線維と関係の深いタンパク質の発現減少した。これはこのように短期間(5日間)のトレーニングによっても、筋線維組成が変化している可能性を示しているのかもしれない。4) 速筋線維で発現が高い筋弛緩因子であるparvalbumin(PV)が、どの運動トレーニングによっても共通して発現減少した。特に、高強度の運動トレーニングでこのPVが減少することが初めて明らかとなった。ミトコンドリアの酸化系タンパク質の発現にPVが影響を与えている可能性を示した先行研究と本研究の結果から、PVの減少は必ずしも筋弛緩の機能低下を示しているのではなく、このタンパク質の発現と、筋の酸化的代謝能力(ミトコンドリア酵素活性の上昇など)の向上との関係があることが示唆された。

急性期応答タンパク質である α -1-antitrypsin precursor (α 1-AT precursor)の発現が HIT6 で減少した。このタンパク質は血清においては運動などの刺激によって濃度が上昇することは知られているが、このタンパク質が骨格筋由来のサイトカイン(マイオカイン)の前駆体である可能性も含めて今後の研究が望まれる。

【結論】

本研究のプロテオーム解析により、運動強度・時間・頻度の違いによって様々な骨格筋タンパク質の発現変動を知ることができ、計 41 個、22 種類のタンパク質を同定することができた。このうち、運動に関しての生理学的機能が既知のものや、不明なものが観察された。今回、新しい見解が得られたタンパク質については、in vitro, in vivo での様々な解析を行い、その機能を検証することが期待される。

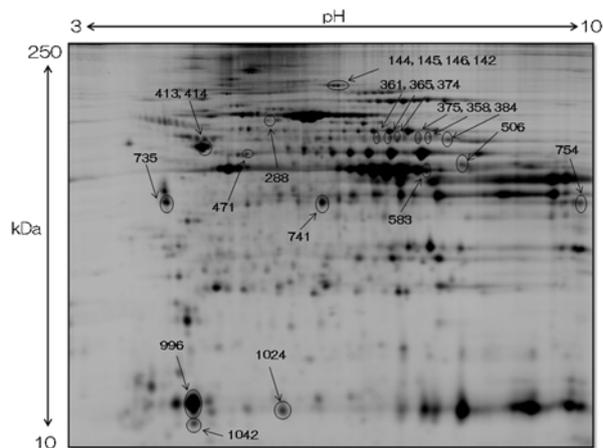


Fig. 1 Epitrochlearis muscle protein profiling by 2D-DIGE. Differential analysis of epitrochlearis muscle extracts after low-intensity prolonged training (LIT) compared to control (CON), revealed that 22 spots were differentially expressed ($p < 0.05$).

Table 1. Summary of identified proteins

protein name	function	vs control each experiment		
		LIT	HIT	HIT6
ATPsyn α	mitochondrial electron transport chain enzyme (complex V)	\nearrow $\times 1.8$	-	-
ATPsyn β	mitochondrial electron transport chain enzyme (complex V)	\nearrow $\times 1.3$	\nearrow $\times 1.4$	-
UQCRC1	mitochondrial electron transport chain enzyme (complex III)	\nearrow $\times 1.3$	-	-
NDUFS1	mitochondrial electron transport chain enzyme (complex I)	-	\nearrow $\times 1.5$	-
NDUFS2	mitochondrial electron transport chain enzyme (complex I)	-	\nearrow $\times 1.5$	-
OGDH	mitochondrial oxidative enzyme (TCA cycle)	\nearrow $\times 1.4$	\nearrow $\times 1.4$	-
dihydrolipoamide dehydrogenase	mitochondrial oxidative enzyme (PDH complex)	\nearrow $\times 1.5$	-	-
dihydrolipoamide acetyltransferase	mitochondrial oxidative enzyme (PDH complex)	\nearrow $\times 1.3$	-	-
m-MDH	mitochondrial oxidative enzyme (TCA cycle) /malate-aspartate shuttle	\nearrow $\times 1.3$	\nearrow $\times 1.3$	-
c-MDH	malate-aspartate shuttle	\nearrow $\times 1.3$	-	-
c-AST	malate-aspartate shuttle	\nearrow $\times 1.4$	-	-
FABP3	fatty acid transport	\nearrow $\times 1.6$	-	-
muscle glycogen phosphorylase	muscle glycogen degradation	-	\searrow $\times -1.4$	-
grp75	stress protein (glucose-regulated protein)	-	\nearrow $\times 1.6$	-
α B-crystallin	stress protein (small heat shock protein)	-	-	\nearrow $\times 1.6$
carbonic anhydrase 3	stress protein ?	-	-	\searrow $\times -1.4$
α -tropomyosin	contractile protein (fast-twitch skeletal muscle)	\searrow $\times -1.4$	-	-
MLC-f, phosphorylatable	contractile protein (fast-twitch skeletal muscle)	-	\searrow $\times -1.3$	\searrow $\times -1.4$
MLC1-f	contractile protein (fast-twitch skeletal muscle)	-	\searrow $\times -1.3$	-
α 1-actin	contractile protein	-	-	\searrow $\times -1.4$
parvalbumin	relaxing factor in fast-twitch skeletal muscle	\searrow $\times -1.3$	\searrow $\times -1.5$	\searrow $\times -1.5$
α 1-AT precursor	acute phase reactant	-	-	\searrow $\times -1.4$

目次

論文要旨

第1章 緒言 ……4

第2章 文献考証 ……7

I. プロテオミクスの歴史・背景

II. 筋を対象としたプロテオーム研究の歴史・背景

第3章 研究課題 1:

「5日間の低強度・長時間水泳運動トレーニングによりラット骨格筋で発現変動するタンパク質の網羅的解析」 ……17

I. 目的

II. 方法

III. 結果

IV. 論議

第4章 研究課題 2:

「5日間の高強度・短時間水泳運動トレーニングによりラット骨格筋で発現変動するタンパク質の網羅的解析」 ……33

I. 目的

II. 方法

III. 結果

IV. 論議

第5章 研究課題 3:

「5日間の高頻度・高強度・短時間水泳運動トレーニングによりラット骨格筋で発現変動するタンパク質の網羅的解析」 ……48

I. 目的

II. 方法

III. 結果

IV. 論議

第6章 総合討論	…59
I. 研究課題 1,2,3 で得られた結果の比較	
II. 今後の課題	
謝辞	…66
参考文献	…67

第1章 緒言

身体運動・トレーニングにより、骨格筋では様々な適応が起こることが知られている。例えば、持久力の向上、筋力の向上、筋肥大、糖・脂質代謝機能の向上、タンパク質・アミノ酸代謝回転の亢進、抗ストレス機構の亢進などが挙げられる。これらの適応現象は、運動・筋収縮に関係する様々な筋内シグナルを介して最終的に生理学的機能をもつ分子、主にタンパク質の発現を高めていることが考えられる。しかしながら、それぞれの分子メカニズムについては不明な点が多い。このメカニズムを理解することで、健康増進・スポーツ科学の分野において、タンパク質発現を指標とした分子生物学的アプローチに基づいた効果的なトレーニング処方 の確立が進むことが期待される。

これまでに、運動による骨格筋の適応のみならず、生体で起こる分子メカニズムを解明しようとする研究が数多くなされてきた。従来の生化学・分子生物学研究では、酵素活性など一つの機能に注目し、それを担うタンパク質を単離精製した後、そのタンパク質の部分アミノ酸配列をもとに遺伝子をクローニングする解析を基盤とした、個々の研究の積み重ねであった。一方で、ゲノム配列と質量分析を基盤とし、細胞に含まれる遺伝子、タンパク質の発現を網羅的に解析する方法が脚光を浴びるようになった。これが近年「オミックス研究」と呼ばれる生物の体の中にある分子全体を網羅的に調査する学問の一つである。遺伝子の総体であるゲノムの解読が完了して以来、遺伝子の網羅的な発現情報(トランスクリプトーム; transcriptome)や細胞内タンパク質総体(プロテオーム; proteome)など様々な種類の網羅的分子情報の収集・解析が急速に進展してきている。これにより、時間・組織・種といった様々な変化要因による多くの遺伝子・タンパク質の発現変動を網羅的かつ定量的に検出することが可能となった。今日の医学の分野では、これらのオミックス情報を分子のネットワーク・パスウェイに結びつけ、生命現象を分子レベルのシステムとして理解することを目指しているプロジェクトが進行している。

最近、運動科学・体力科学の分野においても、運動によって骨格筋で発現変動が認められる分子を以上のような網羅的解析によって探索するという試みがなされている。例えば、DNAマイクロアレイやSAGEとよばれる細胞内の遺伝子(mRNA)発現量を網羅的に解析する手法を用いて、一過性の持久的運動による筋の遺伝子発現を広範囲に観察し、その運動トレーニングによる機能向上の分子生物学的機序を明らかにする研究がある(Mahoney et al. 2005)。

細胞内でのタンパク質の合成の過程は、核内に存在する遺伝情報であるDNAがmRNAへと転写され、核外に出たmRNAが細胞質でタンパク質へと翻訳される。タンパク質の発現変動を左右する過程は、DNAからmRNAへと転写される際の転写の段階であると考えられている。しかしながら、mRNAの発現変動は必ずしもタンパク質の発現量を反映しないことが知られている(Griffin et al. 2002; Chen et al. 2002)。さらにmRNAの発現だけでは翻訳後修飾の情報を得ることができず、この修飾によって遺伝子の転写変動なしに細胞の機能的特性を変化させているかもしれない。

これに対し、実際に生理学的機能をもつ細胞内タンパク質を2次元電気泳動と質量分析を用いて網羅的に解析するプロテオーム解析(2-DE/MS)によって、持久的運動トレーニングや(Burniston, 2008)、一過性の水泳運動などで発現変動する新しいタンパク質の発見も観察されている(Guelfi et al. 2006; Takahashi and Kubota, 2005)。このような網羅的解析方法は、生体で起こる分子メカニズムを理解する上で重要なツールであると考えられる。しかしながら、運動と骨格筋に関する分野においてこの手法を用いた報告は乏しく、分子メカニズムの解明に役立つような新しい分子(転写因子など)の発見にまでは結びついていない。さらに、運動によるタンパク質の発現には、運動によるシグナルの程度が影響を与えることが知られている。したがって、本研究では、最新のプロテオーム解析技術(2D-DIGE/MS)を用い、高い強度のトレーニングと低い強度のトレーニング後に発現するタンパク質を同定し、その差を見ることで、身体運動・トレーニングにより骨格筋のタンパク質発現の機

序解明の一助とすることを目的とした。

第2章 文献考証

本章では、本研究で用いた「プロテオーム解析」について、その語源や歴史、技術内容を紹介し、続いて運動や筋に対しこの解析を使用した研究報告をまとめることとする。

I. プロテオミクスの歴史・背景

1) プロテオームとは

ヒトゲノムの全塩基配列の解読が終わり、研究の着眼点は遺伝子の構造解析から遺伝子の発現産物であるタンパク質の機能解析へと移行し始めている。これを受けて、近年、細胞に含まれるタンパク質を網羅的に解析するプロテオーム研究が注目を浴びている。1個の生物、細胞がもつすべての遺伝子の集合をゲノム(genome)と呼ぶのに対し、プロテオーム(proteome)とは、「タンパク質(protein)の集団(genome)」という造語であり、細胞がもつすべてのタンパク質の集合を意味している。このプロテオーム研究の総称はプロテオミクス(proteomics)と呼ばれており、関連する論文数は年々増加を続けている。

本来の意味のプロテオーム研究とは、細胞のすべてのタンパク質を同定し、タンパク質の動態、翻訳後修飾、タンパク質相互作用などの解析によってその機能を明らかにするとともに、各タンパク質が構築する機能ネットワークを解明することに最終目標をおいた研究のことである。この研究により、基礎生物学の分野で多くの発見をもたらしているが、最近では疾病の早期診断を目指す臨床医療や癌をはじめとする疾病の病因の解明、さらには創薬研究への適応など、プロテオーム解析法を高度医療技術とする試みも活発に行われるようになってきている(Hanash, 2003)。

2) プロテオーム解析技術内容

プロテオーム研究では、高性能な分析機器を駆使した多種多様なアプローチが存在する。

中でも、2次元電気泳動(two-dimensional electrophoresis; 2-DE)と質量分析(mass spectrometry; MS)をベースとしたプロテオーム解析(2-DE/MS)は、広く使用されている最も有効な方法のひとつである。その概要を Fig. 1-1 に示した。2次元電気泳動とは、1975年に O'Farrell が最初に発表した一度に数千ものタンパク質を分離する技術である。これは、サンプル中(組織、細胞など)に含まれるタンパク質を抽出し、個々のタンパク質のもつ等電点(pI)の違いを利用した等電点電気泳動(isoelectric focusing; IEF)と、分子量の違いを利用したポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)によってタンパク質を分離する分子生物学的な技術である。この手法により、一度の解析で数 100 から数 1000 種類のタンパク質が可視化された 2次元マップを作成して、時間・組織・種といった様々な変化要因によるタンパク質の発現変化が簡便に解析できるようになった。以上の理由から、2次元電気泳動はプロテオーム解析のためのタンパク質分離法として代表的な方法である。

また、質量分析に関しては、2002年にノーベル化学賞を受賞した田中耕一氏らが開発した、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry; MALDI-TOF/MS)による分析機器の出現により、高精度、高分解能、高感度の測定が可能となった。2次元電気泳動で明らかとなった興味ある(発現変動の見られた)タンパク質は、ゲルからスポットを実際に切り出した後、ゲル中で酵素特異的に消化したペプチド断片を使用して、この MALDI-TOF/MS とデータベース検索によって同定することができる。この同定の仕組みは、質量分析によって得られたサンプル固有の多数のペプチドイオンのピークを示すマススペクトルの集合(ペプチドマスフィンガープリント)と、データベース上に登録されているタンパク質の部分質量と比較照合することによって行われており、これをペプチドマスフィンガープリンティング (Peptide Mass Fingerprinting; PMF) 法と呼んでいる(Fig. 1-3)。また、最近では、タンデムマス質量分析(MS/MS)装置により、部分アミノ酸配列まで詳細な情報を得ることができるなどさらに高精度にタンパク質の同定が可能になり、タンパク質の分析技術を飛

躍させている。

3) 2D-DIGE

Unlu et al. (1997)は、2次元電気泳動の発展系として、蛍光標識ディファレンシャルゲル電気泳動法(2-dimensional difference gel electrophoresis ; 2D-DIGE)を初めて提唱し、これを受けて Tonge et al. (2001)がこの技術を発展させた。以降、この手法を用いた研究が頻出してきている。そして Amersham Biosciences 社(現 GE Healthcare 社)は独自の 2D-DIGE システム、Ettan DIGE system を確立した(Marouga et al. 2005)。今日までに、2D-DIGE を使用した研究報告は 1000 件にまでたどり着いている。

従来の 2次元電気泳動法には、発現差異解析において再現性に関する欠点が存在する。それは、2枚のゲルで個別に泳動した後、それぞれのゲル画像を比較解析するため、泳動の差異などゲル間で異なる様々な実験誤差の影響を受けることである。一方で 2D-DIGE では、異なる蛍光波長をもつ色素(CyDye; Cy2, Cy3, Cy5)を用い、泳動する前に各サンプルのタンパク質をあらかじめ標識(Cy3, Cy5)することで、i)同一のゲルで複数のサンプルを分離すること、すなわちゲル 1枚で 2群の発現比較が可能となった。さらに、ii) 比較するサンプルを等量ずつ混合した内部標準(Cy2 で標識)を使用することにより、ゲル間の泳動誤差が改善され、2次元電気泳動法の限界であった定量性、再現性が著しく向上した。この CyDye を使用した 2D-DIGE 法(Ettan DIGE system; GE Healthcare 社)の概要を Fig. 1-2 に示した。主にこの 2点から、2D-DIGE システムは従来の 2次元電気泳動をベースとしたプロテオーム解析を発展させ、タンパク質の発現変動を網羅的かつ定量的に検出することが可能となった。この解析方法はディファレンシャル解析と呼ばれている。

II. 筋を対象としたプロテオーム研究の歴史・背景

プロテオミクス技術を筋(muscle)に対して応用した研究はこれまで数多くの報告がなさ

れている。Ohlendieck のグループは、これまで病的状態、加齢に関する数々の骨格筋プロテオーム研究の報告をしており、2007 年に Review としてまとめている(Doran et al. 2007)。この Review では、2007 年までの主な骨格筋プロテオームのプロファイリング研究が紹介されている。これに最新の報告も加えて紹介することとする。

1) 筋プロテオームのレファレンスマップ作成

2000 年に 1 次元目の等電点電気泳動の向上(固定化 pH 勾配; Immobiline 法の開発)がなされてから、2 次元電気泳動の再現性も向上した。この方法の普及により、様々な種、部位における筋タンパク質の分離に関する研究が進められてきた。そこで、骨格筋において、2 次元電気泳動によってどのようなタンパク質がスポットとして可視化されるのかを示した研究がいくつか存在する。例えば、ヒト外側広筋のレファレンスマップ(Capitanio et al. 2005)や、マウス心筋と骨格筋の比較(Raddatz et al. 2008)、また、筋線維タイプに関してラット速筋 (EDL 筋; 長指伸筋)と遅筋 (soleus 筋; ヒラメ筋)の比較(Okumura et al. 2005)などが報告されている。これら多種にわたるレファレンスマップの作成とともに、サンプル調製など、2 次元電気泳動画像の改善も進められてきている。

2) 筋細胞におけるフォーカストプロテオーム研究

現在の技術では、含量の多いタンパク質の存在下で微量成分を検出することは難しい(ダイナミックレンジの不足)。そこで、特定のタンパク質セットに焦点を絞った解析を行う目的で、タンパク質を分画して単純化したプロテオームを便宜的に「フォーカストプロテオーム」と呼んでいる。すなわち、目的対象でない大量のタンパク質を除去することで、微量タンパク質の検出を試みるものである。この方法の一つに、細胞分画が挙げられる。実際、筋細胞に含まれる核、ミトコンドリアの細胞分画を抽出しそれらにフォーカスしたプロテオーム研究が存在する(Vitorino et al. 2007; De Palma et al. 2007)。しかしながら、核

