

規則的な身体運動が骨格筋オートファジー機構に 及ぼす影響とその加齢変化

	聖マリアンナ医科大学	小倉裕司
(共同研究者)	順天堂大学	内藤久士
	同	柿木亮
	聖マリアンナ医科大学	杉山仁
	同	明間立雄

Effects of Regular Endurance Exercise on Autophagy in Skeletal Muscles of Adult and Old Rats

by

Yuji Ogura, Hitoshi Sugiyama, Tatsuo Akema
St. Marianna University School of Medicine
Hisashi Naito, Ryo Kakigi
Juntendo University

ABSTRACT

Macroautophagy is a major pathway of autophagy in the cells. It plays roles in breaking down of proteins or organelles using lysosomal proteases. This study investigated the effects of chronic exercise training on macroautophagy in skeletal muscles of both adult and older rats. Adult (18 mo) and old (28 mo) male Fischer 344 rats were assigned to either a sedentary control or an endurance training group (n = 6 per group). Animals in the training groups ran on a treadmill for 8 weeks. The training intensity was adjusted to be identical between the adult and old groups. After completing the training program, the soleus and plantaris muscles were taken for subsequent analyses of autophagy-related

proteins. In the plantaris muscle, Beclin 1, microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) -I and LC3-II were elevated by aging. Aging lowered Atg7 but exercise training restored the Atg7 expression in the plantaris muscle. In the soleus muscle, aging increased only LC3-I. Taken together, the results show that the expression of macroautophagy protein can be altered by both aging and exercise training. Importantly, the manner of alteration is not entirely consistent among examined proteins and muscle types.

要 旨

マクロオートファジーは、細胞内小器官およびタンパク質の分解を行うオートファジーの主経路である。本研究では、長期的な運動トレーニングがオートファジーに及ぼす影響を、成熟および老齢動物の骨格筋を対象に検討した。成熟（18月齢）および老齢（28ヶ月齢）の雄性Fischer 344ラットが運動群と対照群にそれぞれ群分けされた（各群n=6×4群）。運動群の動物には、8週間同一の相対的運動強度で持久的なトレーニングを行わせた。トレーニング期間終了後、ヒラメ筋と足底筋を摘出し、オートファジー関連タンパク質を分析した。足底筋において、Beclin 1, microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) -IおよびLC3-IIは加齢により増加した。また、加齢はAtg7を低下させたが、運動トレーニングはその低下を抑制した。他方、ヒラメ筋においては、加齢がLC3-Iの増加させたこと以外の変化は観察されなかった。これらの結果は、マクロオートファジーを制御するタンパク質発現が運動と加齢により改変されることを示唆する。また、これらの改変は、タンパク質の種類、あるいは骨格筋の種類により異なる可能性がある。

1. はじめに

細胞内におけるタンパク質分解は、損傷を受けたタンパク質や機能不全に陥ったタンパク質の除去を行うなど細胞の正常機能を維持する上で必須

である。これらにかかわる機序として特にユビキチンプロテアソーム系とオートファジー系がよく知られている。前者は、一連の酵素反応によってタンパク質を選択的に識別し、プロテアソームを介してアミノ酸まで分解する^{10, 12)}。一方、後者は本質的に非選択的なタンパク質あるいは細胞内小器官の分解系である。オートファジー系は、主に3つの大きな様式に分別される（マクロオートファジー、マイクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジー）。それぞれの様式は、異なる経路によって活性化されると考えられるが、最終的にリソソームを介する反応に帰着する^{3, 13, 17)}。

マクロオートファジー（以後オートファジー）は、中でも主要な経路と見なされており、したがって比較的よく研究されている^{3, 13, 17)}。オートファジーを刺激するトリガーについてはいまだ議論の最中であるが、オートファジーが進行する過程についてはよく知られている。すなわち、何らかのトリガーが細胞内に生じることにより、単位膜（ファゴフォア）が細胞質に形成される。単位膜は、一連のオートファジー関連酵素反応により伸張し、その過程でタンパク質や細胞内小器官を囲って取り込み（オートファゴソーム）、最終的にリソソームと融合する（オートリソソーム）。その結果、内包物はリソソーム内のタンパク質分解酵素によりアミノ酸へと分解される^{3, 13, 17)}。

