

第3章 持久性運動による mtDNA の変異の動的変化

第1節 短期ベッドレストによる mtDNA の変異

(1) はじめに

ヒトにおいて、ミトコンドリアは 16,569 塩基対の閉じた環状 DNA 分子を含んでいる (Anderson, et al., 1981)。このミトコンドリア DNA (mtDNA) は、核の染色体 DNA が約 30 億塩基対あるのと比べると、非常に小さなゲノムである。mtDNA は電子伝達系を構成するサブユニットのうちの 13 種類をコードしている。これらのサブユニットの内訳は、複合体 I (NADH:ユビキノン酸化還元酵素) が 7 種類、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、複合体 IV (シトクロム c 酸化酵素) が 3 種類、複合体 V (ATP 合成酵素) が 2 種類である。そして、mtDNA には核の遺伝子にみられるようなイントロンは存在せず、塩基配列のほとんどが、先に示した 13 種類のたんぱく質の他、22 種類のトランスファー RNA、および大小の 2 種類のリボソーム RNA をコードした極めてコンパクトな構造をとっている (Anderson, et al., 1981; Chomyn, et al., 1985; Attardi, et al., 1988)。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あたり 1,000 個ほど存在するため、一個体では膨大な数の mtDNA 分子が存在していることになる。

正常なヒトの個体内では、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)。しかしながら、特定の疾病に伴って、mtDNA は脳、肝臓、心臓、および骨格筋のような組織で点突然変異や欠失を蓄積することが多くの研究によって報告されている (Cortopassi, et al., 1990; Yen, et al., 1991; Soong, et al., 1992)。そして、これらの欠失の 1 つは同じ配列の領域で頻繁に現われることから、common deletion と呼ばれている (Soong, et al., 1992; Corral-Debrinski, et al., 1992; Chung, et al., 1994)。この common deletion の欠失の長さは、人間の mtDNA では 4,977 bp である。さらに、mtDNA の欠失はしばしば老化に伴って現れるため (Hayakawa, et al., 1992)、mtDNA の欠失変異が蓄積することによって起こるミトコンドリアにおける酸化的リン酸化反応の低下が老化の原因の一つであるとも考えられている (Lunnane, et al., 1989; Wallace, 1992)。

そのような中で、Iwai ら (2002a) は、若く健康な被験者においても、持久性運動 (ジョギング) を行うことによって白血球の mtDNA に common deletion が出現することを報告した。さらに、Iwai ら (2002a) は、この common deletion は運動終了後すぐに現れるのではなく、運動終了から 2~3 日後に出現すること、また運動後は安静を確保することによって、運動終了から 7 日後に消失することを突き止めた。欠失が出現するメカニズムについて、Iwai ら (2002a) は、持久性の運動を行うことにより酸素摂取量が増大するが、その際にミトコンドリア内で活性酸素が大量に発生し、その際の酸化ストレスの増大によってミトコンドリア内膜に位置している mtDNA に欠失変異が生じた可能性を指摘している。しかしながら、この実験は十分に計画された実験ではなかったため、どの程度の運動負荷の場合に common deletion が出現するかなど、その詳細についてはほとんど明らかにすることは

できなかった。そのため、様々な運動負荷条件で実験を行うにより、mtDNAに欠失変異を生じさせる運動負荷の条件を発見することが期待されている。

そこで、本研究では、この欠失変異を引き起こす運動負荷を探索するための1つのステップとして、短期間のベッドレスト実験を実施し、日常生活において極端に運動負荷を制限した場合に、白血球のmtDNAにcommon deletionが出現するか否かについて検討した。

(2) 方法

1) 被験者とインフォームドコンセント

本研究で用いた血液サンプルは、2名の健康な女性から採取した。被験者の年齢は、両者とも21歳であった。各被験者は一連の実験内容について説明を受けた後、参加同意書に署名し、また医師の健康チェックにより実験への参加に問題がないことを確認した。

なお、本研究の実験計画については、ヘルシンキ宣言、および文部科学省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて、学内の倫理委員会により承認された（承認番号：No. 55）。

2) ベッドレストおよび運動と血液サンプリング

2名の被験者に対して、以下のような2種類の実験を実施した。各実験プロトコールはFig. 3-1に示した。

まず、ベッドレスト実験を実施した。あらかじめ、ベッドレスト実験前に4日間の休息を

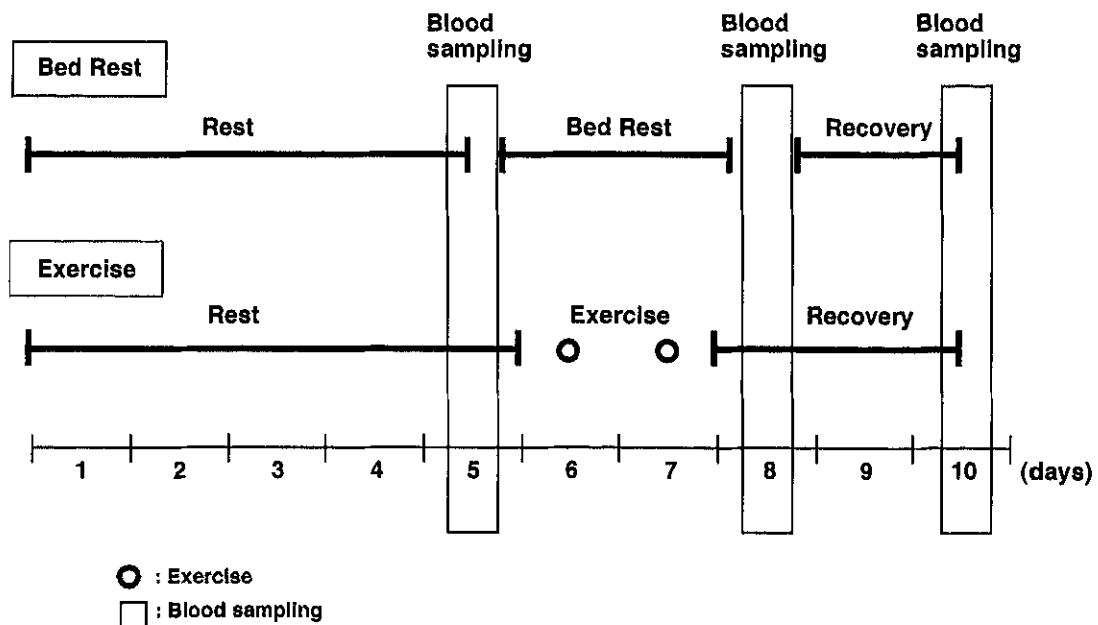


Fig. 3-1 Experimental design. Bed rest performed on three days. Subjects performed exercise on two days. Three blood samples were withdrawn from each subject, once before bed rest or exercise and two times thereafter.