に関しては特に、2次元電気泳動で分離し、可視化すると細胞骨格系タンパク質が大量に発現しているなどと、精製度に問題があるのが現状である(Vitorino et al. 2007)。

3) 様々な病的状態・刺激に対する骨格筋での発現比較プロテオーム研究

プロテオーム解析によって、生体への様々な刺激による骨格筋タンパク質の発現変動を網羅的に検討する研究がこれまで数多くなされてきている。主に、病的な状態で発現するタンパク質(疾病マーカー)を同定し、分子メカニズムの解明及び治療への応用を目標に行われている。

筋疾患としては筋ジストロフィーに関する研究が代表的であり、そのモデルとなるMDXマウスを用いたプロテオーム研究が数多く報告されている。Doran et al.(2006)は、MDXマウスの骨格筋でカルシウム結合タンパク質であるcalsequestrinやregucalcinが発現減少することを明らかにしている。

加齢に伴う骨格筋でのタンパク質の変動についてもプロテオーム解析が応用されている。加齢した骨格筋はサルコペニア(sarcopenia; 筋肉減少症)のモデルである。Doran et al. (2008)は、加齢ラットと若齢ラットとを比較したところ、pyruvate kinase と adenylate kinase が相反する変動を示したことを報告している。

代謝異常として、肥満、糖尿病の研究にプロテオーム解析が応用された報告が存在する(2報)。Højlund et al. (2003)は、2型糖尿病患者の骨格筋でATP synthase β のリン酸化が重要な意義をもっている可能性を示している。Hittel et al.(2005)は、肥満、極度肥満の女性を対象とし、骨格筋でadenylate kinase 1(AK1)などの発現が変動したことを報告している。

さらに、除神経(Isfort et al. 2000)、筋委縮を誘導する尾部懸垂 (Moriggi et al. 2008)など実験的処置での検討にもプロテオーム解析が応用されている。

低酸素刺激(hypoxia)が骨格筋に及ぼす影響を実験動物やヒトを対象に網羅的に検討している報告もされている(De Palma et al. 2007; Viganò A et al. 2008)。

以上の他にも、筋の発達、筋の分化、筋肥大などに関するプロテオーム研究も報告されている。

4) 運動刺激を与えた骨格筋・心筋の発現比較プロテオーム研究

次に、運動・筋活動に関しての報告(すべて対象は実験動物)はいくつか存在する。Burniston (2008)は、ラットに中強度(70~75% $\dot{V}O_2$ peak)、30分/日、4日/週、7週間の走行運動トレーニングを行わせた足底筋(plantaris)で、TCA回路の酵素であるミトコンドリアアコニターゼ(aconitase 2)など11種類のタンパク質が発現変動したことを報告している。Guelfi et al. (2006)は、空腹状態のラットに一過性の高強度水泳運動をさせた腓腹筋(gastrocnemius)でトロポニンTなど4つのタンパク質が発現変動したことを報告している。Takahashi and Kubota (2005)は、マウスに150分の一過性水泳運動をさせると、腓腹筋で9個のタンパク質スポットの発現変動が見られ、そのうちAI854635と呼ばれる機能未知の遺伝子産物が発現減少し、これが筋芽細胞の分化に関係する新規遺伝子の候補として提唱している。

また、慢性的・低頻度電気刺激(chronic low-frequency stimulation; CLFS)を、ラビットの前脛骨筋に14日間あるいは60日間施すと、計41個のタンパク質の発現変動が見られ、その中でアクチン結合タンパク質であるcofilin-2や、内皮マーカであるtransgelinが筋線維組成の移行の新規マーカとして提唱している(Donoghue et al. 2007)。この研究には先述した2D-DIGE法を使用している。

一方、心筋に注目した研究も存在する。Boluyt et al. (2006)は、ラットに高強度のトレッドミル運動を15~60分/日、5日/週、6週間行わせたトレーニング後の心筋で、Hsp20の発現が増加するなど、他4種類のタンパク質が発現変動したことを報告している。この後にBurniston (2009)は、骨格筋で行った実験を心筋についても同様に行った結果、持続的トレーニングによりHsp20のリン酸化を引き起こしたことを明らかにしている。また、

Sun et al.(2008)は、ラットに 1~2 時間/日、6 日/週、8 週間の持久的水泳運動トレーニングで心肥大した心筋で、代謝系、細胞骨格系、シグナル伝達系、ストレス系、酸化系など 18 種類のタンパク質の発現変動が見られたことを報告している。

以上の研究は、すべて 2 次元電気泳動を用いて行われている。しかしながら、純粹に生体に運動をさせ、骨格筋に含まれるタンパク質に注目した実験で、先述した 2D-DIGE と呼ばれる定量性に改善がなされた新しい手法を使用した報告はない。そこで、本研究は、この最新技術を取り入れたプロテオーム解析 (2D-DIGE/MS)を用いて、身体運動・トレーニングにより骨格筋組織で発現が増減するタンパク質の同定を行うこととした。

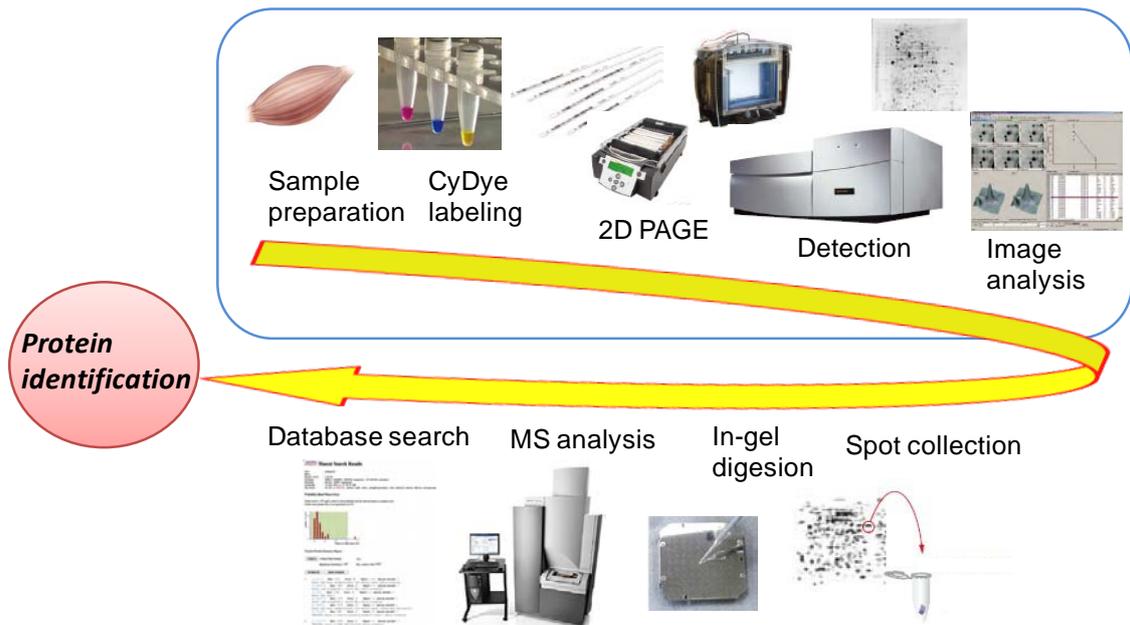


Fig. 1-1 Proteome analysis workflow involved in 2D-DIGE (2-dimensional difference gel electrophoresis)

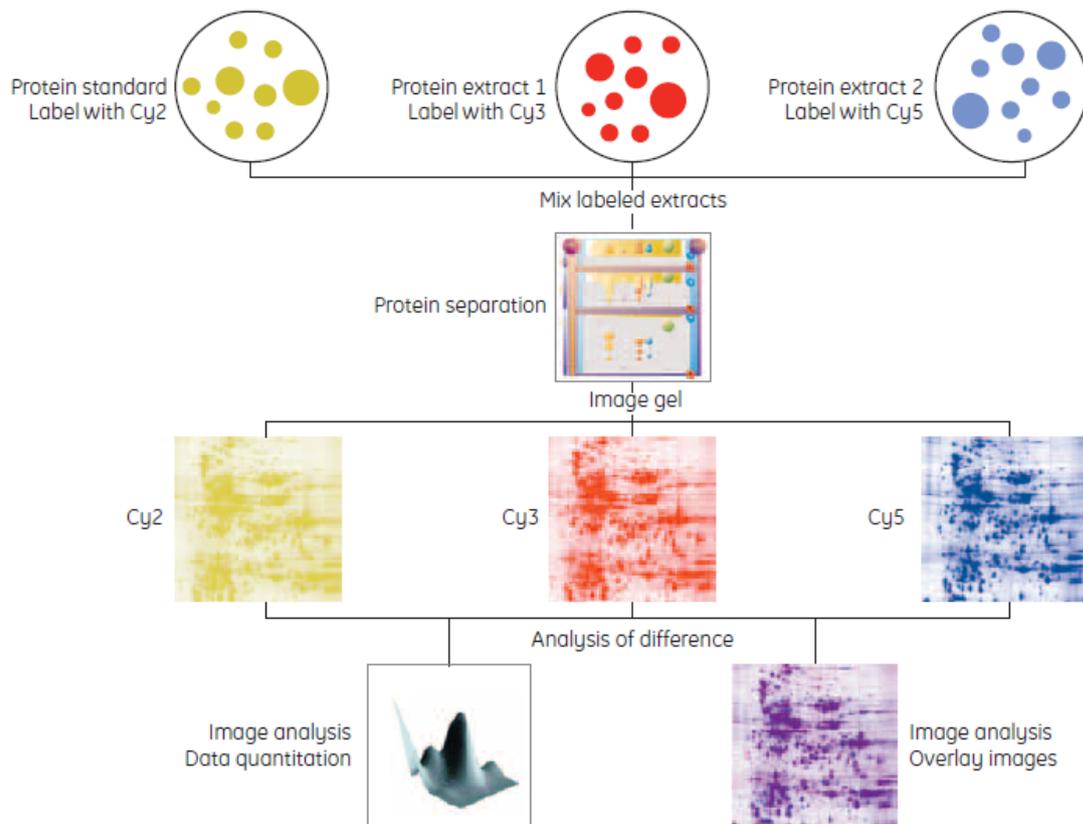


Fig. 1-2 Multiplexing using the CyDye DIGE fluor minimal dye option with Ettan DIGE system (GE Healthcare)

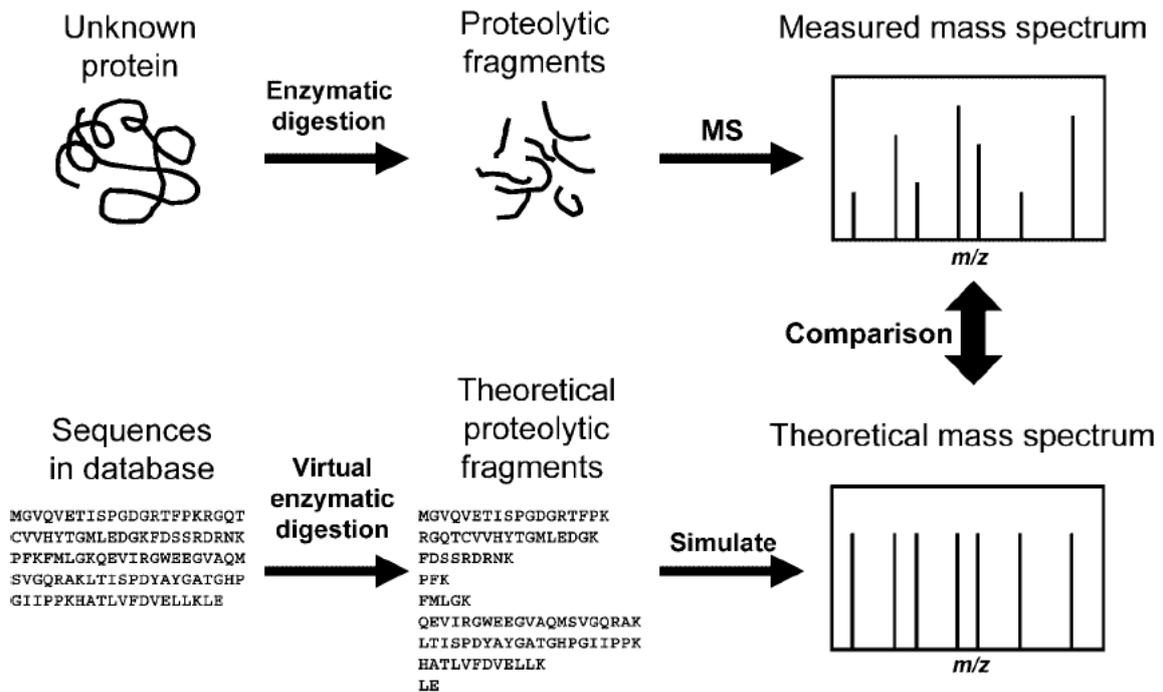


Fig. 1-3 Schematic illustrations of protein identification by peptide mass fingerprinting (Yoshino et al. 2004)

第3章 研究課題1

「5日間の低強度・長時間水泳運動トレーニングによりラット骨格筋で発現変動するタンパク質の網羅的解析」

I. 目的

研究課題1では、これまで健康増進や持久的運動能力向上のために一般的に行われている低強度・長時間運動トレーニングによって骨格筋で発現変動するタンパク質を網羅的に解析することを目的とした。

ラットにおいて、低強度・長時間水泳運動トレーニング(low-intensity prolonged swimming training: LIT)を行うことにより、骨格筋で糖取り込み機能と強い関係のあるタンパク質である糖輸送体 GLUT4 の発現や、ミトコンドリア新生のマーカであるクエン酸合成酵素(CS)活性などが最大限に増加することが認められている(Terada et al. 2001, 2004)。本研究ではプロテオーム解析法を用いることにより、低い強度のトレーニングで発現変動する骨格筋のタンパク質を同定し、それぞれのタンパク質の生理学的意義を検討した。

II. 方法

1. 実験動物

実験動物として4週齢(体重70~80g)の雄性Sprague-Dawley系ラットを日本クレア社より購入した。ラットは室温 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60\pm 5\%$ に保たれた飼育室にて、実験動物用固形飼料(日本クレア社製:CE-2)および飲料水を自由摂取させながら飼育した。照明は、午前7時と午後7時を境とする明暗サイクルとした。

2. 群分け

ラットは、無負荷で3時間の水泳運動を45分の休息を挟んで2セット行う低強度・長時間水泳運動トレーニング(low-intensity prolonged swimming training: LIT)群と、非運動群として終日ケージに入れておくコントロール(CON)群の2群に5匹ずつ無作為に分けた。

3. 運動プロトコル

4日間の予備飼育期間中、水泳運動に慣れさせる目的で、LIT群のラットに10分間の水泳運動を2日間行わせた(Ren et al. 1994)。トレーニング期間は連続した5日間とし、1日1回の頻度で行った。90L容量のポリバケツに水深45cmまで $35 \pm 1^\circ\text{C}$ の温水を入れ、LIT群のラットに対し無負荷で3時間の水泳運動を45分の休憩を挟んで2セット(計360分)行わせた。

4. 分析方法

(1) 筋サンプル採取

最終トレーニング終了の翌日(18時間後)に、両群のラットに体重100g当たり5mgのペントバルビタール・ナトリウムネンブタール注射液(大日本製薬社製)を腹腔投与し麻酔した後、前肢滑車上筋(Epitrochlearis; Epi)を摘出した。このEpi筋は、速筋線維優位(Type II fiber: ~90%)であり、本研究で用いた水泳運動トレーニングによってこの骨格筋が動員されることが数々の研究で報告されている(Nesher et al. 1980; Terada et al. 2001, 2004)。摘出した筋サンプルは液体窒素にて冷却したクランプに挟んで凍結させた後、分析まで -80°C で保存した。

(2) サンプル調製

LIT群とCON群のラットの滑車上筋を、筋重量の29倍量のRIPA buffer [50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Nonidet P-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM

EDTA, 1 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate(Na_3VO_4), 2 $\mu\text{l/ml}$ Protease Inhibitor Cocktail (Sigma 社製)]で氷中にてホモジナイズした。その後、凍結-溶解を3回繰り返し、700 \times gで15分間遠心し、その上清をサンプルとした。

得られたサンプルを2D-Clean-Up kit(GE Healthcare 社製)により脱塩、濃縮し、得られた沈殿物をLysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4 % w/v CHAPS, 30 mM Tris, pH 8.5)にて溶解した。溶解したサンプルのタンパク質量は2D-Quant kit(GE Healthcare 社製)にて定量した。

(3) サンプルの蛍光標識

蛍光試薬はGE Healthcare社のCyDye DIGE fluor minimal dyeを用いた。タンパク質サンプルを同社のプロトコルに従って、Cy3, Cy5により暗所で30分間、氷上で標識した(50 μg protein/400 pmol dye)。Cy3とCy5間の標識効率の差異による誤差を避けるために、それぞれの群の半分をCy3で、もう半分をCy5で標識した(Table 3-1.)。また、内部標準としてすべてのサンプルを等量ずつ混合したものを別チューブに用意し、Cy2 蛍光色素で標識した。同一ゲルに添加するそれぞれCy2, Cy3, Cy5で標識したサンプル(タンパク質量: 50 μg)をTable 3-1.のように混合した。

(4) 蛍光ディファレンスゲル2次元電気泳動(2D-DIGE)

標識したサンプルを等量の2 \times サンプルバッファー[7 M urea, 2 M thiourea, 4 % w/v CHAPS, 2.4 % v/v DeStreak Reagent (GE Healthcare 社製), 1 % v/v IPG buffer pH 3-10]を添加した後、膨潤バッファー(7 M urea, 2 M thiourea, 4 % w/v CHAPS, 1.2 % DeStreak Reagent, 0.5 % IPG Buffer pH 3-10)を加えて、タンパク質150 μg あたりの総液量が450 μL となるように調製した。全液量を、固定化pH勾配ゲルであるIPG Drystrip [24 cm, pH 3-10, linear (GE Healthcare 社製)]に添加し、IPGphor 3 Isoelectric Focusing Unit (GE