オートファジーは平常時においてもわずかに活性化されているものの、その劇的な活性上昇をも

たらず主要なトリガーの一つは、細胞内の栄養状態の悪化である。マウスを用いた研究では、飢餓状態に陥った際、多くの組織でオートファジーが活性化されたことを見いだされている⁸⁾。また、別の研究では、オートファジーの進行に必須であるタンパク質をコードする *atg5*⁶⁾ あるいは *atg7*⁵⁾ 遺伝子を欠損させた場合には、生後の飢餓状態における生存率が著しく低下することを示している。これらの報告は、細胞内の栄養状態がオートファジーの活性調節に関与することを強く示唆している。

骨格筋は、当然ながら運動時にエネルギーの需要が急速に高まる器官である。また、他の細胞と同様に骨格筋においても飢餓時に顕著なオートファジーが活性化されることが確認されている⁸⁾。したがって、エネルギー源を急速に消費する骨格筋活動は骨格筋細胞内でのオートファジー系を活性化させる可能性が考えられるが、運動とオートファジーを関連づけた研究はこれまでに報告されていない。

また、オートファジーの活性水準は加齢によっても影響を受けることが最近になって示唆されている。例えば、肝臓におけるオートファジーの活性化は老齢動物で低下する^{1,2)}。また、McMullen et al.⁷⁾ は、ラットの外輪筋において、加齢がオートファジーの進行に必須である *microtubule-associated protein light chain 3 (LC3)* タンパク質発現量を低下させ、同様に *atg5* および *atg7* 遺伝子発現を減少させることを示している。したがって、下肢骨格筋においても同様に加齢がオートファジーに関連するタンパク質群に影響を与える可能性が示唆されるが、両者の関連性を検討した研究は見られない。

以上のことから、本研究では、ラットの下肢骨格筋を対象に、加齢と運動トレーニングがオートファジー関連タンパク質の発現量に及ぼす影響について検討することを目的とした。

1. 実験方法

1. 1 実験動物

本研究は順天堂大学さくらキャンパス実験動物委員会による承認の基に行われた。成熟 (18ヶ月齢, $n=12$) および (28ヶ月齢, $n=12$) の雄性 Fischer 344 ラットが実験に用いられた。実験期間中、動物は12時間ごとの明暗サイクルを持つ動物施設において飼育された。水および飼料は自由摂取とした。

1. 2 実験デザイン

動物を、動物用トレッドミル (KN-73, 夏目製作所) を用いた走運動に対して順応させた後、以下の4群: 1) 成熟対象群 (AS; $n=6$), 2) 成熟トレーニング群 (AT; $n=6$), 3) 老齢対象群 (OS; $n=6$), および 4) 老齢トレーニング群 (OT; $n=6$) に群分けした。

成熟および老齢トレーニング群に、上記トレッドミルを用いた8週間の持久性運動トレーニングを同一相対運動強度にて行わせた。詳細なトレーニングプロトコルは我々の先行研究に記載されている¹¹⁾。トレーニング期間終了後、動物はペントバルビタールナトリウムの投与 ($25\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) により麻酔された。ヒラメ筋 (遅筋) と足底筋 (速筋) が素早く摘出され、液体窒素にて瞬間凍結した後、分析までディープフリーザー (-80°C) 中で保存した。

1. 3 サンプルの処理

オートファジー関連タンパク質の分析のため、凍結された骨格筋サンプルは、氷冷下で脱リン酸化酵素阻害剤 (Phosstop tablet; Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN, USA) とタンパク分解酵素阻害剤 (Complete tablet; Roche Diagnostics Corp.) を含む破砕バッファー (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 2% Triton-X100,

pH7.5) 中で均質化された。遠心分離処理を経た後の上清のタンパク質濃度を測定した後に、標準的なプロトコールに従いウェスタンブロッティング法にてタンパク質の発現量を分析した。分析されたタンパク質はBeclin 1, Atg7, Atg5 (Atg5-12として) LC3-IおよびLC3-IIであった。結果は、それぞれの骨格筋において、対象タンパク質ごとにAS群に対する相対値として示した。

1. 4 統計処理

全てのデータは平均値±標準誤差で示されている。データはtwo-way ANOVA (月齢×トレーニング) で分析された。有意な交互作用が観察された際には、one-way ANOVA およびTukey-Kramer testにより群間の差を検討した。P < 0.05を有意水準とした。なお、すべての検定は統計処理プログラムを用いて行われた (Prism 5.0; GraphPad Software Inc., CA, USA)。