確保した。この期間は特別な運動を避け、通常の日常生活を心がけた。そして、まず第1回目の採血を行った。採血後、直ちにベッドレストを開始し、3日間にわたってベッドレストを実施した。ベッドレスト期間中は、トイレ以外は1日中ベッドに横になり、食事もベッド上で摂った。ベッドレスト終了直後に2回目の採血を行い、さらに2日後に3回目の採血を行った。

ベッドレスト実験と比較するため、同一の被験者に対して運動負荷実験を行った。運動負荷実験のプロトコールは以下の通りである。まず、運動実施前に4日間の休息を確保した。この期間は運動を避け、通常の日常生活をするよう指示した。そして、運動実施前にまず第1回目の採血を行った。そして、採血後翌日から2日間、自転車エルゴメータを用いた持久性の運動を実施した。運動負荷は60～70 Wとし、60 rpmの速度で30分間の運動を行った。運動中は130拍/分の心拍数を保つように運動負荷を調整した。運動期間後は、通常の日常生活を心がけ、それ以外の運動を行わなかった。そして、運動終了後翌日と3日目に採血を行った。

なお、採血にあたっては、1回当たりの採血量は2 mlとし、抗凝固剤として2Na-EDTAを用いた。

3) DNA の抽出

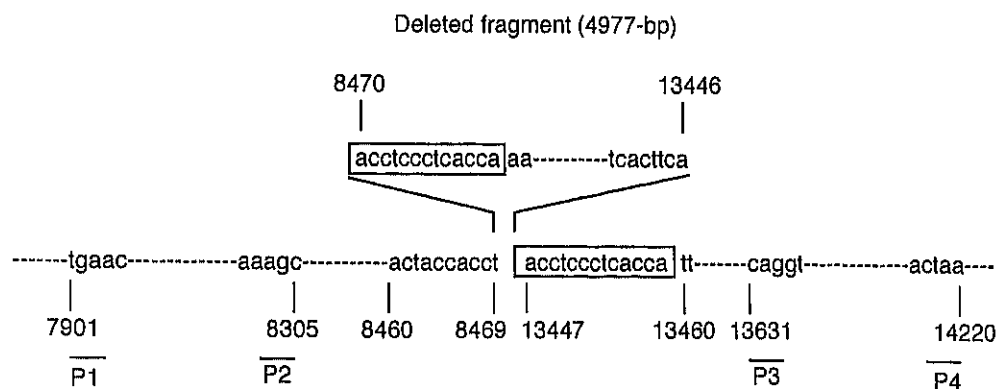
被験者から採血された末梢血液の白血球細胞よりトータルDNA（核DNA + mtDNA）を抽出した。DNAの抽出にはDNA Extractor WB Kit（和光純薬工業，日本）を用いた。

4) プライマー

本研究で用いたプライマーは、先行研究（Holt, et al., 1988; Shoffner, et al., 1989; Iwai, et al., 2002a）で用いられたものと同様である。オリゴヌクレオチドプライマーの配列のサイトは、Andersonら（1981）によって記述されたmtDNAの塩基配列に沿って、Fig. 3-2に示した。プライマーは、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）、および軽鎖のP2（8,282-8,305）と重鎖のP3（13,650-13,631）の2組のプライマーセットが用いられた。

5) Polymerase Chain Reaction (PCR) 分析

本研究では、わずかな量の変異mtDNAを検出するため、20ngのトータルDNAを、0.5 μ M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（Hayashi, et al., 1994; Ikebe, et al., 1990; Yen, et al., 1991）と同様の方法で増幅した。増幅のために2組のプライマーセットが用いられた。最初のPCRのラウンドでは、外側のプライマーセットであるP1とP4を用いた。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、まず、94°Cで30秒（変性）、54°Cで30秒（アニーリング）、および72°Cで75秒（伸長）の操作を35サイクル遂行した。次に、2段階のPCRラウンド



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

Fig. 3-2 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.

では、内側のプライマーセットである P2 と P3 を用い、94°C で 30 秒、58°C で 30 秒、および 72°C で 75 秒の操作を 30 サイクル遂行した。

6) 電気泳動

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

Fig. 3-3 には PCR 分析の結果を示している。2 名の被験者に対して 3 日間のベッドレストを実施した場合においては、両被験者ともに mtDNA の欠失の出現が認められなかった。一方、2 日間の持久性運動を実施した場合の結果では、両被験者ともに mtDNA に欠失変異 (common deletion) が出現した。

ベッドレスト実験の場合、被験者 A、被験者 B ともにベッドレストを行う前の血液サンプルからは白血球の mtDNA に common deletion は認められなかった。また、ベッドレスト直後の血液サンプルからも、両者ともに common deletion は認められなかった。しかし、被験者 B において、2 日後の血液サンプルから common deletion が出現した。

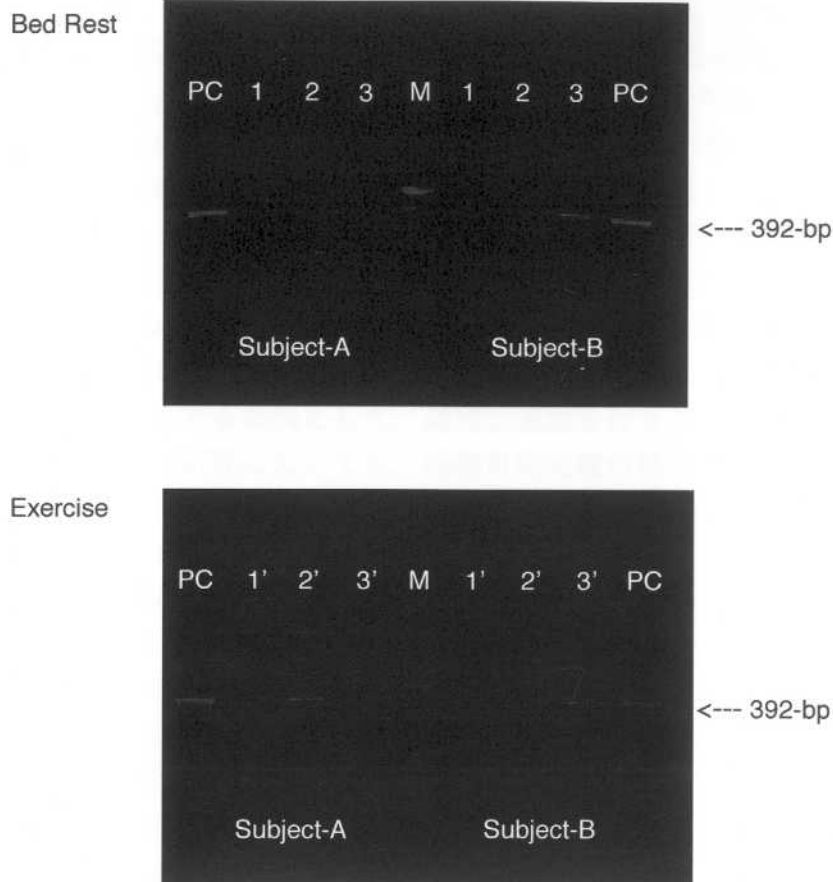


Fig. 3-3 Detection of mtDNA deletion by PCR. Fragments of mtDNA were isolated on 2.5% agarose gels and stained with ethidium bromide. Size marker (M) is shown center. Positive control (PC) is from muscle of a patient with progressive external ophthalmoplegia. Lanes 1-3, bed rest. Lane 1, before bed rest; Lane 2, at the end of bed rest; Lane 3, two days later. Lane 1'-3', exercise. Lane 1', before exercise; Lane 2', next day of exercise; Lane 3', three days after exercise.

運動負荷実験の結果では、運動実施前の血液サンプルからは、被験者A、被験者Bともに common deletion のバンドはみられなかった。しかし、被験者Aにおいては、common deletion とは異なる長さのバンドがみられた。なお、この異なる長さのバンドは欠失ではなく、プライマーが核DNAの mtDNA 様配列に反応した結果と考えられる (Iwai, et al., 2002b)。運動後翌日の血液サンプルからは、被験者A、被験者Bともに common deletion を示す長さのバンドが出現し、先に被験者Aにみられていたバンドは消失した。そして、運動後3日目の血液サンプルからは、被験者Aにおいては common deletion が消失したが、被験者Bにおいては common deletion のバンドが残った。

