

第4章 スポーツ領域における応用

第1節 シャトルランテストによる 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, この欠失 mtDNA の量は老化に伴って増加することが報告されている (Hayakawa, et al., 1992)。そのため, 変異した mtDNA 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)。特に, 運動時の酸素消費量は安静時の 10 ~ 40 倍に増加するため, 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。このような環境下において, mtDNA の損傷は頻繁に発生する可能性が高いといえる。それに加え, mtDNA には核 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 は核 DNA と比較して形態・機能的な違いが多く見られている (Bandy, et al., 1990)。これらの事実から類推すると, mtDNA の変異は急激な運動負荷により増大するかもしれないと考えられる。

そのような中で, Iwai ら (2002a) は, 持久性運動を行うことにより白血球の mtDNA に欠失変異 (common deletion) が出現し, その後の数日間の休養により消失することを報告した。また, Iwai ら (2003a) は, 運動前の日常生活ですでに白血球の mtDNA に common deletion がみられている者に対し, 自転車エルゴメータによる運動を行ったところ, 2 ~ 4 日後には common deletion が消失したことを報告した。これらの結果から, 持久性運動は mtDNA に変異を起こすだけでなく, 変異した mtDNA を消去するための機能を高める可能性を指摘している。

そこで, 本研究では, スポーツ領域への応用の一つとして, シャトルランテストを実施し, 一過性のかなり強い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かどうかを探った。そしてさらに, その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

本研究では、2名の健康な成人を対象とした。1人は22歳の女性（以下被験者A）で、もう1人は21歳男性（以下被験者B）であった。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（承認番号：No. 55）。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、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) 運動と採血

実験のプロトコルは、Fig. 4-1に示した。

各被験者は運動を実施する前に4日間の休養を確保した。この期間にはできるだけ運動を避け、なるべく通常の日常生活を送るよう心がけた。そして、運動開始の前日に、第1回目の採血を行った。

その後2日間にわたって運動を実施した。第1日目は、コンディショニングを整えることを目的とし、トレッドミルを用いて、非常に軽い負荷のランニングを10分間行った。そして、第2日目には、シャトルランテストを実施した。シャトルランテストは、文部科学省が実施している体力・運動能力テストの測定種目の1つで、全身持久力を測定する検査項目である。20m間隔の2本の平行線の間を、一定の間隔で鳴る電子音に合わせて往復するもので、電

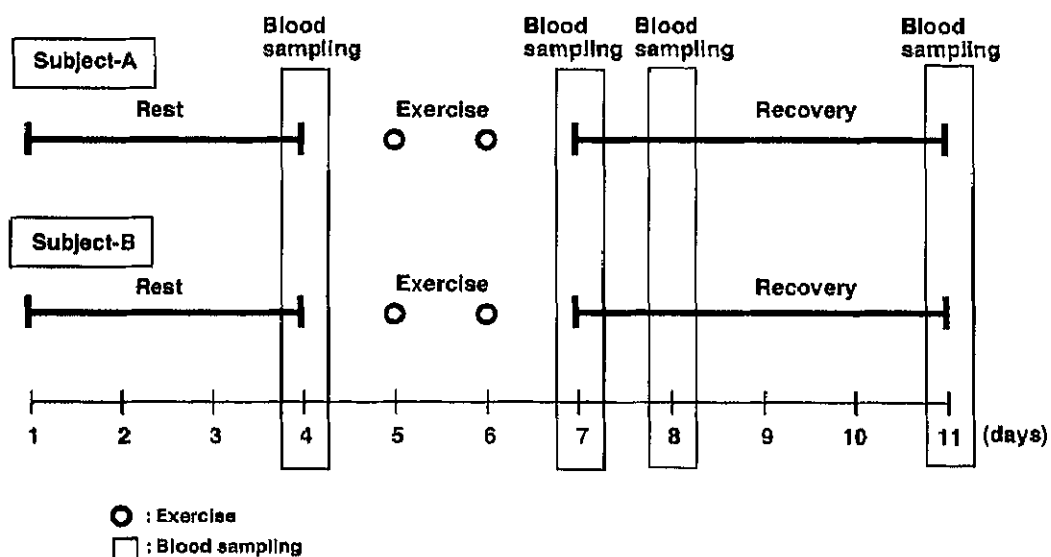


Fig. 4-1 Experimental design. All subjects performed exercise on two day. Four blood samples were withdrawn from each subject, once before exercise and three times thereafter.