2. 実験結果

動物の体重および絶対的・相対的筋重量の結果を表1に示した。加齢と運動はいずれの体重を減少させたが、有意な交互作用は観察されなかった。足底筋およびヒラメ筋の絶対筋湿重量は老齢動物で有意に低下した。加齢は、足底筋およびヒラメ筋において体重当たりの相対的な筋湿重量を低下させたが、運動は両骨格筋においてともに相対的な筋湿重量を増加させた。

図1はBeclin 1発現量の結果を示す。Beclin 1発現量は足底筋において老齢動物で有意に増加した。一方、ヒラメ筋において加齢はBeclin1発現量に影響しなかった。運動トレーニングは、いずれの骨格筋においてもBeclin1発現量に影響しなかった。

図2に示されるように、Atg5-12発現量は両骨格筋において、いずれの条件も影響しなかった。

表1 Body weights and weights of plantaris and soleus muscles in animals

	Adult sedentary (n=6)	Adult training (n=6)	Old sedentary (n=6)	Old training (n=6)	Main effect		Interaction
					Age	Training	
Pre body weight, g	398.2 ± 14.3	384.8 ± 8.4	386.0 ± 9.4	380.3 ± 10.0	n. s.	n. s.	n. s.
Post body weight, g	404.0 ± 11.6	352.8 ± 8.8	372.7 ± 11.0	336.0 ± 5.2	P<0.05	P<0.001	n. s.
Plantaris absolute wet weight, mg	323.8 ± 6.2	328.5 ± 6.4	247.4 ± 2.4	240.8 ± 4.9	P<0.0001	n. s.	n. s.
Plantaris relative wet weight,mg·g ⁻¹	0.803 ± 0.019	0.932 ± 0.012**	0.666 ± 0.018**	0.717 ± 0.018*	P<0.0001	P<0.0001	P<0.05
Soleus absolute wet weight, mg	114.7 ± 2.7	117.4 ± 4.1	98.3 ± 2.4	102.9 ± 2.7	P<0.0001	n. s.	n. s.
Soleus relative wet weight,mg·g ⁻¹	0.284 ± 0.007	0.333 ± 0.006	0.264 ± 0.006	0.306 ± 0.007	P<0.001	P<0.0001	n. s.

Values are means ± S.E.M. * P<0.05, *** P<0.001 vs. adult sedentary. P<0.001 vs. adult training

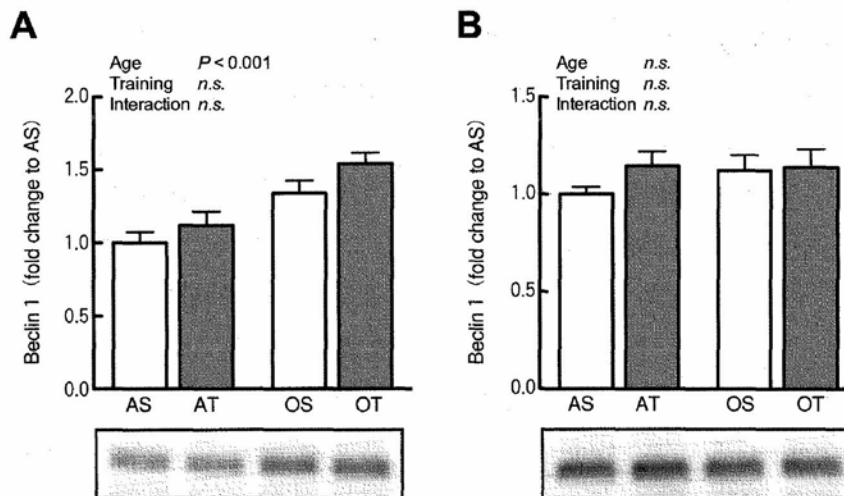


図1 Western blot analysis of Beclin 1 in plantaris (a) and soleus (b) muscles. AS, AT, OS, and OT respectively signify adult sedentary, adult training, old sedentary, and old training groups. Values are means ± S.E.M.