(4) 考 察

特定の疾患患者では mtDNA に common deletion の蓄積が認められることが報告されて

いる (Cortopassi, et al., 1990; Yen, et al., 1991; Soong, et al., 1992)。また高齢化に伴って common deletion の蓄積は指数関数的に増加することが報告され、このような mtDNA の変異の蓄積が老化の原因の 1 つであると考えられている (Lunnane, et al., 1989; Wallace, 1992)。しかしながら、Iwai ら (2002a) は、若く健康な被験者においても、持久性の運動後には白血球の mtDNA に common deletion が出現し、数日間の休息をとることによって消失したことを報告している。つまり、若く健康な被験者の場合、持久的運動負荷によって common deletion の出現がみられるものの、蓄積はせずに消失することが示されている。さらに、Iwai ら (2003a) は、持久的な運動負荷を与える前の日常生活の状態ですでに白血球の mtDNA に common deletion がみられた者がおり、それらの者では中等度の持久的な運動を行った数日後にその common deletion が消失したことを報告している。そして、このように欠失が消失する要因として、適度な運動を行うことによって酵素の活性が高まる可能性を指摘した。本研究においても、運動負荷実験の結果では、運動前には見られていなかった common deletion が持久性運動後に出現し、うち 1 名では 3 日後には消失しており、Iwai ら (2002a) の報告を支持する結果を示している。

ところで、岩井ら (2002a; 2003a) が行った一連の実験結果を見ると、運動を実施する前の日常生活の状態において、白血球中の mtDNA にすでに common deletion が見られた場合と見られていない場合があった。我々はその原因として、欠失を出現させる運動負荷の閾値が存在する可能性を提案し、日常生活においてもその閾値を超える場合があるのではないかと考えた。今回のベッドレスト実験により、運動負荷がほとんどない生活の状態では common deletion は出現しないことが明らかになったことから、閾値が存在する可能性はより高まったと考えられる。

なお、今回のベッドレスト実験は 3 日間であり、ベッドレスト実験としてはかなり短期間であった。ベッドレストに関する実験はかなり以前に行われたものが多いが、通常 3～5 週間、非活動的な状態が保たれる。そして、ベッドレストにより、安静心拍数は 10～15 拍/分高くなり、持久性の作業時間や最大酸素摂取量は著しく低下する (Miller, et al., 1965; Chase, et al., 1966; Saltin, et al., 1968)。また、最近の研究成果としては、DeRoshia ら (1993) による 30 日間の 6 度頭を下にしたベッドレスト実験プロジェクトなどがある。また、ベッドレスト中の高い強度のアイソトニック運動により、最大酸素摂取量は維持され、睡眠の質や精神的な集中力が減少するが、アイソキネティック運動では最大酸素摂取量が減少することが報告されている (Greenleaf, 1997)。さらに、Gunji (1994) や Ishizaki ら (1994) は、20 日間のベッドレスト実験を行い、Cornell Medical Index (CMI), Zung (1972) の自己評価抑うつ尺度 (SDS), General Health Questionnaire (GHQ) などの心理学的・精神医学的指標を用い、ベッドレストによって抑うつ傾向がうかがえたことを報告している。

今回のベッドレストは短期間であったが、もしベッドレストが長期間に及ぶ場合には、今回の結果とはまた異なる結果が示される可能性がある。Kondo ら (1998) は、ラットの片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。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、その後の低下は緩やかになっている。筋萎縮において、TBA 反応陽性物質 (TBARS) の上昇が認められており、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た。また、萎縮筋において酸化型グルタチオンは増加していたが、同時にグルタチオンの酸

化型を還元型にするグルタチオンレダクターゼの活性も上昇していた。このことは、生体中の酸化反応の増加がグルタチオンレダクターゼ活性の増加を上回ったため、結果として酸化型グルタチオンが上昇したものと考えられる。つまり、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的ストレスが増加していることを反映したものと考えられる。また、阪井ら(2002)は、6週齢のラットに2週間の後肢懸垂を行い、実際に廃用後のヒラメ筋のmtDNAに欠失変異が出現したことを報告している。なお、この種の実験動物での大きな課題、つまりヒトにおいて同様の傾向が認められるか否かという点については未解決である。この課題について、現在のところ、結論は得られていない。

次の課題としては、mtDNAに欠失変異を出現させる運動負荷の閾値がどの範囲にあるかということをはっきりとすることになる。この課題を解決するためには、運動負荷を正確に把握したうえで、さらに綿密な実験を行うことが必要である。

(5) 小 括

ヒトのmtDNAの場合、4,977 bpの長さの欠失が頻繁にみられることからcommon deletionと呼ばれている。我々は、短期間のベッドレスト実験および持久性運動実験を行い、それらによって起こる欠失mtDNAの出現とその消失の動態を探った。血液サンプルは、2名の若い被験者からベッドレストおよび運動の前後に採取され、PCR法により分析された。ベッドレスト開始前には両被験者とも白血球のmtDNAにcommon deletionは認められなかった。また、ベッドレスト終了後においてもcommon deletionは出現しなかったが、1名の被験者において、ベッドレスト終了から2日後にcommon deletionが出現した。持久性運動実験の場合、運動開始前には両被験者とも白血球のmtDNAにcommon deletionは見られなかった。しかしながら、運動終了後の翌日にcommon deletionが出現し、1名の被験者では3日後に消失した。これらのデータは、短期間のベッドレスト後にはmtDNAのcommon deletionが出現しなかったが、運動後にはcommon deletionが出現したことを示している。

第2節 異なる負荷の自転車エルゴメータによる mtDNA の変異

(1) はじめに

ミトコンドリア病と呼ばれる特定の疾患に伴い、脳、肝臓、心臓、および骨格筋のような組織で mtDNA に点変異や欠失が蓄積することが報告されている (Cortopassi, et al., 1990; Yen, et al., 1991; Corral- Debrinski, et al., 1992; Cortopassi, et al., 1992; Wallace, et al., 1992)。これらの欠失の1つは同じ配列の領域に頻繁に現われるため、common deletion と呼ばれている (Schon, et al., 1989; Corral-Debrinski, et al., 1992; Soong, et al., 1992; Chung, et al., 1994)。この mtDNA の欠失は、ヒトの場合では 4,977 bp の長さである。さらに、この mtDNA 欠失はしばしば老化によっても蓄積されることが報告されている (Hayakawa, et al., 1992)。そのため、mtDNA の変異の蓄積によって引き起こされた酸化リン酸化反応の低下が老化の原因の1つであるかもしれないと推察されている (Lunane, et al., 1989; Wallace, 1992)。

一方で、強い運動が酸化ストレスを誘発することが報告されている (Brady, et al., 1978)。さらに、酸化ストレスによって、mtDNA 損傷が蓄積することが報告されている (Richter, et al., 1988)。mtDNA はミトコンドリアの内膜に数個存在しているが、ミトコンドリアは活性酸素の発生源であることから、mtDNA は酸化ストレスによる損傷を受けやすいかもしれないと考えられている。それに加えて、mtDNA は核 DNA のような保護のためのヒストンを欠いており、また効率的な DNA 修復システムを持っていないことが明らかになっている (Bandy, et al., 1990)。さらに、エアロビクスの条件下では、生体内における物質代謝の際に超酸化ラジカルのような興奮した活性酸素種、過酸化水素やヒドロキシルラジカルなどが形成される (Chance, et al., 1979)。したがって、これらの状況を総合すると、mtDNA の欠失変異は運動を行うことによって頻繁に起こり得るように思われる。

しかしながら、これまでヒトを対象に、運動と mtDNA 欠失変異の関係を確かめた研究は少ない。Iwai ら (2002a) は、健康な若い被験者が持久的運動を行うことによって、白血球の mtDNA に欠失が出現すること、および数日間の安静後にはその欠失が消失することを報告した。また、Iwai ら (2003a) は、持久性運動を行う前から mtDNA に欠失が見られた5名の被験者において、運動後の安静期間中に欠失が消失したことを報告している。その際、運動前の日常生活においてすでに欠失が見られていたことになるが、その原因として、mtDNA の欠失を引き起こすには運動負荷に閾値が存在し、日常生活での運動負荷がその閾値を超えた可能性を指摘している。さらに、岩井ら (2003c) は、短期間のベッドレスト実験を行い、運動負荷がほとんどない状態においては mtDNA の欠失が出現しなかったことを報告している。