子音が鳴るときには必ずどちらかの線上に足が触れていなければならない。電子音の間隔は1分ごとに短くなり、走速度は少しずつ増加していく。設定された速度を維持できなくなり、走るのをやめた時、または2回続けてどちらかの足で線に触れることができなくなった時に、走行を終了した。

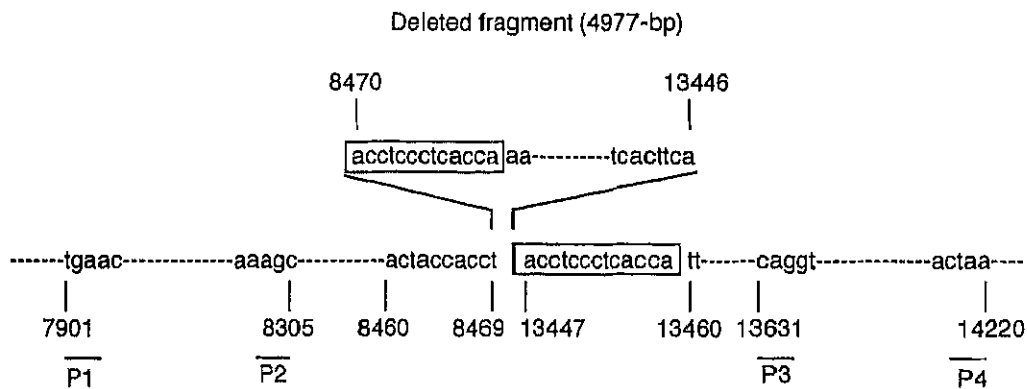
シャトルランテストによる運動終了後は、再び通常の日常生活を送るよう心がけ、特別な運動を控えた。運動期間終了後の採血は、シャトルランテストによる運動を実施した翌日（1日後）、2日後、および5日後に計3回実施し、それぞれ2 mlの血液を採取した。

3) DNAの抽出

トータルDNA（核DNA + mtDNA）の抽出は、DNA Extractor WB Kit（和光純薬工業、日本）を用い、抹消血白血球から所定の手順に従って抽出した。

4) PCR (Polymerase Chain Reaction) 法

PCR法（DNA合成酵素連鎖反応法）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。まず、鋳型となるDNA2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つ



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. 4-2 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.

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。

本研究では、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; Iwai, et al., 2002a）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. 4-2）。最初の PCR 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（岩城ガラス，TRS-300，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。

5) 電気泳動

PCR 生成物からの欠失の検出は、アガロースゲル電気泳動とエチジウムブロマイド染色で行った。トランスイルミネーター(UVP)上でDNAバンドに紫外線(UV)を照射して可視化し、ポラロイドカメラで撮影した。common deletionの有無の判定は、サンプルと同時に電気泳動したサイズマーカーおよびポジティブコントロールとの比較によって行った。

(3) 結果

シャトルランテストの実施による白血球の mtDNA の欠失出現の状況は、Fig. 4-3 に示した。

被験者 A、および被験者 B の両被験者ともに、運動前の段階ですでに白血球の mtDNA には common deletion が認められた。

運動後の状況については、被験者 A では、運動終了後の翌日と 2 日後においても common deletion が認められた。そして、運動終了から 5 日後のサンプルからは、common deletion が消失した。

また、被験者 B でも同様に、運動終了後の翌日と 2 日後において common deletion が認められたが、運動終了から 5 日後には common deletion は消失した。

