

低酸素環境下でのスプリントインターバルトレーニングによるトレーニング効果をエピジェネティクスで探る

順天堂大学 吉原利典
(共同研究者) 同 柿木 亮

The Epigenetic Mechanism of Normobaric Hypoxia on the Sprint-Interval Training

by

Toshinori Yoshihara
COI project center, Juntendo University
Ryo Kakigi
Faculty of Medicine, Juntendo University

ABSTRACT

The purpose of this study was to examine the effect of mild normobaric hypoxia on the sprint-interval training (SIT) -induced histone deacetylases (HDACs) protein expression and histone modification (acetylation) in the rat gastrocnemius muscle. Male Wistar rats (8 weeks old) were assigned randomly into normoxic control (NC), normoxic training (NT), hypoxic control (HC) or hypoxic training (HT) groups (n = 6/group). The training group rats were exposed to SIT on a treadmill (1 min sprint and 2-5 min rest, 6-10 sets/day) 5-6 days per week for 9 weeks. After the experiment, the gastrocnemius muscles were removed and the expression of HDACs and the global levels of histone acetylation were determined by Western blot analysis. A two-way ANOVA revealed significant effects of hypoxia on the CS activity; however, no main effect of hypoxia and training was observed in the PGC1- α , SOD1, HIF-1 and VEGF.

Although, there was no change in HDAC4 expression, effect of hypoxia on HDAC5 and effect of training on nuclear SIRT1 were observed. There were no significant effect of training on the acetylation of histone H3 among groups. However, de-acetylation of lysine residue 9 and 27 was significantly lower in the Hypoxic groups compared with the NC group. These findings demonstrated that SIT could enhance the improvement of the citrate synthase activity (oxidative capacity) in the gastrocnemius muscle, and it is partly related to the decline of histone acetylation mediated by the alternation of class III histone deacetylase SIRT1 in normobaric hypoxia.

要 旨

本研究の目的は、低酸素環境下のスプリントインターバルトレーニングがヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 発現量やそれにより制御されているヒストンのアセチル化に与える影響について明らかにすることを目的として行った。若齢の Wistar 系雄性ラット 24 匹を、常圧常酸素コントロール群 (20.9%O₂, normoxic control; NC), 常圧常酸素トレーニング群 (NT), 常圧低酸素コントロール群 (14.5%O₂, hypoxic control; HC) および常圧低酸素トレーニング群 (HT) 群に分けた。NT 群および HT 群は、それぞれ常圧常酸素および常圧低酸素環境下において、週 5~6 回、9 週間のスプリントインターバルトレーニングを実施した。本研究の結果、スプリントインターバルトレーニングによるラット腓腹筋のクエン酸合成酵素 (CS) 活性の増加は低酸素環境下でのみ有意であり、ヒストン H3 におけるアセチル化状態の低下が認められた。その背景として、核内における SIRT1 発現量には低酸素環境下においてのみトレーニングによる増加が認められた。以上のことから、常圧低酸素環境下でトレーニングを行うことによって CS 活性の向上が認められるが、その調節に関わるメカニズムとして、SIRT1 を介したヒストン H3 リジン 9 および 27 残基の脱アセチル化の亢進が関与している可能性がある。

諸 言

一流アスリートがパフォーマンスを向上させるためには、高い水準の生理機能をさらに高めるようなトレーニング刺激を与える必要がある。これまで我々の研究室では、人工的な低酸素環境を利用したスプリントインターバルトレーニング (sprint interval training; SIT) により無酸素的なエネルギー供給系に対してより高い負荷をかけることで、ラット横隔膜の遅筋化が促されクエン酸合成酵素 (citrate synthase; CS) 活性が相乗的に高まることを報告している¹⁾。しかし、そのような適応が起こるメカニズムは不明である。

近年、骨格筋の適応に関わる新たなメカニズムとして、生育環境や栄養などの環境要因によって DNA 配列の変化を伴わない後天的なゲノム修飾 (DNA のメチル化やヒストンのアセチル化など) によるエピジェネティクス制御機構が注目されている²⁾。例えば、マウス骨格筋においてヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase; HDAC) である HDAC5 過剰発現させると、トレーニングに対する骨格筋の適応が減弱されることを明らかにしている³⁾。また、一過性の持久的な運動はヒト骨格筋における核内の HDAC5 を低下させることが報告されている。そして、近年、我々は骨格筋が適応する新規メカニズムとして、この HDACs を介したエピジェネティクス制御機構に