Healthcare 社製)を用いて、一晚膨潤した後(20°C, 15 時間)、等電点電気泳動を 500V(1 時間)、1000V(1 時間)、8000V(~7 時間)のプログラムで行い、45kVhr に達した時点で終了した。この 1 次元目の泳動後、平衡化バッファ(6 M urea, 30 % v/v glycerol, 2 % w/v SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 1 % w/v DTT)で IPG Drystrip の SDS 平衡化を行い、次に DTT の代わりに 130 mM iodoacetamide(IA)を含む同じバッファでさらにインキュベーションした。2 次元目の SDS-PAGE は、Ettan DALTsix Large Electrophoresis System (GE Healthcare 社製)を用いて、12.5 %均一 Laemmli gel (24×20 cm)上に IPG Drystrip を設置し、30°Cで 1 W/gel で 60 分、さらに 2 W/gel で一晚泳動した。

(5) 画像解析

電気泳動後、Typhoon 9400 scanner (GE Healthcare 社製)により、それぞれ Cy2, Cy3, Cy5 の各最適励起波長(Cy2 : 488 nm、Cy3 : 532 nm、Cy5 : 630 nm)で蛍光標識タンパク質のイメージ(ゲル 5 枚×3)を、100 μm の解像度で取り込んだ。

画像解析は、DeCyder V. 5.0 software (GE Healthcare 社製)を用いて、製造元の推奨プログラムに従って行った(Marouga et al. 2005; Karp et al. 2004)。Differential In-gel Analysis(DIA)および Batch Processor モジュールによりスポット検出、定量解析を行い、最終的に Biological Variation Analysis(BVA)モジュールを用いて内部標準サンプルを介したゲル間のスポットマッチングおよび定量値の標準化、Student's T-test による有意差検定を行った。

(6) ゲル内消化(in gel digestion)

2D-DIGE 解析に使用したのと同じサンプル(約 400 μg)を用い、質量分析用ゲルを作成、泳動し、SYPRO Ruby (Invitrogen 社)を用いて同社推奨プロトコルに従って染色した。

タンパク質のゲル内消化は、Shevchenko et al. (1996)の方法を一部修正して行った。各

タンパク質スポットを UV トランスイルミネーター上で切り出し、約 1 mm³の大きさにカットしてそれぞれ回収した。ゲルは、100mM NH₄HCO₃(重炭酸アンモニウム)で洗浄した後に、アセトニトリル(ACN)で脱水し、さらに減圧濃縮遠心エバポレータ(Speed Vac)を用いて乾固した。次に、ゲルを 10 mM DTT/100 mM NH₄HCO₃溶液でシステイン残基を還元し(56°C)、55 mM iodoacetamide(IA)/100 mM NH₄HCO₃溶液でアルキル化した。さらに再度ゲルを重炭酸アンモニウム溶液、アセトニトリルで洗浄・脱水し、乾固させた後、トリプシン溶液[12.5 ng/μL sequencing grade modified trypsin (Promega 社製), 50 mM NH₄HCO₃, 5 mM CaCl₂]を添加し、氷上でインキュベーションした。消化反応後、上清を取り除き、50 mM NH₄HCO₃/5 mM CaCl₂溶液に 37°Cで一晩浸した。この処理によりゲル内で消化されたペプチドを 20 mM NH₄HCO₃、5 %ギ酸/50 % ACN 溶液を用いて回収し、その回収した抽出液を Speed Vac で濃縮した。

(7) 質量分析と PMF(peptide mass fingerprinting)法によるタンパク質の同定

得られたペプチド抽出液に対し、逆相カラムの担体が固定された ZipTip μ-C18 ピペットチップ(Millipore 社製)を用いて脱塩処理を行った。ピペッティングによりサンプルをカラムに吸着後、50 % ACN/0.1 % TFA(トリフルオロ酢酸)に溶出させ、さらに濃縮した各ペプチド溶液を matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS)解析(Voyager DE-STR, Applied Biosystems 社製)用のプレートにそれぞれ添加した。プレート上のペプチド溶液に、内部標準物質(ACTH, bradykinin, SIGMA 社製)とマトリックス溶液[10 mg/mL α-CHCA(α-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸)in 50 % ACN/0.1 % TFA]を混合させ、サンプルを結晶化した。ペプチドの質量分析は、リフレクターモードを使用し、測定質量範囲を 700~3600 Da とした。

タンパク質の同定は、Matrix Science 社の MASCOT (<http://www.matrixscience.com>)と、Rockefeller Univ.が提供している ProFound(<http://prowl.rockefeller.edu>)の2つのソフトウ

エアを利用して行った。検索には NCBI データベースを用い、生物種: *rattus norvegicus*、消化酵素: trypsin、理論ペプチド分子量との許容範囲(Peptide tolerance): 100 ppm の条件下で行った。

III. 結果

低強度・長時間水泳運動トレーニング群(LIT)とコントロール群(CON)で、ラット Epi 筋において発現しているタンパク質を 2D-DIGE 法によってディファレンシャル解析を行った結果、すべてのゲルで約 1000 スポット検出され、その中で 681 スポットがすべてのゲル間でマッチして検出された。さらに、統計的に有意に 1.3 倍以上発現が増減したスポットが 22 個存在した(Fig. 3)。このうち、19 スポットが発現増加し、残りの 3 スポットが発現減少した。さらに MALDI-TOF/MS によって 19 個のタンパク質の同定に成功した(Table 3-2)。

同定したタンパク質のうち、代謝系タンパク質 16 個すべてが発現増加した。それらを分類すると、ミトコンドリア電子伝達系酵素[**ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit** (spots 374 and 358)/**ATP synthase beta subunit** (spots 414 and 413)/**ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1** (spot 471)]、ミトコンドリア酸化系酵素[**oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)** (spots 142, 146, 145, and 144) / **dihydrolipoamide dehydrogenase** (spots 361 and 365) / **dihydrolipoamide acetyltransferase** (spot 288)]、脂肪酸結合タンパク質[**fatty acid binding protein 3, muscle and heart** (spot 1024)]、リンゴ酸-アスパラギン酸シャトル[**Cytosolic aspartate aminotransferase** (spot 583) / **malate dehydrogenase, mitochondrial** (spot 754) / **malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)** (spot 741)]であった。

さらに、収縮系タンパク質[**striated-muscle alpha tropomyosin** (spot 735)]や、その他[**parvalbumin** (spot 996) / **Chain 1, Refined X-Ray Structure Of Rat Parvalbumin,...** (spot 1042)]などのタンパク質が発現減少した。

IV. 論議

1) 代謝系タンパク質

1-1) ミトコンドリア系酵素

本研究のプロテオーム解析により、LIT群でミトコンドリア電子伝達系酵素であるATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit (ATPsyn α)、ATP synthase beta subunit (ATPsyn β)、ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1 (UQCRC1) や、ミトコンドリア酸化系酵素である oxoglutarate dehydrogenase (OGDH)、dihydrolipoamide dehydrogenase と dihydrolipoamide acetyltransferase、計 6 種類のタンパク質が、CON群に比べ有意に約 1.3~1.8 倍発現増加した(p<0.05)。このうち、ATPsyn β 、OGDHについてはこれまでに運動トレーニングで増加する報告がある(Rose et al. 2007, Tikkanen et al. 1995)。

ATPsyn α 、UQCRC1、dihydrolipoamide dehydrogenase、dihydrolipoamide acetyltransferase は初めて運動トレーニングで増加することが明らかとなった。

Burniston (2008)のプロテオーム研究では、ラットに中強度(70~75% $\dot{V}O_2$ peak)、30 分/日、4 日/週、7 週間の走行運動トレーニングを行わせ、足底筋(plantaris; 速筋線維優位)で発現変動したミトコンドリアタンパク質は、TCA 回路の酵素である aconitase 2、succinate CoA のみ(2 spots)であった。本研究ではこの 2 つのタンパク質は同定されなかったが、6 種類(12 spots)ものミトコンドリアタンパク質が発現増加し、ミトコンドリア酸化系だけでなく電子伝達系に関わる酵素も見られた。これは、Burniston の研究では、i)染色における感度(CBB 染色, 感度: 100 ng)が比較的低いからか総検出スポット数が 187 と少ないこと、ii) 定量的な手法である 2D-DIGE を用いていないことに対し、本研究では蛍光色素である CyDye(感度: 1 ng)を用いた 2D-DIGE を行い、高感度かつ定量的に解析したためにこのような結果の違いが出たと推測される。また、運動条件に関しては、強度を除けば本研究の

ほうが総運動時間が2倍も長い(Burnistonの研究: 14時間、本研究: 30時間)ことも、原因の一つとして考えられるかもしれない。

Donoghue et al. (2007)は、慢性的・低頻度電気刺激(chronic low-frequency stimulation; CLFS)を施した前脛骨筋(速筋線維優位)に対し、プロテオーム解析を行っている。この研究では2D-DIGEでの解析によって、985個のスポットがすべてのゲル間でマッチして検出され、41個のスポット変動があったことを報告している。この結果、[Cytochrome c oxidase /NADH-ubiquinone oxidoreductase/pyruvate dehydrogenase/ubiquinol-cytochrome c reductase/ATP synthase, mitochondria F1 complex (F1ATP synthase)]などのミトコンドリア系酵素の発現が増加することを明らかにしている。このうち、pyruvate dehydrogenase (PDH)は dihydrolipoamide dehydrogenase と dihydrolipoamide acetyltransferaseと同じPDH複合体の構成酵素であり、ubiquinol-cytochrome c reductaseはUQCRC1が構成している酵素本体であり、F1ATP synthaseはATPsyn α 、ATPsyn β を構成している複合体である。本研究のプロテオーム解析で増加したOGDHは、CLFSの実験では同定されていない。また、このCLFSは遅筋化の実験モデルとして広く使用されているが、運動という刺激の面からは生理学的とは考えにくい。

ミトコンドリア電子伝達系酵素に関して、本研究のLITでATP synthase、H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit (ATPsyn α)、ATP synthase beta subunit (ATPsyn β)、ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1 (UQCRC1)の3種類のタンパク質が発現増加した。ミトコンドリア内膜では、呼吸鎖を構成する複合体(I～IV)を介して電子を伝達し、それに伴い生じたプロトン(H⁺)濃度勾配を利用して複合体VによりADPからATPを合成する。骨格筋ATPsyn β は、持久的トレーニングによって増加することが報告されている(Rose et al. 2007)。一方でUQCRC1とATPsyn α については運動によって発現増加する報告はされていないが、本研究では発現増加が見られた。UQCRC1に関しては、UQCRC2が運動トレーニングで発現増加することが報告されており(Hittel et al.

2005)、この二つは電子をシトクロムcに渡す機能をもつ電子伝達系酵素複合体IIIを構成するサブユニットである。ATPsyn α に関しては、ATPsyn β と同じくADPと結合してATPを合成する機能をもつ電子伝達系酵素複合体Vの構成するサブユニットである。すなわち、本研究における低強度・長時間運動トレーニングによってミトコンドリア電子伝達系酵素複合体III、Vを構成するタンパク質がそれぞれ発現増加し、この二つの電子伝達系酵素複合体の発現が増加することが確認された。

ミトコンドリア酸化系酵素に関して、本研究のLITでoxoglutarate dehydrogenase (OGDH)、dihydrolipoamide dehydrogenaseとdihydrolipoamide acetyltransferaseの3種類のタンパク質が発現増加した。OGDHは、2-オキソグルタル酸脱水素酵素(OGDH)複合体の構成酵素の一つであり、TCA回路における2-オキソグルタル酸→スクシニルCoAの反応を触媒する。このOGDH活性は、低強度の持久的トレーニングによって増加することが報告されている(Tikkanen et al. 1995)。

dihydrolipoamide dehydrogenase と dihydrolipoamide acetyltransferase は、それぞれピルビン酸脱水素酵素(PDH)複合体の構成酵素(PDH-E2, PDH-E3)であり、解糖系でピルビン酸→アセチル CoA の反応を触媒する。この2つのタンパク質は、75 % VO₂maxでの持久的トレーニングによってPDH-E2, PDH-E3の発現量は変化しなかったことが報告されている(LeBlanc et al. 2004)。このLeBlanc et al.の研究では、持久的トレーニングでPDH-E1(=PDH)の発現量と総PDH活性は増加したことから、総PDH活性を決定するのはPDH-E1(=PDH)であると考えられている。一方、本研究におけるプロテオーム解析ではPDH-E2, PDH-E3が発現増加したが、PDH-E1の発現はその差異が認められなかった。本研究ではPDH活性を測定していないため今後の研究課題であるが、もしPDH活性が増加しているとすると、PDH-E2, PDH-E3もその活性に影響を与えているのかもしれない。

以上の知見から、本研究において低強度・長時間運動トレーニングにより、種々のミトコンドリア系酵素の発現量が増加することが明らかとなった。

また、持久的な運動トレーニングにより種々の骨格筋ミトコンドリア系酵素の活性が上昇することは古くからよく知られている(Holloszy and Booth, 1976)。これは、運動によって nuclear respiratory factor-1(NRF-1)や estrogen-related receptor α (ERR α)などの発現が増加し、それらが転写因子としてミトコンドリア系酵素のタンパク質の発現を調節していることが考えられている(Murakami et al. 1998; Schreiber et al. 2004)。さらに、最近、ミトコンドリア系酵素の発現調節において重要な役割を果たしていることが示唆されている peroxidase proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α)と呼ばれるタンパク質が注目されている。この PGC-1 α は、NRF-1 や ERR α など多くの転写因子群と結合し、ミトコンドリア系酵素の mRNA 発現を促進していると考えられている(Lin et al. 2005; Scarpulla, 2008)。さらに、骨格筋 PGC-1 α は、本研究と同様な運動・トレーニング方法で増加することや(Terada et al. 2004; Goto et al. 2000)、5日間という短期間のトレーニングで PGC-1 α ならびにミトコンドリア酵素活性が増加することがわかっている(Baar et al. 2002)ことから、本研究でも骨格筋 PGC-1 α 発現量が増加している可能性が高い。

1-2) 脂肪酸輸送

本研究により、LIT 群で fatty acid binding protein 3, muscle and heart(FABP3)が CON 群に比べ有意に 1.55 倍発現増加した ($p<0.05$)。このタンパク質は、既に運動・トレーニングによって発現増加することが知られている。

FABP(脂肪酸結合タンパク質)は、近年、脂質代謝において遊離脂肪酸(FFA)の細胞内への取り込みと輸送に関与すると考えられている。FABP3 は、Heart-type FABP(H-FABP)とも呼ばれ、骨格筋や心筋で発現しているタンパク質である(Chmurzyńska 2006)。FABP3 は、活動筋において長鎖脂肪酸と糖の利用の決定に重要な役割をもっていることが示唆されている。H-FABP 欠損マウスでは、運動中の脂肪酸の利用が減少し、糖の利用が増加したことが報告されている(Shearer et al. 2005)。Clavel et al. (2002)は、8週間の水泳運動ト

レーニングにより、ラット速筋線維優位の骨格筋(EDL)で FABP 含量が増加したことを報告している。さらに、持久的なトレーニングをしている人では、座りがちな人に比べて FABP3 mRNA 発現が高く、さらにミトコンドリア脂肪酸酸化に関わる遺伝子発現に重要な役割をもつと考えられている peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α)と高い相関を示したことが報告されている(Schmitt et al. 2003)。これは、FABP3 が PPAR α の下流に存在する遺伝子であり(Fujishiro et al. 2002)、PPAR α は持久的トレーニングにより発現量が増加することが知られているため(Horowitz et al. 2000)、持久的なトレーニングによって骨格筋における脂肪酸の取り込みとそれを酸化する能力が向上していることが考えられる。また、慢性的・低頻度電気刺激(CLFS)によって速筋タイプの骨格筋を遅筋化させると、2D-DIGE 解析によって FABP3 の発現量が増加したことから、筋線維組成の移行のバイオマーカーとしても考えられている(Donoghue et al. 2007)。

以上より、本研究における低強度長時間の運動トレーニングによって骨格筋 FABP3 の発現量が増加したことから、遊離脂肪酸の取り込みが増加した可能性が考えられる。

1-3) リンゴ酸 - アスパラギン酸シャトル

本研究により、LIT 群で Cytosolic aspartate aminotransferase (c-AST)と、malate dehydrogenase 1, NAD (c-MDH)、malate dehydrogenase, mitochondrial (m-MDH)が CON 群に比べ有意に約 1.3~1.4 倍発現増加した ($p<0.01$)。運動トレーニングに関して、これらの酵素が増加することは過去に報告されている(Hittel et al. 2005)。これらの酵素は、ミトコンドリア外の NADH のエネルギー(電子)を、電子伝達系で利用するためにミトコンドリア内へ転送する役割を担うリンゴ酸-アスパラギン酸シャトル(MA shuttle)に関するタンパク質である。このうち、c-AST は、glutamate-oxoglutarate transaminase(GOT1)としても知られ、MA shuttle の律速酵素であることが知られている(Barron et al. 1998)。よって、本研究の低強度・長時間運動トレーニングにより、筋中の MA shuttle に関わる酵

素が発現増加したことが明らかとなった。これは、運動により筋中の MA shuttle での代謝回転が亢進していることを意味しているのかもしれない。

2) 収縮系タンパク質

本研究により、LIT 群で striated-muscle alpha tropomyosin が CON 群に比べ有意に 1.36 倍発現減少した ($p < 0.01$)。

tropomyosin(トロポミオシン)はアクチン上に存在するタンパク質であり、トロポニンに結合し、筋収縮の制御に関与している。骨格筋では、本研究で同定された α トロポミオシンと β トロポミオシンの 2 種類のアイソフォームがあり、 $\alpha\alpha$ 、 $\beta\beta$ 、 $\alpha\beta$ と 2 量体で存在している。また、遅筋線維に比べて速筋線維では α タイプの発現量が高く、 α/β の比が高いことも知られている(Cummins and Perry, 1974)。よって、本研究における低強度・長時間運動トレーニングにより α タイプのトロポミオシンの発現量が減少したのは、速筋線維優位である Epi 筋での筋線維組成の変化によるのかもしれない。これは、このような短期間のトレーニング中においても筋線維組成が変化している可能性を示しているのかもしれない。

