

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、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。これまでに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。

- 2) 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。
- 3) 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、運動に関する生理学的機能が既知のものや、不明なものもが観察された。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。

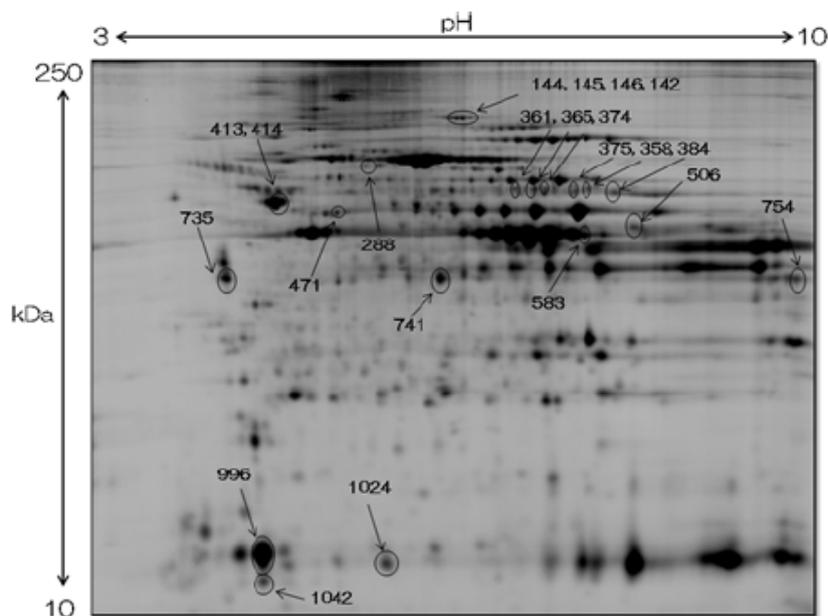


Fig. 1 Epitrochlearis muscle protein profiling by 2D-DIGE. Differential analysis of epitrochlearis muscle extracts after low-intensity prolonged training (LIT) compared to control (CON), revealed that 22 spots were differentially expressed ($p < 0.05$).

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)	↗ 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