

第1章 序論

第1節 ミトコンドリアの構造と機能

(1) ミトコンドリアの構造

ミトコンドリアは約 $1 \mu\text{m}$ の大きさの細胞器官で、外膜と内膜からなる二重構造を持っている (Fig. 1-1)。内膜に連続して複雑に入り組んだ膜構造はクリステと呼ばれる。また、内膜とクリステで仕切られた内側の液体はマトリックスと呼ばれ、内膜と外膜の間を占める空間は膜間腔と呼ばれる。ミトコンドリアで行われる酸化の最終段階は電子伝達反応であるが、電子伝達反応はこの内膜で行われる。有機物の炭素はその前にマトリックスの酵素の働きによる脱炭酸反応によって除かれる。電子伝達系で生じたエネルギーはアデノシン三リン酸 (ATP) 合成に利用される。電子伝達系による ATP 合成は酸化的リン酸化であり、これは真核生物ではミトコンドリアの内膜で行われる (Mitchell, 1979; Wallace, 1992; 村松ら, 1992; 香川, 1994; 香川, 1995)。

細胞の様々な活動は、ATP の水解のエネルギーで駆動されているが、その ATP の大部分を合成しているのが、ミトコンドリア内膜に存在する ATP 合成酵素 (F_0F_1) である。Fig. 1-1 のクリステ上に並んだ F_1 と呼ばれる粒子は、ATP 合成酵素の一部である。これに、電子伝達系が水素イオンの電気化学ポテンシャル差の形で ATP 合成のエネルギーを供給している (Mitchell, 1979)。 F_0F_1 も電子伝達系も共にクリステに組み込まれており、電気化学ポテンシャル差の形成にはこの膜構造が重要な働きをしている。

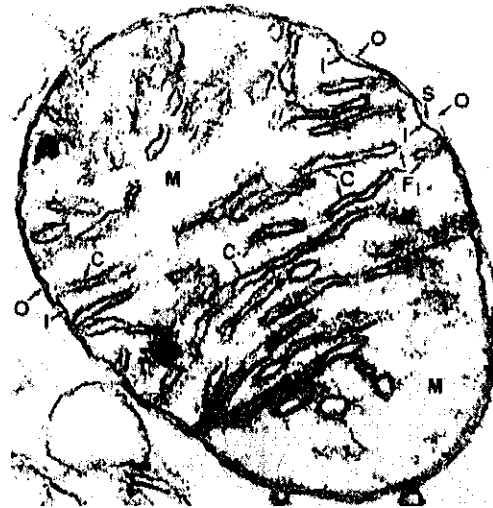


Fig. 1-1 Electron microscope image of the ultrathin section of the cardiac muscle mitochondria of a cow. (Kagawa, 1993)

(Osmic acid fixation, major axis $1.0 \mu\text{m}$)

O: outer membrane, I: inner membrane, C: cristae, S: intermembrane space, M: matrix

(2) ミトコンドリアの機能

ミトコンドリアの機能は Fig. 1-2 のように要約される (村松ら, 1992; 香川, 1993; 香川, 1995)。代謝基質はいずれもミトコンドリアにおいて最終的に水と炭酸ガスに分解される。

アミノ酸など窒素を含むものは脱アミノを受ける。細胞に取り入れられた主要な栄養素は、細胞液で、糖、グリセリンはピルビン酸に、脂肪は主に脂肪酸に、タンパク質は α -ケト酸にまで分解されてマトリックスに入る。そして、その大部分から形成されるアセチル-CoAは、炭素部分は Fig. 1-3 に示すクエン酸回路 (TCA サイクル) によって脱炭酸され、水素部分は脱水素酵素で主に還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) として内膜の電子伝達系に渡される (香川ら, 1995)。電子伝達系は、その系の最後のシトクロム酸化酵素によって酸素を用いてこのNADHの水素を酸化して水を作り、そのとき遊離される多量のエネルギーで F_0F_1 にアデノシン二リン酸 (ADP) と無機リン酸 (Pi) からATPを合成させる。合成されたATPは内膜をATP/ADP交換輸送体を経て膜間腔に移り、一部はATP以外のトリヌクレオチドに変換されて、細胞内のすべての場所で各種のエネルギー利用系に消費される。トリヌクレオチドの分解産物であるジヌクレオチドやモノヌクレオチドは再びミトコンドリアに戻ってトリヌクレオチドに再合成される。

したがって、細胞内のエネルギー利用系はミトコンドリアによって駆動されていると言える。

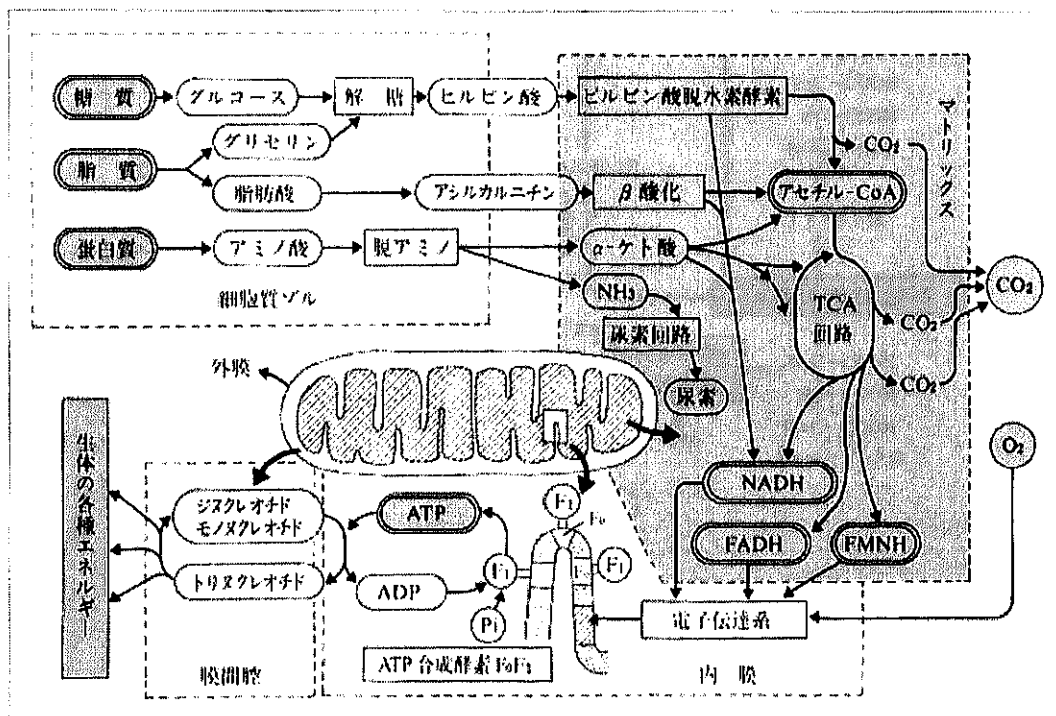


Fig. 1-2 Assignment of the metabolism of cytoplasm sol and mitochondria. (Kagawa, 1993)

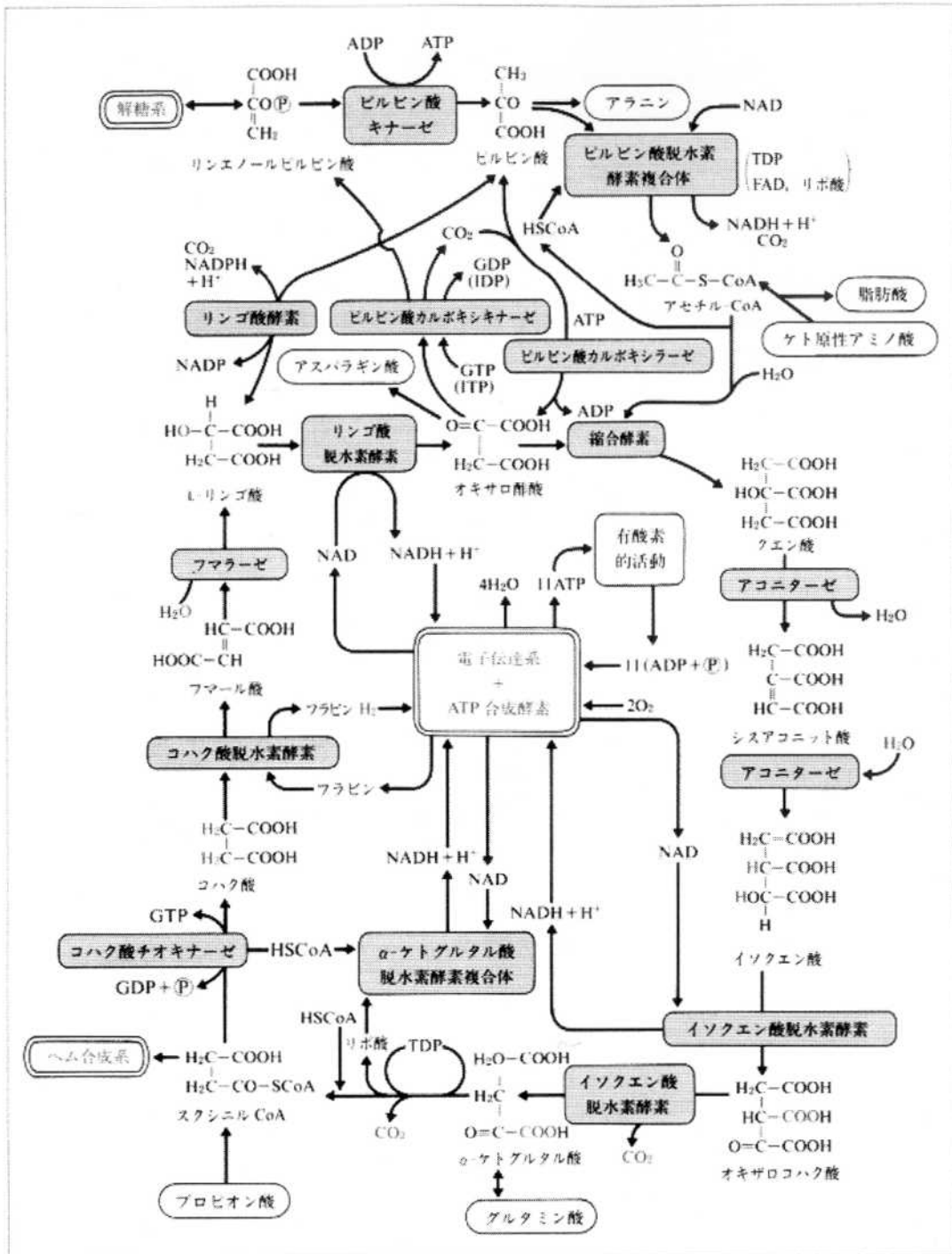


Fig. 1-3 Citric acid cycle (TCA cycle).