注目し、長期間の持久的トレーニングが、ラット足底筋における HDAC4/5 発現量を運動強度依存的に変化させること、ならびに Sirtuin 1 (SIRT1) 発現量を時間依存的に増加させることを見出している。すなわち、運動・トレーニングによる HDACs や HDACs によって制御されるヒストンのアセチル化状態の変化は、その後の骨格筋の適応に多大な影響を与えている可能性があるが、未だ明らかではない。また、HDACs を介したエピジェネティックな変化は、環境要因によって生じることから、低酸素環境下におけるトレーニング効果獲得のメカニズムの一端を担っている可能性がある。

そこで本研究は、低酸素環境下の SIT が HDAC 発現量やそれにより制御されているヒストンのアセチル化に与える影響について分子レベルで解明することを目的として実施した。

1. 研究方法

1.1 実験動物と飼育、およびトレーニング条件

若齢 (5 週齢) の Wistar 系雄性ラット 24 匹 (日本エスエルシー) を用い、常酸素で飼育し常酸素でトレーニングを実施する群 (NT)、常酸素で飼育し、トレーニングを実施しない群 (NC)、常酸素で飼育し低酸素でトレーニングを実施する群 (HT)、および常酸素で飼育し HT 群がトレーニングを実施する時間のみ低酸素に曝露しトレーニングは実施しない群 (HC) の 4 群 (各 6 匹) に分けた。NT 群および HT 群は、Ogura ら¹⁾の方法に基づいて 8 週齢より週 5~6 回、9 週間、動物用トレッドミル (傾斜 0°) を用いてトレーニングを実施した。トレッドミル速度は 30~45m/min から開始し、1 週毎に速度を漸増させ、8 週目には 75~80m/min に到達した。スプリント時間は 1 分間とし、2~5 分間の休憩を挟みながら 6~10 回繰り返した。HT 群のラットはトレーニング

開始 4 週目より低酸素環境でトレーニングを実施した。HC 群は HT 群が低酸素でトレーニングを実施する同時刻に低酸素環境に暴露した。常圧低酸素環境は、低酸素制御装置 (YHS-C10, YKS) を用いて動物環境室に低酸素気を送り込むことにより作製した。

1.2 サンプルング

トレーニング終了 48 時間後にペントバルビタールナトリウム麻酔下で屠殺し、腓腹筋を摘出し、生化学的な分析まで -80℃ で凍結保存した。

1.3 筋サンプル調整

凍結されたラットの腓腹筋を液体窒素存在下でパウダーにし、protease inhibitor cocktail (Complete EDTA-free; Roche, 1873580) および phosphatase inhibitor cocktail (PhosSTOP; Roche, 4906837) を含んだ Homogenate Buffer 中 (20 mM HEPES pH 7.4, 0.1 mM EDTA, 4 mM EGTA, 10 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100) でホモジナイズした。その後、900×g, 4℃ で 5 分間遠心分離して上清を回収した。回収した上清を 12,000×g, 4℃ で 15 分間遠心分離し、上澄みを可溶性分画とした。残った沈殿は 5 倍量の Homogenate Buffer で 3 回洗浄した後、10 倍量の Lysis Buffer (20 mM HEPES pH 7.4, 0.5 M NaCl, 10 mM EDTA, 4 mM EGTA, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100) で可溶化させ、20,000×g, 4℃ で 15 分間遠心分離して上清を核分画として回収した。得られたタンパク質の濃度は、Protein Assay Kit (Bio Rad) を用いて測定し、濃度が 2 mg/ml になるように SDS Sample Buffer [62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2.3% (w/v) SDS, 30% (v/v) Glycerol, 0.05% (w/v) Bromophenol-blue, 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol] を用いて調整した。その後、全てのサンプルを 95℃ で 5 分間加熱し、分析まで -80℃ で凍結保存した。