これらの結果から、両被験者とも白血球中の mtDNA の common deletion は、運動期間の前から出現していたが、運動終了から 1 日後、2 日後にも欠失は残存し、運動終了から 5 日後には欠失が消失することが明らかになった。このように、シャトルランテストによる common deletion の出現と消失のパターンは、両被験者とも同様の傾向を示した。

(4) 考察

運動を行うことによって酸素摂取量が安静時よりも増加し、そのため大量の活性酸素が産生されることが報告されている（Chance, et al., 1979）。そして、その活性酸素によって

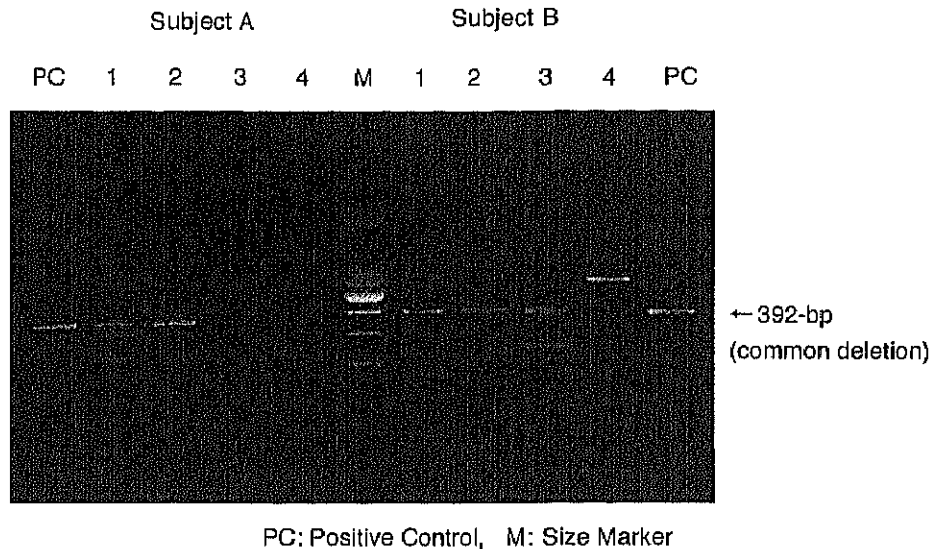


Fig. 4-3 Detection of mtDNA deletion by PCR. Fragments of mtDNA were isolated on 2.5% agarose gels and stained with ethidium bromide. Size marker is shown in (M). Positive control (PC) is from muscle of a patient with progressive external ophthalmoplegia. Each band on the length of 392 bp in the picture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

mtDNA の点変異が起り、点変異の蓄積によってさらに mtDNA の欠失が引き起こされることが報告されている (Linnane, et al., 1989; Inoue, et al., 1999)。

核 DNA に関しては、生体には酸化ストレスに対する抗酸化機能が働いており、適度の運動を実施することによって DNA 修復酵素が活性化することが報告されている (Kasai, 1997)。しかしながら、mtDNA の場合にはこの修復機能が十分ではなく、さらに common deletion のような大きなサイズの欠失の場合、おそらく修復することは不可能であろうと考えられる。したがって、common deletion を持った mtDNA が蓄積したミトコンドリアは機能を失って死滅し、消去されるものと考えられる。そのため、変異 mtDNA の消失までには数日程度の期間が必要となるのではないかと考えられる。Iwai ら (2003a) は、運動実験前の日常生活においてすでに白血球の mtDNA に欠失がみられている者に対して中程度の負荷の持久性運動を行ったところ、欠失の消失が促進される可能性を報告した。