そこで、本研究では、この mtDNA の欠失を引き起こす運動負荷の閾値が存在する可能性を確認するため、同一の被験者に対して2段階の負荷の運動実験を行い、運動負荷の強弱によって mtDNA の欠失変異の出現状況に違いが見られるかどうかを確かめることを目的とした。

(2) 方法

1) 被験者とインフォームドコンセント

日常的なトレーニングをしていない健康な女性3名（平均年齢：20.3 ± 0.4 歳）がこの研究に参加した。本研究の実験プロトコルは茨城県立医療大学の倫理委員会によって審査され、承認された。また、人間の被験者を対象とする研究のため、ヘルシンキ宣言のガイドラインに従って実施された。各被験者は一連の実験内容について説明を受けた後、参加同意書に署名した。そして、医師による事前の健康チェックにより、持久性運動を行う上で支障がないことを確認した。

2) 運動と血液サンプリング

各被験者は、運動負荷を変えた2回の運動負荷実験を実施した。実験プロトコルは Fig. 3-4 に示した通りである。

1回目の実験条件は次の通りである。まず、あらかじめ7日間の休養期間を設けている。この期間は、被験者は標準的な日常生活を行い、特別な運動を控えた。そして、持久性運動を行う前に採血を行い、2 ml の血液サンプルを収集した。採血後、被験者は自転車エルゴメータを用いて、80 W の負荷の運動を 60rpm の速度において30分間実施した。この持久性運動を実施した後はリカバリー期間として通常の日常生活を行い、その後の特別な運動を控えた。このリカバリー期間中、運動後2日目、3日目、および6日目に各被験者から3回の血液サンプルを収集した。

2回目の実験では、同一被験者に対し、同様の実験プロトコルを用いて運動負荷実験を行った。この実験条件では、運動負荷だけを40 W に変え、その他の条件は全く同一に設定した。

3) mtDNA の抽出

末梢白血球細胞から DNA Extractor WB Kit（和光純薬工業，日本）を用いて、トータ

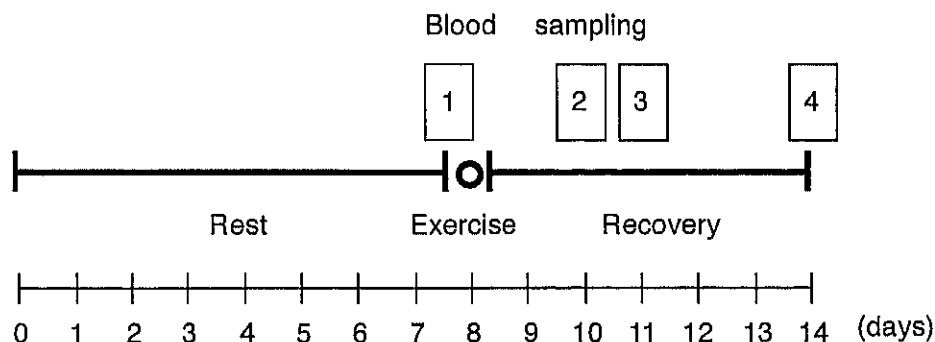
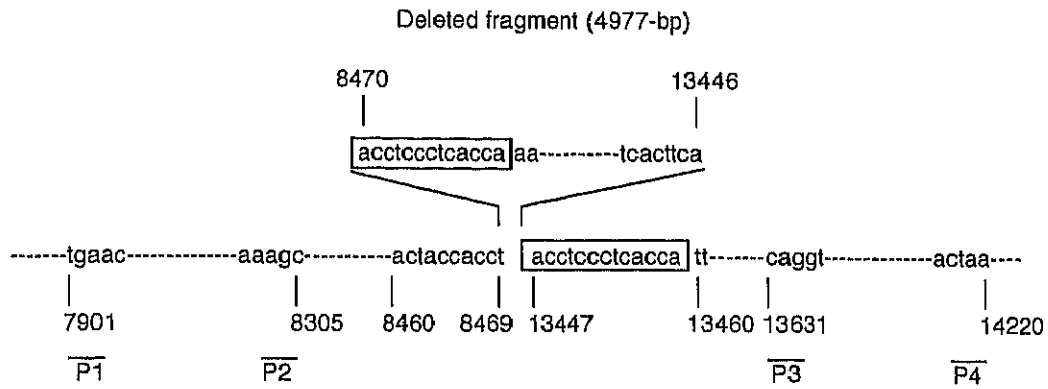


Fig. 3-4 Experimental design. All subjects performed exercise on one day. Four blood samples were withdrawn from each subject, once before exercise and three times thereafter.



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

Fig. 3-5 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.

ル DNA (核 DNA + mtDNA) を抽出した。

4) PCR 分析のためのプライマーセット

この研究で用いたプライマーセットは先行研究と同様であった (Holt, et al., 1988; Shoffner, et al., 1989; Iwai, et al., 2002a)。オリゴヌクレオチドプライマーの配列のサイトは、Anderson ら (1981) によって記述された mtDNA の塩基配列に沿って、Fig. 3-5 に補足的に示した。

5) PCR 分析

わずかな量の変異 mtDNA (mtDNA⁴⁹⁷⁷) を検出するため、20 ng 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: 7901-7920) と重鎖の P4 (14220-14201), および P2 (8282-8305) と P3 (13650-13631)) が用いられた。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、まず、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、内側のプライマーセッ

トである P2 と P3 を使った。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。

6) 電気泳動

増幅された PCR 産物を用い，0.1 μ g/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，ポジティブコントロールとして，進行性外眼筋麻痺 (CPEO) の患者の筋肉から採取した欠失 mtDNA が用いられた。

(3) 結果

ネスト PCR 法を用いて，自転車エルゴメータによる持久性運動の前後における白血球の mtDNA の欠失変異 (common deletion) の有無を調べた。2 段階の運動負荷のうち，80 W の運動負荷による白血球の mtDNA における common deletion の出現状況は Fig. 3-6 (a) に，そして 40 W の運動負荷による common deletion の出現状況は Fig. 3-6 (b) に示した。

80W の運動負荷実験の場合，被験者全員において運動前から common deletion が認められた。また，運動から 2 日後のサンプルからも，全員に common deletion が認められた。そして，3 日後のサンプルからは，全員において common deletion が消失した。6 日後のサンプルでは，被験者 A と被験者 C で，再び common deletion が現れた。

40W の運動負荷実験の場合，被験者 A と被験者 C においては運動前から common deletion が認められた。この両被験者の common deletion は，運動から 2 日後のサンプルからともに消失した。被験者 A ではその後も引き続き消失したままであったが，被験者 C では 6 日後に再び common deletion が現れた。なお，被験者 B においては，運動前から運動後まで一貫して common deletion が認められなかった。

これらの結果から，80W の運動負荷においては運動終了から 2 日後に common deletion が出現したのに対し，40 W の運動負荷の場合には運動を実施しても運動後には common deletion が出現しなかったことが明らかになった。この傾向は，被験者全員でほぼ同様であった。

(4) 考察

Sakai ら (1999) は，急激な運動によってラットの骨格筋中の mtDNA で欠失変異が出現したことを示し，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 の欠失変異を起こすと結論した。また，Iwai ら (2002a) は，2 人の被験者における持久性運動を通じて，ヒトの白血球の mtDNA で common deletion を検出した。そして，この common deletion は運動後数日経過してから出現し，その後のリカバリー期間により消失することを報告した。さらに，Iwai ら (2003a) は，運動前の日常生活の状態ですでに欠失 mtDNA が