1.4 イムノブロットティング

タンパク質の分析には SDS-PAGE 法を用いた。サンプルは、各レーンあたり当量のサンプル (10 または 20 μ g) を負荷し、分子量マーカー (プレジジョン Plus カレイドスコープスタンダード, Bio Rad) と共に泳動した。泳動後、ゲルをミニトランスブロットセル (Bio Rad) を用いて 100 V で 1 時間通電し、PVDF 膜 (Bio Rad) にタンパク質を転写した。その後、Blocking Reagent for Can Get Signal (TOYOBO) または 5% (w/v) Skim milk/TTBS [40 mM Tris-HCl (pH 7.5), 300 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20] を用いて 1 時間のブロッキング処理を行った。ブロッキング処理後、室温で 2 時間または 4°C で一晩、一次抗体と反応させた。用いた抗体は、PGC1- α (1:5,000; Calbiochem), Hsp72 (1:2,000; Stressgen), SOD1 (1:10,000; Stressgen), HIF-1- α (1:2,000; Cell Signaling), Hydroxy HIF-1- α (1:2,000; Cell Signaling), VEGF (1:2,000; Cell Signaling), HDAC4 (1:2,000; Cell Signaling), HDAC5 (1:1,000; Cell Signaling), Sirt1 (1:2,000; Millipore), Acetylated Histone H3 (1:2,000; Millipore), Acetylated Histone H3 (Lys9) (1:2,000; Cell Signaling) および Acetylated Histone H3 (Lys27) (1:2,000; Cell Signaling) であった。一次抗体反応終了後、TTBS で 10 分 \times 3 回洗浄し、室温で 1 時間の二次抗体反応を行った。二次抗体は、10,000 倍に希釈した Anti-Rabbit または Mouse IgG Peroxidase conjugate (Cell Signaling) を用いた。二次抗体反応終了後、TTBS で 10 分 \times 3 回洗浄し、ECL Prime (GE Healthcare Japan) を用いて発光させた。

1.5 Citrate Synthase (CS) 活性

クエン酸合成酵素活性の測定は、Srere⁴⁾ の方法に従って分析した。酵素溶液に 1 mM DTNB, 10 mM acetyl-CoA を含む 0.1 M リン酸カリウム

バッファーを加え、室温で 30 分間インキュベートした後、10 mM のオキサロ酢酸を加えて反応を開始させた。反応開始後 5 分から分光光度計を用いて 412 nm の吸光度の変化を測定した。

1.6 統計処理

得られたデータは、全て平均値 \pm 標準誤差で示した。統計学的分析は二元配置の分散分析 (低酸素環境 \times トレーニング) を行い、下位検定には Fischer 法による多重比較を行った。有意水準は危険率 5% 未満とした。

2. 研究結果

2.1 CS 活性

図 1A は各群の CS 活性を示したものである。CS 活性には低酸素環境による主効果が見られた

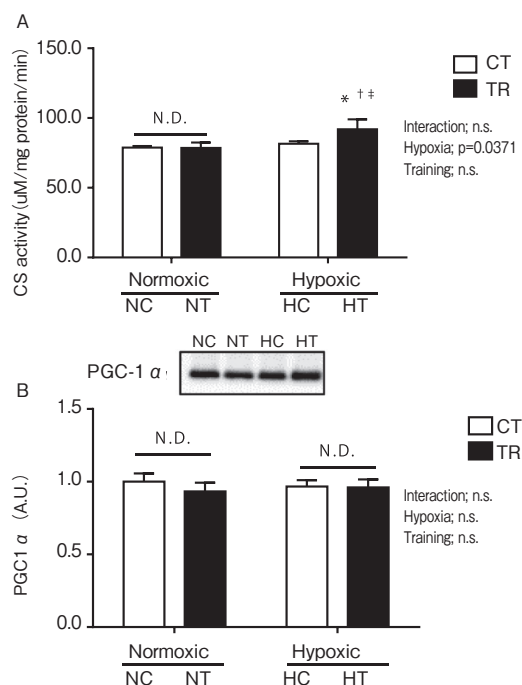


図 1 Citrate synthase (CS) activity (a), and representative blots and the expression of PGC-1 α (b) in the gastrocnemius muscle after SIT