(Kagawa, et al., 1995)

(3) エネルギー産生と電子伝達系

ミトコンドリアのマトリックス内には、Fig. 1-2 に示した主要な代謝中間産物を処理して各種の α -ケト酸に変える諸酵素系と、これを Fig. 1-3 に示したアセチル-CoA を経て分解するクエン酸回路の諸酵素がある。

ピルビン酸は、ピルビン酸脱水素酵素複合体によって、アセチル-CoA を生じる。この複合体のヒト遺伝子は決定され、複雑な構造も解析された (Koike, et al., 1988)。この酵素は代謝の要路に存在するために、酵素レベルのアロステリック効果とリン酸化による制御 (Fig. 1-4(a)) と遺伝子発現による酵素タンパク質合成 (Fig. 1-4(b)) の両面から制御を受けている。これによって、糖消費と脂質消費、ほかの水素供与体などの供給に応じて制御される。

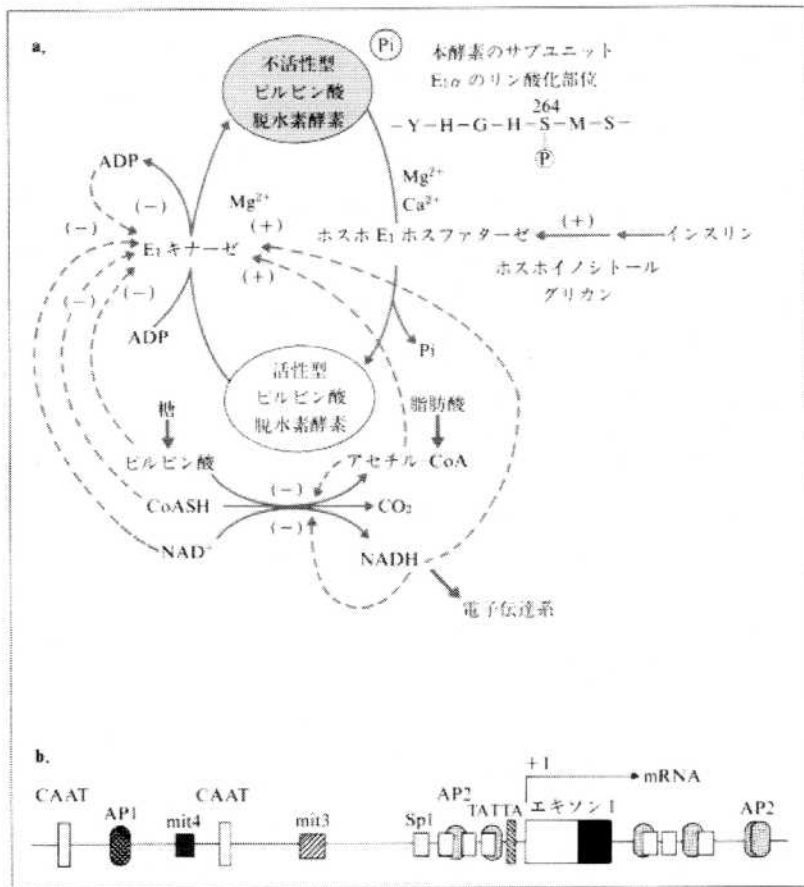


Fig. 1-4 Regulation of pyruvic acid dehydration enzyme. (Kagawa Y, Patel M: Japan-U.S. science seminar "mitochondrial α -keto acid dehydration enzyme complex", 1994)

a. Control on an oxygen level: (+) of a dotted-line arrow; promotion, (-) of a dotted-line arrow; control.

b. Control on a gene expression level: 5' upstream part of E1a gene, mRNA: a messenger RNA, CAAT, AP1, Sp1, etc. is the binding site of a transfer control factor. It is the following four when activity is controlled. 1) when acetyl-CoA increases by beta oxidization of the fatty acid which competes with sugar consumption, 2) when there are many other hydrogen supply objects and a NADH/MAD ratio is high, 3) when there is little energy consumption of a cell and an ATP/ADP ratio is high, and 4) when glycolysis falls and pyruvic acid falls.

ATPの合成経路の中で、解糖系は糖のみが酸素的に消費されるのに対し、ミトコンドリア代謝は好氣的で、主として脂肪酸が β 酸化系で代謝される点に特色がある。このため、後者は持久的運動の主要なエネルギー供給経路として応用される。

この経路で形成されたアセチル-CoAはまずオキサロ酢酸と縮合してクエン酸となる。クエン酸は、Fig. 1-3に示したように回路を1周して再びオキサロ酢酸となるので、次のアセチル-CoAを処理することができる。その1周の間に脱水素により3個のNADHと1個の還元型フラビンが生じる。また、NADHの酸化リン酸化では3個、フラビンの酸化リン酸化では2個のATPが合成されるので、1周で計11個のATPが合成される。さらに、グアノシン三リン酸(GTP)が1分子合成され、このエネルギーはATPに等しいため、計12ATPが得られる。グルコースから乳酸を形成するのが解糖系であるが、グルコース1分子あたり2ATPしか合成できない。一方、酸化リン酸化によってグルコース1分子を分解すれば、乳酸をピルビン酸に変え、ピルビン酸をアセチル-CoAに変える時に得られるNADHをも酸化リン酸化に使うので、グルコースが2分子のピルビン酸を生じることから、総計36ATPを形成することになる。解糖系の2ATPの収率に比べて、酸化リン酸化は19倍の収率である(解糖の2ATPも加えている)。

(4) mtDNA の構造

1981年に、Sangerらのグループは、はじめてヒトで mtDNA の全塩基配列を決定し、mtDNA が環状2重鎖の形状をしていること、その長さが 16,569 塩基対 (bp) であること、さらに 12S と 16S の2つのリボゾーム RNA (rRNA) 遺伝子、22種類のトランスファー RNA (tRNA) 遺伝子、および電子伝達系を構成するサブユニットのうちの 13種類のタンパク質遺伝子をコードしていることを明らかにした (Anderson, et al., 1981) (Fig. 1-5)。これらの 13種類のタンパク質遺伝子の内訳は、複合体 I (NADH:ユビキノン酸化還元酵素) が7種類 (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6)、複合体 III (ユビキノール:シトクロム c 酸化還元酵素) が1種類 (cyt b)、複合体 IV (シトクロム c 酸化酵素) が3種類 (COX I, COX II, COX III)、複合体 V (ATP 合成酵素) が2種類 (ATPase 6, 8) である。これらのタンパク質はすべて酸化的リン酸化に関与している (Anderson, et al., 1981; Chomyn, et al., 1985; Chomyn, et al., 1986; Fearnley, et al., 1986)。

この発見は、ミトコンドリアに細胞質のものとは別の独自の翻訳機構が存在することを示すと同時に、mtDNA の複製、転写、およびメッセンジャー RNA (mRNA) の翻訳に必要な酵素のすべてとミトコンドリア機能に必須なタンパク質のほとんどは核の染色体 DNA にコードされており、それらのタンパク質は細胞質で合成された後にミトコンドリアへ運び込

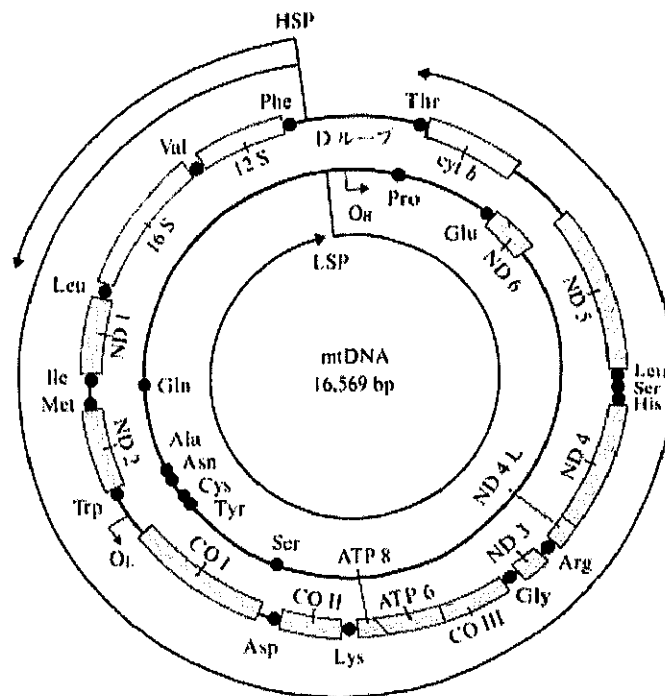


Fig. 1-5 Arrangement of the gene of a human mitochondrial DNA.

The subunit of 13 kinds of various complexes is shown. 12S rRNA and 16S rRNA are ribosome RNA genes, and 22 kinds of tRNA genes correspond to the amino acid of the three-character notation, respectively. OH and OL are the initiation sites of replication of heavy chain and light chain, respectively. An outside shows light chain DNA and an inner side shows heavy chain DNA.

まれることを意味している。つまり、ミトコンドリアの増殖や遺伝情報の発現は、本質的には核の支配を受けているものと考えられる。

このように、mtDNAの場合、わずか16,569 bpの配列の中に37種類の遺伝子をコードしているため、1,100 bpほどの長さのコントロール領域(D-loop)と呼ばれる部位を除くと、各々の遺伝子はDNA上にほとんど隙き間なく連なっている。なお、コントロール領域には遺伝子はないものの、重鎖の複製開始点、重鎖と軽鎖の転写開始点といったmtDNA複製、転写を制御する部位があることがわかっている(Clayton, et al., 1991; Clayton, et al., 1992)。

mtDNAの遺伝子には介在配列(イントロン)は全く存在しない。そして、rRNA遺伝子とほとんどのタンパク質遺伝子は、両端をtRNA遺伝子で区切られている。また、隣り合ったtRNA間では1ないし数bpを共有している場合もある。ATPase 8遺伝子とATPase 6遺伝子は46 bpの領域で、ND4L遺伝子とND4遺伝子は7 bpの領域で、各々の異なる読み枠を使いながら重なりあっている。

タンパク質遺伝子のうち、ND1, ND2, ND3, ND4, COX III, ATPase 6, cyt bは3'末端に終止コドンを持たず、TあるいはTAで配列が終わっている(Anderson, et al., 1981)。これらの遺伝子では、転写後のポリA付加によって初めて"UAA"という終止コドンを持つようになる。tRNAの種類に関しては、核にコードされた細胞質での翻訳には少なくとも31種類が必要であるのに対し、ミトコンドリアには22種類しか存在しない。tRNAのアミノ酸を受容する3'末端に共通してみられる"CCA"という配列は、mtDNA上の遺伝子の配列には存在せず、これもまた転写後付加されるものと考えられる(Anderson, et al., 1981)。このように、ヒトmtDNAの遺伝子構成は極めてコンパクトであり、むだな部分が少ないと言える。

mtDNAを構成する2本のDNA鎖には、極端な塩基組成の違いが見られる。一方のDNA鎖はアデニン(A)が31%、シトシン(C)が31%、チミン(T)が25%、グアニン(G)が13%と、G残基の数が極端に少なく、その相補鎖ではC残基の数が極端に少なくなっている(Anderson, et al., 1981)。このG残基とC残基の分子量の違いにより、両鎖の比重が大きく異なるため、前者は軽鎖(L鎖)、後者は重鎖(H鎖)と呼ばれている。このような塩基組成の偏りは、脊椎動物mtDNAに共通する特徴である(Wolstenholme, 1992)。

また、コードしている遺伝子の数にも2本のDNA鎖間に大きな違いが見られる。重鎖にはわずか8個のtRNA遺伝子と1個のタンパク質遺伝子(ND6)だけがコードされているのに対し、軽鎖には残りの28個の遺伝子がコードされている。

(5) mtDNA の特徴

すでに述べたように、ヒトの mtDNA の特徴は 16,569 bp の長さであり、核の染色体 DNA が約 30 億 bp の長さであるのに比べると、非常に小さなゲノムである (Anderson, et al., 1981)。

