

身体活動が骨格筋に及ぼす影響

身体活動の効果検証チーム（課題番号：137109）

研究期間：平成 25 年 7 月 24 日～平成 26 年 3 月 31 日

研究代表者：安藤創一 研究員：須藤みず紀、道下竜馬

近年、環境的要因がゲノムに書かれた遺伝情報を変えることなく遺伝子の発現を制御する現象であるエピジェネティクスが注目を集めている。エピジェネティクスは、“DNA の塩基配列に変化を起こさず、かつ細胞分裂を経て伝達される遺伝子機能の変化やその仕組み”と定義されている。エピジェネティクスの基本因子は、DNA のメチル化や DNA が巻き付いているヒストンタンパク質のアセチル化やメチル化などである。その中でも DNA のメチル化は重要であり、DNA が高度にメチル化されると遺伝子発現（転写）が抑制される一方で、脱メチル化は遺伝子発現の亢進をもたらすことが明らかになっている。したがって、可逆的な反応である DNA のメチル化は、遺伝子発現におけるエピジェネティックな制御において鍵となっている可能性がある。

一酸化窒素（NO）は、窒素と酸素からなる無機化合物である。NO は生体内において血管拡張作用を有しているだけでなく、骨格筋の糖取り込みを亢進することや神経伝達物質として働くことも知られている。NO の合

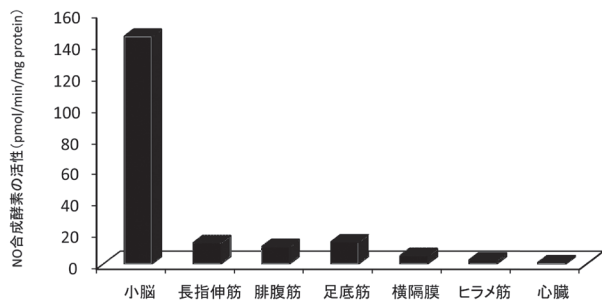


図 1 ラットの脳、骨格筋（長指伸筋、腓腹筋、足底筋、横隔膜、ヒラメ筋）、および心臓の一酸化窒素合成活性

Kobzik et al. (1994) Nature 372(6506):546-8 をもとに作図。

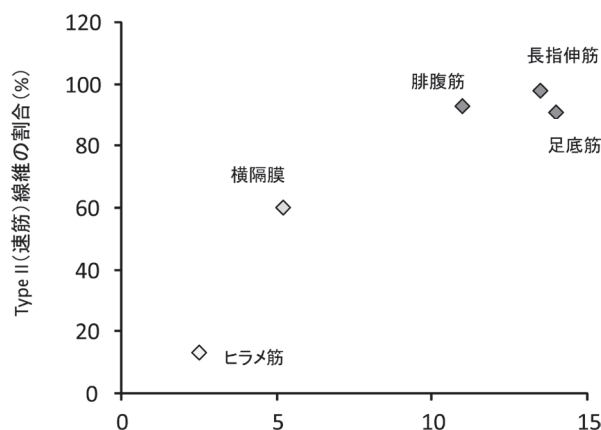


図 2 ラットの骨格筋（長指伸筋、腓腹筋、足底筋、横隔膜、ヒラメ筋）の一酸化窒素合成活性とそれぞれの筋の Type II（速筋）線維の割合との関係

成には、一酸化窒素合成酵素（NOS）が重要な役割を担っており、NOSは常時細胞内に一定量存在する構成型 NOSである神経型 NOS（nNOS）・血管内皮型 NOS（eNOS）、および炎症やストレスにより誘導される誘導型 NOS（iNOS）の3種類のアイソフォームに区別されている。

Kobzikら（1994）はラットの骨格筋におけるNOの産生、起源と機能について調べた。その結果、nNOSが骨格筋の細胞膜付近にみられること、そしてnNOSの活性が骨格筋、小脳、心臓との間で大きく異なることを明らかにした（図1）。さらに、同じ骨格筋であっても、筋ごとにnNOSの活性に大きな差がみられることがわかった。特に、速筋線維を多く含む長指伸筋、腓腹筋、足底筋においてnNOSの活性が高いこと、遅筋線維を多く含む横隔膜、ヒラメ筋ではその活性が低いことが