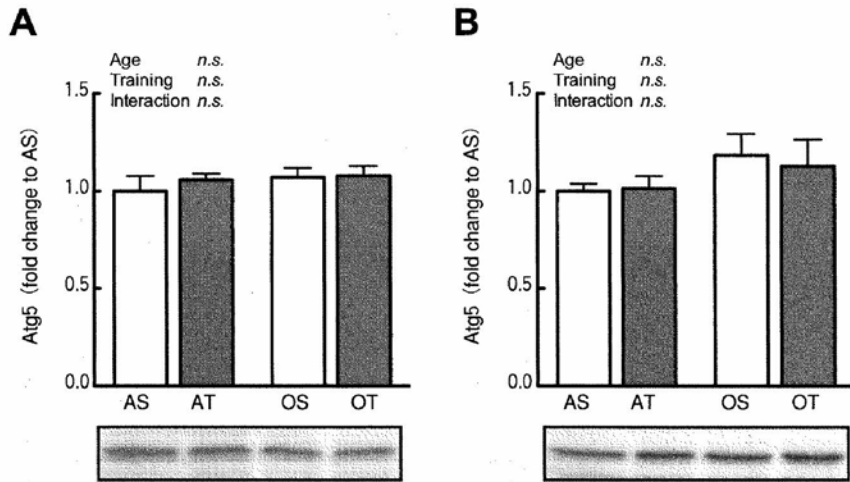


図2 Western blot analysis of Atg5 in plantaris (a) and soleus (b) muscles. AS, AT, OS, and OT respectively signify adult sedentary, adult training, old sedentary, and old training groups. Values are means \pm S.E.M.

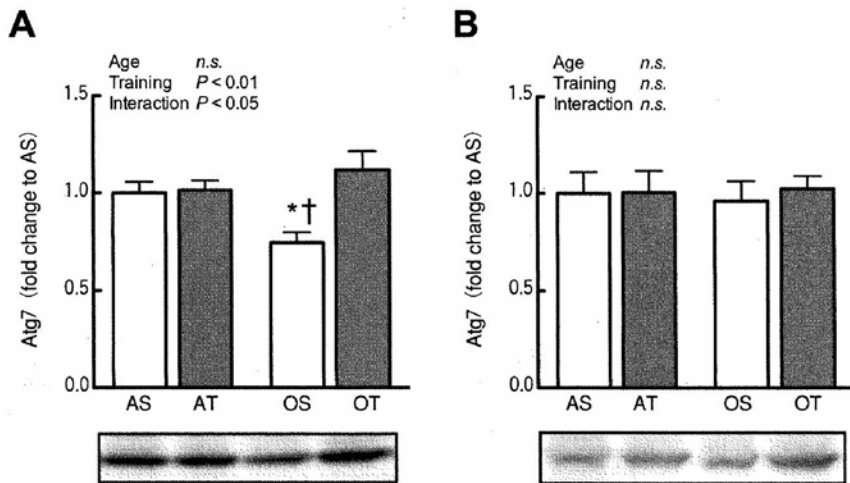


図3 Western blot analysis of Atg7 in plantaris (a) and soleus (b) muscles. AS, AT, OS, and OT respectively signify adult sedentary, adult training, old sedentary, and old training groups. Values are means \pm S.E.M.* $P < 0.05$ vs. AT, *** $P < 0.01$ vs. OT.

図3はAtg7発現量の結果を示している。two-way ANOVAの結果、Atg7発現量には有意な交互作用が観察された。OS群のAtg7発現量は、AT群およびOT群よりも有意に低値を示した。一方、ヒラメ筋においては加齢および運動トレーニングによる影響は観察されなかった。

図4には、LC3-Iの発現量が示されている。高齢群のLC3-I発現量は、足底筋およびヒラメ筋の両方で有意に増加した。しかしながら、運動トレーニングによる影響はいずれの筋でも見られなかった。

図5は、LC3-IIの結果を示している。足底筋においては高齢群のLC3-II発現量が有意に増加し

ていた一方、ヒラメ筋には加齢による影響は見られなかった。運動トレーニングはいずれの骨格筋のLC3-IIにも影響しなかった。

3. 考察

オートファジーは酵母からは乳類にまで保存されているタンパク質分解機構である^{3,13,17}。本研究では、この機構に関与するタンパク質について、運動トレーニングと加齢の観点からその適応状況について検討した。その結果、足底筋のBeclin 1, LC3-I, LC3-IIとヒラメ筋のLC3-I発現量は加齢に伴って増加した。さらに興味深いことに、足底筋Atg7で観察された加齢による発現量の低下は、