また、mtDNA は次のような特徴を持っていることが報告されている。

- 1) 核の染色体 DNA のようにヒストンで保護されたクロマチン構造はなく、裸の環状二本鎖 DNA である (Caron, et al., 1979)。
- 2) 遺伝様式は母系遺伝である (Hutchison 3rd, et al., 1974; Giles, et al., 1980)。母親の mtDNA のみが子に伝えられ、父親の mtDNA は、受精の際に卵に入るが、卵中には母親由来の遺伝子コピーが圧倒的に多いので、増殖せずに消失する。
- 3) mtDNA は個々のミトコンドリア内に数コピー存在し、またミトコンドリア自体が細胞当たり 1,000 個ほど存在するため、1 個体では膨大な数の mtDNA 分子が存在していることになる。そして、通常は、正常人の個体内ではこれらすべての mtDNA が同じ塩基配列より成り立っている (Potter, et al., 1975)。この状態はホモプラズミーと呼ばれている。一方、病的状態 (たとえばミトコンドリア脳筋症など) の個体内では、変異型と正常型の mtDNA が混在するヘテロプラズミーの状態である (Goto, et al., 1990a; Goto, et al., 1990b; Shoffner, et al., 1990)。
- 4) mtDNA は突然変異を起こしやすく、DNA の修復機構も不完全である。そのため、進化の過程においては、核の染色体 DNA に比べて塩基置換速度が 5 ~ 10 倍程度速いとされている (Brown, et al., 1979)。たとえば、ヒトに最も近縁な生物と考えられているチンパンジーとヒトとで染色体 DNA の相同遺伝子の塩基配列を比較すると、塩基配列が異なっている割合はたかだか 1 % 程度であるが、mtDNA ではその割合は 10% 近くになっている (Brown, et al., 1982; Horai, et al., 1992)。つまり、これら 2 種の DNA は、共通の祖先から分かれてそれぞれ進化してきたわけであるが、2 種間に蓄積した塩基置換の量は、mtDNA では核の染色体 DNA より 10 倍ほど多いということになる。この mtDNA の持つ特徴は、種内変異を調べる際にも応用されている。
- 5) mtDNA はミトコンドリアの内膜に存在しているために、電子伝達系から生じるフリーラジカルによる損傷を受けやすい。さらに、DNA を保護するタンパク質であるヒストンが存在せず (Caron, et al., 1979)、変異に対する修復機構も不十分である (Richter, et al., 1988) ことから、mtDNA は核の染色体 DNA に比べてかなりダメージを受けやすいと考えられる。これらのことから mtDNA は染色体 DNA の約 16 倍の酸化的ダメージを受けているとされており (Richter, et al., 1988)、突然変異率も核遺伝子の 10 倍高いことが知られている (Brown, et al., 1979)。さらに、1,100 bp 程の長さのコントロール領域 (D-loop) と呼ばれる部位以外には、何もコードしていない介在配列 (イントロン) が存在していないために、もし突然変異などによって mtDNA が損傷を受けた場合には、電子伝達系を構成しているタンパク質を合成できなくなってしまう、生体に重大な影響を与えるとされている (Anderson, et al., 1981; Wallace, 1992)。

(6) mtDNA の複製

mtDNA の複製に関しても、mtDNA は特殊な複製機構を持っており (Clayton, 1982), これもまた突然変異が起こりやすい原因の 1 つとなっている。

mtDNA の複製は、2本の DNA 鎖について非対称的に起こる (Clayton, 1982)。まず、コントロール領域 (D-loop) に存在する重鎖複製開始点 (O_H) から、軽鎖を鋳型にして重鎖の複製のみが行われる。重鎖の複製が全体の 3 分の 2 ほど進んで、軽鎖複製開始点 (O_L) に至ってから、重鎖を鋳型にして軽鎖の複製が始まる。重鎖の複製が O_L に至るまでの間、もとの重鎖は一本鎖の状態にある。このことが、欠失を起こりやすくしている。

1) 重鎖の複製

重鎖の複製に必要なプライマー RNA は軽鎖転写プロモーター (LSP) から転写される (Chang, et al., 1989)。したがって、重鎖の複製と軽鎖の転写は同じ機構によって開始される。プライマー RNA から重鎖 DNA の合成への移行には、RNase MRP (mitochondrial RNA processing) という RNA 成分を含んだ酵素が深く関わっている (Chang, et al., 1987; Chang, et al., 1989; Topper, et al., 1990; Bennet, et al., 1990)。この酵素は、CSB II と CSB III の配列を認識してプライマー RNA を切断し、DNA 複製機構へと渡す (Bennet, et al., 1990)。RNase MRP の RNA 成分は核 DNA にコードされた 1 コピー遺伝子で、その長さはヒトで 265 bp, マウスで 275 bp であり、2 種の配列には 84% の相同性がみられる (Clayton, 1991; Chang, et al., 1989; Bennet, et al., 1990)。

mtDNA の合成は、DNA ポリメラーゼによって行われる。複製中の重鎖 DNA と D ループ DNA の 5' 末端は同じ位置にあるが (Tapper, et al., 1981), 重鎖の複製がすでに存在している D ループ DNA をさらに延長することによるのか、新たにプライマー RNA から合成されるのかはまだわかっていない。

2) 軽鎖の複製

O_L はアスパラギンとシステインの tRNA 遺伝子の間にあり、11 bp からなるステムと 12 bp からなるループを持つ構造をとることができる配列をしている。このステムループ構造はほかの哺乳動物 mtDNA の O_L にも共通してみられる特徴である。合成中の軽鎖の 5' 末端は、ステムの根元に位置している (Chang, et al., 1987)。

O_L からの複製開始点には O_H からのものと全く別の因子が関与している。その一つが mtDNA プライマーゼで、その活性には小分子の RNA が必須である (Wong, et al., 1985a; Wong, et al., 1985b; Wong, et al., 1986)。この酵素は、in vitro では O_L のループの T 残基の連続した箇所からプライマー RNA の合成を始めること、DNA 合成への転換にはステムの下流のシステイン tRNA 遺伝子の中にある "GCCGG" という配列が必須であることがわかっていて (Hixson, et al., 1986)。

第2節 ミトコンドリア DNA の変異

(1) mtDNA の突然変異

mtDNA の変異には4つのタイプが存在する。この変異のタイプは、1)一塩基置換変異, 2)欠失, 3)挿入, および4)コピー数の異常の4つであり, これらの突然変異が複合して様々な症状の発現に関与している。

このような変異は, DNA の複製時に突発的に起こる。これらの変異が起こる主な原因としては, フリーラジカルによる突然変異と, 同一配列 (direct repeat) の存在による読み違いがあげられる。

1) フリーラジカルによる突然変異

電子伝達系において酸化リン酸化を行う際, その副産物として全酸素消費のおよそ2~3%はフリーラジカルを発生することが明らかとなっている (Chance, et al., 1979)。そのほとんどは, 複合体IとIIIで発生している。このフリーラジカルは強い酸化力を持っており, 核酸, タンパク質, 脂質などに障害を及ぼす。

フリーラジカルは, mtDNA 中のデオキシグアニン (dG) を8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OH-dG) に変化させる。この8-OH-dGは複製の際に他の塩基に誤読されることが明らかとなっており (Kamiya, et al., 1992), これによって点変異が生じる。さらに, この点変異が蓄積されると, 遺伝子の欠失を引き起こすことがわかっている (Linnane, et al., 1989)。

2) 同一配列における複製ミス

mtDNA の塩基配列の中には同じ配列を有する部位が多数存在していることが明らかになっている (Anderson, et al., 1981)。ヒトでは, mtDNA 中に11 bpの同一配列が60組, 10 bpのものが260組存在していることが報告されている (Schon, et al., 1989)。この同一配列の存在によって, たくさんの塩基配列が抜け落ちた欠失 mtDNA ができる。本来転写が行われるべき部位に同一配列の他の部分が結合し, 途中の部分は転写されずに切り離されてしまう。その結果, たくさんの塩基配列が抜け落ち, 正常な遺伝子発現が行われなくなる。

(2) common deletion

mtDNA に欠失を生じた部位の塩基配列を調べると、その前後で同じ繰り返し配列 (direct repeat) を示す場合がある。これは、mtDNA の複製時に重鎖が一本鎖になっている時期が長い間、その間に同じ塩基配列の間で滑りが生じ (slipped mispairing)、一定の塩基配列が抜け落ちてしまう (欠失) というメカニズムである (Shoffner, et al., 1989)。特に、ミトコンドリア病と呼ばれる疾患患者の組織細胞の mtDNA では、Fig. 1-6 および Fig. 1-7 に示したように、“common deletion” と呼ばれる 13 bp の繰り返し配列を有するアデノシン トリホスファターゼ 8 (ATPase 8) gene の部分から ND5 gene まで、約 5,000 塩基対 (4,977 bp) にわたる欠失を有する頻度が高いことが知られている (Schon, et al., 1989)。

なお、それ以外の長さの欠失も多数報告されている (Holt, et al., 1988; Moraes, et al., 1989; Tanaka, et al., 1989; Johns, et al., 1989)。

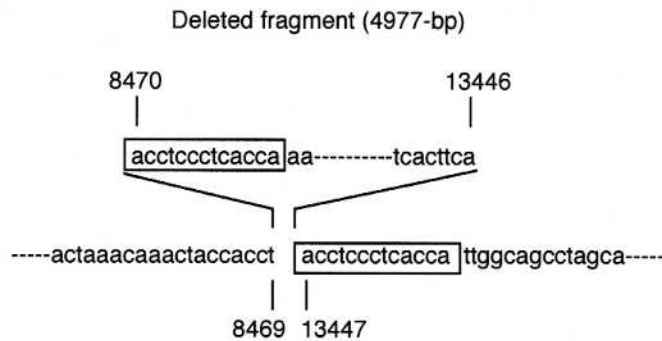


Fig. 1-6 The base sequence of common deletion.

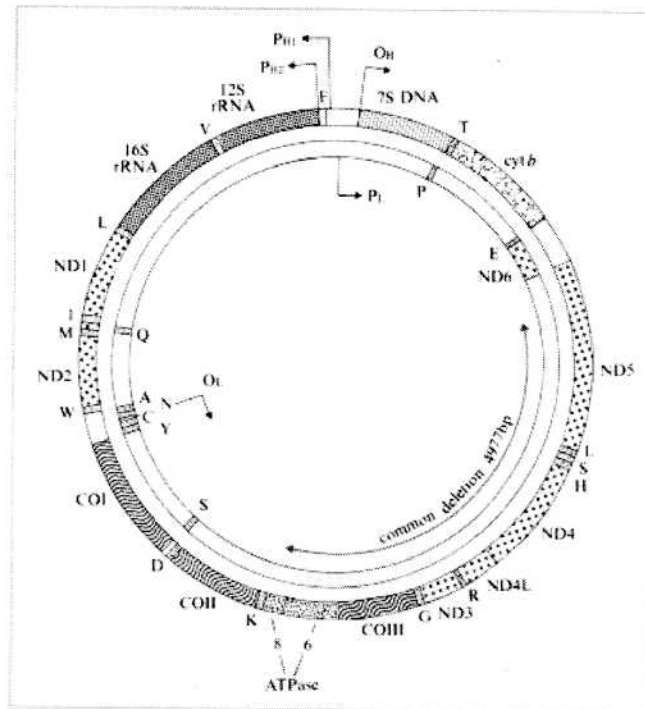


Fig. 1-7 Arrangement of the gene of a human mitochondrial DNA and the position of common deletion.

