

第2章 実験系の確立

第1節 mtDNAの抽出

本研究における一連の実験の中で mtDNA を抽出する際に、全血中 mtDNA 抽出用 DNA Extractor WB Kit (和光純薬工業, 日本), および全血中 DNA 抽出用 DNA Extractor WB Kit (和光純薬工業, 日本) の2種類の抽出キットを用いた。ただし、今回の実験のほとんどの場合においては、後者の全血中 DNA 抽出用 DNA Extractor WB Kit を用いて、血液中の白血球からトータル DNA (mtDNA + 核 DNA) を抽出した。

このトータル DNA 抽出の原理は、次の通りである。

まず、溶解液でサンプル中の細胞から核細胞を取り出した後、タンパク分解酵素により核膜および核タンパクを破壊する。そこへヨウ化ナトリウム溶液を添加することにより、タンパク質および脂質等を可溶化状態にした後、イソプロピルアルコールで DNA を沈殿させ、回収するというものである。

血液からの DNA 抽出は以下の手順で行った。

- 1) 全血 0.5 ml (2Na-EDTA 抗凝固剤使用) を 1.5 ml 容のマイクロ遠心管に入れる。
- 2) 溶解液を 0.5 ml 加えて、チューブを数回軽く逆さにして、液を混ぜる。
- 3) 4°Cにおいて 10,000 G で 20 秒間遠心した後、黒いペレットが流出しないように上清を除く。
- 4) 溶解液を 1 ml 加え、マイクロチューブミキサーにて攪拌する。
- 5) 4°Cにおいて 10,000 G で 20 秒間遠心した後、上清を除く。
- 6) 溶解液を 1 ml 加え、マイクロチューブミキサーにて攪拌する。
- 7) 4°Cにおいて 10,000 G で 20 秒間遠心した後、上清を除く。
- 8) 酵素反応液 200 μ l とタンパク分解酵素 10 μ l を加えて混合する。
- 9) 37°Cで 1 時間保温する。(途中 2 ~ 3 回軽く振り混ぜる。)
- 10) ヨウ化ナトリウム溶液を 300 μ l 加えて混合する。
- 11) イソプロピルアルコールを 0.5 ml 加えて、白い綿状の DNA が完全に見えてくるまで混合する。
- 12) 室温において 10,000 G で 10 分間遠心した後、上清をゆっくり除く。容器を濾紙の上に逆さに置くなどして、器壁に残った溶液を充分に除く。
- 13) 洗浄液 (A) を 1 ml 加えて混合する。沈殿が器壁から剥がれる程度に充分混合する。
- 14) 室温において 10,000 G で 5 分間遠心した後、上清を除く。
- 15) 洗浄液 (B) を 1 ml 加えて混合する。沈殿が器壁から剥がれる程度に充分混合する。
- 16) 室温において 10,000 G で 5 分間遠心した後、上清を除く。
- 17) DNA 沈殿を軽く減圧乾燥する。

1. 0.5 ml of whole blood, prepared with EDTA-Na₂ as anti-coagulant, is dispensed into a 1.5 ml microcentrifuge tube with screwed cap and then placed standing on ice.
2. After adding 0.5 ml of Lysis Solution and capping the tube, invert the tube several times to gently mix the solution.
3. After a brief centrifugation (10,000 x g, 20 seconds at 4 °C), carefully remove the supernatant, keeping the dark red precipitate intact.
4. Add 1 ml of Lysis Solution to the tube and set the capped tube on a microfuge tube mixer for 30 seconds at a moderate speed.
5. Remove the supernatant from the tube after a brief centrifugation of the mixture at 10,000 x g for 20 seconds at 4 °C.
6. Repeat operation 4 - 5.
7. Suspend the resultant pellet in 200 µl of Enzyme Reaction Solution. Add 10 µl of Protease Solution to the suspension and mix gently by inversion.
8. Incubated at 37 °C for 1 hour. (During the incubation, mix the solution several times by inversion.)
9. After the 1 hour-incubation, add 0.3 ml of NaI Solution to the mixture and mix well by inversion.
10. Add 0.5 ml of isopropyl alcohol to the mixture and mix well until DNA, a whitish material, appears.
11. After centrifugation at 10,000 x g for 10 minutes at room temperature, gently removed the resultant supernatant. Put the tube upside down to remove the solution remaining on the surface of the tube.
12. Rinse the pellet in the tube by adding 1 ml of Washing Solution (A) to the tube followed by centrifugation (10,000 x g, 5 minutes). Mix thoroughly so that the pellet is removed from the tube wall.
13. Repeat the same operation described above using Washing Solution (B) instead of Washing Solution (A).
14. The resultant pellet is vacuum-dried for about 3 minutes. (Drying should be made within 3 minutes because DNA completely dried may be hard to be dissolved).