明らかとなった(図2)。このように、速筋線維と遅筋線維との間でnNOSの発現が異なることが示されたが、なぜnNOSの発現が速筋線維と遅筋線維で大きく異なるのかについては、依然として解明されていない。

本研究では、速筋線維と遅筋線維との間でみられるnNOSの発現に差異にエピジェネティックな制御機構が関与しているという仮説を立てた。さらに、小脳と心臓といった生体内の組織のnNOS活性が骨格筋と異なることを考えると(Kobzik et al. 1994)、nNOSの発現に対するエピジェネティックな制御機構が生体内の組織によっても異なる可能性が考えられる。しかし、骨格筋や臓器などで発現するnNOSの発現に対するエピジェネティックな制御機構に関しては明らかとなっていない。

そこで本研究では、DNAの塩基配列の変化を伴わずに、遺伝子発現を後天的に修飾するエピジェネティックな制御機構に着目した。本研究チームの目的は、骨格筋を中心に生体内の各組織でのnNOS遺伝子のプロモーター領域におけるDNAメチル化レベルを定量化し、nNOSの発現に対するエピジェネティックな制御機構の一端を明らかにすることであった。

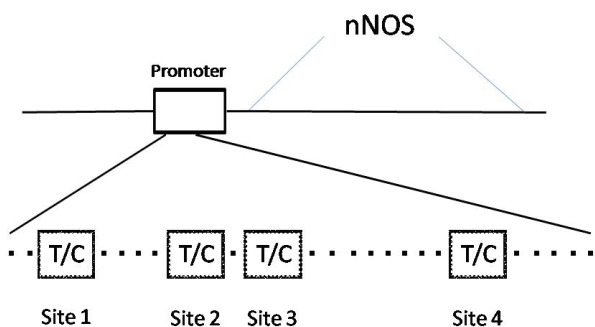


図3 nNOS 遺伝子のプロモーター領域の CpG の 4 サイトの位置

実験動物は12週齢のC57BL/6J雄性マウスとした。本研究で解析の対象とする骨格筋・組織は、Kobzikら(1994)の先行研究をもとに、骨格筋(長指伸筋、腓腹筋速筋部位、腓腹筋遅筋部位、足底筋、ヒラメ筋)、小脳、心臓とした(それぞれn=5)。

最初にそれぞれのサンプルからDNAを抽出した。DNAの抽出にはQIAamp DNA mini kit (Cat. 51306: QIAGEN)を用いた。次に、抽出したDNAに対してバイサルファイト処理を行った。バイサルファイト処理にはEpiTect® Bisulfite kit (48) (Cat. 59104: QIAGEN)を用いた。シトシンのメチル化率の定量にはパイロシーケンス法を用いた(PyroMark Q96ID: DIAGEN)。パイロシーケンス法は、DNAポリメラーゼの伸長反応をリアルタイムに検出することで塩基配列を解読するDNAシーケンス(DNAを構成するヌクレオチドの塩基配列

を決定する)の手法である。DNAサンプルをあらかじめバイサルファイト処理を行なうとメチル化シトシンは変換されず、非メチル化シトシンのみがウラシルに変換される。シーケンス反応としてウラシル(U)はチミン(T)として表現されることから、バイサルファイト処理前後で生じるCとT(U)の差異を配列データとして用いることができる。本研究では、ポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction: PCR)により、バイサルファイト処理したDNAからnNOSの領域を挟む180bpのDNA断片を増幅した。そして、メチル化サイトをC/Tの一塩基多型としてアレル(対立遺伝子)頻度解析を行うことで、nNOS遺伝子のプロモーター領域における4か所のCpGサイト(図3)のシトシンのメチル化率を定量化した。パイロシーケンス法での実験は、1サンプルあたり3回測定し、その平均値を代表とした。測定基準を満たさないサンプルがある場合は除外し、残りの2回の平均値を用いた。