(3) mtDNA の突然変異と疾患

ミトコンドリア病に属する3つの代表的病型は、MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes), MERRF (myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers), および CPEO (chronic progressive external ophthalmoplegia) である。

Holt ら (1988), および Wallace ら (1988) により, mtDNA の変異が証明されて以来, 次々に新たな変異の存在が認められ, またミトコンドリア病という概念も生まれた。これらはすべて mtDNA の点変異, 欠失, 部分的重複, および欠乏に基づいて発生している (Moraes, et al., 1991)。しかし, これらの臨床症状は多彩で, 変異の種別と臨床症状をただちに結び付けることは困難である。事実, 同一の遺伝子変異を伴いながら全く異なる臨床症状を呈する疾患がいくつか知られている。たとえば, 全く同様の大規模欠失によって CPEO が生じ, 一方で Pearson 症候群が現れる (Pearson, et al., 1979; Lotig, et al., 1988)。また, 点変異では, 3243 変異における MELAS と母系遺伝に伴う糖尿病 (MIDD; maternally inherited diabetes and deafness) (Van den Ouweland, et al., 1992; Van den Ouweland, et al., 1995), 8993 変異における NARP (neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa) と Leigh 脳症, 8344 変異における MERRF と多発性対称性脂肪腫 (multiple symmetric lipomas) (Ekholm, 1975; Berkovic, et al., 1989) など同様の現象である。

すでに述べたように, mtDNA は核の染色体 DNA に比べて, 少なくとも 10 倍以上変異を受けやすい (Richter, et al., 1988)。これは, ヒストンの保護作用や修復系 (repair system) を欠いていることに加え, ミトコンドリア内で発生した活性酸素によって 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OH-dG) などを生じ, mtDNA が損傷を受けるためである (Kamiya, et al., 1992)。さらに, もはや分裂能を失った組織やターンオーバーの極めて緩徐な組織に変異ミトコンドリアが蓄積することが, 中年以後に発現する退行性疾患の成因に関わっている可能性についても検討されている (Flier, et al., 1995)。つまり, これまで mtDNA の突然変異はミトコンドリア病と呼ばれるごく限られた患者の組織細胞にのみ存在すると考えられてきた (Ikebe, et al., 1990; Wallace, 1992a) が, 近年になりアルツハイマー病 (Hutchin, et al., 1995), 糖尿病 (Reardon, et al., 1992; Van den Ouweland, et al., 1992), パーキンソン病 (Ikebe, et al., 1990), ピアソン病 (Rotig, et al., 1988), 心筋症 (Ito, et al., 1992; Obayashi, et al., 1992) といった様々な退行性疾患の患者の組織細胞にも多く蓄積していることが明らかとなった。また, mtDNA の突然変異が発ガン過程に関与している可能性も示唆されている。

(4) mtDNA と老化

高齢者から得られた細胞の呼吸能は必ず低下しており、80～97歳では胎児レベルの15%程度である(小沢, 1993; Hayashi, et al., 1994; 香川, 1996)。Fig. 1-8 に示したように、外膜のモノアミンオキシターゼについては酵素活性は加齢に伴う低下がみられないのに対し、内膜の複合体の酵素活性は低下が顕著であり、データを外挿すると約100歳で0となる(香川, 1996)。

また、個体の老化においてもエネルギー代謝の低下は特徴的であり、ミトコンドリアの最大活動量を示す最大酸素消費量は70歳で青年の60%にまで低下している。なお、基礎代謝基準値(22 kcal/kg/日)が成人で一定であるということはミトコンドリア機能が正常であることを意味しない。これは、休息時にはミトコンドリア機能が一部しか利用されていないためである。

mtDNA 変異による疾患の発見が契機となって、老化に伴うミトコンドリア機能の低下は mtDNA の変異の蓄積によって起こるといふ説が提唱された(小沢, 1993)。また、老化に伴って、mtDNA の欠失や変異が増加することが報告されている(Ikebe, et al., 1990; Wallace,

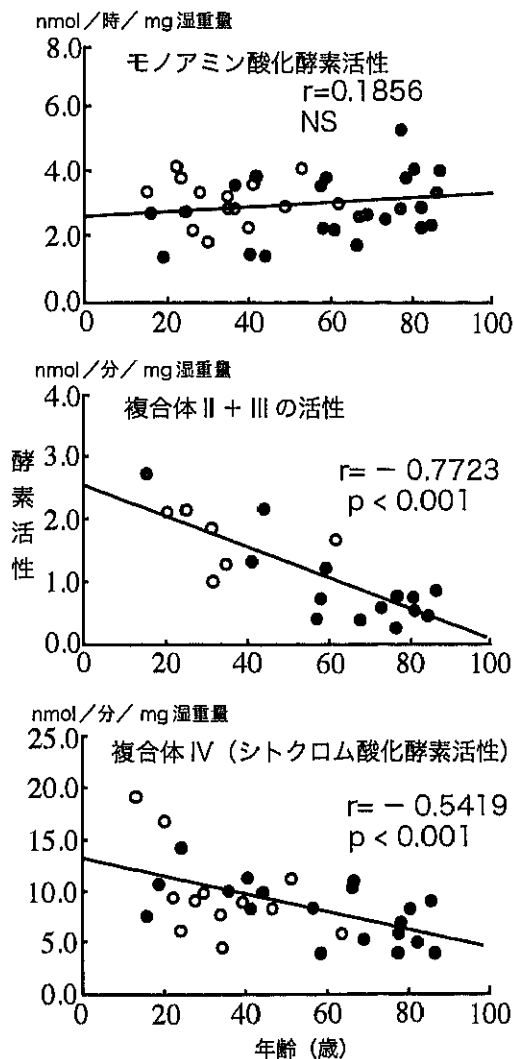


Fig. 1-8 Aging change of human skeletal muscle mitochondria enzyme activity. (Kagawa, 1996)

The mitochondria enzyme activity of the human skeletal muscle covering each age obtained at the time of an orthopedics operation was measured. The monochrome amine oxidative enzyme with which the code of the upper row is carried out to a nuclear DNA, the middle and the lower berth are the succinic acid-cytochrome c reducing enzyme and cytochrome oxidative enzyme with which the code of the main ingredients is carried out to a mitochondrial DNA. A black circles show orthopedics patients and the white circles show the chronic fatigue syndrome patients. If the age when both the enzyme activity of middle and the low berth becomes zero is extrapolated, it will become 100-130 years old.

1992a; 小沢, 1993)。この変異の蓄積は若齢の組織には見られず、約 40 歳以降に指数関数的に増加する (Fig. 1-9) ことが明らかになっており (Ozawa, et al., 1990; hayakawa, et al, 1992), この変異の蓄積の増加が老化や老化に関わる変性疾患を起こしやすくしているとする「ミトコンドリア老化説」の根拠となっている (Miquel, et al., 1980; Wallace, et al., 1995)。

しかし、mtDNA の変異が病態を引き起こすには細胞内の数千のミトコンドリアの約半数以上が異常ミトコンドリアでなければならない。つまり、正常遺伝子と異常遺伝子との間で遺伝子産物の受け渡しを行えるため、もし mtDNA に変異が生じたとしても、それが RNA やタンパク質の異常を引き起こすには、多くの変異 mtDNA の蓄積が必要であると考えられる。細胞の酸化的リン酸化能は 10 ~ 40% 程度の正常型 mtDNA が存在すれば維持される (Hayashi, et al., 1991; Chomyn, et al., 1992) が、mtDNA の変異がさらに蓄積して各組織のエネルギー産生酵素の活性がある閾値以下になると、ミトコンドリアは呼吸不全となり (Koga, et al., 1989), 病変となって現れる (Wallace, 1992)。この閾値は各組織によって異なっており、どのようにして違いが起こるかについては現在のところ明らかになっていない。特に、加齢に伴って蓄積する変異 mtDNA の割合は全体のわずか 0.1% 程度に過ぎず (Cortopassi, et al., 1990), この変異 mtDNA 単独ではエネルギー産生能の低下を引き起こすことはできない (Hayashi, et al., 1991)。老化による呼吸低下を説明しうる量の変異の蓄積はまれであり、したがって老化の原因は核の老化にあつて mtDNA の変異の蓄積ではないと考えられる。

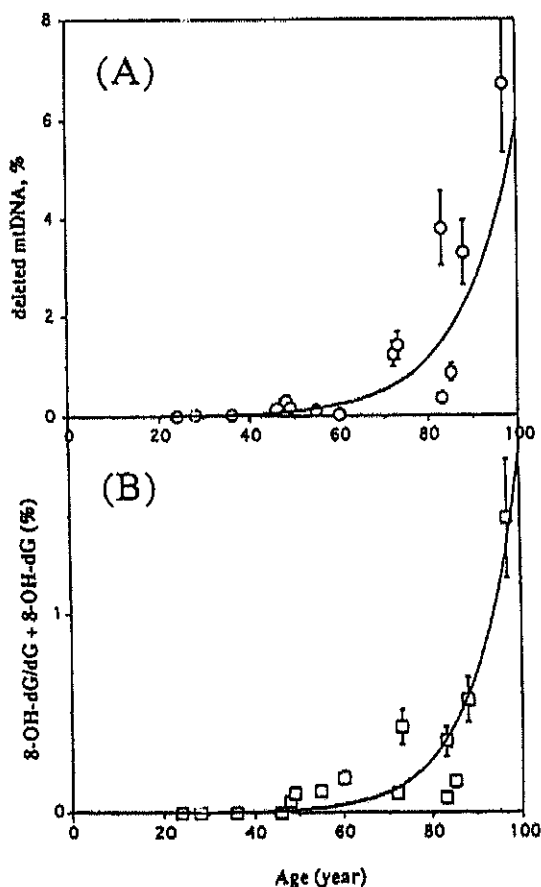


Fig. 1-9 Correlative increase in the deletion and oxygen free radical damage in mtDNA associate with age. (Ozawa T, et al., 1990)

(A) The ratio of deleted mtDNA to total mtDNA was plotted against the age of subjects.

(B) The 8-OH-dG content was plotted against the age of subject.