Values are means \pm standard error (SE); n = 6 per group. The results of two-way ANOVA are displayed. *p < 0.05 vs. NC, †p < 0.05 vs. NT, ‡p < 0.05 vs. HC

($p=0.0371$). また、N群ではトレーニングによる有意な変化は認められなかったが、HT群のCS活性はHCおよびN(NCおよびNT)群と比較して有意に高値を示した。

図1Bは各群のPGC1 α 発現量を示したものである。いずれの群間においても有意な変化は見られなかった。

2.2 HSP72 および SOD1 発現量

図2は熱ショックタンパク質72(Hsp72)(A)およびスーパーオキシドジスムターゼ1(SOD1)(B)を示したものである。Hsp72発現量にはトレーニングによる主効果が見られ($p<0.0001$)、NTおよびHT群のHsp72発現量はNCおよびNT群と比較して有意に高値を示した。

一方、SOD1発現量には、いずれの群間におい

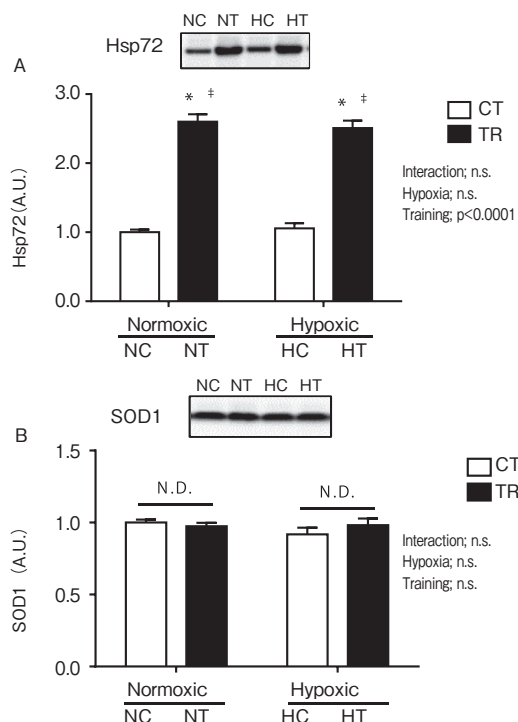


図2 Representative blots and the the expression of Hsp72(a) and SOD1(b) in the gastrocnemius muscle after SIT. Values are means \pm standard error(SE); $n = 6$ per group. The results of two-way ANOVA are displayed. * $p < 0.05$ vs. NC, † $p < 0.05$ vs. HC

ても有意な変化は見られなかった。

2.3 HIF-1 α , Hydroxy HIF-1 α および VEGF 発現量

図3はHIF-1 α (A)、Hydroxy HIF-1 α (B)およびVEGF(C)発現量を示したものである。HIF-1 α 発現量は、トレーニングにより増加したものの有意な変化は見られなかった。Hydroxy