3) その他

本研究により、LIT 群で parvalbumin(PV)が CON 群に比べ有意に 1.32 倍発現減少した ($p < 0.01$)。PV は、細胞質に局在する高親水性カルシウム結合タンパク質であり、骨格筋や心筋、脳の海馬で発現している。骨格筋において、PV は遅筋線維と比べて速筋線維の方で高濃度に存在する。さらに詳細には、Type II b 線維で PV は最も発現が高く、次いで II d/x であり、II a と I ではごく微量でしか発現していない(Schmitt and Pette, 1991)。筋における PV の生理学的機能は、細胞内 Ca^{2+} 緩衝作用とそれに伴う筋弛緩因子(relaxing factor)である。速筋線維において、筋収縮時に筋小胞体から放出された Ca^{2+} に PV が結合することで、 Ca^{2+} を再び筋小胞体に回収する役割をもっており、これにより筋弛緩速度を増加させてい

ると考えられている(Rall, 1996; Berchtold et al. 2000)。

運動・筋活動が PV 発現に及ぼす影響を観察した研究はいくつか存在する。そのほとんどが、長期の持久的トレーニングあるいは慢性的な低頻度電気刺激(CLFS)により、速筋線維で PV 発現量が減少したことを報告している(Gallo et al. 2008; Green et al. 1984; Huber and Pette, 1996)。さらに、CLFS ではプロテオーム解析(2D-DIGE)によっても PV 発現量の減少が認められている(Donoghue et al. 2007)。これらの結果は、運動トレーニングなど筋の活動量の増加により速筋線維で遅筋化が進行したためと考えられており、骨格筋において PV は筋線維組成の移行、すなわち遅筋化のマーカーとして知られている。

本研究では、5 日間という比較的短期間の持久的トレーニングであった。PV タンパク質について、Gallo et al. (2008)の研究で 13 週間の自発性運動で約 50%の減少が、Green et al. (1984)の研究で 15 週間の走行運動で約 40%の減少が観察されたことに対して、本研究での 5 日間の運動トレーニングで遅筋化が本当に進行しているかは疑問である。しかしながら、速筋線維における PV 発現比は、 $\text{II b} > \text{II d/x} \gg \text{II a}$ であること、さらに $\text{II d/x} \rightarrow \text{II a}$ の移行が運動刺激後の初期段階で起こることが示唆されている(Schmitt and Pette, 1991)。この知見から、本研究における 5 日間のトレーニングで PV 発現量が 30%ほど減少したのは、Epi 筋において $\text{II d/x} \rightarrow \text{II a}$ の線維組成の移行が顕著に起こったからなのかもしれない。

以上より、本研究での持久的トレーニングといえる低強度・長時間運動トレーニングによって、速筋線維優位の Epi 筋で筋線維組成の変化が起こり、PV 発現量が減少したと推測される。

また、本研究により、LIT 群で Chain 1, Refined X-Ray Structure Of Rat Parvalbumin が CON 群に比べ有意に 1.32 倍発現減少したが ($p < 0.05$)、これは 2 次元電気泳動の結果 PV が一部分解されて発現されたスポットであると考えられる。

Table 3-1. 2D-DIGE experimental design for *experiment-1*

No. of gel	Cy2	Cy3	Cy5
1	pool	CON-1	LIT-1
2	pool	LIT-2	CON-2
3	pool	CON-3	LIT-3
4	pool	LIT-4	CON-4
5	pool	CON-5	LIT-5

※Each gel was loaded with 50 μ g of Cy2-labelled protein pool from all samples as an internal standard, 50 μ g of Cy3-labelled and 50 μ g of Cy5-labelled samples as indicated.

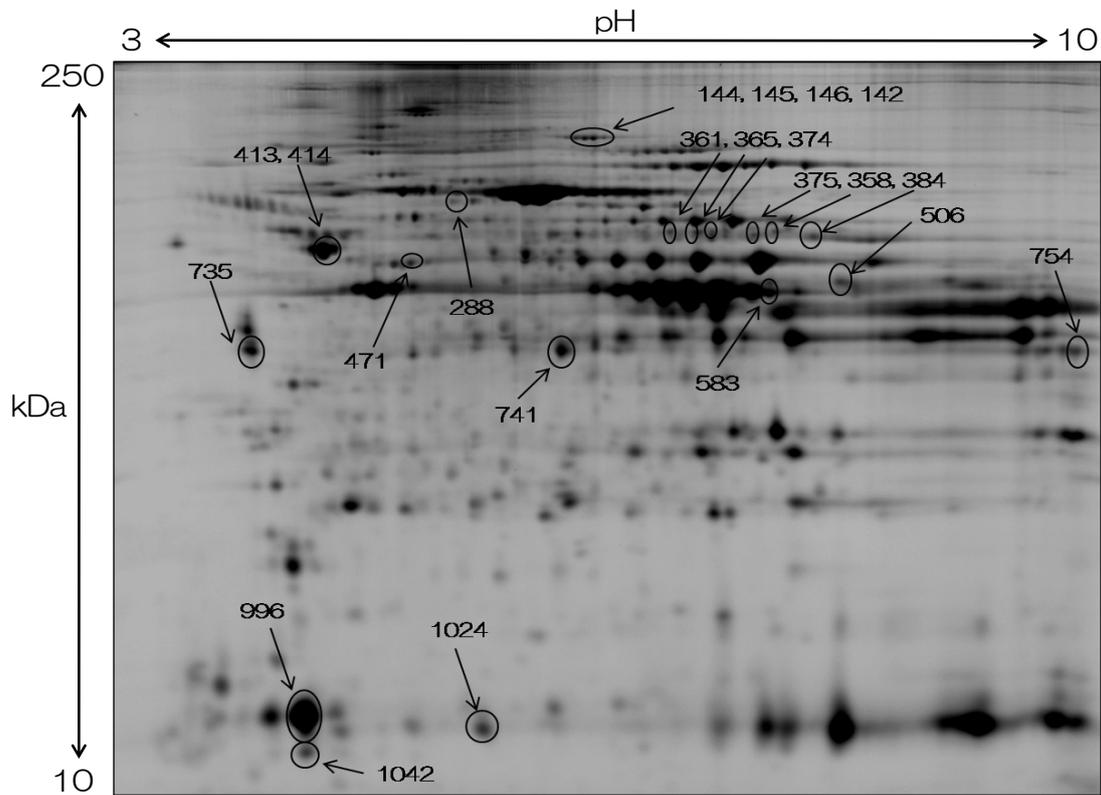


Fig. 3 Epitrochlearis muscle protein profiling by 2D-DIGE. Shown is a typical 2D-pattern (Cy2-labelled) gel image of 50 μ g of protein extract separated in a pH 3-10 IPG strip in the first dimension and 12.5 % polyacrylamide gel in the second. Automated image analysis by Decyder detected and matched 681 protein spots in a single-gel images. Differential analysis of epitrochlearis muscle extracts after low-intensity prolonged training (LIT) compared to control (CON), revealed that 22 spots were differentially expressed ($p < 0.05$). Identified protein spots were labeled with number as they appear in MS list (see Table 3-2.)

Table 3-2. List of DIGE-identified proteins with a changed expression level following low-intensity prolonged training (LIT) in rat epitrochlearis muscle

Protein function (Classification)	Master No. (LIT)	gi No.	Protein name	Molecular mass (kDa)	Isoelectric point (pI)	Sequence coverage (%)	Average ratio V_E/V_C ※ (Fold change)	t-Test <i>p</i> -value
<i>Metabolic proteins</i>	374	149029483	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1, isoform CRA_d	54.6	8.2	27	1.79	1.80E-04
	358	149029483	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1, isoform CRA_d	54.6	8.2	32	1.73	8.40E-04
	414	1374715	ATP synthase beta subunit	51.2	4.9	25	1.33	6.60E-03
	413	1374715	ATP synthase beta subunit	51.2	4.9	25	1.31	1.80E-02
	471	51948476	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1	53.5	5.6	20	1.30	8.70E-03
	142	62945278	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)	117	6.3	17	1.53	6.50E-04
	146	62945278	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)	117	6.3	22	1.43	2.30E-04
	145	62945278	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)	116	6.3	12	1.42	1.50E-03
	144	62945278	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)	117	6.3	22	1.37	4.00E-03
	361	40786469	dihydrolipoamide dehydrogenase	54.6	8.0	24	1.46	3.50E-04
	365	40786469	dihydrolipoamide dehydrogenase	54.6	8.0	21	1.38	1.00E-03
	288	220838	dihydrolipoamide acetyltransferase	57.6	5.5	11	1.31	7.50E-03
	1024	13162363	fatty acid binding protein 3, muscle and heart	14.8	5.9	33	1.55	1.40E-02
	583	220684	Cytosolic aspartate aminotransferase	46.6	6.7	36	1.39	7.10E-04
	754	42476181	malate dehydrogenase, mitochondrial	36.1	8.9	46	1.30	4.70E-03
	741	15100179	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	36.6	6.2	31	1.30	1.70E-03
	<i>Contractile protein</i>	735	207349	striated-muscle alpha tropomyosin	32.7	4.7	40	-1.36
<i>Other</i>	996	11968064	parvalbumin	11.9	5.0	79	-1.32	5.20E-03
	1042	494573	Chain 1, Refined X-Ray Structure Of Rat Parvalbumin, A Mammalian Alpha-Lineage Parvalbumin, At 2.0 A Resolution	11.8	5.0	53	-1.32	2.00E-02

※ V_E/V_C indicates the value ratio derived from the normalized spot volume standardized against the intra-gel standard provided by DeCyder software analysis.

第4章 研究課題2

「5日間の高強度・短時間水泳運動トレーニングによりラット骨格筋で発現変動するタンパク質の網羅的解析」

I. 目的

運動によるタンパク質の発現には、運動によるシグナルの程度が影響を与えることが知られている。研究課題1では、低強度・長時間運動トレーニングが骨格筋で発現変化するタンパク質を探索したが、研究課題2では、競技力向上のために使用されている高強度・短時間運動トレーニングによって骨格筋で発現変動するタンパク質を網羅的に解析することを目的とした。

ヒトにおいて、この高強度・短時間運動トレーニングにより有酸素性能と無酸素性能の両方が向上することが認められている(Tabata et al. 1999)。ラットにおいては、高強度・短時間水泳運動トレーニング(high-intensity intermittent swimming training: HIT)により、骨格筋で糖取り込み機能と強い関係のあるタンパク質である糖輸送体 GLUT4 の発現や、ミトコンドリア新生のマーカーであるクエン酸合成酵素(CS)活性などが、研究課題1で用いた低強度・長時間水泳運動トレーニング(LIT)と比べ同程度増加することが認められている(Terada et al. 2001, 2004)。本研究ではプロテオーム解析法を用いることにより、高い強度のトレーニングで発現変動する骨格筋のタンパク質を同定し、それぞれのタンパク質の生理学的意義を検討した。

II. 方法

1. 実験動物

実験動物として4週齢(体重70~80g)の雄性 Sprague-Dawley 系ラットを日本クレア社より購入した。ラットは室温 22 ± 2 °C、湿度 60 ± 5 °C に保たれた飼育室にて、実験動物用

固形飼料(日本クレア社製：CE-2)および飲料水を自由摂取させながら飼育した。照明は、午前7時と午後7時を境とする明暗サイクルとした。

2. 群分け

ラットは、体重の14%の錘を装着して20秒間の水泳運動を10秒の休息を挟んで続けて14セット行う高強度・短時間水泳運動トレーニング(high-intensity intermittent swimming training: HIT)群と、非運動群として終日ケージに入れておくコントロール(CON)群の2群に4匹ずつ無作為に分けた。

3. 運動プロトコル

4日間の予備飼育期間中、水泳運動に慣れさせる目的で、HIT群のラットに10分間の水泳運動を2日間行わせた(Ren et al. 1994)。トレーニング期間は連続した5日間とし、1日1回の頻度で行った。ラットは直径24 cm、高さ36 cmのポリバケツに水深25 cmまで35±1°Cの温水を入れ、1匹ずつ20秒間の水泳運動を10秒間の休息を挟みながら14セット行わせた。その際、前半の3日間は体重の14%の錘を装着させ、後半の2日間は体重の15%の錘を装着させながら水泳運動を行わせた。

4. 分析方法

(1) 筋サンプル採取

筋サンプル採取は、研究課題1と同様に行った。

(2) サンプル調製

HIT群とCON群のラットの滑車上筋を、研究課題1と同様な方法で調製した。

(3) サンプルの蛍光標識

サンプルの蛍光標識は研究課題 1 と同様に行った(Table 4-1.)。

(4) 蛍光ディファレンスゲル 2 次元電気泳動(2D-DIGE)

2D-DIGE は研究課題 1 と同様に行った。

(5) 画像解析

画像解析は研究課題 1 と同様に行った。

(6) ゲル内消化(in gel digestion)

ゲル内消化は研究課題 1 と同様に行った。

(7) 質量分析と PMF(peptide mass fingerprinting)法によるタンパク質の同定

質量分析とタンパク質の同定は研究課題 1 と同様に行った。

III. 結果

高強度・短時間水泳運動トレーニング群(HIT)とコントロール群(CON)で、ラット Epi 筋において発現しているタンパク質を 2D-DIGE 法によってディファレンシャル解析した結果、すべてのゲルで約 1000 スポット検出され、その中で 800 スポットがすべてのゲル間でマッチして検出された。さらに、統計的に有意に 1.3 倍以上発現が増減したスポットが 13 個存在した(Fig. 4)。このうち、7 スポットが発現増加し、残りの 6 スポットが発現減少した。さらに MALDI-TOF/MS を用いて 13 個すべてのタンパク質の同定に成功した(Table 4-2.)。

同定した 13 個のタンパク質のうち、代謝系タンパク質では 7 個発現変動した。それらを

分類すると、3 種類のみトコンドリア電子伝達系酵素[**ATP synthase beta subunit** (spot 347)/**NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, 75kDa** (spot 164)/**NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2** (spot 431)]、2 種類のみトコンドリア酸化系酵素[**oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)** (spots 65 and 67)/**malate dehydrogenase, mitochondrial** (spot 677)]が発現増加した。一方で、**muscle glycogen phosphorylase** (spot 100)が発現減少した。

さらに、ストレスタンパク質である **grp75** (spot 183)が発現増加し、収縮系タンパク質 [**myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle** (spots 1111 and 1136)/**myosin light chain MLC1-f** (spot 1021)]や、その他のタンパク質[**parvalbumin** (spot 1132) /**Chain 1, Refined X-Ray Structure Of Rat Parvalubumin,...**(spot 1181)]が発現減少した。

IV. 論議

1) 代謝系タンパク質

1-1) ミトコンドリア系酵素

本研究のプロテオーム解析により、HIT群でミトコンドリア電子伝達系酵素である NADH dehydrogenase Fe-S protein 1 (NDUFS1)、NADH dehydrogenase Fe-S protein 2 (NDUFS2)、ATP synthase beta subunit (ATPsynβ)や、ミトコンドリア酸化系酵素 oxoglutarate dehydrogenase (OGDH)、malate dehydrogenase, mitochondrial (m-MDH)、計 5 種類のタンパク質が、CON群に比べ有意に約 1.3~1.5 倍発現増加した ($p < 0.05$)。このうち、ATPsynβ、OGDH、m-MDHは運動・トレーニングで発現増加することが既に報告されている。一方、NDUFS1、NDUFS2 は運動で増加することは報告されていないため、本研究で初めてこの二つのタンパク質が発現増加することが明らかとなった。

本研究は、高強度の運動トレーニングを刺激とした初めての骨格筋プロテオーム研究である。Guelfi et al. (2006)のプロテオーム研究では、空腹状態のラットに一過性の高強度水

泳運動(3分)をさせ、腓腹筋(gastrocnemius)で発現変動したミトコンドリアタンパク質は、一つもなかったとしている。この結果は、本研究とは異なるものである。その理由として、i)先行研究が一過性の運動であること、ii)2D-DIGEでないこと、iii)比較的感度の低いCBB染色を使用しているからかスポットの総検出数(61 spots)が本研究(800 spots)に比べて極端に乏しいこと、などが理由として挙げられる。また、腓腹筋は水泳運動で動員されない筋であることが挙げられる。

ミトコンドリア電子伝達系酵素に関しては、本研究のHITによってNADH dehydrogenase Fe-S protein 1 (NDUFS1)、NADH dehydrogenase Fe-S protein 2 (NDUFS2)、ATP synthase beta subunit (ATPsynβ)が発現増加した。NDUFS1とNDUFS2は、ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体Iの構成タンパク質である。この複合体は、ミトコンドリア電子伝達系の最初の段階で、TCA回路より生成されたNADHからユビキノン(CoQ)に電子を渡す役割をもっている。運動によってNDUFSタンパク質の発現が変動するかを直接的に調査した研究報告はない。一方で、電子伝達系の複合体I~IVまでの活性を反映するNADH-oxidase活性に関しては、ヒトにおいて中強度(60~70% HRmax)の運動トレーニングにより増加することが報告されている(Menshikova et al. 2007)。さらに、最大酸素摂取量よりも高い高強度の運動を含むトレーニングを積んだ人と座りがちな人を比較した研究では、複合体II、IVと比べて複合体Iの活性が増加していることが報告されている(Daussin et al. 2008)。すなわち、中等度から高強度の運動トレーニングによってミトコンドリア電子伝達系酵素複合体Iの酵素活性が上昇することが報告されているが、本研究では、それをタンパク質の発現という形で追認することができた。一般的に、低い強度の運動トレーニングがミトコンドリアのタンパク質の発現量を増加させると言われているが、本研究及び先行研究でも短時間・高強度運動トレーニングでもこれらのタンパク質が増加したことは、興味深い。この機序としては、高い強度の運動により強度依存性に増加するPGC1α等が関係している可能性がある。

ATPsyn β は、低強度の運動トレーニングで発現増加することが知られており (Rose et al. 2007)、同様に本研究課題 1 の低強度運動トレーニングによっても発現増加した。一方、本研究では、高強度での運動トレーニングにおいても増加することが初めて明らかとなった。