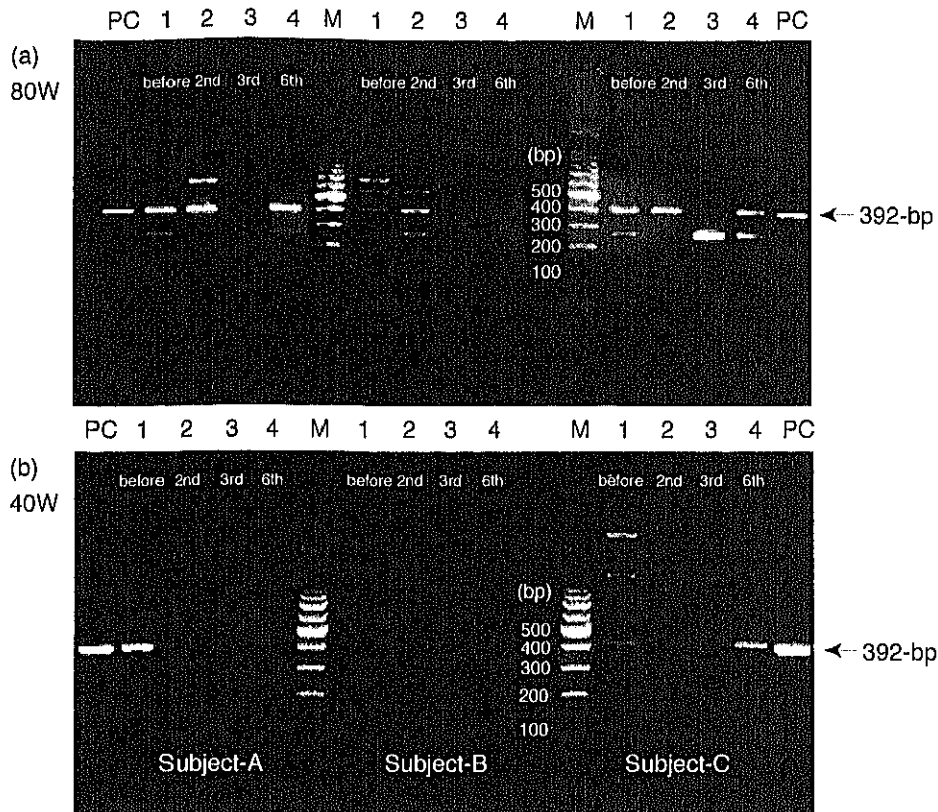


Fig. 3-6 Detection of mtDNA deletion by PCR. Picture (a) is the case of exercise at 80 W on a bicycle ergometer, and picture (b) is the case of exercise at 40 W. Fragments of mtDNA were isolated on 2.5% agarose gels and stained with ethidium bromide. Size marker is shown in (M). Positive control (PC) is from muscle of a patient with progressive external ophthalmoplegia. Each band on the length of 392 bp in the picture shows the common deletion. Each lane on the picture for all subjects shows the following condition: Lane 1, before exercise; Lane 2, two days after exercise; Lane 3, three days after exercise; Lane 4, six days after exercise.

みられていた5人の被験者に持久性の運動を行ったところ、運動期間から数日後に全員のcommon deletionが消失したことを報告した。しかしながら、少し視点を変えると、このIwaiら(2003a)の報告の結果では、欠失を蓄積させるような特定の病気を持っていない健康な若い被験者であっても、運動前の段階における毎日の日常生活の間にmtDNAの欠失変異が現われていたといえる。この理由について、Iwaiら(2003a)は、様々な可能性の中から、mtDNAに欠失変異を引き起こす運動負荷には閾値があり、日常生活の中でも負荷がその閾値を超える可能性があるかと推察した。しかし、残念ながら、実験中の運動負荷は厳密に測定されておらず、閾値の存在の可能性については推察されるだけにとどまっていた。したがって、本当にこのような閾値が存在するのか否かについて、それを明らかにするための実験が必要であった。

そのような中で、岩井ら(2003c)は短期間のベッドレスト実験を実施し、運動負荷を極端に制限した場合に、mtDNAの欠失変異が出現するかどうかを確かめた。そして、そのベッ

ドレスト実験によっては common deletion が出現しなかったことを報告した。この岩井ら (2003c) の研究は、直接閾値の有無の問題を解決するまでには至らないものの、運動負荷がほとんどない場合には mtDNA の欠失変異が確かに出現しないことを確かめることにより、一連の研究を一步前進させたものといえる。本研究の主な目的は 2 段階の運動負荷による持久性運動により mtDNA の欠失が出現するかどうかを確認することであった。したがって、その意味から考えると、本研究は、岩井ら (2003c) の研究をさらに一步前進させるものと位置づけられる。

本研究では、同一被験者に対して異なる 2 段階の運動負荷による持久性運動を実施し、運動負荷の違いによって白血球の mtDNA における common deletion の出現の状況が異なるかどうかを探った。そして、すべての被験者において、80 W の運動負荷の場合には mtDNA に common deletion が出現するが、40 W の運動負荷では出現しないことがわかった。したがって、この 40W と 80W の運動負荷の間に、common deletion を出現させるための閾値が存在する可能性がうかがえる。

本研究では、40W および 80W の 2 段階の運動負荷を設定したが、被験者の体力レベルには個人差がある。したがって、これらの運動負荷が実際にどの程度の負荷に相当するかは厳密に設定できていない。今後は、最大酸素摂取量などの指標を基準として、その何%に相当する負荷であるかという形で表現するなど、体力レベルの個人差の影響をコントロールする必要があると考えられる。

(5) 小 括

本研究では、2 段階の負荷による自転車エルゴメータを用いた持久性運動によって起こされた欠失 mtDNA の出現と消失の動態を調べた。3 人のトレーニングしていない健康な女性 (平均年齢: 20.3 ± 0.4 歳) が自転車エルゴメータを用い、40W と 80 W の運動負荷を加え、60rpm の速度で 30 分間の運動を行った。各被験者の血液サンプルは、運動前 1 回と運動後 3 回の計 4 回収集された。白血球から抽出された mtDNA は、ネスト PCR 法を用いて増幅され、分析された。80W の運動負荷実験の場合、被験者全員において運動前から common deletion が認められた。また、運動終了から 2 日後のサンプルからも、全員に common deletion が認められた。そして、3 日後のサンプルからは、全員の common deletion が消失した。6 日後のサンプルでは、被験者 A と被験者 C で、再び common deletion が現れた。一方、40W の運動負荷実験の場合、被験者 A と被験者 C においては運動前から common deletion が認められた。この両被験者の common deletion は、運動から 2 日後のサンプルからともに消失した。被験者 A ではその後も引き続き消失したままであったが、被験者 C では 6 日後に再び common deletion が現れた。なお、被験者 B においては、運動前から運動後まで一貫して common deletion が認められなかった。

本研究では、同一被験者に対して異なる 2 段階の運動負荷による持久性運動を実施し、運動負荷の違いによって白血球中の mtDNA における common deletion の出現の状況が異なるかどうかを探った。そして、すべての被験者において、80 W の運動負荷の場合には運動後の白血球の mtDNA に common deletion が出現したが、40 W の運動負荷では出現しないことがわかった。したがって、この 40W と 80W の運動負荷の間に、common deletion を

出現させるための閾値が存在する可能性がうかがえる。

なお、本研究では、40W および 80W の 2 段階の運動負荷を設定したが、被験者の体力レベルには個人差がある。したがって、これらの負荷が実際にどの程度の負荷に相当するかは厳密に設定できていない。今後は、最大酸素摂取量などの指標を基準として、その何%に相当する負荷であるかという形で表現するなど、体力レベルの個人差の影響をコントロールする必要があると考えられる。

第3節 自転車エルゴメータによる mtDNA の変異

(1) はじめに

ミトコンドリア病と呼ばれている特定の疾患を持った患者の脳、肝臓、心臓、および骨格筋などの組織において、mtDNA に点変異や欠失が蓄積していることが多くの先行研究で報告されている (Cortopassi, et al., 1990; Yen, et al., 1991; Corral-Debrinski, et al., 1992; Cortopassi, et al., 1992; Soong, et al., 1992)。これらの欠失の1つは同じ配列領域に頻繁に現われるため、common deletion と呼ばれている。この欠失の長さは、人間の mtDNA では 4,977 bp である (Corral-Debrinski, et al., 1992; Soong, et al., 1992; Chung, et al., 1994)。