本研究においても、運動前から白血球の mtDNA に欠失がみられていた被験者に短期間の激しい運動 (シャトルラン・テスト) を行うことによって、その後も数日間にわたって欠失が出現する状況が示された。しかし、その欠失は蓄積されることなく、一定期間の休養をとることによってしだいに消失していく傾向が明らかになった。1 人の被験者では運動終了から 2 日後には欠失のバンドがかなり薄くなっており、欠失が消失する傾向が認められている。しかし、今回の実験では 5 日後には欠失が消失しているものの、3~4 日後には採血しておらず、実際に欠失が何日後に消失したかは明らかになっていない。50~60 W の負荷で自転車エルゴメータによる運動を行った場合には、2~4 日後に欠失が消失したことが報告されている (Iwai, et al., 2003a)。この場合、運動負荷は最大酸素摂取量の約 50% 程度であっ

たと推定されている。一方、本研究で行ったシャトルランテストは最大運動テストであり、最大酸素摂取量の100%に相当する。したがって、最大運動テストの場合、欠失の消失までの日数がやや長くなる可能性はうかがえるものの、最大運動テストによる欠失出現の違いについては、今回は必ずしも十分明らかにならなかった。

なお、被験者Bの場合、運動終了から2日後、および5日後のレーンには、それぞれ common deletion とは異なる長さのバンドが示されている。2日後のサンプルで common deletion とともに見られているバンドは、alternative deletion と命名されているものである (Iwai, et al., 投稿中)。また、5日後のレーンで見られているバンドは、プライマーが核 DNA にある mtDNA 様配列に反応した結果であることが報告されている (岩井ら, 2002b)。

(5) 小 括

ヒトの白血球の mtDNA で、一過性の最大負荷運動の後に欠失変異 (common deletion) の出現と消失の時間経過を調べた。日常的にトレーニングしていない若く健康な被験者2名が、最大運動 (シャトルランテスト) を実施した。血液サンプルが、運動実施前に1回、運動終了後に3回、計4回採取された。白血球から抽出された mtDNA はネスト PCR 法を使って分析された。両被験者とも、運動実施前の白血球の mtDNA からすでに common deletion の存在が確認された。この common deletion は、両被験者ともに、シャトルランテストの終了から1日後、および2日後においても再び確認された。しかしながら、運動終了から5日後には、両被験者ともに欠失が消失したことが明らかになった。これらの結果は、白血球での common deletion が強い負荷の持久性運動から数日後に消失したことを示している。今回の実験結果からは、最大運動テストの場合には mtDNA の欠失が消失するまでの日数がやや長くなる可能性がうかがえるものの、それを確定するには必ずしも十分ではなかった。白血球における mtDNA の common deletion の出現と消失の状況は、最大運動テストの場合においても非常にダイナミックであることが明らかになった。

第2節 バスケットボール合宿による mtDNA の変異

(1) はじめに

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のみ存在すると考えられてきた (Ikebe, et al., 1990)。しかし、近年になり、アルツハイマー病、糖尿病、パーキンソン病、ピアソン病、心筋症といった様々な疾患患者の組織の mtDNA にも多く蓄積していることが明らかになった (Van den Ouweland, et al., 1992; Obayashi, et al., 1992; Hatchin, et al., 1995; Rotig, et al., 1998)。

また、健康なヒトにおいても、加齢とともに mtDNA の突然変異が蓄積することが報告されている (Rotig, et al., 1998)。これらの突然変異の中でも、加齢に伴って特に頻繁に現れる欠失があり、common deletion と呼ばれている。この欠失は、ヒトの mtDNA の場合、4,977 bp の欠失であり、加齢とともに指数関数的に増加することが明らかにされている (Miquel, et al., 1980)。このような事実に基づいて、欠失の蓄積が老化や老化に関わる変性疾患を起しやすくしているものと推測されている (Clayton, et al., 1982)。

一方、一般に運動は生活習慣病の予防や老化防止策として効果があると考えられているが、運動を行うことによっても、この mtDNA の欠失変異が生じるとする報告がある。Sakai ら (1999) は、ラットに強度の運動をさせることで、ヒラメ筋と前脛骨筋の筋肉中の mtDNA に欠失が出現することを報告した。また、Iwai ら (2002a; 2003a) は、ヒトを対象とした実験を行い、持久性の運動により白血球の mtDNA に欠失変異 (common deletion) が出現すること、およびその後の休養期間によりその欠失は消失することを報告した。