運動による骨格筋タンパク質の発現は、運動強度と運動時間に依存することが知られている。これまで、運動による骨格筋のミトコンドリア酵素の発現は、低い強度の運動を長時間行うことで増加すると考えられてきた。一方で、最近、AMPK などの酵素活性は、高い強度の運動を短時間行うことでも低い強度の運動と同様に十分に発現増加が見られたことが報告されている (Terada et al. 2005)。これは、高い強度の運動を行うことで低い強度の運動よりも高いシグナルを得ることができ、運動継続時間が短時間であっても、低強度・長時間運動と同量の運動刺激を受け、結果として同等な酵素発現量に影響を及ぼしていると考えられる。以上の理由から、本研究における高強度・短時間運動により、ATPsyn β の発現機序は低強度・長時間運動と同様なシグナルを受け、その発現量が同様に増加したと考えられる。

ミトコンドリア酸化系酵素に関しては、本研究の HIT によって oxoglutarate dehydrogenase (OGDH)、malate dehydrogenase, mitochondrial (m-MDH)、が発現増加した。OGDHの酵素活性は、低強度の持続的トレーニングによって増加することが報告されている (Tikkanen et al. 1995)。一方で、高い強度の運動に関しては、ヒトにおいて一過性の高強度 (131 % $\dot{V}O_2\text{max}$) 運動を行い疲労困憊になった状態で OGDH 活性が減少するという報告がある (Rasmussen, 2001) が、運動トレーニングによる影響は調べられていない。今後、ウェスタンブロット法により、本研究と同様なトレーニングを行った後の OGDH の発現を比較して、本研究の結果を確認する必要がある。また、高強度トレーニングによる本酵素タンパク質の増加の機序であるが、他の高強度トレーニングにより発現が増加するタンパク質と同様に、運動強度と関係の深い発現機序であると推測される。

m-MDH は、低強度のトレーニングにより発現増加することが報告されている (Hittel et

al. 2005)。本研究では、高強度での運動トレーニングにおいても増加することが初めて明らかとなった。これも、ATPsyn β や OGDH と同様な運動強度に依存する発現機序により、その発現量が同様に増加したと考えられる。

また、Terada et al. (2001, 2004)は、本研究と同様な高強度・短時間運動トレーニング(HIT)によって、低強度・長時間運動トレーニング(LIT)と同程度にミトコンドリア酵素活性の増加が認められたことを報告している。さらに、この時ミトコンドリア系酵素の発現調節において重要な役割を果たしていることが示唆されている PGC-1 α タンパク質は、一過性の高強度運動でも発現量が増加することも明らかにされている(Terada et al. 2005)。この知見から、本研究における運動トレーニングにおいても PGC-1 α タンパク質の発現量が増加していることが予想され、同定されたいくつかのミトコンドリア系酵素の発現量を増加させたことが考えられる。すなわち、このような研究から、高強度トレーニングにより骨格筋の有酸素性代謝能の改善ということが多くのミトコンドリアタンパク質の発現という形で確認された。

1-2) 筋グリコーゲン分解酵素

本研究により、HIT 群で muscle glycogen phosphorylase(GPh)が CON 群に比べ有意に 1.35 倍発現減少した ($p < 0.05$)。GPh は、筋グリコーゲン分解酵素であり、グリコーゲン→グルコース 1 リン酸の反応を触媒し、グリコーゲンの分解過程で重要な役割をもっている。本研究における高強度・短時間運動トレーニングのモデルとなったスプリントトレーニング(short-sprint training)の研究においては、トレーニング後にグリコーゲン分解酵素や解糖系酵素の活性が上昇した報告が多いことが Review によりまとめられている(Ross and Leveritt, 2001)。これは、最大運動パフォーマンスを発揮するためには解糖系酵素の高い活性が必要であることを意味しているのかもしれない。しかしながら、本研究では GPh の発現量が低下しており、この仮説を説明することができない。

一方で、持久系タイプのアスリートでは一般人と比較して GPh の遺伝子発現が低下していることが報告されている(Yoshioka et al. 2003)。さらに、PGC-1 α を高発現させた骨格筋では GPh の酵素発現量が減少し、グリコーゲン分解を抑制したことが報告されている(Wende et al. 2007)。本研究でも用いた高強度トレーニング後には PGC1- α の発現量が増加することが知られており、PGC1- α の増加により GPh 発現量が低下したと考えられる。この生理学的意義であるが、高強度運動トレーニングによる同一運動強度の運動時間延長効果に関連する乳酸産生量減少であると考えられる。高強度運動中に産生される乳酸は筋疲労の要因になる。乳酸は解糖系により産生されるが、解糖系の基質であるグルコース 1 リン酸を供給するのは本酵素である。したがって、本酵素のタンパク質発現が低下し、酵素活性が低下すると、解糖系への基質の供給量が低下し、その結果として乳酸の産生量が低下し、筋疲労の発生が遅延すると推測される。

2) ストレスタンパク質

本研究により、HIT 群でストレスタンパク質である GRP75 が CON 群に比べ有意に 1.6 倍発現増加した ($p<0.05$)。このタンパク質は運動によって増加することが知られている(González et al. 2000; Hernando et al. 1997)。

GRP75(glucose-regulated protein 75)はミトコンドリアに局在し、HSP60 や他の HSP と相互作用でミトコンドリアタンパク質を輸送する機能を持っているため、ミトコンドリア機能・新生に必須なタンパク質である(Mizzen et al. 1991)。GRP75 は熱ショックタンパク質(heat shock protein; HSP)として HSP70 ファミリーと分類されることもあるが、細胞内グルコースが欠乏状態に陥ったときに誘導されるため、HSP とは誘導機構が異なるとされている。さらに、運動は熱ストレスとともに代謝ストレスとしてのグリコーゲン濃度の低下を伴うことから、運動後に骨格筋の GRP75、GRP78、HSP72 などが誘導されることが知られている(González et al. 2000; Hernando et al. 1997)。運動強度に関して検討した

研究では、特にトレーニング内容で GRP75 の発現量に有意な差はないが、高強度のほうがトレーニングによる発現量の増加度が高い傾向にあることを報告している(Gjøvaag and Dahl, 2006)。

3) 収縮系タンパク質

本研究により、HIT 群で筋の収縮タンパク質である myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle と myosin light chain MLC1-f が CON 群に比べ有意に約 1.3 倍発現減少した ($p < 0.05$)。

myosin light chain(MLC:ミオシン軽鎖)は筋の主な構造タンパク質であるミオシンを構成するタンパク質であり、MLC1-f は速筋タイプのミオシン軽鎖である。また、ミオシン軽鎖はミオシン軽鎖キナーゼによってリン酸化されることが知られている(MLC, phosphorylatable)。これらの速筋タイプの収縮系タンパク質は、持久的トレーニングや電気刺激(CLFS)を行うと、筋線維組成の移行が起こり、その発現が低下することが知られている(Donoghue et al. 2007)。これと対照的な間欠的・高頻度刺激のモデルとなるスプリントトレーニングや筋力トレーニングをヒトで行っても、低強度運動トレーニングと同様に外側広筋におけるミオシン重鎖(MHC)の発現パターンにおいて Type II b の減少及び Type II a の増加が見られることが報告されている(Allemeier et al. 1994; Adams et al. 1993)。すなわち、高強度のトレーニングを行うことでも、筋の速筋化は起こらないことを追認する結果であると考えられる。これは、このような酸素摂取量という観点からは高い強度の運動トレーニング(本研究で用いたトレーニングの強度は少なくとも最大酸素摂取量よりも高い)でも、筋力(ヒトでは、最大随意(等尺性)筋力)としては、低い(ヒトにおける同様の運動強度の場合、最大随意筋力の 10%程度)ので、筋の速筋化は起こらなかったと推測される。

4) その他

本研究により、HIT 群で parvalbumin(PV)が CON 群に比べ有意に 1.45 倍発現減少した ($p<0.05$)。PV は、研究課題 1 でも述べたが、速筋線維で高く発現している筋弛緩因子 (relaxing factor)であり、その発現比は $\text{II b} > \text{II d/x} \gg \text{II a, I}$ である (Schmitt and Pette, 1991)。研究課題 1 やこれまでの研究のように、低強度トレーニングにより PV 発現量が減少することが報告されている (Gallo et al. 2008; Green et al. 1984)。これらの研究とは異なり、本研究では初めて高強度・短時間運動トレーニングでも PV 発現量が減少することが明らかとなった。

本研究では、1 日の総運動時間が 4 分 40 秒と短時間であり、ヒトでは $130\% \dot{V}O_2\text{max}$ まで及ぶ高強度間欠的運動のモデルであるトレーニング(HIT)を行った。研究課題 1 で述べた通り、PV はその発現変動に対する生理学的動態から「遅筋化のマーカー」としてよく知られている。一般的には高強度のトレーニングでは、筋の速筋化が起こると考えられているが、前述の MLC で考察したように、このような高強度トレーニングも筋線維組成を速筋化するという観点では刺激が低く、逆に全体として遅筋線維が増加した(あるいは遅筋線維の特性が高まった)ことにより、結果として遅筋線維化と同様な PV の変化が見られたのかもしれない。

高強度トレーニングである HIT を行うことにより、多くの遺伝子の転写に影響を与える PGC-1 α タンパク質の発現量が増加することや、ミトコンドリア新生のマーカーである CS 活性が上昇することが報告されている (Terada et al. 2005, 2004)。これは、HIT で Epi 筋の遅筋化が進行したためにミトコンドリア酵素活性が上昇したのではなく、有酸素性能力が向上したことが原因として考えられる。実際、速筋線維で PV を欠損させると、疲労耐性の増加やミトコンドリアタンパク質の発現量の増加が見られるなど、筋の酸化的代謝能力の向上を示すようになることが報告されている (Chen et al. 2001; Racay et al. 2006)。さらに、この PV が欠損した速筋線維では、遅筋線維で特異的に発現しているタンパク質(遅筋型の MHC, MLC)の発現が変化していないことも報告されている (Racay et al. 2006)。一方

で、PV 発現の低い遅筋線維に PV を過剰発現させると、ミトコンドリアマーカーである SDH 活性が減少し、筋の酸化能力が低下したことが報告されている(Chin et al. 2003)。

以上の知見から、本研究における骨格筋 PV タンパク質の発現減少は、運動トレーニングによるミトコンドリア新生に重要な影響を及ぼしているのかもしれない。すなわち、運動トレーニングによって PV 発現が減少することにより、何らかのメカニズムを介して「ミトコンドリア新生が誘導」されると推測される。PV を欠損させるとミトコンドリア酵素活性が上昇することから、PV はミトコンドリア新生の負のレギュレーターである可能性がある。PV は Ca^{2+} 結合タンパク質であることから、カルシニューリンや CaMK など遅筋線維タイプの遺伝子発現を促す Ca^{2+} シグナル経路を阻害していると考えられている。すなわち、PV が筋収縮により放出された Ca^{2+} と結合し、 Ca^{2+} を筋小胞体へと速やかに回収するために、細胞内で Ca^{2+} シグナルの刺激を受ける時間が短くなることが推測される。実際、遅筋線維に PV を過剰発現させるとカルシニューリンの活性が減少することが報告されている(Chin et al. 2003)。

本研究で PV タンパク質の発現が減少した機序については、運動トレーニングによって何らかの因子の発現増加または活性化が起こり、それが PV の遺伝子発現を阻害していることが推測される。しかしながら、運動による PV の発現制御機序に関しては不明である。

以上をまとめると、本研究での持続的トレーニングではない高強度間欠的運動トレーニングによって骨格筋 PV タンパク質の発現量が減少した。このことは、運動トレーニングが及ぼす PV の新たな生理学的意義を示唆し、運動トレーニングによって PV 遺伝子発現を負に調節する未知の因子の存在を示唆する結果となった。

また、最近の報告では筋活動の要因以外にも PV タンパク質の変動が観察された。Gallo et al. (2008)の実験では、ラットにクレアチンを 7 週間摂取させると、驚くべきことにコントロール食群と比較して PV 発現量が 75 %も減少したことを観察している。さらにこの実験では、7 週間の自発性走行トレーニングにより誘起される筋線維組成の変化(Type II b→

Type II a)が、クレアチンの摂取により抑えられたことが観察され、これまでに知られている PV 発現量の減少が意味する生理学的動態と矛盾している結果が示された。これらは、クレアチンを摂取することにより高エネルギーシャトル能力の亢進が PV による Ca^{2+} 緩衝作用の必要性を軽減させた結果だと考えられている。

また、本研究により、HIT 群で Chain 1, Refined X-Ray Structure Of Rat Parvalbumin が CON 群に比べ有意に 1.48 倍発現減少したが($p < 0.05$)。これは研究課題 1 と同様に 2 次元電気泳動の結果、PV が一部分解されて発現されたスポットであると考えられる。

Table 4-1. 2D-DIGE experimental design for *experiment-2*

No. of gel	Cy2	Cy3	Cy5
1	pool	CON-1	HIT-1
2	pool	HIT-2	CON-2
3	pool	CON-3	HIT-3
4	pool	HIT-4	CON-4

※Each gel was loaded with 50 μg of Cy2-labelled protein pool from all samples as an internal standard, 50 μg of Cy3-labelled and 50 μg of Cy5-labelled samples as indicated.

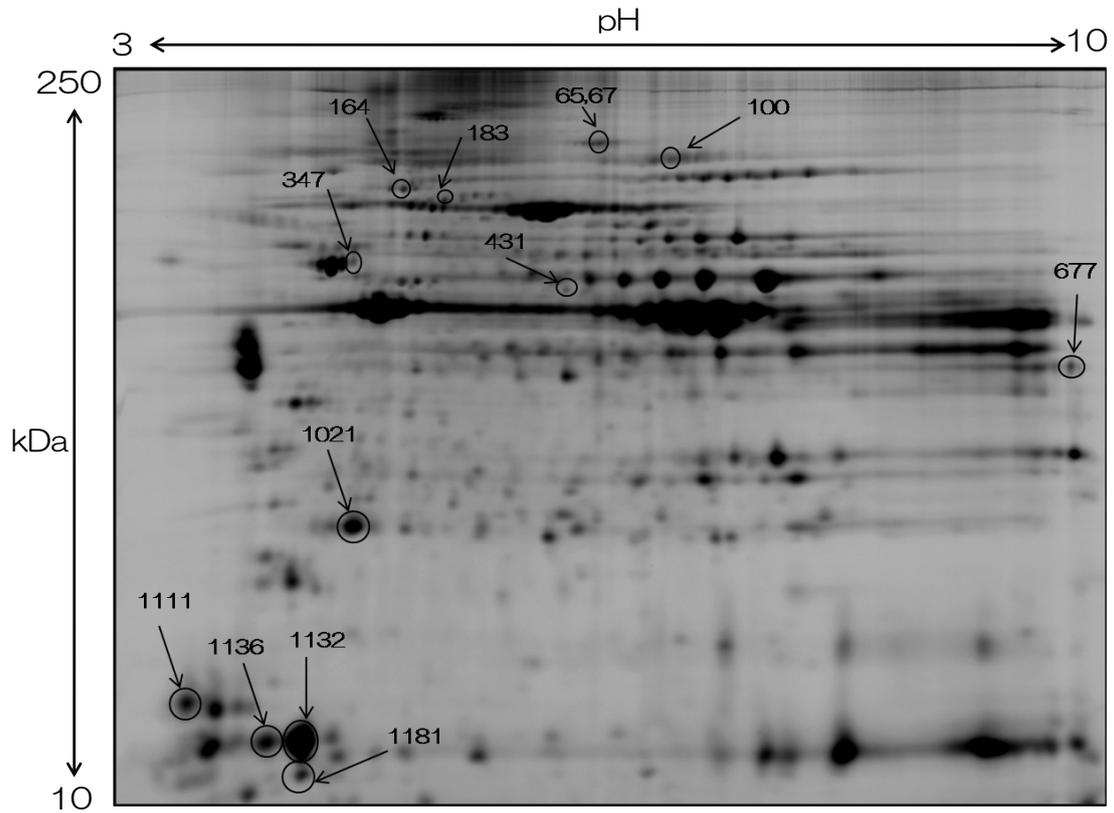


Fig. 4 Epitrochlearis muscle protein profiling by 2D-DIGE. Shown is a typical 2D-pattern (Cy2-labelled) gel image of 50 μ g of protein extract separated in a pH 3-10 IPG strip in the first dimension and 12.5 % polyacrylamide gel in the second. Automated image analysis by Decyder detected and matched 800 protein spots in a single-gel images. Differential analysis of epitrochlearis muscle extracts after high-intensity intermittent training (HIT) compared to control (CON), revealed that 13 spots were differentially expressed ($p < 0.05$). Identified protein spots were labeled with number as they appear in MS list (see Table 4-2.)

Table 4-2. List of DIGE-identified proteins with a changed expression level following high-intensity intermittent training (HIT) in rat epitrochlearis muscle

Protein function (Classification)	Master No. (HIT)	gi No.	Protein name	Molecular mass (kDa)	Isoelectric point (pI)	Sequence coverage (%)	Average ratio V_E/V_C (Fold change)	t-Test p -value
<i>Metabolic proteins</i>	347	1374715	ATP synthase beta subunit	51.2	4.9	23	1.53	2.30E-02
	164	53850628	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, 75kDa	80.3	5.6	29	1.53	2.30E-02
	431	58865384	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2	52.9	6.5	38	1.45	4.30E-02
	65	62945278	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)	117	6.3	22	1.46	1.60E-02
	67	62945278	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)	116	6.3	12	1.42	8.00E-03
	677	42476181	malate dehydrogenase, mitochondrial	36.1	8.9	46	1.33	3.60E-02
	100	158138498	muscle glycogen phosphorylase	97.7	6.7	28	-1.35	3.50E-02
<i>Stress protein</i>	183	1000439	grp75	74	5.9	20	1.62	3.50E-02
<i>Contractile proteins</i>	1111	6981238	myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle	19.1	4.8	37	-1.30	4.60E-02
	1136	6981238	myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle	19.0	4.8	29	-1.34	3.10E-02
	1021	205485	myosin light chain MLC1-f	20.8	5.0	42	-1.31	5.80E-03
<i>Other</i>	1132	11968064	parvalbumin	11.9	5.0	79	-1.45	1.80E-02
	1181	494573	Chain 1, Refined X-Ray Structure Of Rat Parvalubumin, A Mammalian Alpha-Lineage Parvalbumin, At 2.0 A Resolution	11.8	5.0	53	-1.48	1.70E-02

※ V_E/V_C indicates the value ratio derived from the normalized spot volume standardized against the intra-gel standard provided by DeCyder software analysis.

