

レジスタンストレーニングが 骨格筋ミトコンドリアに及ぼす影響

東 京 大 学 北 岡 祐

Mitochondrial Adaptations to Resistance Training in Skeletal Muscle

by

Yu Kitaoka

*Department of Sports Sciences,
Graduate School of Arts and Sciences,
The University of Tokyo*

ABSTRACT

It is well known that exercise training induces mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. More recent studies have demonstrated that exercise also alters mitochondrial quality through the processes of fission and fusion. In this study, we investigated the effect of electrical stimulation-induced resistance training, which induces muscle hypertrophy, on the expression of proteins related to mitochondrial dynamics in rat skeletal muscle. We found that 4 weeks of resistance training increased protein levels of mitofusin 2 (Mfn2) and optic atrophy 1 (Opa1), whereas protein levels of fission protein 1 (Fis1) and dynamin related protein 1 (Drp) were not altered. These results indicate that resistance training induces mitochondrial fusion, which may lead to an expanded mitochondrial reticular network along with muscle hypertrophy. It has been generally assumed that resistance training has little effect on skeletal muscle mitochondria. However, our results suggest that resistance exercise training may

increase mitochondrial function without changing mitochondrial content in skeletal muscle.

要 旨

運動は骨格筋ミトコンドリアの量を増加させるだけでなく、質的な変化をもたらす可能性が近年の研究により示唆されている。本研究では、ラットを実験動物として用いた電気刺激モデルを採用し、レジスタンストレーニングが骨格筋のミトコンドリアに及ぼす影響について検討することを目的とした。4週間のトレーニングによって、ミトコンドリアの融合に関与する mitofusin 2 (Mfn2) および optic atrophy 1 (Opa1) タンパク質量が有意に増加した一方で、ミトコンドリアの分裂に関与する fission protein 1 (Fis1) および dynamin related protein 1 (Drp) 1 タンパク質量に変化はみられなかった。これらの結果は、レジスタンストレーニングは骨格筋ミトコンドリアの融合を促進し、その機能を高める可能性を示唆している。

緒 言

近年の研究において、持久的なトレーニングによって骨格筋のミトコンドリアの量が増加するだけでなく、その形態に変化が起こることや、ダメージを受けたミトコンドリアの分解が選択的に進むことが報告されている¹⁾。一方で、レジスタンストレーニングが骨格筋においてタンパク質合成を高め、筋肥大をもたらすことはよく知られているが、これまで行われてきたミトコンドリアに関する研究の多くは持久的トレーニングに関するものであり、レジスタンストレーニングが骨格筋のミトコンドリアに及ぼす影響についての研究は少ない。過去に行われた研究において、ミトコンドリア量を反映するマーカーとして測定されたクエン酸シンターゼやコハク酸デヒドロゲナーゼ等の酵

素活性にはレジスタンストレーニングによる変化はみられなかったことから、レジスタンストレーニングが酸化系のエネルギー代謝に及ぼす影響は小さいと考えられてきた^{2,3)}。しかしながら近年では、レジスタンストレーニングによって骨格筋ミトコンドリアの呼吸機能が高まったという報告もされている^{4,6)}。これらの先行研究は、レジスタンストレーニングが必ずしも骨格筋ミトコンドリアの量的な変化を伴わず、質的な変化をもたらす可能性を示唆している。

本研究では、特にミトコンドリアの品質管理機構において重要な役割を果たすダイナミクス（分裂と融合）に着目し、レジスタンストレーニングが骨格筋ミトコンドリアに及ぼす影響について検討することにした。ミトコンドリアの分裂には fission protein 1 (Fis1) と dynamin related protein 1 (Drp) 1、融合には mitofusin 2 (Mfn2) と optic atrophy 1 (Opa1)、のそれぞれ2つのタンパク質が重要な役割を果たすことが知られており、これら4つのタンパク質量を測定することによって、ミトコンドリアの形態的な変化を推測することができると思われる（図1）。

1. 実験方法

1.1 トレーニング

実験には10週齢の雄性 Sprague-Dawley ラット（日本クレア社）を用いた。ラットは12時間ごとの照明管理の元で、水分および栄養を十分に与えられて飼育され、すべての動物実験は日本体育大学動物実験規程を遵守し、倫理審査委員会の承認を得て行われた。レジスタンストレーニングとして、麻酔下で右脚の腓腹筋に対し最大等尺性足関節底屈トルクが発揮されるよう経皮的に電気