Fig. 2-1 DNA Extraction Procedure from Whole Blood.

第2節 PCR (polymerase chain reaction) 法

ヒトの mtDNA における common deletion の突然変異 (mtDNA⁴⁹⁷⁷) を検出するため、20 ng のトータル DNA (核 DNA + mtDNA) を、先行研究 (Ikebe, et al., 1990; Yen, et al., 1991; Hayashi, et al., 1994) と同様の方法で、0.5 μ M のプライマーセットと 0.25 ユニットの EX-Taq ポリメラーゼ (宝酒造, 日本) を含んだ 10 μ l の渾散の中で PCR 法 (DNA 合成酵素連鎖反応法) を用いて増幅した。

PCR 法は、DNA ポリメラーゼ反応を利用した DNA の増幅法で、3 段階の温度変化を繰り返すことによって行われる (Fig. 2-2)。まず、鋳型となる DNA 2 本鎖を加熱して変性し、1 本鎖にする。次に、増幅したい特定部位の DNA 鎖の両端に相補的な 2 種類のオリゴヌクレオチドプライマーを反応系に過剰に加えた状態で温度を下げると、プライマーが DNA 鎖の相補的な部位と 2 本鎖を形成する (アニーリング)。そして、この状態で、DNA 合成基質のデオキシヌクレオシド 3 リン酸と DNA ポリメラーゼを作用させると、ポリメラーゼはプライマー部位から DNA 鎖を合成していく。以上のような方法によって DNA 鎖を指数関数的に増幅することができ、莫大な数の DNA 分子を得ることができる。

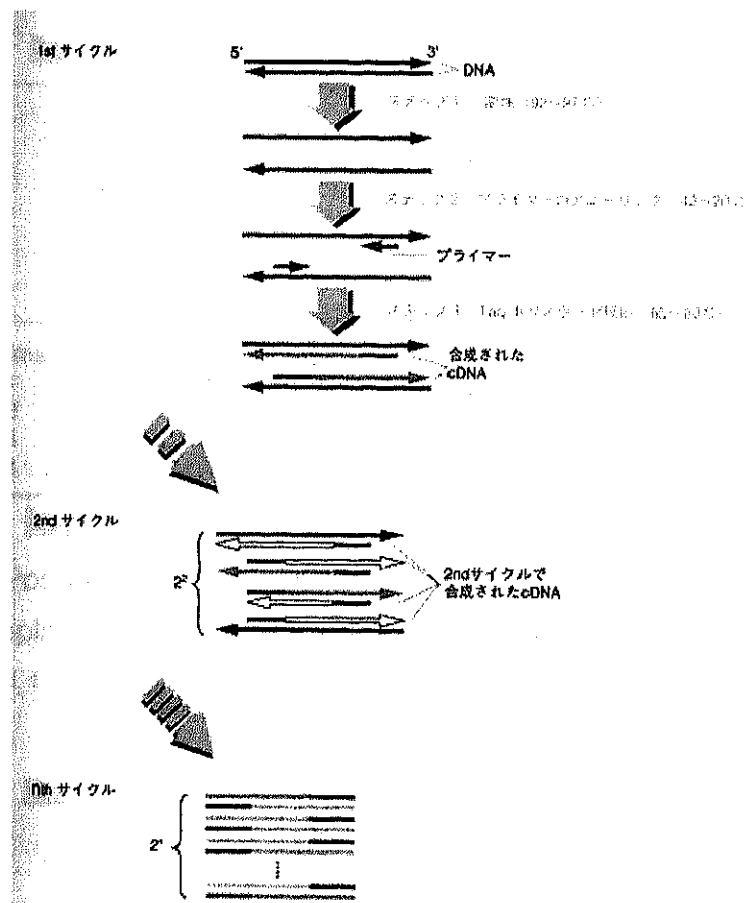
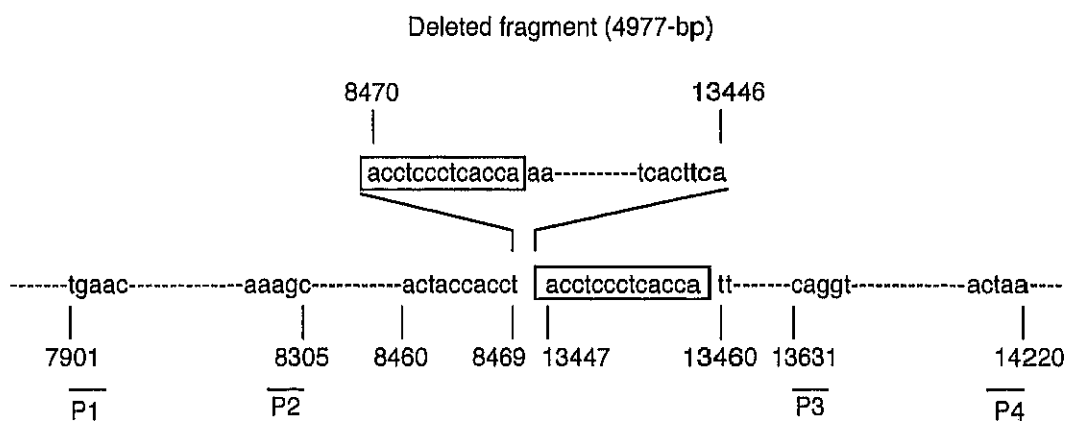