第5章 研究課題3

「5日間の高頻度・高強度・短時間水泳運動トレーニングによりラット骨格筋で発現変動するタンパク質の網羅的解析」

I. 目的

研究課題3では、研究課題2で行った高強度トレーニングよりもさらに高強度・高容量トレーニングのモデルとする運動によって骨格筋で発現変動するタンパク質を網羅的に解析することを目的とした。

本研究で用いた運動トレーニングは、研究課題2で1日1回行った高強度・短時間水泳運動トレーニング(HIT)に対し、1日に複数回(6回)と頻度を増加させた運動トレーニング(HIT6)である。本研究ではプロテオーム解析法を用いることにより、高強度・高容量のトレーニングで発現変動する骨格筋のタンパク質を同定し、それぞれのタンパク質の生理学的意義を検討した。

II. 方法

1) 実験動物

実験動物として4週齢(体重70~80g)の雄性Sprague-Dawley系ラットを日本クレア社より購入した。ラットは室温 22 ± 2 ℃、湿度 60 ± 5 ℃に保たれた飼育室にて、実験動物用固形飼料(日本クレア社製:CE-2)および飲料水を自由摂取させながら飼育した。照明は、午前7時と午後7時を境とする明暗サイクルとした。

2) 群分け

ラットは、研究課題2で行った高強度・短時間水泳運動トレーニング(HIT)を1日に6回行う(HIT6)群と、非運動群として終日ケージに入れておくコントロール(CON)群の2群に5

匹ずつ無作為に分けた。

3) 運動プロトコル

4 日間の予備飼育期間中、水泳運動に慣れさせる目的で、HIT6 群のラットに 10 分間の水泳運動を 2 日間行わせた(Ren et al. 1994)。トレーニング期間は連続した 5 日間とし、1 日 1~2 時間に 1 回、計 6 回の頻度で行った。ラットは直径 24 cm、高さ 36 cm のポリバケツに水深 25 cm まで $35 \pm 1^\circ\text{C}$ の温水を入れ、1 匹ずつ 20 秒間の水泳運動を 10 秒間の休息を挟みながら 14 セット行わせた。その際、前半の 3 日間は体重の 14 %の錘を装着させ、後半の 2 日間は体重の 15 %の錘を装着させながら水泳運動を行わせた。

4) 分析方法

(1) 筋サンプル採取

筋サンプル採取は、研究課題 1 と同様に行った。

(2) サンプル調製

HIT6 群と CON 群のラットの滑車筋を、研究課題 1 と同様に調製した。

(3) サンプルの蛍光標識

サンプルの蛍光標識は研究課題 1 と同様に行った(Table 5-1.)。

(4) 蛍光ディファレンスゲル 2 次元電気泳動(2D-DIGE)

2D-DIGE は研究課題 1 と同様に行った。

(5) 画像解析

画像解析は研究課題 1 と同様に行った。

(6) ゲル内消化(in gel digestion)

ゲル内消化は研究課題 1 と同様に行った。

(7) 質量分析と PMF(peptide mass fingerprinting)法によるタンパク質の同定

質量分析とタンパク質の同定は研究課題 1 と同様に行った。

III. 結果

1 日に 6 回の高強度・短時間水泳運動を 5 日間トレーニングさせた群(HIT6)とコントロール群(CON)で、ラット Epi 筋において発現しているタンパク質を 2D-DIGE 法によってディファレンシャル解析した結果、すべてのゲルで約 1000 スポット検出され、その中で 741 スポットがすべてのゲル間でマッチして検出された。さらに、統計的に有意に 1.3 倍以上発現が増減したスポットが 18 個存在した(Fig. 5)。このうち、4 スポットが発現増加し、残りの 14 スポットが発現減少した。さらに MALDI-TOF/MS によって 9 個のタンパク質の同定に成功した(Table 5-2.)。

同定した 9 個のタンパク質のうち、ストレスタンパク質である **crystallin, alpha B** (spot 1086)が発現増加し、一方で同じくストレスに関わるタンパク質の **carbonic anhydrase 3** (spots 962 and 951)が発現減少した。さらに、収縮系タンパク質[**actin, alpha 1, skeletal muscle** (spots 617, 620, 621) / **myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle** (spot 1130)]や、その他のタンパク質[**alpha-1-antitrypsin precursor** (spot 463) / **parvalbumin** (spot 1131)]が発現減少した。また、研究課題 1,2 で見られた代謝系タンパク質の発現変化は一つも観察されなかった。

IV. 論議

1) ストレスタンパク質

本研究により、HIT6 群でストレスタンパク質である crystallin, alpha B(α B-crystallin) が CON 群に比べ有意に 1.6 倍発現増加した ($p < 0.01$)。このタンパク質は運動で増加することが既に知られている。

α B-crystallin は、熱ショックタンパク質(heat shock protein; HSP)のひとつであり、分子量が比較的小さいことから、small HSP と分類されている。また、細胞質に局在し、ストレスに対する変性タンパク質の凝集抑制作用や、ストレスからの回復におけるタンパク質のリフォールディングを亢進する分子シャペロンとしての機能が知られている(Neufer et al. 1996)。骨格筋においては、 α B-crystallin は遅筋線維に多く発現しており、これは酸化的代謝が高いことから生じる酸化ストレスへの筋防御機構のためと考えられている。さらに、マウスに運動トレーニング(自発性ランニング)をさせると、ヒラメ筋(soleus) α B-crystallin の発現量が増加することが報告されている(Huey and Meador, 2008)。また、ヒトにおいては、遅発性筋痛(DOMS)を起こすような一過性の 30 分のエキセントリック運動(downhill treadmill exercise)により運動終了 24 時間後に骨格筋 α B-crystallin タンパク質の発現が増加したことが報告されている(Féasson et al. 2002)。この結果は、 α B-crystallin が運動で損傷した中間径フィラメントやマイクロフィラメントの動態を調節していることを示唆している。

以上より、本研究により、高強度の運動を 1 日に複数回行う極度な刺激を施したトレーニングによって α B-crystallin の発現量が増加することが明らかとなった。これは損傷した筋のフィラメント修復に関与しているかもしれない。

また、HIT6 群で carbonic anhydrase 3(CA3)が CON 群に比べ有意に約 1.3~1.4 倍発現減少した ($p < 0.05$)。CA3 は、細胞質に局在し、骨格筋では CA ファミリーの中で遅筋線維

に多く存在するアイソフォームであり、速筋線維では非常に低いレベルで存在している (Geers and Gros, 2000)。CA の主な生理学的機能は、 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ の反応を触媒して組織内の pH を緩衝することであり、運動中の乳酸の蓄積による筋漿内の pH 低下を抑止する機能を持っていると考えられている (Messonnier et al. 2007)。しかし、本実験では運動トレーニングにより骨格筋 CA3 の発現量が減少しており、その観点からは適応反応とは考えられない。一方、CA3 は、抗酸化物質としての機能が注目されている。実際、CA3 の欠損マウスでは、活性酸素などを除去する機能をもつグルタチオンの酸化還元に関連する多くの遺伝子発現が変動したことから、グルタチオンを介する抗酸化経路に CA3 が重要な役割を持っていることが示唆されている (Zimmerman et al. 2004)。また、CA3 活性の減少により、疲労耐性とグリコーゲン利用率が増加するという報告がある (Côté et al. 1999, 1993)。さらに、プロテオーム研究により、アセチル L-カルニチンを補助的にラットに摂取させると、骨格筋(soleus)CA3 の発現量が減少したことを報告している (Moriggi et al. 2008)。これらの知見から、本研究における骨格筋 CA3 の発現量の減少は、運動トレーニングによる抗酸化機能向上や糖代謝機能向上を引き起こしている可能性がある。

一方で、運動または筋活動により骨格筋から血清に CA3 が遊離し、血清 CA3 濃度が上昇することも知られている (Takala et al. 1989)。これはミオグロビンやクレアチンキナーゼなどと同様に筋組織の崩壊(損傷)により血中に逸脱すると考えられ、筋損傷の指標として捉えられている。

2) 収縮系タンパク質

本研究により、HIT6 群で actin, alpha 1, skeletal muscle と myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle が CON 群に比べ有意に約 1.3~1.4 倍発現減少した ($p < 0.05$)。

actin, alpha 1($\alpha 1$ -アクチン)は、骨格筋に含まれる代表的な構造タンパク質である。アク

チンには、 α の他に β 、 γ と 3 種類のアイソフォームがあるが、骨格筋に含まれるものはすべて α -アクチンであり、筋線維タイプによる含量の差はない。したがって、本研究における高頻度の高強度・短時間の運動トレーニングで $\alpha 1$ -アクチンの発現量が減少した理由は不明である。

ミオシン軽鎖(速筋タイプ、リン酸化型)については研究課題 2 でも同様に述べたが、これは筋の活動量の増加により筋線維組成の変化が起こり、 $\text{II b} \rightarrow \text{II a}$ の移行が起こったのかも知れない。

3) その他

本研究により、HIT6 群で $\alpha 1$ -antitrypsin precursor($\alpha 1$ -AT precursor)が CON 群に比べ有意に 1.38 倍発現減少した ($p < 0.01$)。このタンパク質が骨格筋で運動によって発現変動する報告はない。よって、本研究で初めて $\alpha 1$ -AT が高強度の運動を 1 日に複数回行う極度な刺激を施したトレーニングによって減少することが明らかとなった。

$\alpha 1$ -AT は、肝臓で作られる糖タンパク質で、流血中に放出され、血清中に最も多量に存在するセリンプロテアーゼ阻害物質の一つである。主な生理機能としては、好中球エラスターゼを阻害し組織障害を防御する役割を担っている。臨床的には、炎症時に血中に増加する代表的な急性期反応物質(acute phase reactant)のひとつであり、炎症性疾患、悪性腫瘍の指標となっている。

本研究では、骨格筋にて、 $\alpha 1$ -ATの前駆体がHIT6 で発現減少した。先述した通り、 $\alpha 1$ -AT は肝臓で合成され血清に放出されることが知られている。一方で、 $\alpha 1$ -ATなどのプロテアーゼインヒビターは骨格筋(筋内膜周囲)においても発現し、筋の構造を不必要なタンパク質分解から保護していることが知られている(Fumagalli et al. 1996)。ヒツジにおいては $\alpha 1$ -AT が遺伝的に筋肥大型の筋で発現が低く、筋芽細胞の増殖シグナルと関係していることが示唆されている(Hamelin et al. 2006)。さらに、ストレプトゾトシン誘発性の糖尿病ラットの

骨格筋細胞でも $\alpha 1$ -ATが減少していることも報告されている(Stauber et al. 1983)。以上から、骨格筋 $\alpha 1$ -ATは様々な生理学的な役割を果たしている可能性が考えられる。

本研究と同様に $\alpha 1$ -AT 前駆体は、ヒト外側広筋に発現していることがプロテオーム解析により確認されている(Gelfi et al. 2003)。さらに本研究では $\alpha 1$ -AT 前駆体が運動トレーニングにより発現減少することを明らかにしたが、 $\alpha 1$ -AT 前駆体の骨格筋における生理学的機能に関する報告はなく、運動によってそれが発現変動する生理学的意義は不明である。

ヒト $\alpha 1$ -AT 遺伝子をマウス骨格筋にアデノウイルスを用いて遺伝子導入すると、血清に $\alpha 1$ -AT が分泌されるようになることから、骨格筋細胞には $\alpha 1$ -AT を血中に分泌する能力があることが示されている(Song et al. 1998)。

一過性の間欠的運動をさせた直後(Markovitch et al. 2007)や、約 2 時間のランニング後(Dufaux and Order, 1989)に、血漿 $\alpha 1$ -AT 濃度が上昇することが報告されている。一方で、トレーニングによる影響に焦点を当てた研究はほとんどないが、ウルトラマラソンをモデルとした 5 日間の超長時間運動トレーニングによって血清 $\alpha 1$ -AT 濃度は統計的に有意ではないが増加傾向であったことが報告されている(Fallon, 2001)。また、 $\alpha 1$ -AT 前駆体(precursor)も血清に存在し、プロテオーム解析を用いて魚油(de Roos et al. 2008)や CoQ₁₀(Santos-González et al. 2007)の長期摂取により、その発現量が減少することが報告されている。

以上より、 $\alpha 1$ -AT ならびにその前駆体は、骨格筋と血清の双方に存在することが考えられる。これらの知見から、 $\alpha 1$ -AT が骨格筋由来のサイトカイン(マイオカイン)の前駆体である可能性も考えられる。しかしながら、本研究において高頻度・高強度のトレーニングにより $\alpha 1$ -AT 前駆体の発現が減少した理由も含め、その生理学的な機能は不明である。

また、本研究により、HIT6 群で parvalbumin(PV)が CON 群に比べ有意に 1.45 倍発現減少した ($p < 0.01$)。PV は研究課題 1,2 でも述べたが、速筋線維で高く発現している筋弛緩

因子(relaxing factor)であり、その発現変動に対する生理学的動態から「遅筋化のマーカ―」として知られている。

HIT では発現増加が見られたミトコンドリア系酵素の発現の増加を、この HIT6 の実験におけるプロテオーム解析では確認できなかった。HIT6 は、研究課題 2 における HIT と 1 回の運動時は同強度であるが、総運動時間が HIT の 6 倍(HIT: 4 分 40 秒に対し HIT6: 28 分)である。このことから、高強度の運動でも 1 日の運動量が多くなれば、5 日間のトレーニングで筋の活動量の増加に伴う筋線維組成の変化が優位に現れるのかもしれない。すなわち、本研究における高頻度・高強度・短時間のトレーニングによって PV 発現量が減少したのは筋線維組成の変化を示している可能性が考えられる。

また、本研究では代謝系のタンパク質がひとつも発現増加が見られなかった。この HIT6 を一過性に(すなわち 1 日のみの運動)行くと、HIT の一過性運動と同様に運動後に骨格筋 PGC-1 α タンパク質の発現量が増加したことが観察されている(Terada et al. unpublished data)。よって、本研究でもミトコンドリア酵素の活性が増加していることが推測されるが、プロテオーム解析ではそれを示すタンパク質の発現増加を観察できなかった。これは、極度な刺激を施した運動トレーニングによって、代謝系タンパク質の発現に何らかの抑制因子が働いたのかもしれない。例えば、運動で増加することが知られている PGC-1 α タンパク質も、ある程度運動刺激を増加させる(トレーニングを積む)と、これ以上ミトコンドリアの増加などを引き起こさないために負のフィードバックを起こし、mRNA の発現量が減少することも考えられる。本研究でも、そのようなメカニズムが働いたのかもしれない。

Table 5-1. 2D-DIGE experimental design for *experiment-3*

No. of gel	Cy2	Cy3	Cy5
1	pool	CON-1	HIT6-1
2	pool	HIT6-2	CON-2
3	pool	CON-3	HIT6-3
4	pool	HIT6-4	CON-4
5	pool	CON-5	HIT6-5

※Each gel was loaded with 50 μg of Cy2-labelled protein pool from all samples as an internal standard, 50 μg of Cy3-labelled and 50 μg of Cy5-labelled samples as indicated.

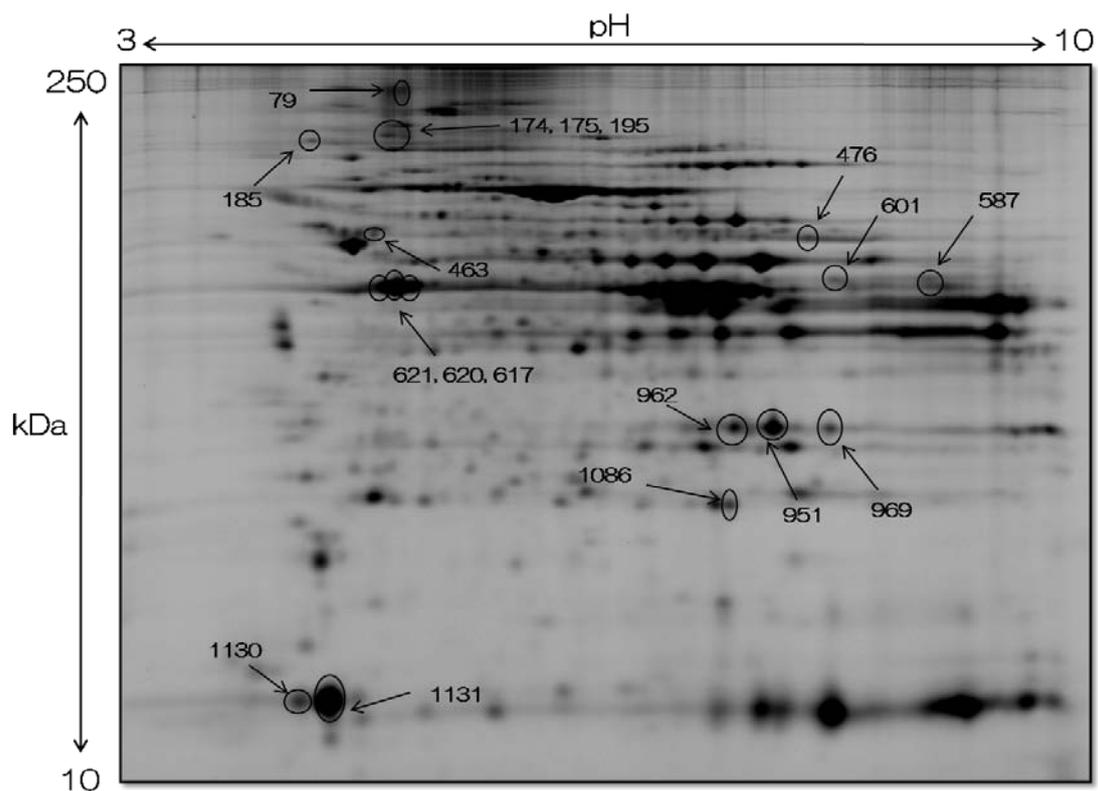


Fig. 5 Epitrochlearis muscle protein profiling by 2D-DIGE. Shown is a typical 2D-pattern (Cy2-labelled) gel image of 50 μ g of protein extract separated in a pH 3-10 IPG strip in the first dimension and 12.5 % polyacrylamide gel in the second. Automated image analysis by Decyder detected and matched 741 protein spots in a single-gel images. Differential analysis of epitrochlearis muscle extracts after six set of high-intensity intermittent training (HIT6) compared to control (CON), revealed that 18 spots were differentially expressed ($p < 0.05$). Identified protein spots were labeled with number as they appear in MS list (see Table 4-2.)