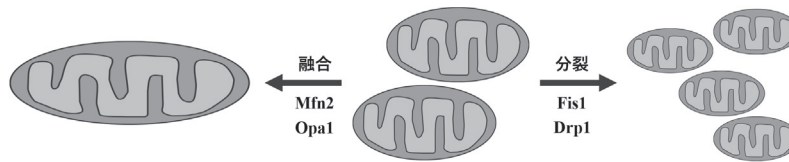


図1 ミトコンドリア分裂・融合タンパク質

刺激 (100 Hz, ~ 30 V) を行い, 左脚はコントロールとした. 具体的には, 3秒間の収縮を7秒間のインターバルを空けて10回を1セットとし, セット間には3分間のレストを挟み計5セット行った. トレーニングは1日おきに計12回, 4週間行い, 最後のトレーニングから48時間後に腓腹筋サンプルを採取した. この実験系は, ラットに対するレジスタンストレーニングモデルとしてすでに確立されたものであり, 一過性の刺激による mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナル経路の活性化, および長期トレーニングによる筋肥大効果はすでに確認済みであることから, 今回も同様の実験プロトコルを用いた^{7,8)}. 採取したサンプルは液体窒素にて急速冷凍し, 分析まで-80℃で保存した.

1.2 ウェスタンブロッティング

腓腹筋サンプルを用い, プロテアーゼおよびフォスファターゼ阻害剤を含んだRIPA (Radio-immunoprecipitation assay) バッファーでホモジナイズした. タンパク濃度はBCA (Bicinchoninic Acid) 法により測定した. 10-12%のポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った後, PVDFメンブレンに転写した. Ponceau染色にて確認した後, メンブレンを5%スキムミルクまたはウシ血清アルブミンを含むTBST溶液で室温にて1時間ブロッキングし, 測定するタンパクを特異的に認識する一次抗体反応 (1000-3000倍希釈して4℃で16時間) およびそれに対応した二次抗体反応 (5000倍希釈して室温で1時間) 後,

化学発光検出試薬にて発色し, ChemiDoc XRS および Quantity One (Bio-Rad) を用い撮影と定量を行った. 実験に用いた一次抗体のリストは表1に示す.

表1 本研究で使用した一次抗体

	メーカー	品番
VDAC	Cell Signaling Technology	#4661
Mfn2	Abcam	ab124773
Opa1	BD Transduction Laboratories	612606
Fis1	Abcam	ab96764
Drp1	Abcam	ab56788

1.3 統計解析

データはすべて平均値 ± 標準偏差で表した. 2群間の比較には対応のあるt検定を用い, 有意水準は $p < 0.05$ とした. 解析には GraphPad Prism 6.0 を用いた.

2. 実験結果

2.1 ミトコンドリア量

まず, ミトコンドリア量の指標として, Voltage-dependent anion channel (VDAC) のタンパク質量を測定したところ, 4週間のレジスタンストレーニングの効果はみられなかった (図2).

2.2 ミトコンドリアダイナミクス

次に, ミトコンドリアの融合と分裂に関するタンパク質量の測定を行った. 本研究では, ミトコンドリアの質的な変化を評価するため, VDACタンパク質量あたりの分裂・融合タンパク質量という形でデータを示した. 4週間のレジスタンス

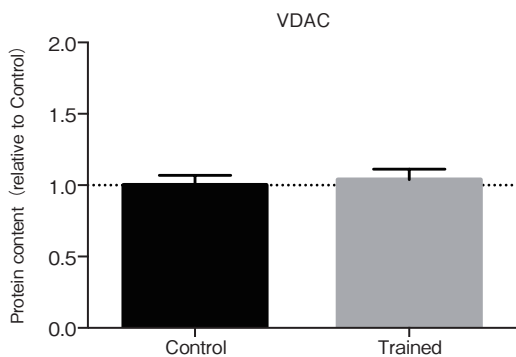


図2 レジスタンストレーニングによるミトコンドリア量の変化

トレーニングによって、ミトコンドリアの融合に関与する Mfn2 および Opa1 のタンパク質量が有意に増加した (図 3)。一方で、ミトコンドリアの分裂に関与する Fis1 や Drp1 のタンパク質量に変化はみられなかった (図 4)。