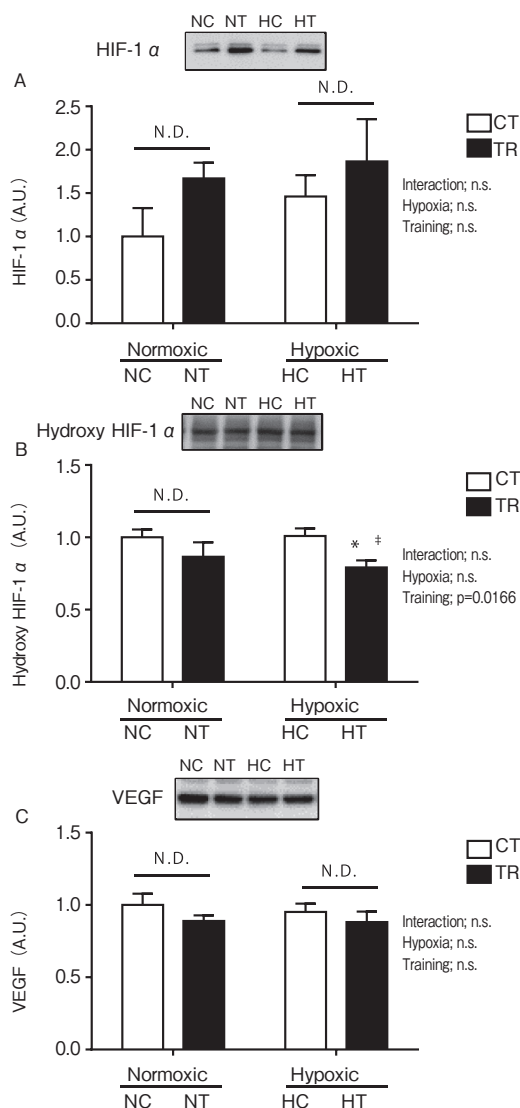


図3 Representative blots and the the expression of HIF-1 α (a), Hydroxy HIF-1 α (b) and VEGF(c) in the gastrocnemius muscle after SIT. Values are means \pm standard error(SE); $n = 6$ per group. The results of two-way ANOVA are displayed. * $p < 0.05$ vs. NC, † $p < 0.05$ vs. HC

HIF-1 α 発現量にはトレーニングによる主効果が見られ ($p=0.0166$), HT 群の Hydroxy HIF-1 α は NC および HC 群と比較して有意に低値を示した.

一方, VEGF 発現量には, いずれの群間においても有意な変化は見られなかった.

2.4 Nuclear HDAC4 および 5 発現量

図 4 は核内におけるヒストン脱アセチル化酵素 4 (HDAC4) (A) および HDAC5 (B) 発現量を示したものである. 核内の HDAC4 発現量には, いずれの群間においても有意な変化は見られなかった.

一方, 核内の HDAC5 発現量には, 低酸素環境による主効果が見られ ($p=0.0044$), H (HC および HT) 群の核内における HDAC5 発現量は NC 群と比較して有意に低値を示した.

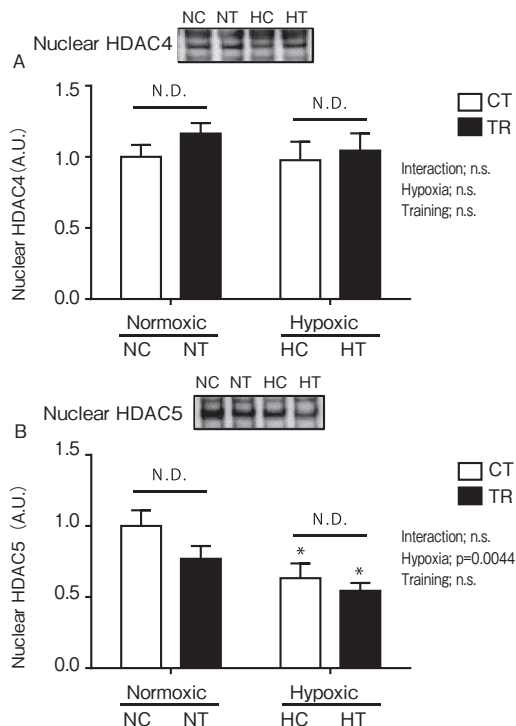


図 4 Representative blots and the the expression of nuclear HDAC4 (a) and HDAC5 (b) in the gastrocnemius muscle after SIT

Values are means \pm standard error (SE) ; $n = 6$ per group. The results of two-way ANOVA are displayed. * $p < 0.05$ vs. NC

2.5 SIRT1 発現量

図 5 は細胞質 (A) および核内 (B) におけるサーチュイン 1 (SIRT1) 発現量を示したものである. 細胞質における SIRT1 発現量は, NC 群と比較して HT 群で有意に高値を示した. また, 核内における SIRT1 発現量にはトレーニングによる主効果が見られ ($p=0.0291$), HC 群と比較して HT 群で有意に高値を示した.