Table 5-2. List of DIGE-identified proteins with a changed expression level following six set of high-intensity intermittent training (HIT6) in rat epitrochlearis muscle

Protein function (Classification)	Master No. (HIT6)	gi No.	Protein name	Molecular mass (kDa)	Isoelectric point (pI)	Sequence coverage (%)	Average ratio V_E/V_C ※ (Fold change)	t-Test <i>p</i> -value
<i>Stress proteins</i>	1086	16905067	crystallin, alpha B	20.1	6.8	37	1.60	2.80E-03
	962	31377484	carbonic anhydrase 3	29.7	6.9	37	-1.33	9.80E-03
	951	31377484	carbonic anhydrase 3	29.7	6.9	37	-1.39	1.20E-02
<i>Contractile proteins</i>	617	4501881	actin, alpha 1, skeletal muscle	42.4	5.2	38	-1.33	4.60E-03
	620	4501881	actin, alpha 1, skeletal muscle	42.4	5.2	28	-1.39	2.10E-03
	621	4501881	actin, alpha 1, skeletal muscle	42.4	5.2	28	-1.42	1.50E-03
	1130	6981238	myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle	19.0	4.8	29	-1.42	7.20E-03
<i>Other</i>	463	203063	alpha-1-antitrypsin precursor	45.8	5.7	23	-1.38	3.00E-02
	1131	11968064	parvalbumin	11.9	5.0	79	-1.45	2.30E-03

※ V_E/V_C indicates the value ratio derived from the normalized spot volume standardized against the intra-gel standard provided by DeCyder software analysis.

第6章 総合討論

身体運動・トレーニングにより、骨格筋では様々な適応が起こることが知られている。これは、主に運動・筋収縮に関係する様々なシグナルを経て種々のタンパク質発現が亢進し、生理学的機能を発揮させていると考えられている。しかしながら、それぞれの分子メカニズムには不明な点が多い。これまでに、そのメカニズムを解明しようとする研究が数多くなされてきたが、近年、ゲノム配列と質量分析を基盤とし、細胞に含まれるタンパク質を一度に網羅的に解析する方法に脚光を浴びるようになった。その代表的な手法がプロテオーム解析(proteome analysis)である。これにより時間・組織・種といった様々な変化要因による多くのタンパク質の発現変動を網羅的かつ定量的に検出することが可能となった。

この網羅的解析方法は、生体で起こる分子メカニズムを理解する上で重要なツールであると考えられる。さらに、運動トレーニングによるタンパク質の発現には、運動によるシグナルの程度が影響を与えることが知られている。したがって、本研究では、最新のプロテオーム解析技術(2D-DIGE/MS)を用い、高い強度のトレーニングと低い強度のトレーニング後に発現するタンパク質を同定し、その差を見ることで、身体運動・トレーニングによる骨格筋のタンパク質発現の機序解明の一助とすることを目的とした。

I. 研究課題 1,2,3 で得られた結果の比較

研究課題 1 では、低強度トレーニングのモデルとして無負荷で 3 時間の水泳運動を 45 分の休憩を挟んで 2 セット行う(計 6 時間)低強度・長時間水泳運動トレーニング(LIT)を行った。この運動により骨格筋で発現変動するタンパク質のプロテオーム解析を行った結果、有意に 1.3 倍以上発現が増減したスポットが 22 個存在し、さらに MALDI-TOF/MS によっ

て 19 個のタンパク質の同定に成功した。このうち、ミトコンドリア系酵素など代謝系タンパク質が 16 個、収縮系タンパク質が 1 個、その他 2 個のタンパク質が同定された。

研究課題 2 では、高強度トレーニングのモデルとして体重の 14~15%の錘を装着して 20 秒の水泳運動を 10 秒の休憩を挟んで 14 セット行う(計 4 分 40 秒)高強度・長時間水泳運動トレーニング(HIT)を行った。この運動により骨格筋で発現変動するタンパク質のプロテオーム解析を行った結果、有意に 1.3 倍以上発現が増減したスポットが 13 個存在し、さらに MALDI-TOF/MS によって 13 個すべてのタンパク質の同定に成功した。このうち、ミトコンドリア系酵素など代謝系タンパク質が 7 個、ストレスタンパク質が 1 個、収縮系タンパク質が 3 個、その他 2 個のタンパク質が同定された。

研究課題 3 では、さらに高強度高容量トレーニングのモデルとして、研究課題 2 で用いた HIT の運動を 1 日 6 回行う高頻度・高強度・短時間水泳運動トレーニング(HIT6)を行った。この運動により骨格筋で発現変動するタンパク質のプロテオーム解析を行った結果、有意に 1.3 倍以上発現が増減したスポットが 18 個存在し、さらに MALDI-TOF/MS によって 9 個のタンパク質の同定に成功した。このうち、ストレスタンパク質が 3 個、収縮系タンパク質が 4 個、その他 2 個のタンパク質が同定された。

これらの実験結果をまとめたものを Table 6. に示し、以下のことが明らかとなった。

1) 運動トレーニングによる代謝系タンパク質の発現変動

LIT、さらに HIT でも数多くのミトコンドリア系酵素の発現が増加した。このうち、LIT と HIT で共通して発現増加したタンパク質は、ATPsyn β 、OGDH、m-MDH の 3 種類であった。これまでに運動との関連で報告のないタンパク質(ATPsyn α 、NDUFS1、-2、UQCRC1)の発現増加も観察された。さらに NDUFS1、-2 は HIT でのみで増加するなど、運動様式の違いによる特異的な発現も観察された。

これまで報告されている運動と骨格筋に関するプロテオーム解析において(Burniston 2008; Guelfi et al. 2006)、ミトコンドリア系酵素の発現変動は本研究と比較して顕著ではなかった。しかしながら、本研究で行ったミトコンドリア新生のマーカであるクエン酸合成酵素(CS)活性などが十分増加することが認められている両トレーニング方法と(Terada et al. 2004)、2D-DIGEによる定量的な発現差異解析を行えば、ミトコンドリア系酵素の発現増加が認められることが明らかとなった。一方で、HIT6ではミトコンドリア系酵素を含む代謝系タンパク質の発現変動は全く見られなかった。これは、極度な刺激を施した運動トレーニングによって、代謝系タンパク質の発現に何らかの抑制因子が働いたのかもしれない。

また、筋グリコーゲン分解酵素である glycogen phosphorylase が HIT でのみ発現減少した。これは、高い強度の運動中に乳酸産生の最初の段階の酵素活性を低くすることで疲労と関係の深い乳酸産生量を低下させるという高強度トレーニングによる適応なのかもしれない。

2) 運動トレーニングによるストレスタンパク質の発現変動

ストレスタンパク質に関して、高強度トレーニングに関する先行研究(Gjøvaag and Dahl, 2006; Féasson et al. 2002)で既に報告されているように、HIT で grp 75 が、HIT6 では α B-crystallin が発現増加した。また、HIT6 で carbonic anhydrase 3(CA3)が発現減少した。CA の主な生理学的機能は組織内の pH を緩衝することであり、運動中の乳酸の蓄積による筋漿内の pH 低下を抑止する機能を持っていると考えられている(Messonnier et al. 2007)。しかし、本実験では運動トレーニングにより骨格筋 CA3 の発現量が減少しておりその観点からの適応反応とは考えられない。トレーニングによる CA3 の低下は、このタンパク質の未知の機能に関連した適応を示唆しているのかもしれない。

3) 運動トレーニングによる収縮系タンパク質の発現変動

収縮系タンパク質に関しては、低強度トレーニングでも高強度トレーニングでも、 α トロポミオシン、MLC1-f のような速筋線維に多く含まれるタンパク質の発現が低下することが観察された。これは、低い強度のトレーニングを含め、本研究で用いたような酸素摂取量という観点からは高い強度の運動トレーニングも、筋線維組成を速筋化させるという観点からは刺激が少なかったものと考えられる。

4) その他

速筋線維で発現が高い筋弛緩因子である parvalbumin(PV)が、どの運動トレーニングによっても共通して発現減少した。特に、高強度の運動トレーニングでこの PV が減少することが初めて明らかとなった。速筋線維で PV を欠損させると疲労耐性の増加やミトコンドリアタンパク質の発現量の増加が見られるなど、筋の酸化的代謝能力の向上を示すようになることが報告されている(Chen et al. 2001; Racay et al. 2006)。この知見から、本研究における骨格筋 PV タンパク質の発現減少は、運動トレーニングによるミトコンドリア新生に重要な影響を及ぼしているのかもしれない。すなわち、運動トレーニングによって PV 発現が減少することにより、何らかのメカニズムを介して「ミトコンドリア新生が誘導」されると推測される。PV タンパク質の発現を左右する調節因子の存在やメカニズムは明らかではないため、今後の研究課題である。

また、急性期応答タンパク質である alpha-1-antitrypsin precursor (α 1-AT precursor)の発現が HIT6 で減少した。このタンパク質は血清においては運動などの刺激によって濃度が上昇することは知られているが、このタンパク質が骨格筋由来のサイトカイン(マイオカイン)の前駆体である可能性も含めて生理学的機能については不明であり、今後の研究が望まれる。

さらに以上の 4 点以外にも、LIT で脂肪酸輸送に関わるタンパク質(FABP3)や、リンゴ酸-アスパラギン酸シャトルに関するタンパク質(m-MDH, c-MDH, c-AST)などの増加が観察された。

以上をまとめると、本研究のプロテオーム解析により、運動強度・時間・頻度の違いによって様々な骨格筋タンパク質の発現変動を知ることができ、計 41 個、22 種類のタンパク質を同定することができた。このうち、運動に関しての生理学的機能が既知のものや、不明なものも観察された。例えば、これまでに運動との関連で報告のないタンパク質 (ATPsyna, NDUFS1, -2, UQCRC1) や、高強度トレーニングでのみ増加するタンパク質 (NDUFS1, NDUFS2) などが観察された。また、どの強度・時間の運動トレーニングでも発現減少した parvalbumin は、筋弛緩の機能減少及び筋線維変化のマーカーとしてだけでなく、筋ミトコンドリア新生との関係がある可能性が示唆された。

II. 今後の課題

本研究では、運動によって発現が増加または減少し、生理学的に重要な役割をもつ可能性のある新規タンパク質を探索するため、プロテオーム解析という新しい分子生物学的手法を用い、この網羅的解析によっていくつかの候補を発見することができた。新しい見解が得られたタンパク質については、*in vitro*, *in vivo* での様々な解析を行い、その機能を検証することが期待される。

しかしながら、同定できなかったスポットも存在し、転写因子などシグナル伝達に関わるようなタンパク質の同定はできなかった。今後は、以下の検討で改善が可能であると考えられる。

- a) ディファレンシャル解析(2D-DIGE)によって有意に発現変動したスポットのうち、研究課題 1(LIT)で 3 スポット、研究課題 3(HIT6)で 9 スポットを同定することができなかった。これは、i)画像の乱れから複数のタンパク質の混在などコンタミの存在や、ii)微量スポットであるために MALDI-TOF/MS での解析が限界であったことが理由として考えられる。今後は、サンプル調製の方法の検討による画像の改善や、微量な発現スポッ

トでも解析可能なより高性能な分析機器(MS/MS 機器など)の使用によりタンパク質の同定を試みる事が望まれる。

- b) 今回扱ったサンプルは Epi 筋の可溶性タンパク質である。凍結融解によりほぼすべての可溶性画分を 2 次元電気泳動にて分離したと考えられる。しかしながら、この 2 次元電気泳動画像には、アクチンやミオシン、クレアチンキナーゼ(CK)など骨格筋に大量に発現しているタンパク質スポットが見受けられた。現在の技術では、含量の多いタンパク質の存在下で微量成分を検出することは難しい(ダイナミックレンジの不足)。そこで、特定のタンパク質セットに焦点を絞った解析を行う目的で、タンパク質を分画して単純化したプロテオーム研究が注目されている(フォーカストプロテオーム)。さらに、メカニズム研究の軸となるシグナル伝達に関するタンパク質は、転写因子など核内に存在することが多い。今後は、骨格筋組織から核を分画し、プロテオーム解析を行う方法が賢明かもしれない。しかしながら、摘出した骨格筋から市販キットなどで核タンパク質を抽出し、2 次元電気泳動で分離して可視化すると、細胞骨格系タンパク質が大量に発現していることが過去の知見から得られており(Vitorino et al. 2007)、今後の分画・抽出技術の改善が必要である。

Table 6. Summary of identified proteins

protein name	function	vs control each experiment		
		LIT	HIT	HIT6
ATPsyn α	mitochondrial electron transport chain enzyme (complex V)	↗ x 1.8	-	-
ATPsyn β	mitochondrial electron transport chain enzyme (complex V)	↗ x 1.3	↗ x 1.4	-
UQCRC1	mitochondrial electron transport chain enzyme (complex III)	↗ x 1.3	-	-
NDUFS1	mitochondrial electron transport chain enzyme (complex I)	-	↗ x 1.5	-
NDUFS2	mitochondrial electron transport chain enzyme (complex I)	-	↗ x 1.5	-
OGDH	mitochondrial oxidative enzyme (TCA cycle)	↗ x 1.4	↗ x 1.4	-
dihydrolipoamide dehydrogenase	mitochondrial oxidative enzyme (PDH complex)	↗ x 1.5	-	-
dihydrolipoamide acetyltransferase	mitochondrial oxidative enzyme (PDH complex)	↗ x 1.3	-	-
m-MDH	mitochondrial oxidative enzyme (TCA cycle) /malate-aspartate shuttle	↗ x 1.3	↗ x 1.3	-
c-MDH	malate-aspartate shuttle	↗ x 1.3	-	-
c-AST	malate-aspartate shuttle	↗ x 1.4	-	-
FABP3	fatty acid transport	↗ x 1.6	-	-
muscle glycogen phosphorylase	muscle glycogen degradation	-	↘ x -1.4	-
grp75	stress protein (glucose-regulated protein)	-	↗ x 1.6	-
α B- crystallin	stress protein (small heat shock protein)	-	-	↗ x 1.6
carbonic anhydrase 3	stress protein ?	-	-	↘ x -1.4
α -tropomyosin	contractile protein (fast-twitch skeletal muscle)	↘ x -1.4	-	-
MLC-f, phosphorylatable	contractile protein (fast-twitch skeletal muscle)	-	↘ x -1.3	↘ x -1.4
MLC1-f	contractile protein (fast-twitch skeletal muscle)	-	↘ x -1.3	-
α 1-actin	contractile protein	-	-	↘ x -1.4
parvalbumin	relaxing factor in fast-twitch skeletal muscle	↘ x -1.3	↘ x -1.5	↘ x -1.5
α 1-AT precursor	acute phase reactant	-	-	↘ x -1.4

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始御懇篤な御指導ならびに激励を賜りました本研究科の樋口満教授に深甚なる謝意を表します。

本大学の先端科学・健康医療融合研究機構の講師である寺田新先生には、実験手法や研究に関する御助言を頂きましたことを深く感謝いたします。

本研究における 2 次元電気泳動画像のスキャナー、画像解析ソフトウェア、ならびに質量分析機は、国立感染症研究所からお借りいたしました。当機器を無償で貸していただき、機器操作や関連する実験手法など御親切に教えてくださりました、国立感染症研究所ウイルス 2 部の松田麻未様、同研究所細胞化学部の大内史子様に、厚く御礼申し上げます。

本稿作成や研修生生活を様々な方面から支えてくださった、(独)国立健康・栄養研究所健康増進プログラムの皆様、さらに実験の遂行にあたり常日頃御協力を頂きました本研究科の大学院生である藤本恵理様、ならびに樋口研究室の皆様に心より感謝いたします。

最後に、本研究の遂行に際して、(独)国立健康・栄養研究所健康増進プログラムリーダーの田畑泉博士には、常に御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました。ここに心から感謝の意を表します。

参考文献

Adams GR, Hather BM, Baldwin KM, Dudley GA. Skeletal muscle myosin heavy chain composition and resistance training. *J Appl Physiol* 74: 911-5, 1993.

Allemeier CA, Fry AC, Johnson P, Hikida RS, Hagerman FC, Staron RS. Effects of sprint cycle training on human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 77: 2385-90, 1994.

Barron JT, Gu L, Parrillo JE. Malate-aspartate shuttle, cytoplasmic NADH redox potential, and energetics in vascular smooth muscle. *J Mol Cell Cardiol* 30: 1571-9, 1998.

Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M, Kelly DP, Holloszy JO. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J* 16: 1879-86, 2002.

Berchtold MW, Brinkmeier H, Müntener M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev* 80: 1215-65, 2000.

Burniston JG. Adaptation of the rat cardiac proteome in response to intensity-controlled endurance exercise. *Proteomics* 9: 106-15, 2009.

Burniston JG. Changes in the rat skeletal muscle proteome induced by moderate-intensity endurance exercise. *Biochim Biophys Acta* 1784: 1077-86, 2008.

Boluyt MO, Brevick JL, Rogers DS, Randall MJ, Scalia AF, Li ZB. Changes in the rat heart proteome induced by exercise training: Increased abundance of heat shock protein hsp20. *Proteomics* 6: 3154-69, 2006.

Capitanio D, Viganò A, Ricci E, Cerretelli P, Wait R, Gelfi C. Comparison of protein expression in human deltoideus and vastus lateralis muscles using two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 5: 2577-86, 2005.

Chen G, Carroll S, Racay P, Dick J, Pette D, Traub I, Vrbova G, Eggli P, Celio M, Schwaller B. Deficiency in parvalbumin increases fatigue resistance in fast-twitch muscle and upregulates mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C114-22, 2001.

Chen G, Gharib TG, Huang CC, Taylor JM, Misek DE, Kardia SL, Giordano TJ, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* 1:304-13, 2002.