本研究は、スポーツ領域への応用の一つとして、合宿を含むバスケットボールの練習を行った場合、白血球中の mtDNA に欠失変異が出現するか否かを探った。さらに、もし欠失変異の出現が認められた場合には、その欠失変異はどのような動態を示していくかの2点について検討した。

(2) 方法

1) 被験者およびインフォームドコンセント

本研究の被験者は、3名のバスケットボール選手であった。被験者の年齢と性別の内訳は、19歳男性 (以下被験者A)、20歳女性 (以下被験者B)、および18歳女性 (以下被験者C) であった。また、3名の被験者のバスケットボール経験年数は、いずれも9～10年であった。

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おいて審査を受け、承認された (承認番号: No. 64)。また、本研究は人間の被験者を対象とするため、ヘルシンキ宣言のガイドラインに従って実施された。すべての被験者は、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。また、実験前に医師による事前の健康チェックを受け、一連の実験を行うことに支障がないことを確認した。

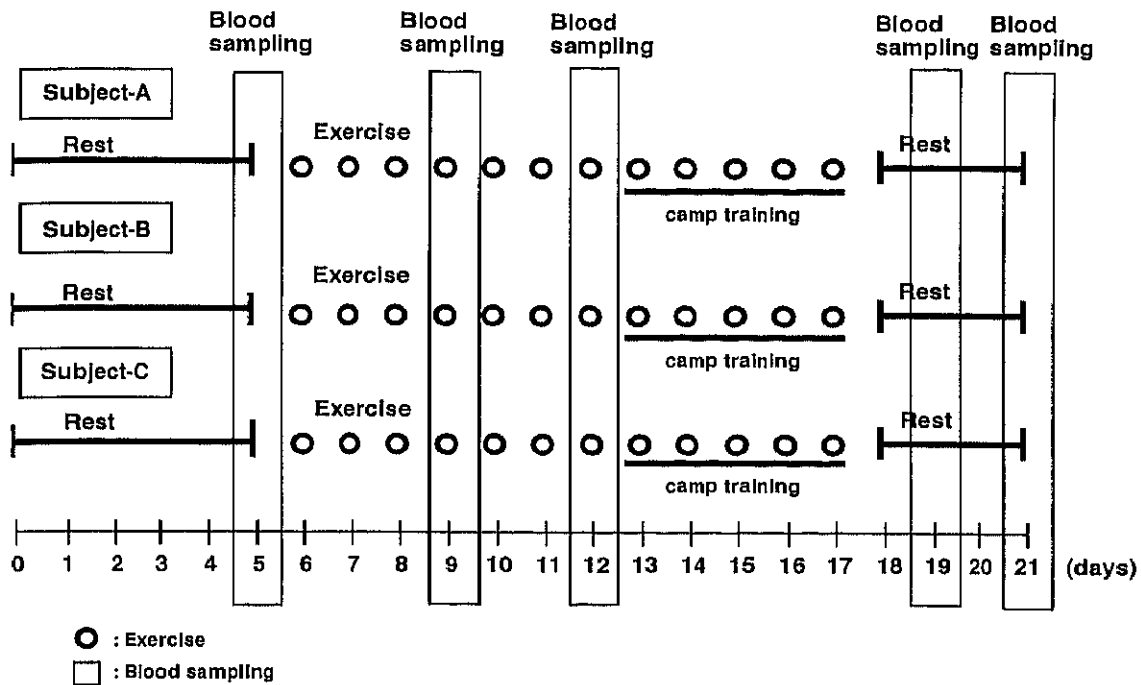


Fig. 4-4 Experimental design. All subjects performed exercise on two day. Four blood samples were withdrawn from each subject, once before exercise and three times thereafter.