3. 考 察

本研究では、ラットのレジスタンストレーニング実験モデルを用い、トレーニングによってミトコンドリアの融合に関与するタンパク質量が増加することを示した。一般的に、融合の進んだミトコンドリアの方がエネルギー産生能力の高いことが知られていることから^{9,10)}、今回の研究結果は、ミトコンドリア量の指標に変化が見られない場合にも質的な変化の起こる可能性、つまり筋の肥大に伴って、ミトコンドリアのネットワークを広げる方向の適応が起こることで、エネルギーの産生能力が高まる可能性を示唆している。実際に、ミトコンドリアの融合に関与するタンパク質の欠損したマウスでは、ミトコンドリアの機能障害が起こるだけでなく、顕著な筋萎縮が起こることが報告されている¹¹⁾。これまで、持久性トレ

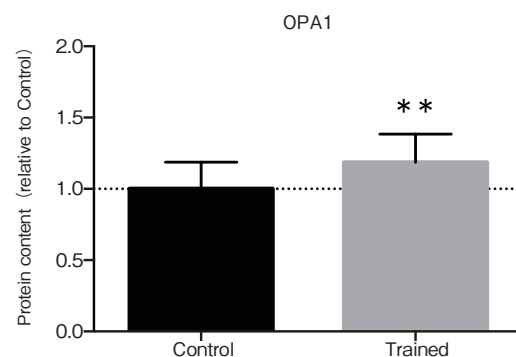
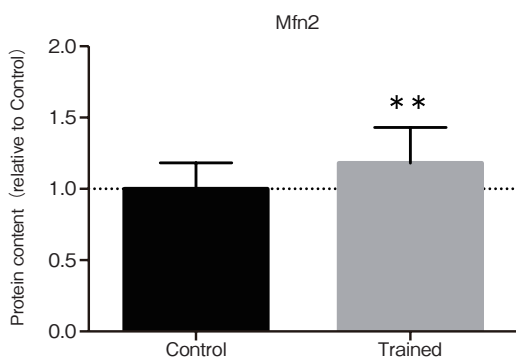


図3 レジスタンストレーニングによるミトコンドリア融合タンパク質量の変化 (**p<0.01)

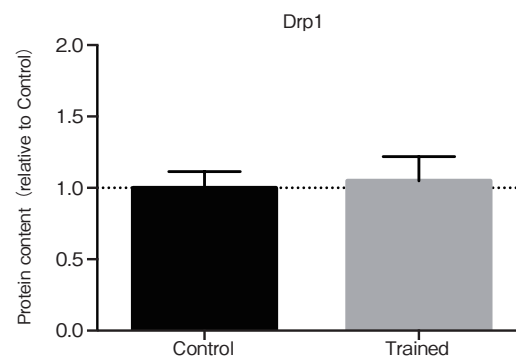
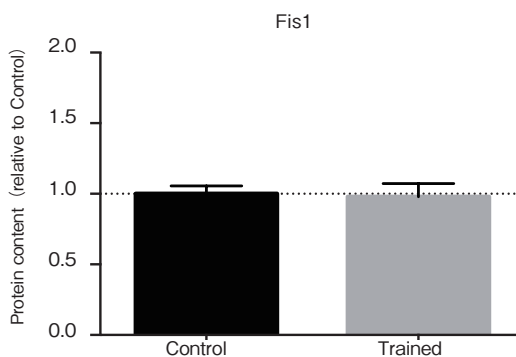


図4 レジスタンストレーニングによるミトコンドリア分裂タンパク質量の変化

ニングとミトコンドリアを中心としたエネルギー代謝、筋力トレーニングと筋肥大、というようにこれらは2つの異なる適応として考えられてきたが、今回の結果はレジスタンストレーニングがミトコンドリアの機能を維持・向上させる上で重要な役割を果たす可能性を示していると考えられる。

本研究で用いたレジスタンストレーニングの結果と同様に、ラットの持久性トレーニング実験モデルの電気刺激 (0 Hz, 3 h/day) によってもミトコンドリアの融合に関与するタンパク質量の増加が起こることが報告されている¹²⁾。また、ヒトの骨格筋においても持久的なトレーニングあるいは高強度インターバルトレーニングによって Mfn の発現が高まることが報告されている^{13, 14)}。その一方で、我々は身体不活動モデルの1つである除神経によって、融合に関与するタンパク質量が減少し、分裂に関与するタンパク質量が増加することを報告している¹⁵⁾。また、別の不活動モデルとして知られる後肢懸垂でも同様の報告がされている¹⁶⁾。持久性のトレーニングによって骨格筋のミトコンドリア新生が起こること、身体不活動によってミトコンドリア量が減少することはよく知られているが、これらの先行研究は、ミトコンドリアの量的な変化が起こる状況においても、身体活動量あるいはエネルギー需要に合わせて質的な変化が合わせて起こることを示唆している。