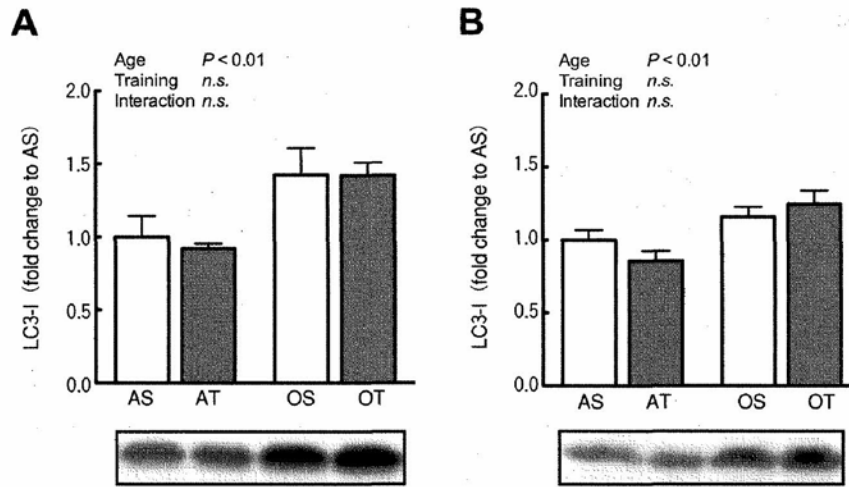


図4 Western blot analysis of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)-I in plantaris (a) and soleus (b) muscles. AS, AT, OS, and OT respectively signify adult sedentary, adult training, old sedentary, and old training groups. Values are means \pm S.E.M.

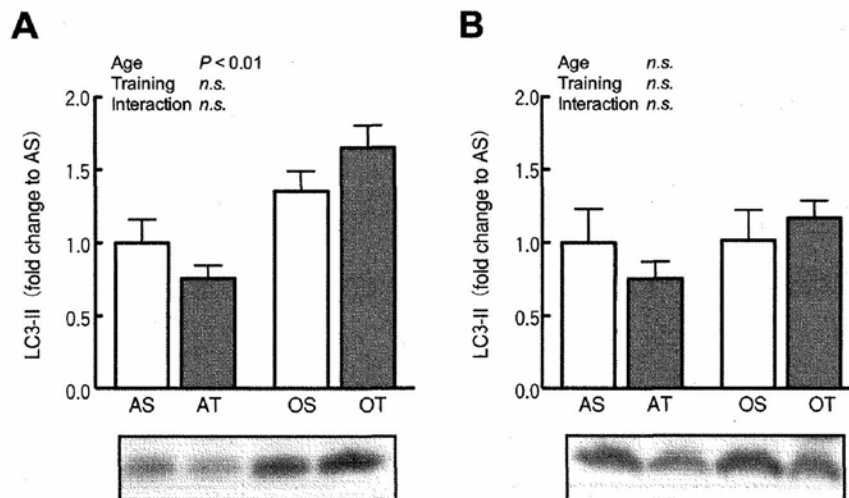


図5 Western blot analysis of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)-II in plantaris (a) and soleus (b) muscles. AS, AT, OS, and OT respectively signify adult sedentary, adult training, old sedentary, and old training groups. Values are means \pm S.E.M.

運動トレーニングによって相殺された。一方で、別の“key molecule”である Atg5 発現量は運動トレーニングにも加齢にも影響されなかった。これらの結果は、i) 加齢と運動トレーニングはともにオートファジー関連タンパク質の発現量を改変すること、ii) その適応様相は、同じ機構で機能するにも関わらずタンパク質ごとで異なること、さらに、iii) 同じタンパク質であっても、骨格筋ごとでその応答性は異なっていることを提案する。

オートファジー経路は連続した酵素反応によって進行する³⁾。本研究では、まず Beclin 1 について検討した。Beclin 1 はオートファジーの初期段

階で単位膜の形成にかかわると考えられている。先行研究において、老齢動物の心筋における Beclin 1 発現量は成熟動物に比べて 90% 増加していた¹⁸⁾。したがって、本研究の成果では足底筋のみが筋組織で得られたその結果に一致する。筋組織の特性は足底筋よりもヒラメ筋の方が心筋に近いと考えられるが、本研究の結果はそのようではなかった。