Chin ER, Grange RW, Viau F, Simard AR, Humphries C, Shelton J, Bassel-Duby R, Williams RS, Michel RN. Alterations in slow-twitch muscle phenotype in transgenic mice overexpressing the Ca²⁺ buffering protein parvalbumin. *J Physiol* 547: 649-63, 2003.

Chmurzyńska A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J Appl Genet* 47: 39-48, 2006.

Clavel S, Farout L, Briand M, Briand Y, Jouanel P. Effect of endurance training and/or fish oil supplemented diet on cytoplasmic fatty acid binding protein in rat skeletal muscles and heart. *Eur J Appl Physiol* 87: 193-201, 2002.

Côté CH, Ambrosio F, Perreault G. Metabolic and contractile influence of carbonic anhydrase III in skeletal muscle is age dependent. *Am J Physiol* 276: R559-65, 1999.

Côté C, Riverin H, Barras MJ, Tremblay RR, Frémont P, Frenette J. Effect of carbonic anhydrase III inhibition on substrate utilization and fatigue in rat soleus. *Can J Physiol Pharmacol* 71: 277-83, 1993.

Cummins P, Perry SV. Chemical and immunochemical characteristics of tropomyosins from striated and smooth muscle. *Biochem J* 141: 43-9, 1974.

Daussin FN, Zoll J, Ponsot E, Dufour SP, Doutreleau S, Lonsdorfer E, Ventura-Clapier R, Mettauer B, Piquard F, Geny B, Richard R. Training at high exercise intensity promotes qualitative adaptations of mitochondrial function in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 104: 1436-41, 2008.

De Palma S, Ripamonti M, Vigano A, Moriggi M, Capitanio D, Samaja M, Milano G, Cerretelli P, Wait R, Gelfi C. Metabolic modulation induced by chronic hypoxia in rats using a comparative proteomic analysis of skeletal muscle tissue. *J Proteome Res* 6: 1974-84, 2007.

de Roos B, Geelen A, Ross K, Rucklidge G, Reid M, Duncan G, Caslake M, Horgan G, Brouwer IA. Identification of potential serum biomarkers of inflammation and lipid modulation that are altered by fish oil supplementation in healthy volunteers. *Proteomics* 8: 1965-74, 2008

Donoghue P, Doran P, Wynne K, Pedersen K, Dunn MJ, Ohlendieck K. Proteomic profiling of chronic low-frequency stimulated fast muscle. *Proteomics* 7: 3417-30, 2007.

Doran P, Donoghue P, O'Connell K, Gannon J, Ohlendieck K. Proteomic profiling of pathological and aged skeletal muscle fibres by peptide mass fingerprinting (Review). *Int J Mol Med* 19: 547-64, 2007.

Doran P, Dowling P, Donoghue P, Buffini M, Ohlendieck K. Reduced expression of regucalcin in young and aged mdx diaphragm indicates abnormal cytosolic calcium handling in dystrophin-deficient muscle. *Biochim Biophys Acta* 1764: 773-85, 2006.

Doran P, Martin G, Dowling P, Jockusch H, Ohlendieck K. Proteome analysis of the dystrophin-deficient MDX diaphragm reveals a drastic increase in the heat shock protein α HSP. *Proteomics* 6: 4610-21, 2006.

Doran P, O'Connell K, Gannon J, Kavanagh M, Ohlendieck K. Opposite pathobiochemical fate of pyruvate kinase and adenylate kinase in aged rat skeletal muscle as revealed by proteomic DIGE analysis. *Proteomics* 8: 364-77, 2008.

Dufaux B, Order U. Plasma elastase- α 1-antitrypsin, neopterin, tumor necrosis factor, and soluble interleukin-2 receptor after prolonged exercise. *Int J Sports Med* 10: 434-8, 1989.

Fallon KE. The acute phase response and exercise: the ultramarathon as prototype exercise. *Clin J Sport Med* 11: 38-43, 2001.

Féasson L, Stockholm D, Freyssenet D, Richard I, Duguez S, Beckmann JS, Denis C. Molecular adaptations of neuromuscular disease-associated proteins in response to eccentric exercise in human skeletal muscle. *J Physiol* 543: 297-306, 2002.

Fujishiro K, Fukui Y, Sato O, Kawabe K, Seto K, Motojima K. Analysis of tissue-specific and PPAR α -dependent induction of FABP gene expression in the mouse liver by an in vivo DNA electroporation method. *Mol Cell Biochem* 239: 165-72, 2002.

Fumagalli L, Businaro R, Nori SL, Toesca A, Pompili E, Evangelisti E, Giannetti S, Ippoliti F, De Renzis G. Protease inhibitors in mouse skeletal muscle: tissue-associated components of serum inhibitors and calpastatin. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 42: 535-46, 1996.

Gallo M, MacLean I, Tyreman N, Martins KJ, Syrotuik D, Gordon T, Putman CT. Adaptive responses to creatine loading and exercise in fast-twitch rat skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R1319-28, 2008.

Geers C, Gros G. Carbon dioxide transport and carbonic anhydrase in blood and muscle. *Physiol Rev* 80: 681-715, 2000.

Gelfi C, De Palma S, Cerretelli P, Begum S, Wait R. Two-dimensional protein map of human vastus lateralis muscle. *Electrophoresis* 24: 286-95, 2003.

Gelfi C, Viganò A, De Palma S, Ripamonti M, Begum S, Cerretelli P, Wait R. 2-D protein maps of rat gastrocnemius and soleus muscles: a tool for muscle plasticity assessment. *Proteomics* 6: 321-40, 2006.

Gjøvaag TF, Vikne H, Dahl HA. Effect of concentric or eccentric weight training on the expression of heat shock proteins in m. biceps brachii of very well trained males. *Eur J Appl Physiol* 96: 355-62, 2006.

González B, Hernando R, Manso R. Stress proteins of 70 kDa in chronically exercised skeletal muscle. *Pflugers Arch* 440: 42-9, 2000.

Goto M, Terada S, Kato M, Katoh M, Yokozeki T, Tabata I, Shimokawa T. cDNA Cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats. *Biochem Biophys Res Commun* 274: 350-4, 2000.

Green HJ, Klug GA, Reichmann H, Seedorf U, Wiehrer W, Pette D. Exercise-induced fibre type transitions with regard to myosin, parvalbumin, and sarcoplasmic reticulum in muscles of the rat. *Pflugers Arch* 400: 432-8, 1984.

Griffin TJ, Gygi SP, Ideker T, Rist B, Eng J, Hood L, Aebersold R. Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics* 1:323-33, 2002.

Guelfi KJ, Casey TM, Giles JJ, Fournier PA, Arthur PG. A proteomic analysis of the acute effects of high-intensity exercise on skeletal muscle proteins in fasted rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33: 952-7, 2006.

Hamelin M, Sayd T, Chambon C, Bouix J, Bibé B, Milenkovic D, Leveziel H, Georges M, Clop A, Marinova P, Laville E. Proteomic analysis of ovine muscle hypertrophy. *J Anim Sci* 84: 3266-76, 2006.

Hanash S. Disease proteomics. *Nature* 422: 226-32, 2003.

Hernando R, Manso R. Muscle fibre stress in response to exercise: synthesis, accumulation and isoform transitions of 70-kDa heat-shock proteins. *Eur J Biochem* 243: 460-7, 1997.

Hittel DS, Hathout Y, Hoffman EP, Houmard JA. Proteome analysis of skeletal muscle from obese and morbidly obese women. *Diabetes* 54: 1283-8, 2005.

Højlund K, Wrzesinski K, Larsen PM, Fey SJ, Roepstorff P, Handberg A, Dela F, Vinten J, McCormack JG, Reynet C, Beck-Nielsen H. Proteome analysis reveals

phosphorylation of ATP synthase beta -subunit in human skeletal muscle and proteins with potential roles in type 2 diabetes. *J Biol Chem* 278: 10436-42, 2003.

Holloszy JO, Booth FW. Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu Rev Physiol* 38: 273-91, 1976.

Horowitz JF, Leone TC, Feng W, Kelly DP, Klein S. Effect of endurance training on lipid metabolism in women: a potential role for PPARalpha in the metabolic response to training. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E348-55, 2000.

Huber B, Pette D. Dynamics of parvalbumin expression in low-frequency-stimulated fast-twitch rat muscle. *Eur J Biochem* 236: 814-9, 1996.

Huey KA, Meador BM. Contribution of IL-6 to the Hsp72, Hsp25, and {alpha}{beta}-crystallin responses to inflammation and exercise training in mouse skeletal and cardiac muscle. *J Appl Physiol* 105: 1830-6, 2008.

Isfort RJ, Hinkle RT, Jones MB, Wang F, Greis KD, Sun Y, Keough TW, Anderson NL, Sheldon RJ. Proteomic analysis of the atrophying rat soleus muscle following denervation. *Electrophoresis* 21: 2228-34, 2000.

Karp NA, Kreil DP, Lilley KS. Determining a significant change in protein expression with DeCyder during a pair-wise comparison using two-dimensional difference gel electrophoresis. *Proteomics* 4: 1421-32, 2004.

LeBlanc PJ, Peters SJ, Tunstall RJ, Cameron-Smith D, Heigenhauser GJ. Effects of aerobic training on pyruvate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinase in human skeletal muscle. *J Physiol* 557: 559-70, 2004.

Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* 1: 361-70, 2005.

Mahoney DJ, Parise G, Melov S, Safdar A, Tarnopolsky MA. Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. *FASEB J* 19: 1498-500, 2005.

Markovitch D, Tyrrell RM, Thompson D. The effect of prior exercise on ex vivo induction of heme oxygenase-1 in human lymphocytes. *Free Radic Res* 41: 1125-34, 2007.

Marouga R, David S, Hawkins E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem* 382: 669-78, 2005.

Menshikova EV, Ritov VB, Ferrell RE, Azuma K, Goodpaster BH, Kelley DE. Characteristics of skeletal muscle mitochondrial biogenesis induced by moderate-intensity exercise and weight loss in obesity. *J Appl Physiol* 103: 21-7, 2007.

Messonnier L, Kristensen M, Juel C, Denis C. Importance of pH regulation and lactate/H⁺ transport capacity for work production during supramaximal exercise in humans. *J Appl Physiol* 102: 1936-44, 2007.

Mizzen LA, Kabling AN, Welch WJ. The two mammalian mitochondrial stress proteins, grp 75 and hsp 58, transiently interact with newly synthesized mitochondrial proteins. *Cell Regul* 2: 165-79, 1991.

Moriggi M, Cassano P, Vasso M, Capitanio D, Fania C, Musicco C, Pesce V, Gadaleta MN, Gelfi C. A DIGE approach for the assessment of rat soleus muscle changes during unloading: effect of acetyl-L-carnitine supplementation. *Proteomics* 8: 3588-604, 2008.

Murakami T, Shimomura Y, Yoshimura A, Sokabe M, Fujitsuka N. Induction of nuclear respiratory factor-1 expression by an acute bout of exercise in rat muscle. *Biochim Biophys Acta* 1381: 113-22, 1998.

Nesher R, Karl IE, Kaiser KE, Kipnis DM. Epitrochlearis muscle. I. Mechanical performance, energetics, and fiber composition. *Am J Physiol* 239: E454-60, 1980.

Neufer PD, Benjamin IJ. Differential expression of B-crystallin and Hsp27 in skeletal muscle during continuous contractile activity. Relationship to myogenic regulatory factors. *J Biol Chem* 271: 24089-95, 1996.

O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250: 4007-21, 1975.

Okumura N, Hashida-Okumura A, Kita K, Matsubae M, Matsubara T, Takao T, Nagai K. Proteomic analysis of slow- and fast-twitch skeletal muscles. *Proteomics* 5: 2896-906, 2005.

Racay P, Gregory P, Schwaller B. Parvalbumin deficiency in fast-twitch muscles leads to increased 'slow-twitch type' mitochondria, but does not affect the expression of fiber specific proteins. *FEBS J* 273: 96-108, 2006.

Raddatz K, Albrecht D, Hochgräfe F, Hecker M, Gotthardt M. A proteome map of murine heart and skeletal muscle. *Proteomics* 8: 1885-97, 2008.

Rall JA. Role of Parvalbumin in Skeletal Muscle Relaxation *News Physiol Sci* 11: 249-255, 1996.

Rasmussen UF, Krstrup P, Bangsbo J, Rasmussen HN. The effect of high-intensity exhaustive exercise studied in isolated mitochondria from human skeletal muscle. *Pflugers Arch* 443: 180-7, 2001.

Ren JM, Semenkovich CF, Gulve EA, Gao J, Holloszy JO. Exercise induces rapid increases in GLUT4 expression, glucose transport capacity, and insulin-stimulated glycogen storage in muscle. *J Biol Chem* 269: 14396-401, 1994.

Rose AJ, Frøsig C, Kiens B, Wojtaszewski JF, Richter EA. Effect of endurance exercise training on Ca²⁺ calmodulin-dependent protein kinase II expression and signalling in skeletal muscle of humans. *J Physiol* 583: 785-95, 2007.

Santos-González M, Gómez Díaz C, Navas P, Villalba JM. Modifications of plasma proteome in long-lived rats fed on a coenzyme Q10-supplemented diet. *Exp Gerontol* 42: 798-806, 2007.

Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and

function. *Physiol Rev* 88: 611-38, 2008.

Schmitt B, Flück M, Décombaz J, Kreis R, Boesch C, Wittwer M, Graber F, Vogt M, Howald H, Hoppeler H. Transcriptional adaptations of lipid metabolism in tibialis anterior muscle of endurance-trained athletes. *Physiol Genomics* 15: 148-57, 2003.

Schmitt TL, Pette D. Fiber type-specific distribution of parvalbumin in rabbit skeletal muscle. A quantitative microbiochemical and immunohistochemical study. *Histochemistry* 96: 459-65, 1991.

Schreiber SN, Emter R, Hock MB, Knutti D, Cardenas J, Podvynec M, Oakeley EJ, Kralli A. The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 6472-7, 2004.

Shearer J, Fueger PT, Rottman JN, Bracy DP, Binas B, Wasserman DH. Heart-type fatty acid-binding protein reciprocally regulates glucose and fatty acid utilization during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E292-7, 2005.

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68: 850-8, 1996.

Song S, Morgan M, Ellis T, Poirier A, Chesnut K, Wang J, Brantly M, Muzyczka N, Byrne BJ, Atkinson M, Flotte TR. Sustained secretion of human alpha-1-antitrypsin from murine muscle transduced with adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14384-8, 1998.

Stauber WT, Ong SH, Fritz VK, Esnard F, Gauthier F. Protease inhibitor localization in control and streptozotocin-diabetic skeletal muscles. *Histochem J* 15: 1079-86, 1983.

Sun B, Wang JH, Lv YY, Zhu SS, Yang J, Ma JZ. Proteomic adaptation to chronic high intensity swimming training in the rat heart *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 3: 108-117, 2008.

Tabata I, Nishimura K, Kouzaki M, Hirai Y, Ogita F, Miyachi M, Yamamoto K. Effects of moderate-intensity endurance and high-intensity intermittent training on anaerobic capacity and VO₂max. *Med Sci Sports Exerc* 28: 1327-30, 1996.

Takahashi M, Kubota S. Exercise-related novel gene is involved in myoblast differentiation. *Biomed Res* 26: 79-85, 2005.

Takala TE, Rahkila P, Hakala E, Vuori J, Puranen J, Väänänen K. Serum carbonic anhydrase III, an enzyme of type I muscle fibres, and the intensity of physical exercise. *Pflugers Arch* 413: 447-50, 1989.

Terada S, Goto M, Kato M, Kawanaka K, Shimokawa T, Tabata I. Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 350-4, 2002.

Terada S, Kawanaka K, Goto M, Shimokawa T, Tabata I. Effects of high-intensity intermittent swimming on PGC-1 α protein expression in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 184: 59-65, 2005.

Terada S, Tabata I, Higuchi M. Effect of high-intensity intermittent swimming training on fatty acid oxidation enzyme activity in rat skeletal muscle. *Jpn J Physiol* 54: 47-52, 2004.

Terada S, Yokozeki T, Kawanaka K, Ogawa K, Higuchi M, Ezaki O, Tabata I. Effects of high-intensity swimming training on GLUT-4 and glucose transport activity in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 90: 2019-24, 2001.

Tikkanen HO, Näveri HK, Härkönen MH. Alteration of regulatory enzyme activities in fast-twitch and slow-twitch muscles and muscle fibres in low-intensity endurance-trained rats. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 70: 281-7, 1995.

Tonge R, Shaw J, Middleton B, Rowlinson R, Rayner S, Young J, Pognan F, Hawkins E, Currie I, Davison M. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* 1: 377-96, 2001.

Unlü M, Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18: 2071-7, 1997.

Viganò A, Ripamonti M, De Palma S, Capitanio D, Vasso M, Wait R, Lundby C, Cerretelli P, Gelfi C. Proteins modulation in human skeletal muscle in the early phase of adaptation to hypobaric hypoxia. *Proteomics* 8: 4668-79, 2008.

Vitorino R, Ferreira R, Neuparth M, Guedes S, Williams J, Tomer KB, Domingues PM, Appell HJ, Duarte JA, Amado FM. Subcellular proteomics of mice gastrocnemius and soleus muscles. *Anal Biochem* 366: 156-69, 2007.

Wende AR, Schaeffer PJ, Parker GJ, Zechner C, Han DH, Chen MM, Hancock CR, Lehman JJ, Huss JM, McClain DA, Holloszy JO, Kelly DP. A role for the transcriptional coactivator PGC-1alpha in muscle refueling. *J Biol Chem* 282: 36642-51, 2007.

Yoshino K, Oshiro N, Tokunaga C, Yonezawa K. Mass Spectrometry-Based Protein Identification by Correlation with Sequence Database. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan* 52: 106-129, 2004.

Yoshioka M, Tanaka H, Shono N, Snyder EE, Shindo M, St-Amand J. Serial analysis of gene expression in the skeletal muscle of endurance athletes compared to sedentary men. *FASEB J* 17: 1812-9, 2003.

Zimmerman UJ, Wang P, Zhang X, Bogdanovich S, Forster R. Anti-oxidative response of carbonic anhydrase III in skeletal muscle. *IUBMB Life* 56: 343-7, 2004.