身体不活動による適応と同様に、加齢によって骨格筋のミトコンドリア量が低下するだけでなく、ミトコンドリアの融合に関与するタンパク質の発現が低下することが報告されている¹⁷⁾。高齢化社会において加齢による筋量あるいは筋機能の低下が問題となる中で、それに対するレジスタンストレーニングの有効性に注目が集まっているが、その効果は主として筋タンパク合成と分解のバランスの改善による筋量増加として説明されてきた。しかしながら、今回の実験結果からミトコ

ンドリア機能の改善にも貢献しているのではないかと推測される。本研究は若齢期の動物を用いた実験であったものの、実際に、高齢者に対するレジスタンストレーニングによってミトコンドリア関連遺伝子の発現が若者の発現パターンに近づいたという研究結果も存在する¹⁸⁾。今後は、加齢ラットを用いた同様の実験を行い、レジスタンストレーニングによるミトコンドリアの適応について、詳細に分析を進めていきたいと考えている。

また、トレーニング以外にミトコンドリアの質的な変化を促進する因子として、カロリー制限が挙げられる。カロリー制限は寿命の延長、あるいは老化の抑制をもたらすことがよく知られているが、骨格筋のミトコンドリア機能を高めることも報告されている。興味深いことに、カロリー制限は、骨格筋ミトコンドリアの数ではなくサイズの変化を引き起こす¹⁹⁾。したがって、今後はトレーニングとカロリー制限の組み合わせの効果について検証を進めていく。ただし、ミトコンドリアの適応において相乗効果がみられる可能性がある一方で、カロリー制限によってタンパク摂取量が低下した結果、レジスタンストレーニングによる筋肥大効果を抑制してしまう可能性も考えらえる。

最後に、本研究の限界として、現時点ではミトコンドリアの質的な評価がウエスタンブロッティング法による分裂・融合に関与するタンパク質量の測定のみであることが挙げられる。今回得られたトレーニングによる融合タンパク質量の増加という結果が、ミトコンドリアの形態的な変化、あるいは呼吸機能の変化へと繋がっているのかどうかは今後の検討課題である。また、今回の実験では運動による一過性の影響を排除するため、4週間のトレーニングの最後の運動から48時間後にサンプリングを行っている。したがって、今回みられたミトコンドリア融合タンパク質の増加がどのようなタイムコースで起こっているのかは不明である。マウスを用いた先行研究において、120

分間のトレッドミル走によってミトコンドリアの分裂に関与する Fis1 タンパク質量が増加したという報告²⁰⁾ や、90分間のトレッドミル走の直後に Drp1 の活性化がみられたという報告²¹⁾ がされている。つまり、一過性の運動では、ミトコンドリアのネットワークの再構成のため、あるいはダメージを受けたミトコンドリアの分解のためにミトコンドリアの分裂が促進され、トレーニングによる長期的な適応としては融合が促進されることでミトコンドリアの呼吸機能の向上が起こるのではないかと推測される。サンプリングのタイムポイントを増やした上で、今後詳細を検討していく必要がある。

4. 結 論

本研究により、レジスタンストレーニングはミトコンドリアの形態変化をもたらすことで骨格筋の機能維持・向上に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました石本記念デサントスポーツ振興財団に暑く御礼申し上げます。また、実験の実施にご協力頂きました名古屋工業大学の小笠原理紀准教授、日本体育大学の中里浩一教授に心から感謝致します。