Atg7 はオートファジーの進行に極めて重要であり⁵⁾、Atg12 を活性化し Atg10 へ受け渡す役割¹⁴⁾に加え、オートファジーの進行マーカーである LC3-I の活性化にも必須である¹⁶⁾。本研究では、

加齢により足底筋のAtg7発現量は低下した。このことは、Atg7を介する反応においては加齢性の悪化を生じる可能性を示唆するように思われる。下肢骨格筋における検討は見られないが、McMullen et al.⁷⁾は、atg7遺伝子発現が18および30ヶ月齢のラット外輪筋において6ヶ月齢のラットよりも低下したことを報告している。この知見は、本研究の足底筋の結果と一致している。Atg7に関するここでの重要な発見は、この加齢性のAtg7発現量の低下が持久性運動トレーニングによって相殺されたことであろう。肝臓を含む他の臓器では、加齢性のオートファジー活性の低下が報告されている^{1, 2)}。骨格筋においても加齢性のオートファジー活性低下が生じるかどうかは明らかではないが、本研究の結果は、高齢期の運動トレーニングが持つ骨格筋に対する好影響の一部を説明するかもしれない興味深い結果であり、その意義について今後明らかにする必要がある。

LC3はオートファゴソーム形成の最終段階において動員される。細胞質に位置するpro-LC3はAtg4によって活性化されてLC3-Iとなり、さらにフォスファチジルエタノールアミンを付加されることで、LC3-IIへ変換される。このLC3-IIはオートファゴソームの形成と相関することから、LC3-IIの増加はオートファジーの進行マーカーとして利用されている（但し、リソソームによる分解については保証されない）^{4, 15)}。本研究では、LC3-Iは加齢によりいずれの骨格筋でも増加した。LC3-IはLC3-IIの前駆体であり、LC3プールの量を間接的に意味するとも考えられる。そのため、加齢によるLC3-I発現量の増加はオートファジーのポテンシャルを高齢期の骨格筋で増加させることを意味するのかもしれない。先行研究では、加齢によりLC3-I発現量は心筋や肝臓では影響されないとする報告¹⁸⁾や、先述した外輪筋⁷⁾においては低下が観察されているなど研究ごとに相違が見られる。この原因は明らかではないが、少なくとも

とも分析された組織ごとに応答が異なる可能性が一因として挙げられるだろう。

本研究の足底筋では、LC3-II発現量は加齢により増加した。先述したように、LC3-IIはオートファジーの進行マーカーとしての側面を持つ¹⁵⁾。そのため、本研究の成果は、トレーニングの有無にかかわらず加齢がオートファジーを活性化させている可能性を示唆している。この点については、本研究の老齢動物において骨格筋量の低下（筋萎縮）が観察されていることと関係するかもしれない。C2C12 myotubeを用いた先行研究において、myotubeを実験的に萎縮させた際のメカニズムにはオートファジーが関与していることが報告されている¹⁹⁾。したがって、少なくとも足底筋においては、オートファジーの活性化が加齢性の筋萎縮に関与していた可能性がある。但し、この見解に対してはLC3-II発現量の解釈に注意しなければならない。なぜなら、LC3-II発現量の増加は、オートファジーの進行状況を表すと同時に、リソソームにおけるタンパク質分解の抑制を示唆する可能性も否定できないからである⁹⁾。この点を区別するためには、リソソームタンパク質分解酵素を阻害する薬剤の投与実験などが新たに必要になると考えられる。

本研究の結果を見る限りでは、分析されたタンパク質が足底筋においてのみ影響を受ける場合が多いなど、筋タイプごとにその応答性が異なっているように思われる。この点について、先行研究において筋タイプによるオートファジー活性化水準の差異が報告されている。Mizushima et al.⁸⁾は、飢餓状態におけるオートファジーの活性化がヒラメ筋より代表的な速筋である長指伸筋で高いことをマウスにおいて観察している。この結果は、おそらく筋線維タイプの違いがオートファジー活性に影響を及ぼすことを示唆している。したがって、運動トレーニングや加齢に伴うオートファジー関連タンパク質の適応動態が異なることは驚く