Fig. 2-2 The principle of polymerase chain reaction (PCR) procedure.

プライマーについて簡単に述べると、本研究では2組のオリゴヌクレオチドプライマーのセットが増幅のために用いられた (Fig. 2-3)。軽鎖の P1 (ヌクレオチドポジション: 7,901-7,920) と重鎖の P4 (14,220-14,201), および P2 (8,282-8,305) と P3 (13,650-13,631) のセットである。PCR の最初のラウンドは外側のプライマーセットである P1 と P4 を使った。そして, DNA サーマルシーケンサ (TRS-300; 岩城ガラス, 日本) を用いて, 完全に DNA を変性するために 94°C において 5 分間の保温の後に, 94°C において 30 秒 (変性), 54°C で 30 秒 (アニーリング), および 72°C で 45 秒 (伸長) の操作を 30 サイクル行った。さらに, 2 段階の PCR では, 内側のプライマーセットである P2 と P3 を使った。そして, 94°C で 25 秒間, 67°C で 25 秒間, および 72°C で 25 秒間の操作を 26 サイクル繰り返した。

このようにして増幅された PCR 産物は, TE-バッファーに溶解させた。



Primers	Sequence 5' → 3'	Complementary site
1	TGAACCTACGAGTACACCGA	7,901 to 7,920
2	CCCCTCTAGAGCCCCTGTAAAGC	8,282 to 8,305
3	GGGGAAGCGAGGTTGACCTG	13,650 to 13,631
4	TTAGTAGTAGTTACTGGTTG	14,220 to 14,201

Fig. 2-3 Positions and oligonucleotide sequences of the primers used in PCR amplification. Primers 1 and 2 were used to amplify light strand mtDNA, and primers 3 and 4 were used to amplify heavy strand mtDNA.

第3節 電気泳動

PCR法によるmtDNAの増幅の後に電気泳動を行い、欠失変異 (common deletion) の有無を判定した。

電気泳動の方法は、増幅されたPCR産物を用い、0.1 μ g/mlのエチジウムブロマイドを含む2.5%アガロースゲル上で、100 V、1時間の電気泳動を行った (Fig. 2-4)。

そして、トランスイルミネーター (UVP) 上でUVを照射してDNAバンドを可視化し、ポラロイドカメラで撮影した。

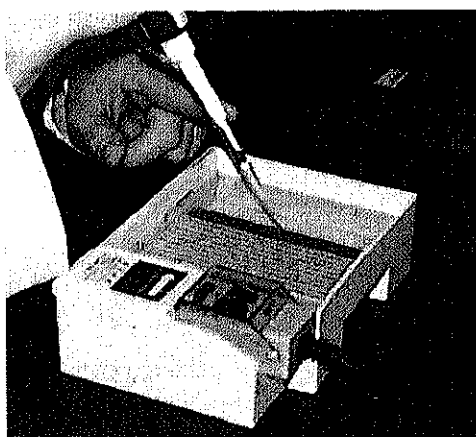


Fig. 2-4 Electrophoresis procedure.