さらに、特定の疾患患者以外でも、老化に伴ってこの欠失を持った mtDNA の量が増加することが報告されている (Hayakawa, et al., 1992)。そのため、mtDNA 突然変異の蓄積によって起こされたミトコンドリアの酸化的リン酸化反応能力の低下が老化の原因の1つであるかもしれないと考えられている (Lunane, et al., 1989; Wallace, 1992)。

また、mtDNA の損傷は、酸化ストレス下で増加することが知られている (Brady, et al., 1978; Richter, et al., 1988)。ミトコンドリア内では、酸素代謝によりスーパーオキシド、過酸化水素、およびヒドロキシルラジカルのような活性酸素種 (ROS) が発生する (Chance, et al., 1979)。運動時の酸素消費量は安静時の 10～40 倍にも増加するため、ミトコンドリアの電子伝達系によって生成された ROS は運動によって急激に増大する。このような環境下で、mtDNA の損傷は頻繁に発生する可能性が高い。そして、それに加え、核 DNA にあるような保護の役割を果たすヒストンがないこと、そして核 DNA で行われているような変異を修復するための機構が十分ではないことなど、mtDNA には核 DNA と形態・機能的な違いが多く見られている (Bandy, et al., 1990)。これらのいくつかの事実から、急激な運動により mtDNA の損傷は増大するかもしれないと考えられる。

そのような中で、Sakai ら (1999) は、ウィスター系ラットのヒラメ筋と前頸骨筋のミトコンドリアで、急激なオーバーロード運動によって mtDNA に欠失を生じることを報告した。また、Iwai ら (2002a) は、ヒトを対象として、若く健康な被験者が持久性の運動を行うことによって、白血球の mtDNA に欠失変異が出現すること、および数日間の休養によってその欠失が消失することを報告した。さらに、岩井ら (2003c) は、短期間のベッドレスト実験を行い、ベッドレストにより運動負荷を極端に制限した場合には、白血球の mtDNA に欠失が出現しないことを報告した。そしてさらに、自転車エルゴメータを用いて、運動負荷を 40 W と 80 W に変えて持久性の運動を行った場合、40 W では mtDNA の欠失は出現しないが、80 W では出現することを確かめ、40 W と 80 W の間に mtDNA に欠失変異を発生させる閾値が存在する可能性を指摘した。なお、これらの実験の際、運動前の数日間は特別な運動を避け、通常の日常生活をするよう指示していたにもかかわらず、運動前の白血球 mtDNA にすでに common deletion が認められる場合があった。

そこで、本研究では、運動前に common deletion が認められた者を対象に持久性の運動を行い、mtDNA の欠失変異を時間経過に沿って追跡することにより、mtDNA 欠失変異のダイナミックな変化について観察した。

(2) 方法

1) 被験者およびインフォームドコンセント

日常的なトレーニングを実施していない健康な女性5名（平均年齢：20.2 ± 0.4 歳）がこの研究に参加した。各被験者は一連の実験内容について説明を受けた後、参加同意書に署名し、また医師による事前の健康チェックにより持久性運動を行う上で支障がないことを確認した。

2) 倫理委員会による承認

本研究の実験計画は、茨城県立医療大学の倫理委員会によって検討され、承認された（承認番号：No. 55）。そして、実験は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。

3) 運動と採血

実験プロトコルは Fig. 3-7 に示した。

各被験者は運動期間前の5日間は通常の日常生活を送り、特別な運動を行わないようにした。次に、被験者は自転車エルゴメータ上で、50～60Wの負荷で60rpmの速度を保ち、

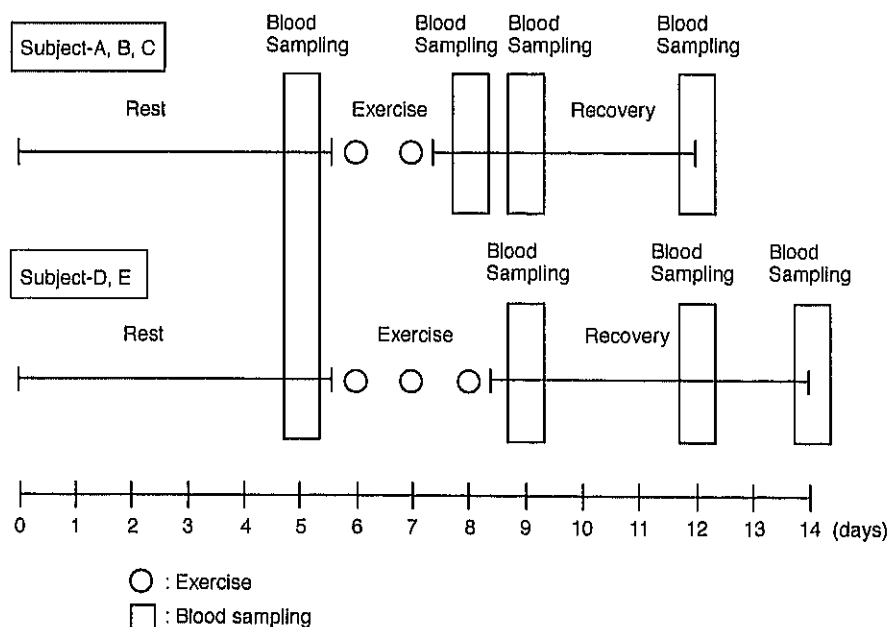


Fig. 3-7 Experimental design. Three subjects performed exercise on two days and two subjects performed exercise on three days. Four blood samples were withdrawn from each subject, once before exercise and three times thereafter.

30分間の運動を行った。被験者の心拍数は140拍/分程度であったことから、最大酸素摂取量の50% (50% VO₂max) 程度の運動負荷であると考えられた。3人の被験者 (A, B, C) は、2日間連続でエルゴメータ運動を行った。一方、残りの2人の被験者 (D, E) は3日間連続で運動を行った。

持久性運動の開始前日に、最初の血液サンプルが採取された。そして、回復状況を調べるため、被験者A, B, およびCについては、運動終了後1日目, 2日目, および5日目に血液サンプルを採取した。また、被験者DとEについては、運動終了後1日目, 4日目, および6日目に採血した。

被験者は、リカバリー期間においては再び通常の日常生活に戻り、特別な運動を控えた。

4) mtDNA の抽出

DNA Extractor WB Kit (和光純薬工業, 日本) を用い、被験者の末梢血中の白血球細胞からトータルDNA (核DNA + mtDNA) が抽出された。

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セットは、Holtら (1988) や Shoffnerら (1989) により記述されている。プライマーの位置と配列は、mtDNA上の位置とともにFig. 3-8に示した。