この考え方は、Hayashiら(1994)により、細胞融合の技術を応用して決定されている(Fig. 1-10)。つまり、高齢者から得たミトコンドリアを細胞質体としてmtDNAを欠損した ρ^0 細胞に移入すると、呼吸能もタンパク質合成能も完全に回復した(Hayashi, et al., 1994)。もし、mtDNAの変異が老化の原因(Wallace, 1992; 小沢, 1993)であるとするならば、この移入でミトコンドリアの機能は回復しない。したがって、mtDNAの欠失や変異(Kagawa, et al., 1991; Wallace, 1992)は脳筋症や糖尿病の原因とはなり得ても(Endo, et al., 1994)、老化の諸特徴とは異なるものと考えられる。

また、mtDNA変異による疾患が多様な臨床像を呈するのはミトコンドリアを支配する核に複雑な制御機構がある(Kagawa, et al., 1990; Shiraiwa, et al., 1993; 富永ら, 1994)ほか、病的mtDNAが個体内の各組織で不均一に分布することによるものと考えられている(Kawashima, et al., 1994; 香川, 1995)。つまり、他の様々な変異mtDNAの蓄積や、蓄積が均一ではなく局所に集中した場合などには、機能低下の原因となり得る可能性が残されている。エネルギー産生の観点から考えれば、たとえ1%の変異が存在したとしても細胞のエネルギー供給は99%保たれる。しかしながら、フリーラジカル産生の観点から考えると、たとえ数%とはいっても、それによる細胞への関与は無視できない。本当にmtDNAにおける変異の蓄積が酸化系酵素活性の低下の原因になっているか否かについては現在論争中である(Hayashi, et al., 1994; Laderman, et al., 1996)。

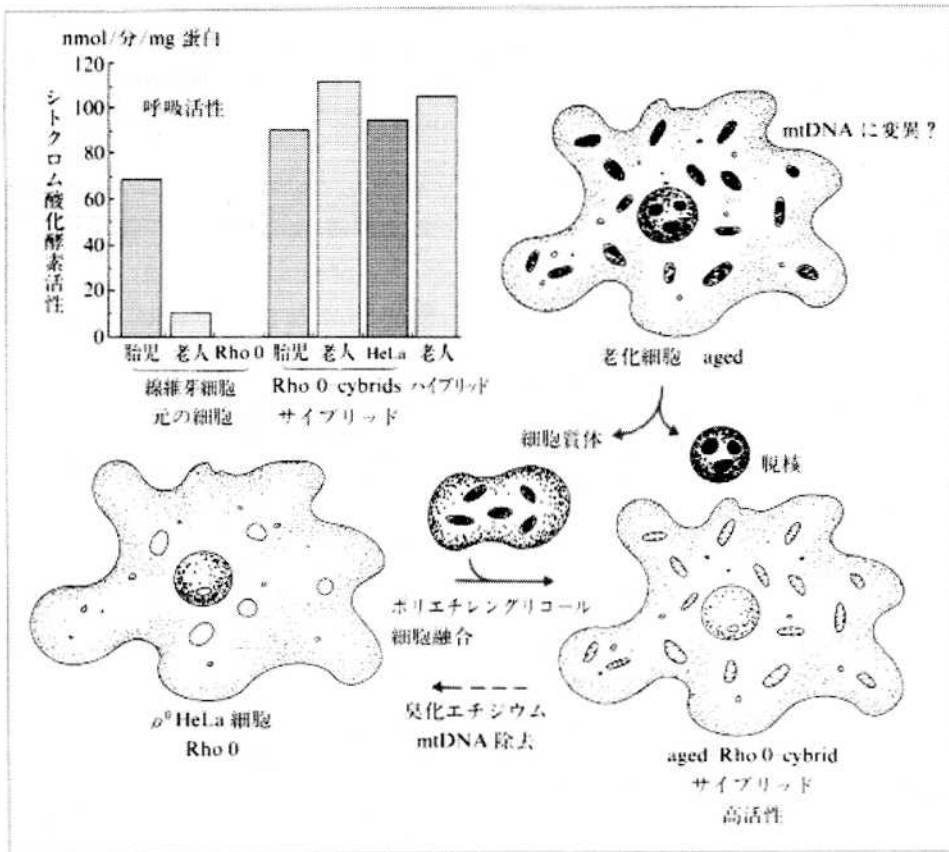


Fig. 1-10 Rule of the mitochondria activity by a nuclear gene. (Hayashi J, et al., 1994).

Recovery of the respiratory ability by the import to the non-deathized cell of an aging mitochondria.

第3節 運動が生体に及ぼす影響

(1) 運動と酸化損傷

好気性生物は、酸素代謝により生じる活性酸素やフリーラジカルに常にさらされている。このことは、発生した活性酸素を消去するためのスーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、カタラーゼ (CAT)、およびグルタチオン (GSH)、ペルオキシターゼなどの酵素が生物界に広く存在していることから明らかである。しかし、これらの酵素による消去を免れた活性酸素は遺伝子に損傷を与え、発がんや老化の原因になると考えられている。このように、酸素を必要とする我々の体内では絶えず活性酸素が生成されていることから、活性酸素の影響を知ることは非常に重要である。特に、運動を行うことによって、体全体の酸素消費量は10～40倍に、骨格筋の酸素消費量は約100倍に、また血流量は約30倍に、そして動脈酸素分圧差は約3倍に増えるとされている (Sen, 1995)。このように、運動は生体内酸素代謝に非常に大きな影響を及ぼしており、運動による生体への影響を確認することは極めて重要である。

1) 活性酸素によって生じる遺伝子損傷

好気性生物は、酸素を利用する過程で種々の活性酸素を生成する。近年、活性酸素の生体への影響が様々な角度から検討されており、その消去システムの重要性が明らかになりつつある。活性酸素は、ミトコンドリアや炎症の場における活性化好中球などで産生されるだけでなく、化学物質 (食品、アルコール、タバコなど) や放射線によっても生じる。こうして生体内で生成された活性酸素は、核酸、タンパク質、脂質などと反応する。

核酸においては、塩基部および糖部に対する反応が起こる。チミン塩基の損傷によりチミングリコールや5-ヒドロキシメチルウラシルなどが生じ、シトシン塩基の損傷によって5-ヒドロキシシトシンなどが生じる。また、プリン塩基の損傷としては、8位が水酸化された8-ヒドロキシグアニン (8-OH-Gua) や5員環が開裂したホルムアミドピリミジン (FAPY) などが発生することが知られている。また、核酸の糖部が攻撃されると、鎖の切断やクロスリンクが生じる。しかし、これらの損傷が生物学的にすべて重要であるとは限らず、各々の損傷について詳細な検討が必要である。これらの損傷の中で、特に、8-OH-Gua は突然変異を起こしうる重要な損傷として注目されている。

8-OH-Gua は、加熱グルコースによる DNA 損傷の検索中に見いだされたものであり (Kasai, 1984)、ヒドロキシラジカル (HO^\cdot) を生成する様々な因子により DNA 中に生じる。8-OH-Gua の生成による影響として最も重大なものが突然変異の誘発である。これについては、大腸菌や哺乳動物細胞の DNA 複製の際に、8-OH-Gua に対してシトシンとアデニンが取り込まれ、GC → TA トランスポージョンを誘起することが知られている。8-OH-Gua が発見されてから現在まで、8-OH-Gua を指標とした多くの研究報告がなされ、発がん物質の多くが活性酸素を介して DNA 損傷を誘起することが明らかとなっている (Asami, 1996; Yamaguchi, 1996)。

一方、生体は、種々の損傷 DNA を除去する酵素を持っている。大腸菌の系では、8-OH-

Gua の修復にはおもに 3 種類の酵素が関与している。このうちの 1 つは、活性酸素によって損傷を受けたヌクレオチドが DNA 中に取り込まれることを防いでいる (Maki, 1992)。また、哺乳動物細胞においても修復酵素が誘導されることが知られていたが、最近ではその中の 1 種類に関してヒトの遺伝子が同定されている (Aburatani, 1997)。

2) 活性酸素と運動

大量の活性酸素を生成するという観点から、運動は我々の健康にとってマイナスであるとの考え方がある。しかし、その一方では多くの疫学的研究の成果により、いくつかの癌や生活習慣病の予防には運動が非常に有効であることが判明している。現在のところ、これらのメカニズムについては未だ不明な点が多い。

もし、運動により生体に酸化ストレスが加わったならば、それに対する生体の適応能力も高まることが予想される。この点に関しては、実際に、よくトレーニングされた身体的運動能力が高い者では、外側広筋の SOD、赤血球中の SOD や CAT の活性が高まっているとの報告がある (Jenkins, 1984)。同様に、よくトレーニングされた者では抗酸化物質である GSH、ビタミン C、およびビタミン E の細胞内濃度が高いことが報告されている (Robertson, 1991)。

活性酸素の主な標的は、膜脂質、タンパク質、および核酸であり、このうち最も重要なものは DNA である。たとえ抗酸化酵素の活性が高まっていたとしても、DNA が損傷を受けてしまえば突然変異や発がんを引き起こす可能性がある。したがって、運動を行うことによって、このような DNA 損傷を来すか否かを確認することが重要であると考えられる。

3) 運動と白血球 DNA 中の 8-OH-Gua

近年、8-OH-Gua をバイオマーカーとして利用した実験がいくつか実施されている。

ヒトを対象にした実験の場合、最も簡便な検体の 1 つとして血液が用いられている。葛西ら (1997) は、最大酸素摂取量の 100% の運動を負荷し、その前後で白血球 DNA 中の 8-OH-Gua を測定したところ、運動後に 8-OH-Gua 生成の有意な低下が見られたことを報告している。また、一過性の運動の場合としては、水泳運動後に 8-OH-Gua レベルの低下が認められたことが報告されている (Inoue, et al., 1993)。さらに、Okumura ら (1997) は、トレッドミルを用いて犬に疲労するまで 7 時間の運動を負荷したところ、リンパ球 DNA 中の 8-OH-Gua が運動後に有意に低下したことを報告している。このように、運動を実施することにより抗酸化能や DNA 修復活性が高まる可能性が示唆されている。

一方、よくトレーニングされた長距離ランナーを 1 日平均約 30km のランニングを行うキャンプに 8 日間参加させ、キャンプ開始時と終了翌日のリンパ球中 8-OH-Gua を測定したところ、ほとんど変動は認められなかったとする報告がある (Okumura, et al., 1997)。また、Kasai ら (1994) の報告でも、有酸素能力の高い者では 8-OH-Gua レベルは常に低く保たれ、運動によってほとんど変動しなかったことが報告されている。さらに、92 名の健康成人男性の身体活動とリンパ球 DNA 中の 8-OH-Gua レベルにも相関関係は認められなかったことが報告されている (Kasai, 1997)。

4) 運動と尿中 8-OH-Gua 排泄量

尿もヒトの検体としては採取が簡便であり、実験によく用いられている。尿中の 8-OH-Gua 排泄量は、損傷を受けた DNA の修復量を反映するものと考えられている。一過性の運動と尿中排泄量との関係では、マラソン後の 10 時間の尿中の 8-OH-Gua / クレアチニン比が有意に上昇したことが報告されている (Alessio, 1993)。また、Poulsen ら (1996) は、1 日あたり 8~11 時間の軍隊訓練を 30 日間続けた平均年齢 22 歳の男性のスポット尿中の 8-OH-Gua 排泄量が、訓練終了後に有意に増加していたことを報告している。しかも、それが非喫煙者で顕著であったと報告している。

しかし、逆の結果を示す報告もある。Sumida ら (1997) は、長距離ランナーにトレッドミルを用いて疲労するまで運動を負荷し、その前日と運動後の 24 時間蓄尿中の 8-OH-Gua / クレアチニン比を測定した。また、普段トレーニングしていない者に自転車エルゴメータを用いて疲労するまで運動を負荷し、その前日と運動後 24 時間蓄尿中の 8-OH-Gua / クレアチニン比を測定した。それらを比較した結果、両群とも有意差が見られなかったことを報告している。Pilger ら (1997) も、男性 27 名、女性 5 名、平均年齢 43 歳の長距離ランナーと非喫煙健康男性 28 名、女性 4 名、平均年齢 41 歳のコントロールグループの 24 時間蓄尿中の 8-OH-Gua 排出量を比べたが、有意差は認められなかったことを報告している。また、長距離ランナーにおいて、1 週間の走行距離と 24 時間蓄尿中の 8-OH-Gua 排出量の間にも有意な相関関係は認められなかった。