第4節 common deletion の判定

白血球の mtDNA に common deletion と呼ばれる欠失変異が出現したかどうかの判定は、各サンプルと同時に電気泳動したサイズマーカーの位置、およびポジティブコントロール (PC) との比較によって行った (Fig. 2-5)。

なお、一連の研究において、ポジティブコントロールとしては、慢性進行性外眼筋麻痺症 (CPEO) 患者の筋から採取された欠失 mtDNA サンプルを用いた。

なお、common deletion は 4,977 bp の長さの欠失であることが知られているが、今回用いたプライマーにより、一連の実験における common deletion のバンドは 392 bp で示される (Fig. 2-6)。

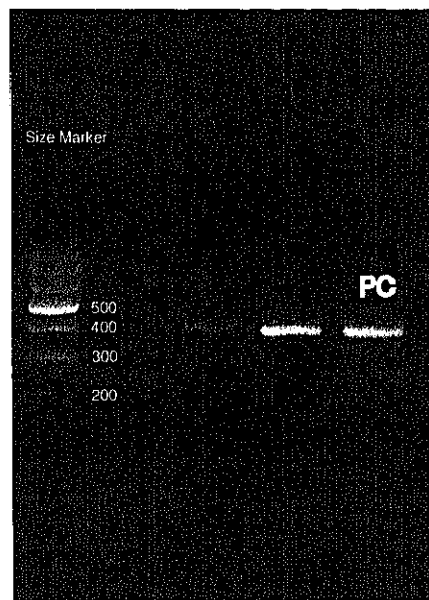


Fig. 2-5 The size marker DNA and a PCR product.

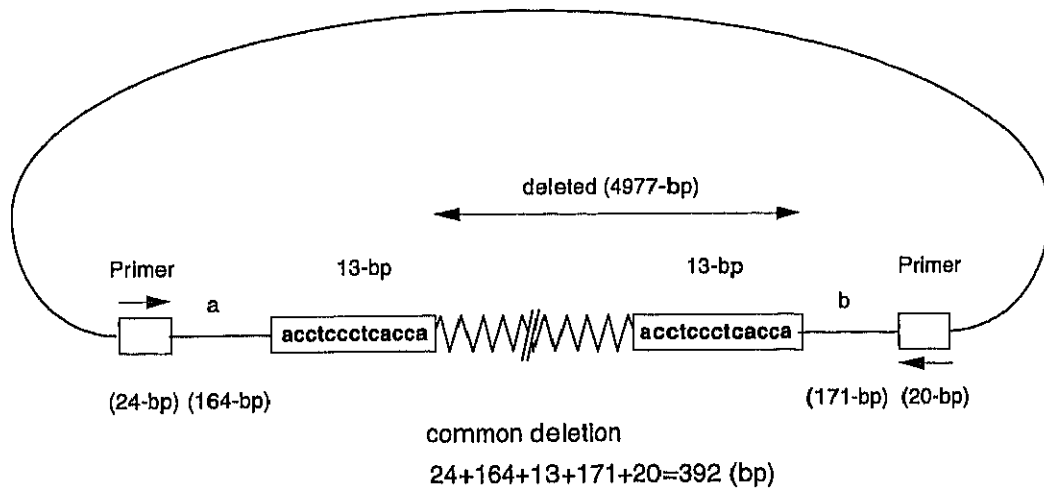


Fig. 2-6 Common deletion length.

第5節 倫理委員会による承認

本研究の一連の実験計画および論文審査は、茨城県立医療大学の倫理委員会により、倫理審査規定第7条第1項各号に掲げる事項に基づいて審査され、それぞれ承認を受けた（承認番号：No. 35, No. 55, No. 64, No. 72）。

なお、本研究の研究期間中に、文部科学省、厚生労働省、および経済産業省により、3省合同で「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」が制定された（平成13年3月29日制定、平成13年4月1日施行）。したがって、本研究は、この倫理指針の基本的考え方を遵守することが求められるようになっており、そのガイドラインに沿った形で研究をすすめた。

また、本研究の実施にあたり、人間の被験者を用いた研究に関するヘルシンキ宣言のガイドラインに沿って行われた。具体的な方法としては、本研究の実施にあたり、被験者への事前の十分な説明とその自由意思による同意（インフォームド・コンセント）に基づき、被験者全員が参加同意書に署名をした。また、医師による運動負荷テスト前の健康チェックにより、被験者全員が持久性運動を伴う実験の実施に支障のないことを確認した後に、実験を開始した。