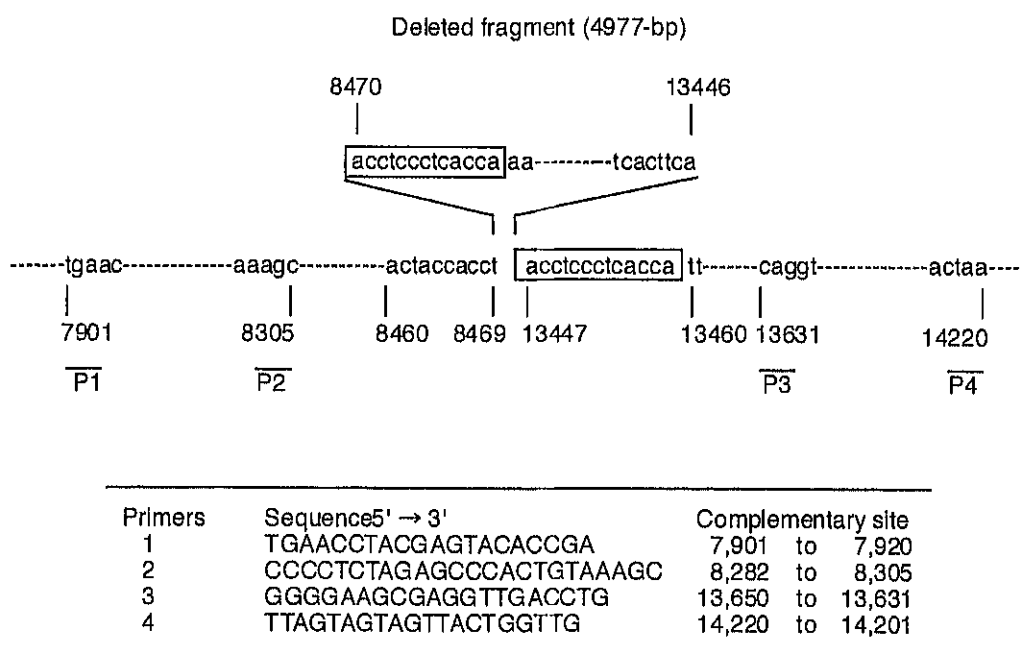


Fig. 3-8 Positions and oligonucleotide sequences of the primers used in PCR amplification. Primers 1 and 2 were used to amplify light strand mtDNA, and primers 3 and 4 were used to amplify heavy strand mtDNA.

6) PCR 分析

わずかな量の変異 mtDNA (mtDNA⁴⁹⁷⁷) を検出するため、20 ng のトータル DNA (核 DNA + mtDNA) 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。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、まず、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、内側のプライマーセットである P2 と P3 を使った。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

増幅された PCR 産物を用い、0.1 μ g/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、DNA バンドをトランスイルミネーター (UVP) 上で UV を照射して可視化し、ポラロイドカメラで撮影した。

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

(3) 結果

白血球の mtDNA の欠失変異 (common deletion) は、運動開始前、および運動後 1 日目に 5 人全員の被験者で認められた (Fig. 3-9a, Fig. 3-9b)。しかしながら、被験者 A、B および C については、mtDNA の common deletion は運動終了後 2 日目に消失した。また同様に、被験者 D と E については、common deletion は運動終了後 4 日目の血液サンプルから消失した。その後、被験者 B と C では運動終了後 5 日目に mtDNA の欠失変異が再び現われたが、被験者 A では欠失は見られなかった。また、被験者 D の血液サンプルでは、運動終了後 6 日目に common deletion が再び現われたが、被験者 E では common deletion は見られなかった。

これらの結果は、白血球の common deletion は、運動開始前の状態において 5 人の被験者全員に出現していたが、common deletion は持久性の運動プログラム終了後の少なくとも 4 日目までに白血球の mtDNA から消失したことを示している。

なお、白血球の common deletion は、運動後 5 日目あるいは 6 日目には 5 人の被験者中 3 人で再び出現している。

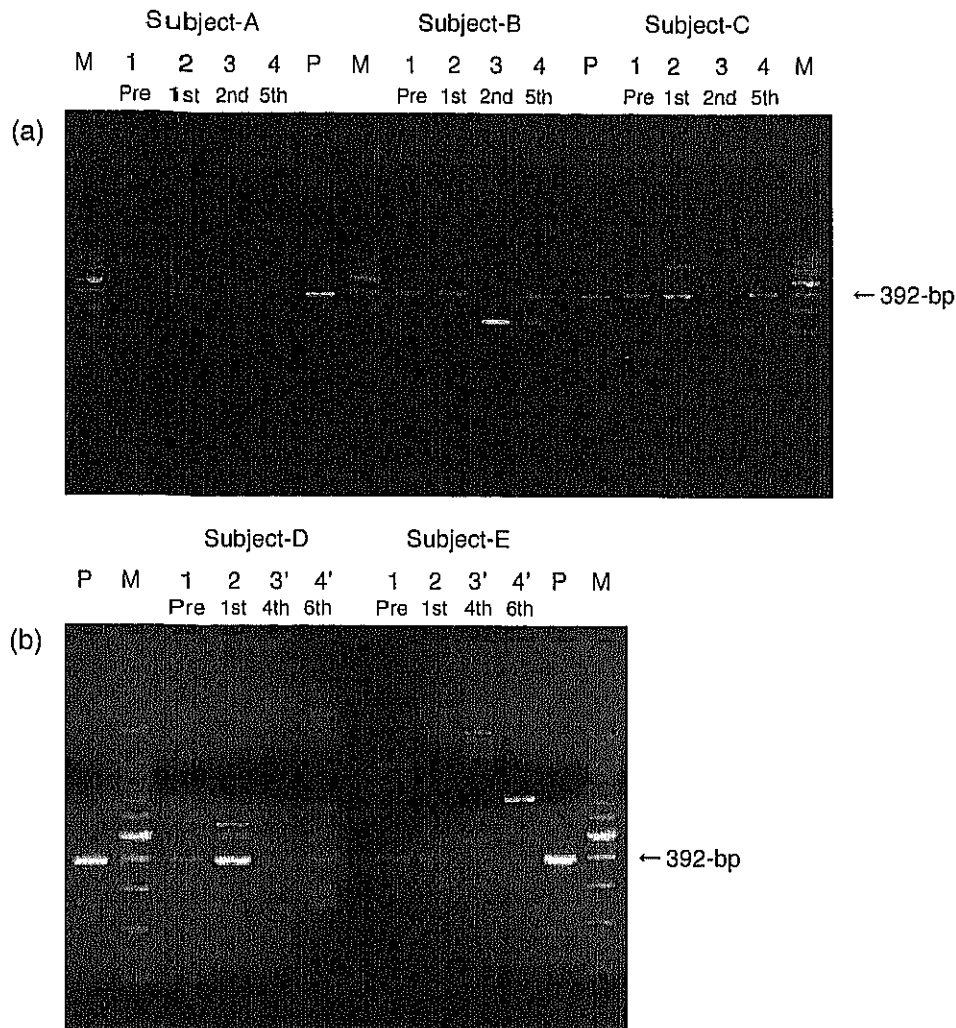


Fig. 3-9 Detection of mtDNA deletion by PCR. Fragments of mtDNA were separated on 2.5% agarose gels and stained with ethidium bromide. The size marker is shown as (M) on the photographs. The positive control (P) is from the muscle of a patient with progressive external ophthalmoplegia. Each band of length 392 bp in these pictures shows the common deletion. The results of subjects A, B, and C are shown in (a). The lanes (shown for each subject) were run with material obtained under the following conditions: Lane 1, before exercise (Pre); Lane 2, one day after exercise; Lane 3, two days after exercise; Lane 4, five days after exercise. The results of subjects D and E are shown in (b). The lanes (shown for each subject) were run with material obtained under the following conditions: Lane 1, before exercise (Pre); Lane 2, one day after exercise; Lane 3', four days after exercise; Lane 4', six days after exercise.