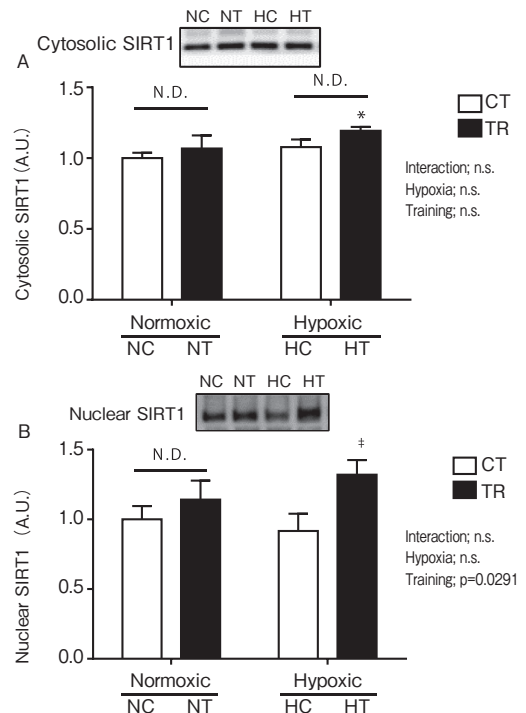


図 5 Representative blots and the the expression of cytosolic (a) and nuclear (b) SIRT1 in the gastrocnemius muscle after SIT

Values are means \pm standard error (SE) ; $n = 6$ per group. The results of two-way ANOVA are displayed. * $p < 0.05$ vs. NC, ‡ $p < 0.05$ vs. HC

2.6 アセチル化ヒストン H3 およびアセチル化リジン 9 および 27 発現量

図 6 はアセチル化ヒストン H3 およびアセチル化リジン 9 (K9ac) および 27 (K27ac) 発現量を示したものである. アセチル化ヒストン H3 発現量には, 低酸素環境による主効果が見られたが ($p=0.0329$), 群間で有意な差は見られなかつ

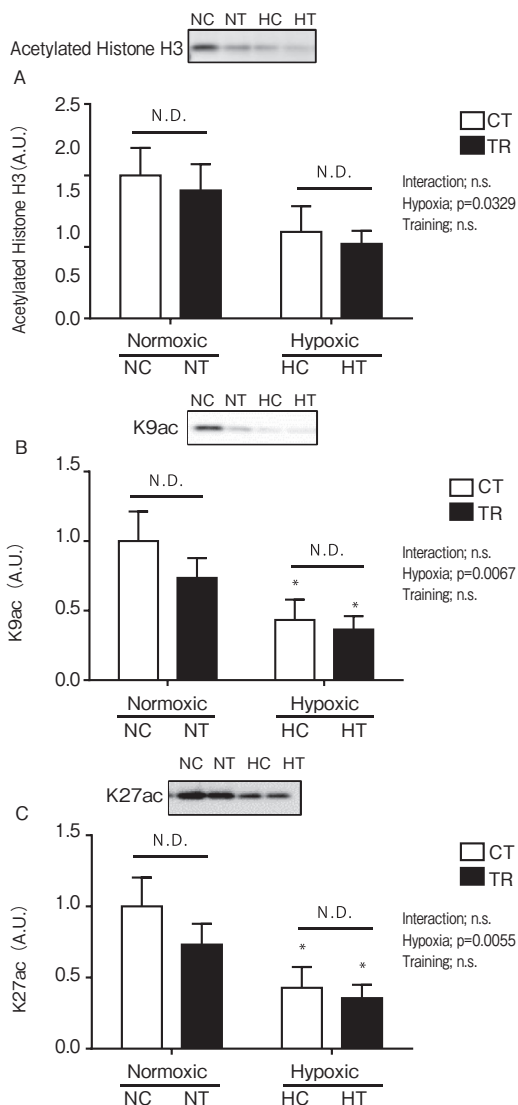


図6 Representative blots and the the expression of Acetylated histone H3(a), K9ac (b) and K27ac (c) in the gastrocnemius muscle after SIT

Values are means ± standard error (SE); n = 6 per group. The results of two-way ANOVA are displayed. *p < 0.05 vs. NC

た。また、K9ac および K27ac 発現量には、低酸素環境による主効果が見られ (p=0.0067 および p=0.0055), H (HC および HT) 群の K9ac および K27ac 発現量は NC 群と比較して有意に低値を示した。

3. 考 察

本研究は、低酸素環境下のスプリントインター

バルトレーニングがヒストン脱アセチル化酵素 (Histone deacetylase; HDAC) を介したエピジェネティクス制御機構 (ヒストンのアセチル化) に与える影響について分子レベルで解明することを目的として実施した。