第6節 予備実験（ジョギングによる mtDNA の変異）

（1）目的

健康な成人を対象として持久性の運動（ジョギング）を行った場合、白血球の mtDNA に欠失変異（common deletion）が出現するかどうかを検討することを目的とした。さらに、その時間経過についても追跡することにより、mtDNA の欠失の動的变化を観察した。

（2）方法

1) 被験者およびインフォームドコンセント

2人の健康なボランティアが被験者として参加した。1人は41歳の男性（以下被験者A）で、もう1人は21歳の女性（以下被験者B）であった。両被験者はシミュレーションを含む実験の説明を受けた後、インフォームドコンセントを与えた参加同意書に署名した。さらに、医師による事前の健康チェックによって持久性運動の実施に支障がないことを確認した。

2) 運動と採血

実験プロトコルは、Fig. 2-7 に示している。

両被験者は、まず5日間運動を控え、通常の日常生活を行った（レスト期間）。そして

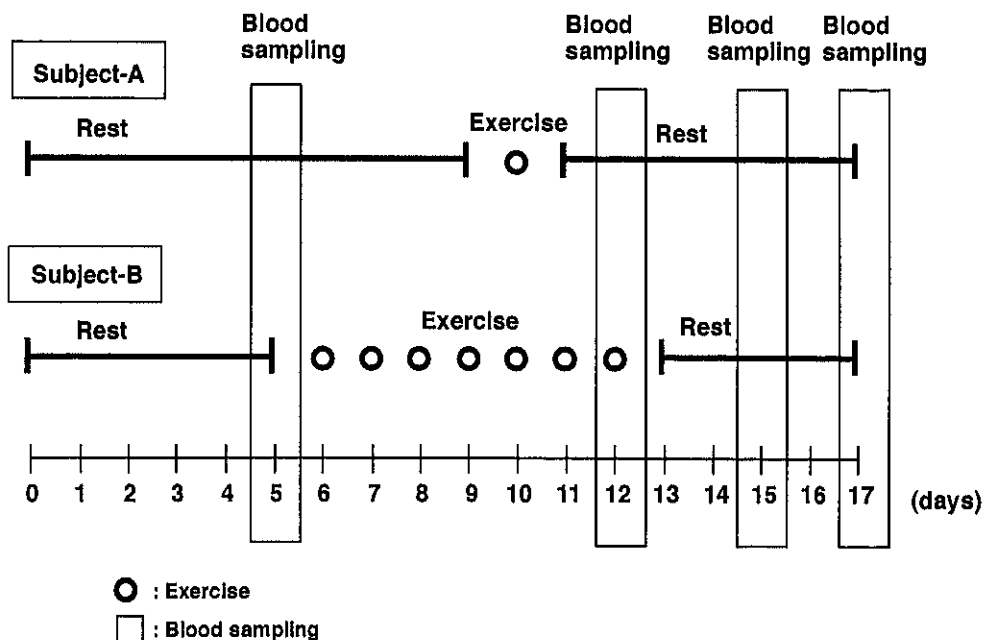


Fig. 2-7 Experimental design. Subject-A performed exercise on one day. Subject-B performed exercise for seven days. Four blood samples were withdrawn from each subject, one before exercise and three times thereafter.

て、5日目に運動前の血液サンプルを採取した。

その後、両被験者は運動を開始した。実施した運動は以下の通りである。

被験者Aは、採血後もさらに4日間休息し、5日目にトレッドミルを用い、10 km/hの走速度において30分間のジョギングを行った。被験者Aがジョギング運動を行ったのはこの1日だけであった。一方、被験者Bは採血が行われた日の翌日から、8 km/hの走速度において、45分間のジョギングを連続7日間実施した。両被験者とも、運動後はそれ以上の運動を控え通常の生活に戻った（リカバリー期間）。

次に、運動後の回復状況を調べるために、血液サンプルは、被験者Aでは運動終了から2日後、5日後、および7日後に計3回採取された。また、被験者Bでは運動終了直後、3日後、および5日後に計3回採取された。

3) 倫理委員会の承認

この実験計画は、茨城県立医療大学の倫理委員会によって承認された（承認番号：No. 35）。また、本研究の実施にあたり、人間の被験者を用いた研究に関するヘルシンキ宣言のガイドラインに沿って行われた。