5) 自発運動と 8-OH-Gua レベルの関係

一般に、適度な運動は健康に良いといわれるが、運動能力には個人差があるため、同程度の運動を負荷してもその影響は各個人で異なる。一般的に、適度な運動負荷として自発運動を用いることが多い。Daneryd ら (1995) は、胆癌ラットを回転ゲージで自発運動させたところ、運動させなかったラットと比べて癌の容積が有意に減少したことを報告している。また、Woods ら (1994) も、胆癌マウスにトレッドミルで強度と中等度の運動を負荷したところ、前者に比較して後者の腫瘍内免疫細胞が有意に活性化されていたことを報告している。

さらに、Asami ら (1998) も、自発運動に注目して以下の実験を行った。ラットを、トレッドミルを用いた強制運動群、好きなときに回転ケージで走れる飼育室での自発運動群、および普通のケージで飼育したコントロール群の 3 群に分け、4 週間飼育した後に臓器中の 8-OH-Gua 量を測定した。その結果、自発運動群では強制運動群に比べて、心、肺、肝での 8-OH-Gua 生成が有意に低下していることを認めている。また、自発運動群では走った距離と臓器中の 8-OH-Gua 量には相関関係はなく、あまり走っていない群でも DNA 損傷の低いものもあり、必ずしも長く走れば良い効果が期待できるという結果ではなかった。このことは、強い運動よりも毎日続けられる適度の運動や個体にあった運動量の方が効果を有する可能性を示唆するものである。しかし、これらは動物実験による結果であり、その結果がヒトにも当てはまるか否かについては今後の検討が必要である。

(2) 運動と 8-OH-dG の代謝

8-OH-gua と同様に、8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OH-dG) は生体の酸化 DNA 損傷の指標として用いられている。8-OH-gua はグリコシラーゼによって塩基として DNA 鎖から切り出されるが、糖の 2'-deoxyribose を付けたデオキシヌクレオシドの 8-OH-dG としても除去修復の過程で排泄されるため、8-OH-gua と 8-OH-dG で評価される DNA 損傷は同じものであると考えられる。そして、酸素消費量の増加が尿中 8-OH-dG 排泄量の増加に関与することから、運動は酸素消費量の増加に伴う活性酸素ラジカルの生成を促進し、その結果として DNA の酸化損傷を引き起こすことが考えられる。

Viguie ら (1993) は、最大酸素摂取量の 65% (65% VO_2max) の運動強度で 90 分間のエルゴメータ運動を 3 日間連続で実施すると、8-OH-dG の 24 時間尿中排泄量は運動開始前の約 400 pmol/kg/日 から約 300 pmol/kg/日 に減少したと報告している。また、Inoue ら (1996) は、剣道部男子学生の運動負荷テストの結果から、運動強度を変えても 8-OH-dG の 24 時間尿中排泄量に有意な変化が認められなかったとしている。さらに、Poulsen ら (1996) は、長距離走を含む 8~11 時間の厳しいトレーニングを 6 日間/週の割合で 30 日間続けると、昼食前の尿中 8-OH-dG 排泄量はトレーニング開始前より 33% 増加したと報告している。つまり、激しい運動を長時間続けると DNA の損傷と修復は新しい定常状態になると考えられ、尿中 8-OH-dG 排泄量から酸化 DNA 損傷の程度を知ることができる。DNA 修復能が高まれば、残存する DNA 損傷は減少し、尿中 8-OH-dG 排泄量は増加すると考えられる。

また、リンパ球の核 DNA 中の 8-OH-dG に与える運動強度の影響を調べた研究が報告されている。剣道部男子学生による最大運動の場合では、8-OH-dG の値は運動直後と 1 時間後には運動前より 16~14% 高い値を示し、24 時間後には運動前より 14% 低下していた。一方、40% VO_2max の運動負荷の場合には、運動直後に 16% 減少したが、1 時間後には運動前の値に戻った (Inoue, et al., 1996)。また、水泳部男子学生の通常の練習後には、8-OH-dG の値は 54% 減少した (Inoue, et al., 1993)。このように、酸化 DNA 損傷の修復が適度な運動により促進される可能性が示唆されている。さらに、Kasai ら (1997) は、DNA 修復酵素活性が運動により増強したことを報告している。

運動による代謝変化を見る場合、個人差が問題になる。そのため、食事内容、たばこやアルコールなどの嗜好品、年齢、運動歴、性差、ホルモンの日内リズム、および体質などの違いなどを考慮する必要がある (Urhausen, 1995; Moller, 1996)。たとえば、単なる精神的ストレスが酸化 DNA 損傷により 8-OH-dG を増加させるとした報告がある。また、食事内容が変わると、代謝過程で産生される活性酸素の量も変化する。カロリー制限により、8-OH-dG は減少し、発がん率が低下すると報告されている。また、脂肪の摂取量を対照群より 68% 減少させ、 β -カロテンを 60%、ビタミン C を 85% 多く摂取させた脂肪制限群では、総カロリー摂取量は 16% 増加するにも関わらず、白血球の酸化 DNA 損傷の指標となる 5-ヒドロキシメチルウラシルは 68% 減少する (Djuri, 1994)。また、8-OH-dG の尿中排泄量は 24 時間あたりの酸素消費量の多い者ほど多く、さらに喫煙者では非喫煙者より 44% も多いことが報告されている (Loft, 1994)。

それに対し、持久性運動を続けている一流のトライアスロン競技選手は、酸化ストレスに耐性を示すことが報告されている (Margaritis, 1997)。運動により活性酸素処理能力が高まると、活性酸素を介するレドックス制御には運動強度をあげる必要があると考えられる。Dionne ら (1991) は、白血球中の mtDNA の NADPH デヒドロゲナーゼの RELP (遺伝子多型性) を調べることで、トレーニングによってどの程度最大酸素摂取量が増加するかを予測できると報告している。

なお、尿中 8-OH-dG 排泄量は DNA 損傷の程度を観察するには有用なバイオマーカーであるが、核 DNA の損傷に基づいたのか、それとも mtDNA の損傷に基づいたのかといった 8-OH-dG の由来については特定することができないところにやや弱点がある。

(3) 運動と白血球

白血球は細菌や異物の侵入を阻止する役割を担っている。そして、運動をすることにより、白血球数の増加がみられる (Suzuki, et al., 1996)。

好中球は、好酸球や好塩基球とともに顆粒球の一種であり、白血球全体の半数以上 (55～65%) を占める。好中球の絶対数は運動負荷により増加するが、この増加は一過性である。運動強度の違いにもよるが、運動後 20 分から 2 時間でほぼ運動前の値に戻るとされている (Masuhara, et al., 1987; Tatsumi, et al., 1987; Galun, et al., 1987)。この原因は、発汗などによって水分が失われて血液が濃縮すること、あるいは骨髄および脾臓から新たに白血球が動員されることなどによるものと考えられている。これはまた、副腎皮質から分泌されるアドレナリンをはじめとする各種カテコールアミンの分泌亢進とも深く関連している。運動中、および運動直後の急性期には好中球をはじめとする多くの白血球が増加する。しかし、その後、副腎皮質から分泌される糖質コルチコイドの作用によって、リンパ球および好酸球は減少する。

NK 細胞に関しては、ウイルス感染症や癌に対する防御機能における役割が考えられており、その運動による変化も注目されている (Nieman, et al., 1994)。NK 細胞活性は運動により一過性に上昇し、運動終了後は運動前の値より低下傾向を示す。それ以後、NK 細胞活性は徐々に上昇し、20 時間後には運動前の値に戻る。運動負荷により NK 細胞活性が変化する機構としては、運動により上昇するアドレナリンやノルアドレナリンの関与が報告されている。これは、NK 細胞が持つアドレナリンレセプターを介する作用と考えられている (Kappel, et al., 1991)。そして、運動後の NK 細胞活性の抑制はコルチゾールによるとした報告がなされている (Zweiman, et al., 1984)。また、NK 細胞の活性変化に影響するものとして、乳酸などの代謝産物の関与も考えられる。

また、急性負荷ばかりでなく、運動を継続した際にも NK 細胞活性が高まることが報告されている (Fig. 1-11)。このように、運動習慣を有する者では、NK 細胞活性も高いことが示されている (Nieman, et al., 1993)。

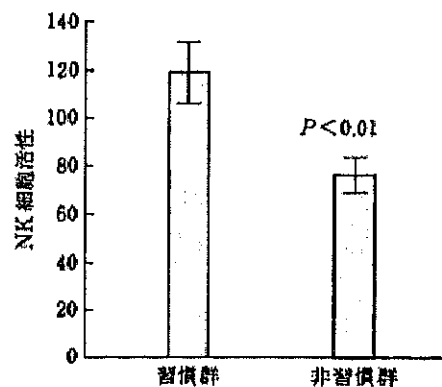


Fig. 1-11 Change of NK cell activity by the existance of the custom of exercise. (Nieman, et al., 1993)

第4節 運動による mtDNA 変異

(1) 活性酸素による mtDNA 変異

1) 活性酸素

活性酸素あるいは活性酸素種とは、大気を構成する通常の酸素よりも活性化された酸素と、その関連化合物を指す。特に、生体との関連では、スーパーオキシド (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシルラジカル ($HO\cdot$)、および一重項酸素 (1O_2) の4種を活性酸素と呼んでいる。スーパーオキシドは酸素分子の一電子還元体であり、白血球やマクロファージなどの食細胞の NADPH オキシターゼ系や虚血部位でのキサンチンオキシターゼ系が代表的な生成系である。前者は種々の炎症反応に、後者は虚血再灌流障害時に関与している。この他に、ミトコンドリアの電子伝達系もスーパーオキシドの重要な産生源である。

2) 生体内抗酸化システム

酸素分子は物質を酸化することをその基本的性質とし、その活性代謝産物は多くの生体成分と反応してその機能や構造を破壊しうる。したがって、生命機構を維持するためには、生体内代謝の様々な過程で発生する活性酸素やフリーラジカルを消去することが必要である。生体内抗酸化システムの主なものを Table 1-1 に示した。

生体内で生じる活性酸素種は多くの場合はスーパーオキシドに由来しているため、生体にとっては、まずスーパーオキシドを消去することが重要であると考えられる。スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) は、スーパーオキシドの過酸化水素と酸素への不均化反応を触媒し、細胞内のスーパーオキシドを消去している。

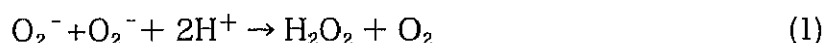


Table 1-1 An antioxidation system in the living body.