文 献

- 1) Yan Z., Lira V.A., Greene N.P., Exercise training-induced regulation of mitochondrial quality. *Exerc. Sport Sci. Rev.*, **40**:159-64 (2012)
- 2) Tesch P.A., Thorsson A., Colliander E.B., Effects of eccentric and concentric resistance training on skeletal muscle substrates, enzyme activities and capillary supply. *Acta. Physiol. Scand.*, **140**:575-80 (1990)
- 3) Green H., Goreham C., Ouyang J., Ball-Burnett M., Ranney D., Regulation of fiber size, oxidative potential, and capillarization in human muscle by resistance exercise. *Am. J. Physiol.*, **276**:R591-6 (1999)
- 4) Pesta D., Hoppel F., Macek C., Messner H., Faulhaber M., Kobel C., Parson W., Burtscher M., Schocke M., Gnaiger E., Similar qualitative and quantitative changes of mitochondrial respiration following strength and endurance training in normoxia and hypoxia in sedentary humans. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **301**:R1078-87 (2011)
- 5) Salvadego D., Domenis R., Lazzer S., Porcelli S., Rittweger J., Rizzo G., Mavelli I., Simunic B., Pisot R., Grassi B., Skeletal muscle oxidative function in vivo and ex vivo in athletes with marked hypertrophy from resistance training. *J. Appl. Physiol.*, **114**:1527-35 (2013)
- 6) Porter C., Reidy P.T., Bhattarai N., Sidossis L.S., Rasmussen B.B., Resistance Exercise Training Alters Mitochondrial Function in Human Skeletal Muscle. *Med. Sci. Sports Exerc.*, **47**:1922-31 (2015)
- 7) Ogasawara R., Kobayashi K., Tsutaki A., Lee K., Abe T., Fujita S., Nakazato K., Ishii N., mTOR signaling response to resistance exercise is altered by chronic resistance training and detraining in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, **114**:934-40 (2013)
- 8) Ogasawara R., Sato K., Matsutani K., Nakazato K., Fujita S., The order of concurrent endurance and resistance exercise modifies mTOR signaling and protein synthesis in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **306**:E1155-62 (2014)
- 9) Eisner V., Lenaers G., Hajnoczky G., Mitochondrial fusion is frequent in skeletal muscle and supports excitation-contraction coupling. *J. Cell. Biol.*, **205**:179-195 (2014)
- 10) Mishra P., Varuzhanyan G., Pham A.H., Chan D.C., Mitochondrial dynamics is a distinguishing feature of skeletal muscle fiber types and regulates organellar compartmentalization. *Cell. Metab.*, **22**:1033-44 (2015)
- 11) Chen H., Vermulst M., Wang Y.E., Chomyn A., Prolla T.A., McCaffery J.M., Chan D.C., Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell.*, **141**:280-9 (2010)
- 12) Iqbal S., Ostojic O., Singh K., Joseph A.M., Hood D.A., Expression of mitochondrial fission and fusion regulatory proteins in skeletal muscle during chronic

- use and disuse. *Muscle Nerve.*, 48:963-70 (2013)
- 13) Cartoni R., Léger B., Hock M.B., Praz M., Crettenand A., Pich S., Ziltener J.L., Luthi F., Dériaz O., Zorzano A., Gobelet C., Kralli A., Russell A.P., Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *J. Physiol.*, 567:349-58 (2005)
 - 14) Perry C.G., Lally J., Holloway G.P., Heigenhauser G.J., Bonen A., Spriet L.L., Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. *J. Physiol.*, 588:4795-810 (2010)
 - 15) Tamura Y., Kitaoka Y., Matsunaga Y., Hoshino D., Hata H., Daily heat stress treatment rescues denervation-activated mitochondrial clearance and atrophy in skeletal muscle. *J. Physiol.*, 593:2707-20 (2015)
 - 16) Wagatsuma A., Kotake N., Kawachi T., Shiozuka M., Yamada S., Matsuda R., Mitochondrial adaptations in skeletal muscle to hindlimb unloading. *Mol. Cell. Biochem.*, 350:1-11 (2011)
 - 17) Crane J.D., Devries M.C., Safdar A., Hamadeh M.J., Tarnopolsky M.A., The effect of aging on human skeletal muscle mitochondrial and intramyocellular lipid ultrastructure. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, 65:119-28 (2010)
 - 18) Melov S., Tarnopolsky M.A., Beckman K., Felkey K., Hubbard A., Resistance exercise reverses aging in human skeletal muscle. *PLoS One.*, 2:e465 (2007)
 - 19) Finley L.W., Lee J., Souza A., Desquiret-Dumas V., Bullock K., Rowe G.C., Procaccio V., Clish C.B., Arany Z., Haigis M.C., Skeletal muscle transcriptional coactivator PGC-1alpha mediates mitochondrial, but not metabolic, changes during calorie restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109: 2931-36 (2012)
 - 20) Ding H., Jiang N., Liu H., Liu X., Liu D., Zhao F., Wen L., Liu S., Ji L.L., Zhang Y., Response of mitochondrial fusion and fission protein gene expression to exercise in rat skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1800:250-6 (2010)
 - 21) Jamart C., Naslain D., Gilson H., Francaux M., Higher activation of autophagy in skeletal muscle of mice during endurance exercise in the fasted state. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 305:E964-74 (2013)