4) mtDNA の抽出

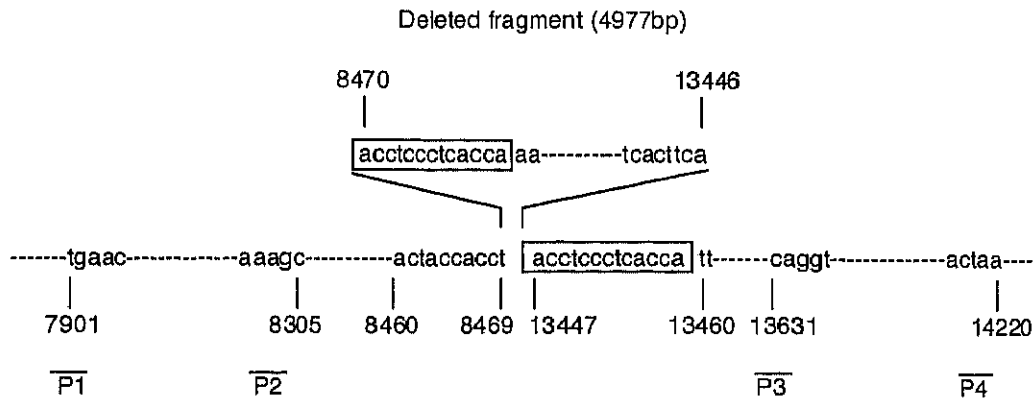
DNA Extractor WB Kit（和光純薬工業、日本）を用いて、被験者の末梢血白血球からトータルDNA（核DNA + mtDNA）を抽出した。

5) PCR 分析のためのプライマーセット

この研究で使われたプライマーは、Holtら（1988）やShoffnerら（1989）により報告されているものと同様である。用いたプライマーの位置と配列は、mtDNA上の位置とともにFig. 2-8に示した。

6) PCR 分析

本研究では、わずかな量の変異 mtDNA (mtDNA⁴⁹⁷⁷) を検出するため、20ng のトータル DNA を、0.5 μ M のプライマーセットと 0.25 ユニットの EX-Taq ポリメラーゼ（宝酒造、日本）を含んだ 10 μ l の渾散の中で、先行研究（Ikebe, et al., 1990; Yen, et al., 1991; Hayashi, et al., 1994）と同様の方法で増幅した。増幅のために 2 組のオリゴヌクレオチドプライマーセット（軽鎖の P1（ヌクレオチドポジション：7,901-7,920）と重鎖の P4（14,220-14,201）、および P2（8,282-8,305）と P3（13,650-13,631））が用いられた（Fig. 2-8）。最初の PCR のラウンドは外側のプライマーセットである P1 と P4 を使った。DNA サーマルサイクラー（TRS-300；岩城ガラス、日本）を用い、DNA の完全な変性のために 94°C において 5 分間保温した後、94°C で 30 秒（変性）、54°C で 30 秒（アニーリング）、および 72°C で 45 秒（伸長）の操作を 30 サイクル遂行した。次に、2 段階の PCR ラウンドでは、



Primers	Sequences 5' → 3'	Complementary site
1	TGAACCTACGAGTACACCGA	7,901 to 7,920
2	CCCTCTAGAGCCCACTGTAAAGC	8,282 to 8,305
3	GGGGAAGCGAGGTTGACCTG	13,650 to 13,631
4	TTAGTAGTAGTACTGGTTG	14,220 to 14,201

Fig. 2-8 Positions and oligonucleotide sequences of the primers used in PCR amplification. Primers 1 and 2 were used to amplify light strand mtDNA, and primers 3 and 4 were used to amplify heavy strand mtDNA.

内側のプライマーセットである P2 と P3 を使った。そして、同様に、94°C で 25 秒、67°C で 25 秒、および 72°C で 25 秒の操作を 26 サイクル遂行した。

7) 電気泳動と欠失の判定

増幅された PCR 産物を用い、0.1 μg/ml の臭化エチジウムを含む 2.5% アガロースゲル上で電気泳動を行った。そして、トランスイルミネーター (UVP) 上で UV を照射して DNA バンドを可視化し、ポラロイドカメラで撮影した。

なお、進行性外眼筋麻痺 (CPEO) の患者の筋肉から採取された欠失 mtDNA を、ポジティブコントロールとして用いた。

(3) 結果

ネスト PCR の方法を用いて、持久性のランニング運動前後において、mtDNA⁴⁹⁷⁷ 欠失変異の出現の有無を調べた。その結果は、Fig. 2-9 に示している。