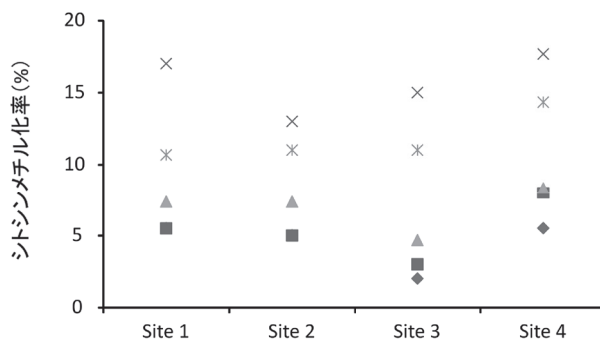


図4 長指伸筋のnNOS 遺伝子のプロモーター領域におけるCpGサイトのシトシンメチル化率(同じ図形は同じ個体を示す)

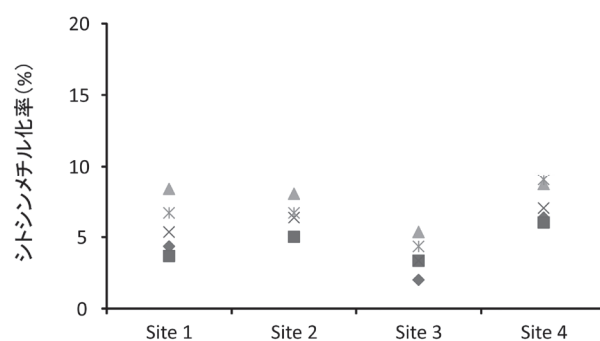


図5 ヒラメ筋のnNOS 遺伝子のプロモーター領域におけるCpGサイトのシトシンメチル化率(同じ図形は同じ個体を示す)

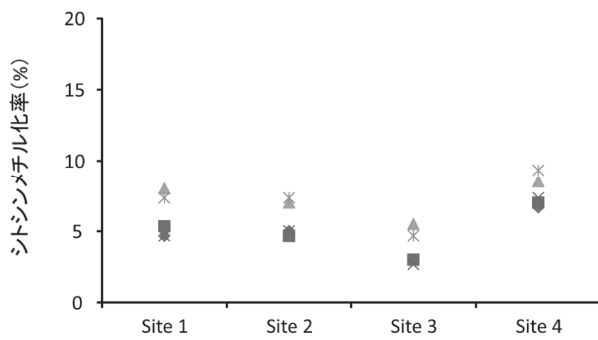


図6 小脳の nNOS 遺伝子のプロモーター領域における CpG サイトのシトシメチル化率 (同じ図形は同じ個体を示す)

図4に長指伸筋、図5にヒラメ筋、図6に小脳の各サンプルの個々のデータを示す。個体によってはメチル化率がやや高いサンプルもみられたものの、全体を通じて顕著な差はみられなかった。表1に nNOS 遺伝子のプロモーター領域における4つの CpG サイトのシトシメチル化率をまとめて示す。骨格筋(長指伸筋、腓腹筋速筋部位、腓腹筋遅筋部位、足底筋、ヒラメ筋)、小脳、心臓の間で大きな差は認められなかった。また、プロモーター領域の CpG サイトごとにも明確な違いはみられなかった。以上の結果から、nNOS 遺伝子のプロモーター領域における CpG のシトシメチル化率は、筋線維組成が異なる骨格筋の間だけでなく、異なる組織の間でも大きな差がないことが示された。