1. 酵素 スーパーオキシドジスムターゼ、グルタチオン、 ペルオキシターゼ、カタラーゼなど
2. 蛋白 アルブミン、セルロプラスミン、 トランスフェリンなど
3. 脂溶性低分子化合物 ビタミンE、ユビキノン、カロテノイド、 ビリルビンなど
4. 水溶性低分子化合物 ビタミンC、グルタチオン、尿酸など

生体内で重要な SOD としては、Cu,Zn-SOD, Mn-SOD があるが、哺乳動物では Cu,Zn-SOD は血球やサイトゾルなどに、Mn-SOD はミトコンドリアに存在しており、それぞれ局所で発生したスーパーオキシドを消去している。H₂O₂ の消去にはカタラーゼやグルタチオンペルオキシターゼなどが役割を担い、生体内で生じる HO・の大部分は Fenton 反応によるので、これらはまた間接的に HO・の消去に関与していることになる。

一方、生体内抗酸化物質としてビタミン E (α-トコフェロール)、ビタミン C (アスコルビン酸)、β-カロチンなどがある。特に、ビタミン E は膜脂質で生じる脂質ペルオキシラジカルを還元することにより脂質過酸化反応を抑制し、自身はビタミン E ラジカルとなる。また、ビタミン C は生体膜表面において、このビタミン E ラジカルよりラジカルを受け取ることにより、ビタミン E を再生させる作用を有している。

このように、活性酸素種による攻撃に対し、生体は二重三重もの抗酸化防御システムを張りめぐらしてその損傷から身を守っている。しかしながら、種々の負荷状態においては、活性酸素生成系と防御系との平衡が崩れるため、病的状態へと進行していくことになる。

3) 活性酸素の酵素的消去システム

生活習慣病予防や健康増進には、有酸素運動が有効であることが知られている。一方、運動によって体内への酸素消費量が増すにつれ、反応性の高い活性酸素の生成が増加することも知られている。大量の活性酸素の継続的な発生は細胞内の DNA の損傷を引き起こしたり、過酸化脂質を生成し、細胞の機能を低下させる可能性がある。しかし、生体は発生した活性酸素を速やかに除去し、脂質過酸化や DNA 損傷を防御するとともに、活性酸素によって生成された過酸化脂質や DNA を修復する機構を備えていることも明らかになっている。なお、活性酸素に対する生体の防御機構は、酵素的防御系と非酵素的防御系の 2 つに分けられる。

4) 体内細胞内外における抗酸化酵素

生体内においては、Table 1-2 に示すように、様々な部分に活性酸素発生系が存在している (中野, 1991)。ミクロゾームにおいては NADPH-チトクローム P 450 還元酵素系と鉄依存性脂質過酸化系が存在しているが、これらの系によって発生する活性酸素を除去する抗酸化酵素はなく、膜脂質に溶け込める天然の抗酸化剤が効果を発揮している。

有酸素的なエネルギー生産に関わる細胞内小器官であるミトコンドリア内には、クエン酸回路 (TCA 回路) と共役している電子伝達系が局在している。電子伝達系においては、系の末端で O₂ を 4 電子還元して、H₂O を生成することにより ATP を再合成しているが、その際に数%の酸素が 1 電子還元を受け、活性酸素が発生することが知られている。Fig. 1-12 に示すように、ミトコンドリア内にはマンガンを含む Mn-SOD が存在しており、スーパーオキシドラジカルを過酸化水素 (H₂O₂) へと速やかに変換することによって除去する働きをしている。ミトコンドリア内にはグルタチオン (還元型: GSH) を基質としたグルタチオンペルオキシターゼ (GPX) やグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) のように、生成された H₂O₂ や脂質ヒドロペルオキシドを還元する酵素が存在している。

ミトコンドリア内で Mn-SOD によって変換・生成した H₂O₂ は、細胞質中のペルオキシゾー

Table 1-2 Anti-oxidative enzyme in inside and outside body cell.

小器官その他	活性酸素発生系	抗酸化酵素	反応様式
ミクロソーム (核膜・小胞体)	NADPH-チトクロームP450 還元酵素系 (O ₂ +H ₂ O ₂) 鉄依存性脂質過酸化系 (ROOHなど)	なし	
ミトコンドリア	電子伝達系 (O ₂ +H ₂ O ₂) 鉄依存性脂質過酸化系 (ROOHなど)	Mn-SOD グルタチオンペルオキシターゼ* グルタチオン-S-トランスフェラーゼ**	$2O_2 + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ $ROOH + GSH \rightarrow GSOH + ROH$ $ROH + GSH \rightarrow GS-SG + H_2O$
ペルオキシゾーム	フラビン酵素および銅酵素 (H ₂ O ₂)	カタラーゼ	$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
細胞液	キサンチン酸化酵素系 (O ₂ +H ₂ O ₂)	Cu,Zn-SOD グルタチオンペルオキシターゼ* グルタチオン-S-トランスフェラーゼ**	$2O_2 + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ $ROOH + GSH \rightarrow GSOH + ROH$ $ROH + GSH \rightarrow GS-SG + H_2O$
細胞外液	鉄依存性脂質過酸化系 炎症に伴う好中球NADPH 酸化酵素系 (O ₂ +H ₂ O ₂)	セルロプラスミン 高分子SOD	$O_2 + 2H^+ \rightarrow H_2O + 1/2O_2$ $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$ $2O_2 + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

* H₂O₂および脂質ヒドロペルオキシドを基質とする

** 脂質ヒドロペルオキシドのみを基質とする

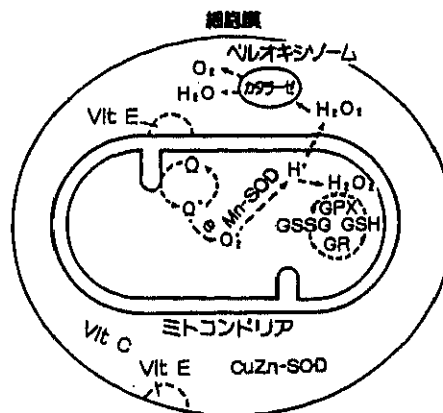


Fig. 1-12 Distribution of an enzymatic and a nonenzymatic anti-oxidative substance in a cell.

ムに局在しているカタラーゼ (CAT) によって、H₂O₂ に不均化される。また、細胞質中の細胞液内にはキサンチン酸化酵素系があり、この系によって発生する活性酸素を除去するために、Cu,Zn-SOD が機能しており、GPX や GST も抗酸化酵素として働いている。

細胞外液中には鉄依存性脂質過酸化系、NADPH 酸化酵素系など活性酸素を発生する反応系が存在しているが、その防御系として抗酸化酵素が局在している。

ここに示した抗酸化酵素はいずれも発生したフリーラジカルを速やかに除去することによって生体損傷を予防する機能を持っている。

5) 一過性運動による抗酸化酵素の応答

Ji ら (1992) は、ラットに動物用トレッドミルで疲労困憊運動を負荷し、骨格筋と肝臓の抗酸化酵素 (GPX, GR, SOD, CAT) の活性を安静コントロールグループのそれぞれの活性と比較した。疲労困憊運動によって、骨格筋の抗酸化酵素活性は有意な上昇を認めたが、肝臓においては細胞質性の Cu,Zn-SOD 以外には変化が見られなかった。また、疲労困憊運動による組織の脂質過酸化状態を TBA 反応によるマロンアルデヒドの生成を指標としてみると、骨格筋においては上昇は顕著ではなかったが、肝臓では有意な上昇が観察された。この結果から、Ji ら (1992) は疲労困憊運動は骨格筋、肝臓いずれにも酸化ストレスを引き起こしていると結論付けている。

6) 持続性トレーニングによる抗酸化酵素の応答

持続性トレーニングは心拍出量を高めるとともに、骨格筋における毛細血管網を発達させ、筋肉細胞内のミトコンドリア含量を高めることによって、動静脈酸素較差を向上させる。骨格筋のミトコンドリア含量の増大は、クエン酸回路や電子伝達系の機能を発達させることが知られている。この機能の充進は、低い強度で行われる運動においては、酸素が1電子反応によって活性酸素になることを最小限にとどめるのに役立つ。しかし、持続性トレーニングによって酸素を大量に取り込むことができるようになると、高い強度で運動を継続して行うことができるが、そのような運動は大量の酸素摂取に伴う活性酸素の発生を増加させることにもなる。

Higuchi ら (1985) は、ラットを用いて、持続性トレーニングが骨格筋、心筋、肝臓における SOD や CAT 活性に及ぼす影響を検討した。3ヶ月齢の雌ラットに、週5日、1日2時間のトレッドミルランニングを3ヶ月間行わせた。このランニングトレーニングは、骨格筋のミトコンドリア含量を2倍に増加させるほど強度の高い運動である。そして、トレーニング群とコントロール群のヒラメ筋、大腿四頭筋の深部と浅部、心筋、および肝臓の SOD 活性を比較した。その結果、細胞質中の Cu,Zn-SOD 活性は各骨格筋間で顕著な差が見られないが、Mn-SOD 活性はミトコンドリア含量が多いヒラメ筋、大腿四頭筋の深部で高く、大腿四頭筋の浅部で低いことを報告した。さらに、心筋は骨格筋に比べて SOD 活性が著しく高く、特に Mn-SOD 活性が高くなっていることから、心臓が血液を全身に送り出すポンプとして常に休みなく働いている重要な器官であることを反映しているとも考えられる。また、肝臓では細胞質の SOD 活性が非常に高く、それは肝臓が様々な代謝機能を担う重要な器官であるためと考えられた。ランニングトレーニングによって total-SOD 活性はヒラメ筋で 29%、大腿四頭筋の深部で 21% 増加していたが、大腿四頭筋の浅部、心筋、肝臓では変化が認められなかった。ヒラメ筋、大腿四頭筋の深部など赤色筋の total-SOD 活性の増加の大部分は、ミトコンドリア中の Mn-SOD 活性の増加 (37%) によることがうかがえる。

持続性トレーニングは酸素摂取能力を高めるが、それに対応して骨格筋ミトコンドリアの有酸素的過程による ATP 生産機能を向上させる。クエン酸回路の酵素であるクエン酸合成酵素 (CS)、電子伝達系の構成要素であるシトクロム c などは、持続性トレーニングの骨格筋における適応的応答を評価するのに有用な指標である。Higuchi ら (1985) は、ランニン

グトレーニングを行ったラット骨格筋のCS活性、シトクロム c 濃度はいずれも2倍に増加したことを報告しており、トレーニングによる増加率はSOD活性の増加よりも高い水準であるとしている。この結果は、持続性トレーニングによる酸素摂取量の上昇と、それに伴う電子漏れ（リーク）による活性酸素生成に対する生化学的適応は同じ比率で起こっているわけではないことを示唆している。

一方、CAT活性は、いずれの組織においてもトレーニングによる変化が見られなかった。この結果は、運動トレーニングによる活性酸素除去系の適応は O_2^- を H_2O_2 へと変換するステップで起こっていることを示唆している。

Laughlinら(1990)は、ラットに12週間の持続性トレーニングを行わせ、抗酸化酵素の活性の変化を検討しているが、ヒラメ筋ではtotal-SOD活性は変化がなく、CAT活性はむしろ低下し、GPX活性のみが増加したと報告している。また、Criswellら(1993)は、ラットを用いて、高強度(80~95% VO_2max)で断続的なランニングと中等度(70% VO_2max)で継続的なランニングによる12週間のトレーニングによって、骨格筋の抗酸化酵素活性がどのように変化するかを検討し、両トレーニング方法ともヒラメ筋のtotal-SODの増加が認められ、GPXの増加は高強度・断続運動によるトレーニングの場合にのみ認められることを報告している。また、18週間の運動トレーニングで、total-SOD活性に変化が見られなかったとの報告もある(Alessio, et al., 1988)。このように、持続性トレーニングによる骨格筋の抗酸化諸酵素の応答は研究者間で必ずしも一致していない。その理由としては、トレーニングプロトコルの違い、および測定対象とした筋線維タイプの違いが考えられる。さらに、SODについてはtotal-SODを測定したかミトコンドリア-SODを測定したかによっても異なる結果が得られる可能性がある。