両被験者ともに、運動前の血液サンプルからは、白血球の mtDNA に common deletion は検出されなかった。ところが、被験者 A の血液サンプルからは、運動終了から 2 日後に mtDNA に common deletion がわずかに出現し、運動終了から 5 日後の血液サンプルでははっきりと出現している。そして、運動終了から 7 日後のサンプルからは消失した。被験者 B の場合、7 日目の運動直後に採取された血液サンプルからは、common deletion は検出されなかった。その後、運動期間の終了から 3 日後のサンプルには common deletion が出

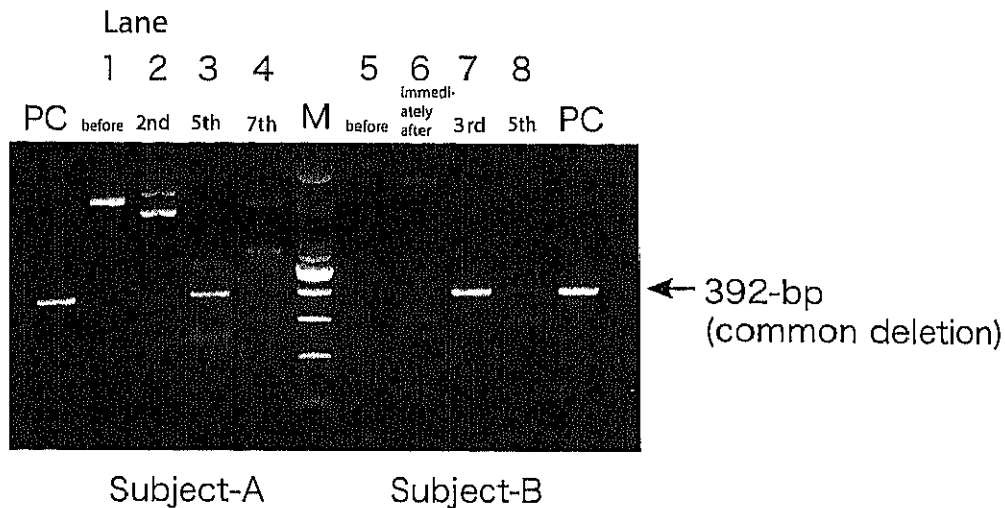


Fig. 2-9 Detection of mtDNA deletion by PCR amplification. Fragments of mtDNA were isolated on 2.5% agarose gels and stained with ethidium bromide. Size marker (M) is shown center. Positive control (PC) is from muscle of a patient with progressive external ophthalmoplegia. Lane 1-4, Subject-A. Lane 1, before exercise; Lane 2, two days after exercise; Lane 3, five days later; Lane 4, seven days later. Lanes 5-8, Subject-B. Lane 5, before exercise; Lane 6, day of exercise; Lane 7, three days after exercise; Lane 8, five days after exercise.

現しており、そして運動終了から5日後のサンプルにも common deletion を示すバンドが残っていた。しかし、common deletion のバンドは非常に薄くなっており、時間経過によってしだいに消失する傾向がうかがえた。

これらの結果から、2人の被験者で持久性のランニングの数日後（2～3日後）に白血球の mtDNA に common deletion が出現し、運動終了から7日後の被験者Aの mtDNA から完全に消失した。被験者Bでも欠失が消失する傾向が見られており、運動後の欠失の出現と消失は両被験者においてほぼ同様のパターンで起こったものと推定された。

(4) 考 察

本研究の結果にはこれまで報告されていない4つの新しい発見があった。

最初の発見としては、mtDNA の欠失変異 (common deletion) はたとえ健康な成人であっても、持久性運動 (ジョギング) を行うことによって出現することが明らかになった。しかも、比較的軽い負荷の持久性運動で、欠失の出現が認められた。これまで、先行研究では、特定の遺伝性の疾患を持っている患者や高齢者の組織に mtDNA の欠失変異が発見されており、これらの病気や老化は欠失 mtDNA が蓄積することによって引き起こされる可能性があると考えられている。たとえば、アルツハイマー病やパーキンソン病のような種々の疾患患者では mtDNA に common deletion が蓄積していることが報告されている (Hutchin, et al., 1995)。

また、欠失を持った mtDNA の蓄積によって減少させられたエネルギー産生が老化を誘発するかもしれないとの報告がある (Wei, et al., 1996)。たとえば、老化に伴って、4,977

bp の欠失がヒトの心臓や他の組織の mtDNA に現われる。加えて、Kearns-Sayre 症候群と慢性進行性外眼筋麻痺 (CPEO) を持っている患者の 30 ~ 50% にこの 4,977 bp の欠失が見られる (Holt, et al., 1988)。さらに、Shoffner ら (1989) は、この欠失がスリップ複製/組織の進行を起こすという考え方を提案した。また、この欠失はミトコンドリアゲノムの 13 bp のダイレトリピートによって起こされたものと考えられる (Holt, et al., 1988; Schon, et al., 1989)。