骨格筋は、可塑性に富んだ組織である。例えば、レジスタンストレーニングなどの運動は筋を肥大させる一方で、加齢や身体活動は骨格筋を萎縮させる。これらの知見は、骨格筋が後天的な要因の影響を大きく受ける組織であることを示唆している。本研究では、骨格筋(長指伸筋、腓腹筋速筋部位、腓腹筋遅筋部位、足底筋、ヒラメ筋)と小脳、心臓の nNOS 遺伝子のプロモーター領域における DNA メチル化率を定量化し、違いがみられるのかについて検討した。しかしながら、それぞれの組織においてプロモーター領域の4つの CpG サイトにおけるシトシメチル化率に明確な違いは認められなかった。今回調べたサンプルでは総じて nNOS 遺伝子のプロモーター領域における DNA メチル化率は低い値であった。DNA メチル化率が低い値を示したことは、これらの組織において、nNOS の遺伝子発現が亢進されていることを示唆している。生体内における NOS の役割の重要性を鑑みると、本研究の結果はそれぞれの組織において nNOS 発現量には違いがみられる可能性は高いものの、その発現に対するエピジェネティック制御機構については大きな差がないことを示唆しているのかもしれない。また、今回我々は通常モデルの12週齢のマウ

表1 nNOS 遺伝子のプロモーター領域における CpG シトシメチル化率 (%)

	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4
長指伸筋	9.2 ± 4.3	8.3 ± 3.2	7.1 ± 5.0	10.8 ± 4.5
腓腹筋速筋部位	9.7 ± 4.1	9.9 ± 2.6	6.6 ± 2.9	10.4 ± 2.6
腓腹筋遅筋部位	8.7 ± 3.0	8.9 ± 4.2	6.0 ± 3.4	10.0 ± 2.9
足底筋	5.1 ± 0.7	4.7 ± 0.6	3.5 ± 0.9	6.4 ± 1.1
ヒラメ筋	5.7 ± 1.7	6.2 ± 1.1	3.7 ± 1.1	7.4 ± 1.2
小脳	6.0 ± 1.4	5.8 ± 1.1	3.8 ± 1.1	7.8 ± 1.0
心臓	8.1 ± 0.5	7.9 ± 0.7	6.1 ± 0.8	10.6 ± 1.1

Mean±SD

スのみを用いており、環境的な要因には大きな差がない群であったことが考えられる。エピジェネティックな制御が環境的要因と深く関係する可能性を考えると、このこともプロモーター領域におけるメチル化率に差異を認めなかった一因であるかもしれない。

今後の研究では、運動などの身体活動、ギブス固定などの身体不活動、加齢が nNOS 遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化率と nNOS の発現に対してどのような影響を与えるのかを明らかにしていく必要があると考えられる。近年、Barrès ら (2012) は、運動後の骨格筋では、PGC1 α 、PDK4 や PPAR δ といった代謝と関連が深い遺伝子のプロモーター領域において低メチル化が起こることを明らかにした。このことはプロモーター領域の DNA メチル化や脱メチル化が、1回の運動のような短期間でも変化しうることを示唆しており、大変興味深い研究結果である。

Baar (2010) は骨格筋の表現型にエピジェネティクスが関与している可能性を示唆した。しかし、骨格筋の表現型に対してどのように関与しているのかについては、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。エピジェネティックな制御機構が遺伝子の発現に及ぼす影響が複雑で多岐にわたることを考えると、今後は DNA メチル化率の測定と併せてヒストンタンパク質の修飾(アセチル化、メチル化など)なども行うことで、遺伝子発現に対するエピジェネティックな制御機構についてより詳細に検討する必要があることが考えられる。

【謝辞】

本研究の一部は、福岡大学研究推進部の研究経費によるものである(課題番号:137109)。本研究を行うにあたり、福岡大学スポーツ科学部の檜垣靖樹教授から多くのアドバイスをいただきました。また、スポーツ健康科学研究科に当時在籍していた江島弘晃君、富賀裕貴君、並びに現在所属している伊藤愛さんからも多大なご協力

をいただきました。この場を借りてお礼を申し上げます。

【参考文献】

Baar K. (2010) Epigenetic control of skeletal muscle fibre type. *Acta Physiol (Oxf)* 199 (4) :477-87.

Barrès R, Yan J, Egan B, Treebak JT, Rasmussen M, Fritz T, Caidahl K, Krook A, O’Gorman DJ, Zierath JR. (2012) Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. *Cell Metab* 15 (3) :405-11.

Kobzik L, Reid MB, Brecht DS, Stamler JS. (1994) Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 372 (6506) :546-8.