本研究の結果、常圧常酸素環境下においては腓腹筋に対するトレーニング効果は小さかったが、常圧低酸素環境下でトレーニングを行うことによって CS 活性の向上が認められた。その調節に関わるメカニズムとして、SIRT1 を介したヒストン H3 リジン 9 および 27 残基の脱アセチル化の亢進が関与している可能性がある。以降に、本研究で得られた結果について考察する。

我々の細胞には、全く同じ DNA 配列を持っているにも関わらず、様々な状況に応じて個々の細胞の遺伝子発現調節機構が変化していく機構が存在し、それはエピジェネティクスと呼ばれる。すなわち、運動、栄養、生活習慣のような刺激は、脳だけではなく筋においても細胞レベルで記憶され、個々の細胞によって遺伝子の発現が ON と OFF に切り替わることで制御されていると考えられる。すなわち、運動トレーニングを行うことにより、核内の HDAC やクラス III HDAC である SIRT1 といった因子を介して、ヒストンの修飾やクロマチンの形成で印付けられたエピゲノムに記憶され、ゲノム上の多くの遺伝子の発現が変化すると考えられる⁵⁾。

本研究において、スプリントインターバルトレーニングに対する骨格筋の適応、運動により生じるスーパーオキシドを消去する抗酸化酵素として知られる SOD1 発現量に変化は認められなかったが、様々なストレスに対して誘導される Hsp72 発現量はトレーニング環境に関わらず有意に増加しており、常圧常酸素および常圧低酸素環境のいずれにおいても同等の生理学的負荷・ストレスを与えることができたと考えられる。また、本研究では低酸素環境下で活性化される低酸素誘導

因子 1 α (hypoxia inducible factor, HIF-1 α) や血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) の発現量には影響は認められなかったが, Hydroxy HIF-1 α 発現量は, 低酸素環境下でのみトレーニングにより低下することが確認された. HIF-1 α は細胞に対する酸素供給が不足した際に誘導されるタンパク質であり, 転写因子として VEGF 等の発現を調節することで骨格筋の適応を引き起こしている⁶⁾. HIF-1 α はヒドロキシル化されることで負の制御を受けるが, 低酸素環境下でのトレーニングを行った場合 HIF-1 α のヒドロキシル化が低下し, HIF-1 α の安定性が維持され転写活性が維持されていたことが推察される. しかしながら, 本研究では, HIF-1 α がターゲットとする遺伝子の発現量は定量していないため明らかではない.

興味深いことに, スプリントインターバルトレーニングは, 低酸素環境下においてのみラット腓腹筋においてミトコンドリア活性の指標となる CS 活性を増加させた. このことは, 無酸素的なエネルギー供給系に対してより高い負荷をかけることによりラット横隔膜の遅筋化が促され CS 活性の相乗的な増加を確認した Ogura et al.¹⁾ の報告と一致するものである. このような適応が生じた背景として, 本研究では常圧常酸素環境に比べて, 常圧低酸素環境においてヒストンアセチル化が低下していることを確認している. ヒストンのアセチル化はエピジェネティックな遺伝子の発現を調節する核内の主要な翻訳後修飾であることは現在よく知られている⁷⁾. ヒストン修飾には, アセチル化, メチル化, リン酸化, ユビキチン化など多彩な修飾が存在するが, 修飾を受ける部位や修飾状態に依存して, 遺伝子の発現を正や負に調節している. 特に, 遺伝子発現が活発に行われているような遺伝子周囲のクロマチンは, 強くアセチル化されていることがこれまでの研究により明らかにされている. 本研究では, 低酸素環境下に