運動の影響に関しては、急激な負荷運動によって骨格筋細胞で起こされる酸化性ストレスの影響が調べられている (Gee, et al., 1981; Alessio, 1988)。しかしながら、これらの研究は生化学的な側面に限定されていた。さらに、Sakai ら (1999) は、急激な運動負荷によりラットのヒラメ筋の mtDNA で欠失が出現したことを報告し、そして急激な運動によって誘発された酸化ストレスが mtDNA を変異させると結論づけた。本研究で我々は持久性の運動を通じてヒトにおいても白血球の mtDNA で発生した common deletion を検出し、しかもそれは高齢者ではなく 2 人の健康な若年者で見いだした。この研究では、両被験者の運動負荷がそれほど強くはなかったにも関わらず、mtDNA の欠失変異が現われた。両被験者の運動期間は、被験者 B で 7 日間、被験者 A ではわずか 1 日だけであった。このように、mtDNA の欠失変異は比較的軽い負荷の持久性の運動によって現われたといえる。今後、欠失 mtDNA の出現のための閾値を決定するために、種々のタイプの負荷運動によって実験が実施されるべきであるといえる。

本研究の 2 つ目の新しい発見は、これらの欠失変異が白血球の mtDNA から発見されたことである。これまでの報告では、欠失はいずれもミトコンドリア病の患者や高齢者の組織から発見されている。白血球の mtDNA から発見されたとする報告は、本研究が初めてである。

本研究の 3 つ目の新しい発見は、この欠失が運動直後に出現するのではなく、運動終了から数日後に出現したことである。白血球の mtDNA の common deletion は、持久性の運動終了から 2 日後あるいは 3 日後の血液サンプルから発見された。しかしながら、運動直後の白血球の mtDNA からは common deletion を検出できなかった。したがって、欠失 mtDNA 分子が現われるためには、運動後に一定の期間が必要とされることが明らかになった。

さらに、4 つ目の新しい発見は、この欠失変異が出現した後、数日の休養を確保することによって、欠失変異は蓄積することなく一定期間後に消失したことである。我々は、1 人の被験者では運動から 5 日後の白血球の mtDNA で欠失が消失する傾向を見だし、そしてもう 1 人の被験者では 7 日後において消失したことを明らかにした。したがって、common deletion が消失するためにはかなり長い休養期間が必要であると考えられる。

欠失変異の修復の機序に関しても、今後さらに追跡的な研究によってそのメカニズムを明確にするべきである。なお、運動後の回復のための条件については本研究では検討されなかった。

この研究で、mtDNA 欠失変異の出現と消失の動態はダイナミックであることがわかった。common deletion は休養期間の後に姿を消した。この mtDNA の欠失の出現と消失のメカニズムは不明確なままである。しかしながら、我々は定期的な、そして適度な運動が確かに欠失 mtDNA の修復 (消去) に関係している酵素活性にも影響を与えるものと推察している。なお、この研究では被験者数が 2 人だけであったため、統計学的なデータ解析が行われるこ

とはなかった。さらに、この2人の被験者は、年齢も性別も異なっていた。そのため、この研究の結果をすぐに一般化することはできないかもしれない。この点は、今後の研究の進展に期待するところである。

(5) 小 括

ヒトの mtDNA の場合、4,977 bp の長さを持った欠失は頻繁に観察されるため、common deletion と呼ばれている。我々は、持久性運動によって引き起こされる mtDNA の欠失の出現と消失の状況を調べた。2名の被験者（41歳男性、および21歳女性）から、運動前1回および運動後3回の計4回血液サンプルを採取し、白血球から mtDNA を抽出し、PCR法を用いて欠失変異（common deletion）の有無を分析した。運動前には、両被験者とも mtDNA に common deletion は検出されなかった。1名の被験者においては、運動終了から2日後と5日後に common deletion が検出されたが、運動から7日後に消失した。もう1名の被験者では、common deletion は運動後3日目に出現し、5日後にもわずかに残っていた。これらのデータは、mtDNA の common deletion が持久性の運動終了から2～3日後に出現することを示している。さらに、この欠失は一定期間の休養後に消失することから、健康なヒトの mtDNA の欠失変異はダイナミックに変化することが明らかになった。