2) 運動プログラムと採血

実験のプロトコルは Fig. 4-4 に示した。

まず、3名の被験者は運動実施前に5日間の休息を確保した。その期間はすべての運動を控え、通常の日常生活を過ごすよう心がけた。そして、バスケットボールの練習を開始する前に、第1回目の採血を行った。

被験者は、採血後、合宿練習に備えたコンディションを整えることを目的とし、7日間バスケットボールのトレーニングを実施した。このトレーニング期間の練習時間は、1日約3時間を費やし、主としてフットワークおよび"3メン"と呼ばれる基礎的な練習などを行った。7日間のトレーニング期間中に2回の採血を行った。その後、継続して5日間の合宿練習に入った。この期間は1日2回の練習を行い、それぞれ午前3時間、午後3時間の時間を費やした。この合宿期間の練習の運動強度は、かなり負荷の高いトレーニングを含んだ練習と考えられた。合宿終了後は、回復期間として、すべての運動を控え、通常の日常生活を送るよう心がけた。そして、合宿終了後2日目、および4日目に採血を行った。

1回あたりの採血量は2 mlで、この実験では抗凝固剤としてヘパリンを用いて処理した。

3) mtDNA の抽出

本研究の場合、白血球から mtDNA を抽出するため、mtDNA Extractor WB Kit (和光純薬工業, 日本) を用いた。なお、一連の実験では DNA Extractor WB Kit (和光純薬工業, 日本)

を使用しているが、この実験では異なる抽出キットを用いている。そのため、mtDNAの抽出の手順が他の実験と少し異なるものとなっている。

血液からの mtDNA 抽出は以下の手順で行った。

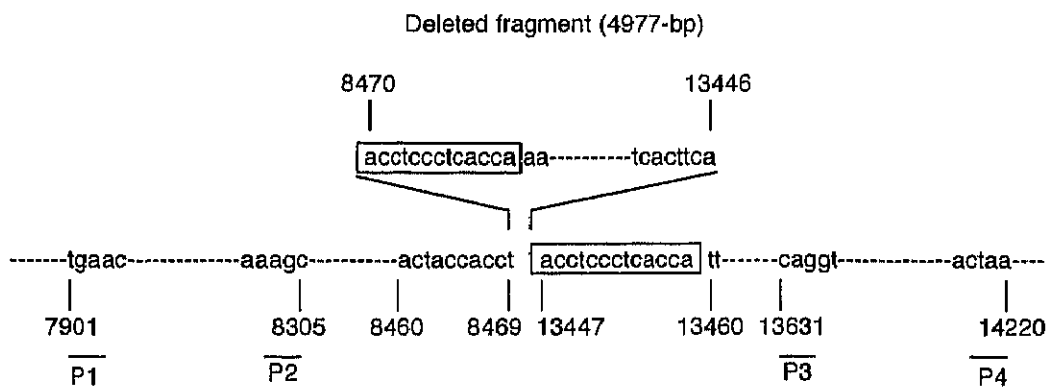
- 1) 100 μ l の新鮮血をマイクロチューブに入れる。
- 2) 200 μ l の Leukocyte Isolation Solution を加え、マイクロチューブを 10 回以上転倒混和し、十分に混合する。
- 3) マイクロチューブを室温で 15 分間静置し、二層に分離させる。
- 4) 白血球を含む上清を、ピペットで新しいマイクロチューブに移す。
- 5) 室温で 10 分間遠心 (500G) した後、ピペッティングにより上清を除く。
- 6) 500 μ l の DNA Extraction Solution I を加え、タッピングによりペレットを懸濁する。
- 7) 室温において 10 分間遠心 (500G) した後、ピペッティングにより上清を除く。
- 8) 500 μ l の DNA Extraction Solution I を加え、タッピングによりペレットを懸濁する。
- 9) 室温において 10 分間遠心 (500G) した後、ピペッティングにより上清を除く。
- 10) 50 μ l の DNA Extraction Solution I を加え、タッピングによりペレットを懸濁する。
- 11) 50 μ l の DNA Extraction Solution II(A) および 50 μ l の DNA Extraction Solution II(B) を別のマイクロチューブ内で混合し、この混合液 100 μ l をサンプルに加え、ボルテックスミキサーで 2~3 回軽く混合した後、5 分間水中におく。
- 12) 75 μ l のあらかじめ氷冷しておいた DNA Extraction Solution III を加え、ボルテックスミキサーで混合した後、5 分間水中におく。
- 13) 4°C で 5 分間遠心 (12,000G) した後、上清 (約 200 μ l) をピペットで新しいマイクロチューブに移す。
- 14) 300 μ l の Sodium Iodide Solution を加えて混合する。
- 15) 500 μ l のイソプロピルアルコールを加えて混合する。
- 16) 室温において 12,000 G で 10 分間遠心した後、上清をゆっくり除く。
- 17) Washing Solution を 1 ml 加えて混合する。
- 18) 室温において 12,000 G で 5 分間遠心した後、上清を除く。
- 19) Washing Solution を 1 ml 加えて混合する。
- 20) 室温において 12,000 G で 5 分間遠心した後、上清を除く。
- 21) ペレット (DNA 沈殿) を減圧乾燥した後、TE バッファーに溶解する。