おけるスプリントインターバルトレーニングがヒストンの修飾 (アセチル化) に及ぼす影響を検討するため, アセチル化ヒストン H3 およびアセチル化リジン 9 (K9ac) および 27 (K27ac) の発現量を, ヒストン修飾抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した. その結果, トレーニングによる有意な変化は確認できなかったものの, アセチル化ヒストン H3 および K9ac, K27ac の発現量は, いずれも低酸素環境下において有意な低下が認められた. このことから, 低酸素環境下におけるスプリントインターバルによりラット腓腹筋において CS 活性の相乗的な増加が認められたメカニズムとして, このヒストン H3 のアセチル化の低下が関与している可能性が考えられる. すなわち, 低酸素環境下における長期的なヒストン H3 のアセチル化の低下は, 骨格筋の適応やトレーニング効果に関わる遺伝子の発現を調節することによって, スプリントインターバルトレーニングによるトレーニング効果の獲得や表現型の変化において重要な役割を担っているのかもしれない. さらに本研究では, 核内における SIRT1 発現量は低酸素環境下におけるスプリントインターバルトレーニングでのみコントロール群と比較して有意な増加が認められた. このことから, 本研究で認められたヒストン H3 のアセチル化の低下は低酸素環境下のスプリントインターバルトレーニングによる核内の SIRT1 発現量の増加によってもたらされた可能性が考えられる.

また, 本研究の新たな知見として, 核内の HDAC4 に変化は認められなかったが, 核内の HDAC5 は低酸素環境下において有意に低値を示した. これまで, マウス骨格筋における HDAC5 の過剰発現は, トレーニングに対する骨格筋の適応を減弱ささせることが示されている³⁾. つまり, 低酸素環境下でトレーニングを行うことで HDAC5 の発現量が低下していたという事実は, 本研究におけるトレーニング効果の獲得, すなわ

ちCS活性の相乗的な増加に貢献している可能性が高いと考えられる。しかしながら、核内におけるHDACとMEF2の相互作用についても明らかにはしていないことから、今後はHDACの機能的な側面について検討を行う必要があると考えられる。

また、本研究ではヒストンH3全体のアセチル化量でグローバルなレベルでの変化を検討したが、より詳細に検討するにはクロマチン免疫沈降法を用いた遺伝子プロモーター解析により、低酸素環境下における長期的なヒストンのアセチル化が、どの遺伝子プロモーター領域に特異的に生じているのかについて検討する必要がある。

4. 結 論

常圧低酸素環境下でトレーニングを行うことによってCS活性の向上が認められるが、その調節に関わるメカニズムとして、SIRT1を介したヒストンH3リジン9および27残基の脱アセチル化の亢進が関与している可能性がある。

謝 辞

本研究に対して助成を賜りました、公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に厚く御礼申し上げます。研究の遂行にあたり、ご協力頂きました聖マリアンナ医科大学講師の小倉裕司先生ならびに分析に多大な協力を頂いた順天堂大学スポーツ健康医科学研究所の都築孝允君には深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Ogura Y., Naito H., Aoki J., Uchimaru J., Sugiura T., Katamoto S.: Sprint-interval training-induced alterations of Myosin heavy chain isoforms and enzyme activities in rat diaphragm: effect of normobaric hypoxia. *Jpn. J. Physiol.*, **55**(6), 309-16 (2005)
- 2) McGee S.L., Hargreaves M.: Histone modifications and exercise adaptations. *J. Appl. Physiol.*(1985), **110**, 258-63(2011)
- 3) Potthoff M.J., Wu H., Arnold M.A., Shelton J.M., Backs J., McAnally J., Richardson J.A., Bassel-Duby R., Olson E.N.: Histone deacetylase degradation and MEF2 activation promote the formation of slow-twitch myofibres. *J. Clin. Invest.*, **117**, 2459-67(2007)
- 4) Srere P.: Citrate synthase. *Methods Enzymol.*, **13**, 3-11(1969)
- 5) Sanchis-Gomar F., Garcia-Gimenez J.L., Perez-Quilis C., Gomez-Cabrera M.C., Pallardo F.V., Lippi G.: Physical exercise as an epigenetic modulator: Eustress, the "positive stress" as an effector of gene expression. *J. Strength Cond. Res.*, **26**, 3469-72 (2012)
- 6) Ohno H., Shirato K., Sakurai T., Ogasawara J., Sumitani Y., Sato S., Imaizumi K., Ishida H., Kizaki T.: Effect of exercise on HIF-1 and VEGF signaling. *J. Phys. Fitness Sports Med.*, **1**(1), 5-16(2012)
- 7) Fukuda H., Sano N., Muto S., Horikoshi M.: Simple histone acetylation plays a complex role in the regulation of gene expression. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.*, **5**, 190-208(2006)