(4) 考 察

急激な負荷運動によって起こされた酸化ストレスの骨格筋細胞に対する影響を調べた研究がいくつか報告されている (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。Sakai ら (1999) は急激な運動負荷がラット

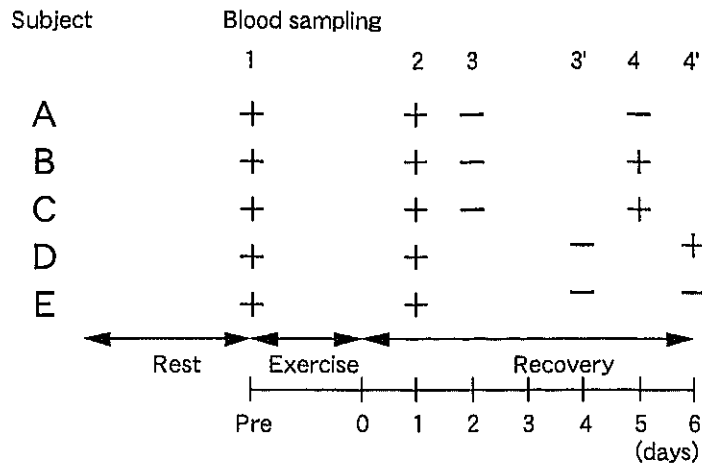


Fig. 3-10 This figure shows a summary of the results obtained. The symbol "+" indicates when the common deletion appeared, and "-" indicates when it disappeared.

の骨格筋の mtDNA に欠失変異を起こすことを示し、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した。

本研究では、白血球の mtDNA⁴⁹⁷⁷ の欠失は、特別な運動を行っていない通常のライフスタイルで生活している 5 人の被験者全員から運動開始前にすでに検出された。

この結果について、以下のようないくつかの可能性が考えられる。1) 運動前の 5 日間の休養期間中は、被験者は活動的な運動を控えるよう指示されていたが、それ以前の活動的なライフスタイルの影響が表れた、2) 被験者に標準的な日常生活を送るように指示していたが、被験者の毎日の生活は非常にアクティブであったかもしれない、3) 血液と組織に対する酸化ストレスの影響が異なっている、4) 被験者は健康で若いにもかかわらず、すでに common deletion を蓄積していた、5) 運動以外に欠失変異の出現に影響を及ぼす未知のファクターが存在し、運動よりも強い影響を与えた。

1 番目の可能性については、回復期にダイナミックな変化が観察されたことから現実的にはありそうもない。また、2 番目の可能性については、比較的軽い運動負荷の mtDNA⁴⁹⁷⁷ に対する影響がまだ未知であるため、明確な結論を下すことは難しい。また、3 番目の可能性については、説明を検討するための十分な証拠がない。4 番目の可能性については、回復期の期間にすべての被験者で common deletion が一時的に消失したことから、その可能性はないものと考えられる。最後に、5 番目の可能性については、この分野の研究がはじまったばかりであり、今後の研究を通して他のファクターについても検討していく必要があるかもしれない。

Holt ら(1988)による研究で、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%が mtDNA⁴⁹⁷⁷ の欠失変異を示したことが報告された。mtDNA⁴⁹⁷⁷ 欠失変異はまた、アルツハイマー病のような高齢者に関連した疾患、あるいは老化に伴って蓄積することがわかっている (Blanchard, et al., 1993)。しかしながら、本研究では、白血球の mtDNA⁴⁹⁷⁷ 欠失変異が運動の前に 5 日間運動することを控えていた 5 人の若く健康な女性で検出された。そのため、この欠失変異は一般的な母集団でもしばしば起こるように思われる。

間接的に酸化性的 DNA 損傷を示すために使われるすべてのバイオマーカーの中で、8-OH-dG のレベルは最も多く用いられるものの 1 つである。Viguie ら (1993) は、尿中の 8-OH-dG レベルが、65% VO₂max において 90 分間エルゴメータ運動 3 日間の後に、24 時間尿で運動前のレベルのおよそ 400 pmol/kg/日 からおよそ 300 pmol/kg/日 まで減少したと報告した。さらに、Inoue ら (1993) は、男性の水泳選手での 8-OH-dG の尿中濃度が典型的なトレーニングセッションの後に 54% 減少したことを報告した。Inoue ら (1996) はまた、男性の剣道選手から最大運動時のリンパ球の核 DNA で 8-OH-dG のレベルを調べ、運動直後および 1 時間後に 14 ~ 16% の増加を、さらに運動終了から 24 時間後に運動前のレベルと比較して 14% の低下を報告した。彼らはまた、40% VO₂max の運動において、細胞内 8-OH-dG レベルにおいて、運動直後と 1 時間後に 16% の減少がみられたが、24 時間後に運動前のレベルに戻ったと報告した。これらの報告は酸化性的 DNA 損傷の修復が適度な運動によって促進されることを示唆する。したがって、適度な運動によって酸化性的な mtDNA 損傷の修復が促進される可能性がある。

なお、組織と白血球における mtDNA の違いについて検討しておく必要がある。Hartmann ら (1994) は、Single Cell Gel (SCG) テストを用いて、運動後にヒトの血液細胞に DNA 損傷がみられることを報告した。身体活動後の DNA への影響が、無酸素性作業閾値 (AT) を超えた運動プロトコルの後に続いて検出された。そのため、活性酸素との関連が提案された。本研究においても、mtDNA⁴⁹⁷⁷ 欠失変異が白血球で検出され、そして運動によって誘発された mtDNA⁴⁹⁷⁷ 欠失変異がまた他の組織、特に活性酸素が生成される部位でも起こっていたと想定されたが、被験者に対する負担を考え、この研究では組織ではなく、白血球から抽出された mtDNA が使われた。

また、運動強度の影響に言及することは重要である。Leaf ら (1997) は、酸化性ストレスが仕事率に沿って直線的に増加せず、それが乳酸閾値 (LT) を超えた場合に急激に増加することを示した。しかしながら、本研究では運動前のサンプルで、すべての被験者の白血球中に mtDNA⁴⁹⁷⁷ 欠失変異が存在していることが明らかになった。Iwai ら (2002a) は、mtDNA⁴⁹⁷⁷ 欠失変異が生体内で比較的低い運動強度でも出現することを報告している。また、Iwai ら (投稿中) は、40 W の運動負荷での自転車エルゴメータ運動後では白血球の mtDNA に common deletion は出現しないが、80 W の負荷の場合には common deletion が出現したことを報告した。したがって、mtDNA⁴⁹⁷⁷ 欠失変異が起こる運動負荷の閾値を見つけるにはさらに詳細な研究を必要とする。

本研究は、持久性運動を行った後に白血球細胞で起こる mtDNA⁴⁹⁷⁷ 欠失変異の出現と消失のダイナミックな性質を明らかにした。特に、休養期間に観察された白血球での mtDNA⁴⁹⁷⁷ の欠失変異が運動後にはすべての被験者で一度消失した。mtDNA の場合、損傷した DNA の修復機構は十分でないことから、我々は、この欠失を持った mtDNA は溶解酵素によって壊される可能性が高いと考えている。したがって、適度な持久性の運動によってこの溶解酵素の活性が高まった結果であると推察している。

この欠失を持った mtDNA の修復機序や欠失の消去の機序についてはまだほとんど明らかになっていない。今後、さらに綿密な実験が必要である。

(5) 小 括

持久性運動の後に、ヒトの白血球の mtDNA の欠失の出現と消失の時間経過を調べた。5 人のトレーニングされていない健康な女性（平均年齢: 20.2 ± 0.4 歳）が、自転車エルゴメータを用い、60 rpm の速度において 50 ~ 60 W の負荷で 30 分間の運動を 2 ~ 3 日間連続して実施した。血液サンプルは運動前に 1 回、運動終了後に 3 回、計 4 回採血された。白血球細胞から抽出した mtDNA はネスト PCR 法を使って分析された。運動前に、すべての被験者で mtDNA の common deletion が観察された。この common deletion は運動期間の終了から 1 日後にすべての被験者で再び観察された。しかしながら、この common deletion は、3 人の被験者で運動の 2 日後に、また他の被験者では 4 日後に消失したことが明らかになった。その後、common deletion は 5 人の被験者中 3 人で運動終了から 5 ~ 6 日後に再び現われた。これらの結果により、白血球中の common deletion が持久性運動の数日後に消失することが明らかになった。このように、白血球における mtDNA の common deletion の出現と消失の状況は非常にダイナミックであることがわかった。