Jiら(1993)は、ラットに8週間のトレーニングを行わせ、心筋、肝臓、および骨格筋の抗酸化酵素活性の変化を検討している。その結果によると、心筋ではいずれの抗酸化酵素活性もトレーニングによって顕著な変化が引き起こされなかった。また、肝臓では、Mito-GPX, Cyto-GPXがトレーニングによって低下していたが、他の抗酸化酵素活性には変化が見られなかった。一方、骨格筋においては、肝臓とは逆に、トレーニングによってMito-GPX, Cyto-GPXの有意な上昇が認められた。この結果から、GPXの上昇は運動によって引き起こされる酸素ストレスに対する骨格筋の適応として最も重要なものであると結論付けている。

Kanterら(1985)は、マウスに21週間スイミングトレーニングを行わせ、血中、肝臓、および心筋の抗酸化酵素(CAT, GPX, SOD)活性を測定した。その結果、血中および肝臓においては、いずれの抗酸化酵素もスイミングトレーニングによって有意な上昇を示した。一方、スイミングトレーニングは、心筋のCAT, GPX活性を有意に上昇させるが、SOD活性の顕著な変化を引き起こさないことを示した。

Jenkinsら(1984)は、最大酸素摂取量(VO_2max)が異なる若年成人2グループ(各グループ6名)を対象として、バイオプシー法によって外側広筋から採取した筋のSODとCATの活性を比較検討した。その結果、 VO_2max が高いグループのCAT, SOD両抗酸化酵素活性が VO_2max の低いグループよりも高かった。

これらの研究成果を併せて考えると、持続性トレーニングは酸素ストレスを引き起こすが、

いくつかの抗酸化酵素活性が適応的に応答することによって、組織へのダメージを防御しているものと結論付けることが可能と思われる。

(2) 運動による mtDNA 変異

一般に、運動は多くの有益な効果をもたらすとされている。しかし、エネルギー産生のために体内では、絶えず活性酸素が生成されている (Asayama, et al., 1990)。運動により、身体の酸素消費量は安静時の 10～40 倍に、また骨格筋では 100 倍に増加すると言われている。一過性の激しい運動を負荷した場合には、筋ミトコンドリアでの酸素消費量の増大に伴って活性酸素の生成も増大し、運動に伴う骨格筋細胞の障害を引き起こす要因とも考えられている (Jenkins, 1988; Asayama, et al., 1990)。mtDNA には細胞エネルギーの生成に不可欠な電子伝達系の酵素複合体の遺伝情報があり、この mtDNA に変異が生じることによって、電子伝達系の機能が障害を受ける。

Sakai ら (1999) は、ラットのヒラメ筋を用い、一過性のオーバーロード運動による酸化ストレスの影響について検討した。その結果、電顕像に基づき、運動直後のミトコンドリアは濃縮・変性過程、あるいは膨化・融解過程にあり、運動終了から 2 時間後ではミトコンドリアは崩壊過程を示し、6～12 時間後では壊死像を示していることを報告した。また、mtDNA の変異についても検討しており、運動直後の筋の mtDNA で欠失が認められた。その後、運動終了から 1～6 時間後のサンプルからは欠失は消失したことを報告している。

(3) 不動による mtDNA 変異

運動により活性酸素生成が高まることは比較的容易に理解できるが、逆に不動により酸化ストレスが増加するという報告もある(近藤, 1994; Kondo, et al., 1998)。これは、細胞質内のキサンチンオキシターゼが増加し、ミトコンドリア内の活性酸素を中和する Mn-SOD が減少することによるものとされている。Kondo ら (1998) は、不動性萎縮筋の回復期にみられる活性酸素の増大とともに、組織損傷が悪化することを検討している。ラットの後肢の足関節を底屈位で固定し、代表的な赤筋であるヒラメ筋に実験的に廃用性筋萎縮を生じさせたところ、筋萎縮は最初の 8 日間で急速に進行し、8 日目には筋重量は約半分になるが、その後の筋萎縮は緩やかとなったことを報告した。また、萎縮筋において、細胞の酸化損傷の状態を示す TBA 反応陽性物質 (TBARS) が増加する傾向が認められたが、これは萎縮筋での脂質過酸化反応の亢進を反映しているものと考えられる (Kondo, et al., 1991; Kondo, et al., 1992)。また、萎縮筋において酸化型グルタチオンが増加していたが、同時にグルタチオンの酸化型を還元型にする glutathione reductase (GSSGRx) の活性も萎縮筋において上昇していた。このことは、生体中の酸化反応の増加が GSSGRx 活性の増加を上回ったため、結果としては酸化型グルタチオンが上昇したのと考えられる。したがって、萎縮筋における TBARS・酸化型グルタチオンの上昇は、萎縮筋において酸化ストレスが増加していることを示しているものと考えられる。

阪井ら (2002) は、同様にラットの後肢懸垂を行い、2 週間後および 4 週間後に、ヒラメ筋の mtDNA に欠失が見られたことを報告している。これは、不動により増大した酸化ストレスの影響によるものと考えられる。

第5節 研究の目的

1) 研究の背景

これまで述べてきたように、ミトコンドリア病といわれるいくつかの疾患患者、あるいはアルツハイマー病やパーキンソン病などの特定の疾患患者、さらに健康な高齢者の脳、肝臓、心臓、および骨格筋といった様々な組織で、mtDNAの点変異や欠失がかなり蓄積しているとする研究成果が数多く報告されている。そして、これらの欠失のうちの1つは頻繁に見られ、また同一の塩基配列の部分で起こっていることから、common deletionと呼ばれている。これは、ヒトの場合、4,977 bpの長さの欠失であることがわかっている。そして、このcommon deletionの量は、加齢に伴って指数関数的に増加するという研究成果が報告されており (Ozawa, et al., 1990; hayakawa, et al, 1992), これらの状況証拠をもとにして、mtDNAの変異の蓄積によって引き起こされるミトコンドリアの酸化的リン酸化反応の低下が老化の原因の1つではないかとの学説が提唱されている (Miquel, et al., 1980; Wallace, et al., 1995)。しかし、その一方で、病原性突然変異 mtDNA の蓄積が、本当にミトコンドリア呼吸酵素活性の低下をもたらすことを示す研究成果は示されておらず、老化の本当の原因は mtDNA の突然変異ではなくて、核の染色体 DNA の突然変異によって起こされるものであるとする学説が提出されており (Hayashi, et al., 1994; Laderman, et al., 1996), 現在論争中である。

ところが、私たちが実施した予備実験の結果からは、このような疾患を持つ患者や高齢者ばかりでなく、健康な成人においても、比較的軽い負荷の持久性運動 (ジョギング) をすることによって、白血球中の mtDNA にこの common deletion が出現することがわかってきた (Iwai, et al., 2002a)。トレッドミルを用い、8~10km/hの走速度で30~45分程度のジョギングを行うことにより、白血球中の mtDNA に欠失変異 (common deletion) が出現することが明らかになった (Iwai, et al., 2002a)。しかし、この実験は、綿密に設計された実験計画に沿って行われたものではなく、そのため、どの程度の運動負荷によって mtDNA の欠失が出現するのか、あるいはどのようなタイプの運動によって出現するかといった点については今のところほとんどわかっていない状況である。

2) 研究目的

そこで、本研究では、様々な負荷の運動を実施することにより、果たして mtDNA の欠失が出現するかに否かについて詳細に検討していくことを第一の目的としている。

さらに、視点を180度変えてみることにした。運動実践が健康の維持・増進に必要不可欠であることから考えると、運動によって出現した変異 mtDNA がそのまま各細胞組織に蓄積され、健康に悪影響を及ぼしているとは考えにくい。特に、被験者が健康な若者であれば、必ず変異した DNA を修復するためのシステムなどが活発に働くなどして、何らかの形で発生した変異 mtDNA を消去するメカニズムが機能しているものと推察される。そこで、運動によって出現した変異 mtDNA は、本当に蓄積するのか否かについて、あるいは蓄積せずに消失するとすればどの程度の期間の休息を取るにより消失するのかについて、様々な実

験結果をもとに検討することを第二の目的としている。

3) 研究の位置づけ

これまで実施された本研究に関連する先行研究のうち、ヒトを対象としたものとしては、尿中の8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OH-dG)の濃度を測定し、運動に伴って増大した活性酸素による酸化的なDNA損傷(点変異)の増加を推定した研究や、あるいはsingle cell gel electrophoresis(SCG)法を用いてDNAの酸化損傷の量を推定した研究がいくつか報告されている(Inoue, et al., 1993; Inoue, et al., 1996; Hartmann, et al., 1994)。しかし、8-OH-dGの濃度に基づく研究の場合には、DNAの酸化損傷状態を示す8-OH-dGの増加は細胞単位で検出されるために、核の染色体DNAとmtDNAへのそれぞれの影響の程度は明らかになっていない。また、SCG法による研究の場合には、いわゆる切断(nick)の出現をもとに解析していくことになるが、DNAの抽出を行う際にもこのnickは出現してしまうため、観察されたDNAの切断が運動負荷が加わったことによって発生したものであるか、あるいはDNAの抽出などの際に発生したものであるかを特定することは困難である。これらは、それぞれの研究方法の弱点となっている。

そこで、本研究では、血液中の白血球細胞からmtDNAを抽出し、さらにpolymerase chain reaction(PCR)法を用いて変異を起こしたmtDNAを増幅し、それがわずかな量であっても変異mtDNAの出現の有無を検出することを可能にした。したがって、この方法を用いることによって、運動負荷の前後における欠失mtDNAの出現の有無を検証していくことが可能となった。このように、変異したmtDNAの有無を直接的に確認していくところに本研究の大きな特徴がある。

近年になって、多くの疾患や老化とmtDNAの変異との関係については数多くの研究成果が報告されてきた。しかし、運動負荷によるmtDNAの変異に関する先行研究はこれまでほとんど報告されていない。本研究では、体育学・スポーツ科学分野および分子生物学分野における研究手法を融合させることにより、運動の実施によるmtDNA変異に対する影響について検討することをねらっている。したがって、本研究により、従来の体育学・スポーツ科学・健康科学の研究分野をより発展させ、新しい研究領域の展開につながるような研究成果をあげることが期待される。

4) 学術的特徴, 独創性, および意義

運動は極めて日常的な活動であり、健康の維持・増進のために必要不可欠であることはよく知られている。また、運動を行うことに伴って大量に生成される活性酸素によって、DNA損傷が発生するというメカニズムについては、近年になって多くの研究報告によりしだいに明らかにされてきている。しかし、運動の実践はこのようなメカニズムによって健康に悪影響を及ぼすだけでなく、同時にDNA修復酵素の活性化を促し、この活性化によって生体の防御機能がより一層促進されるという可能性が示唆されている。

本研究は、このような運動と健康のメカニズムを解明するための第一歩であり、極めて先進的、かつ独創的な研究テーマである。先行研究の結果から推測すると、おそらく、適度な

運動を実践することによって、生体の防御機能や適応能力がより高まるだろうと考えられるが、そのようなメカニズムを解明していくことは、体育学、スポーツ科学や健康科学の分野において、極めて意義のある研究テーマであるといえる。