べきことではないように思われるが、その機序は不明である。

最後に、本研究の解釈で注意を要する点を指摘すれば、本研究はあくまでも安静状態（基底状態）にあるオートファジータンパク質を分析しているということである。緒言でも述べたように、オートファジーは例えば飢餓状態などの条件下で著しく活性化する^{5, 6, 8)}。したがって、運動トレーニングや加齢などの介入を受けた骨格筋がそのような状況下でどのような反応を示すのかについて今後明らかにしていく必要がある。

4. まとめ

マクロオートファジーを制御するタンパク質発現は加齢および運動トレーニングより改変される。しかしながら、これらの改変はタンパク質の種類、あるいは骨格筋の種類により異なる。

謝 辞

本研究に対して助成を賜りました財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Cuervo A.M., Bergamini E., Brunk U.T., Droge W., Ffrench M., and Terman A., Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. *Autophagy*, 1: 131-140 (2005)
- 2) Donati A., Recchia G., Cavallini G., and Bergamini E., Effect of aging and anti-aging caloric restriction on the endocrine regulation of rat liver autophagy. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, 63: 550-555 (2008)
- 3) Gustafsson A.B. and Gottlieb R.A., Recycle or die: the role of autophagy in cardioprotection. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 44: 654-661 (2008)
- 4) Kabeya Y., Mizushima N., Ueno T., Yamamoto A., Kirisako T., Noda T., Kominami E., Ohsumi Y., and Yoshimori T., LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J.*, 19: 5720-

- 5728 (2000)
- 5) Komatsu M., Waguri S., Ueno T., Iwata J., Murata S., Tanida I., Ezaki J., Mizushima N., Ohsumi Y., Uchiyama Y., Kominami E., Tanaka K., and Chiba T., Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J. Cell. Biol.*, 169: 425-434 (2005)
- 6) Kuma A., Hatano M., Matsui M., Yamamoto A., Nakaya H., Yoshimori T., Ohsumi Y., Tokuhisa T., and Mizushima N., The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, 432: 1032-1036 (2004)
- 7) McMullen C.A., Ferry A.L., Gamboa J.L., Andrade F.H., and Dupont-Versteegden E.E., Age-related changes of cell death pathways in rat extraocular muscle. *Exp. Gerontol.*, 44: 420-425 (2009)
- 8) Mizushima N., Yamamoto A., Matsui M., Yoshimori T., and Ohsumi Y., In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol. Biol. Cell.*, 15: 1101-1111 (2004)
- 9) Mizushima N., and Yoshimori T., How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 3: 542-545 (2007)
- 10) Murton A.J., Constantin D., and Greenhaff P.L., The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1782: 730-743 (2008)
- 11) Radak Z., Naito H., Kaneko T., Tahara S., Nakamoto H., Takahashi R., Cardozo-Pelaez F., and Goto S., Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *Pflugers. Arch.*, 445: 273-278 (2002)
- 12) Reid M.B., Response of the ubiquitin-proteasome pathway to changes in muscle activity. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 288: R1423-1431 (2005)
- 13) Shintani T., and Klionsky D.J., Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 306: 990-995 (2004)
- 14) Shintani T., Mizushima N., Ogawa Y., Matsuura A., Noda T., and Ohsumi Y., Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *EMBO J.*, 18: 5234-5241 (1999)
- 15) Tanida I., Minematsu-Ikeguchi N., Ueno T., and Kominami E., Lysosomal turnover, but not a cellular

- level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy., *Autophagy*, 1: 84-91 (2005)
- 16) Tanida I., Tanida-Miyake E., Ueno T., and Kominami E., The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3., *J. Biol. Chem.*, 276: 1701-1706 (2001)
- 17) Uchiyama Y., Shibata M., Koike M., Yoshimura K., and Sasaki M., Autophagy-physiology and pathophysiology., *Histochem. Cell. Biol.*, 129: 407-420 (2008)
- 18) Wohlgemuth S.E., Julian D., Akin D.E., Fried J., Toscano K., Leeuwenburgh C., and Dunn W.A., Jr. Autophagy in the heart and liver during normal aging and calorie restriction., *Rejuvenation Res.*, 10: 281-292 (2007)
- 19) Zhao J., Brault J.J., Schild A., Cao P., Sandri M., Schiaffino S., Lecker S.H., and Goldberg A.L., FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells., *Cell. Metab.*, 6: 472-483 (2007)