4) 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。プライマーの位置と配列は、mtDNA 上の位置とともに Fig. 4-5 に示した。common deletion は 13 bp のダイレクトリピートによって挟まれた部分である。

5) 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、20 ng の mtDNA を、



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. 4-5 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.

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; Iwai, et al., 2002a) 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, 第 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

このようにして増幅された 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, 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 を, ポジティブコントロールとして用いた。

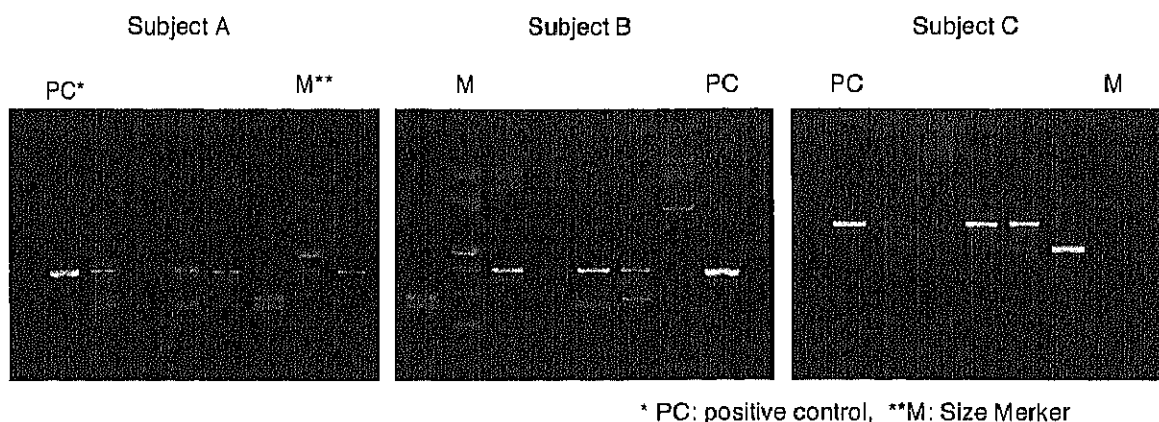


Fig. 4-6 Detection of mtDNA deletion by PCR. Fragments of mtDNA were isolated on 2.5% agarose gels and stained with ethidium bromide. Size marker is shown in (M). Positive control (PC) is from muscle of a patient with progressive external ophthalmoplegia. Each band on the length of 392 bp in the picture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

(3) 結果

まず、トレーニングを開始する前に採取した全員の血液サンプルから、白血球の mtDNA に common deletion が認められた。

その後、被験者 A の場合、トレーニング開始から 4 日目のサンプルでは common deletion が残っているものの、バンドの濃度はかなり薄くなった。そして、トレーニング開始から 7 日目のサンプルでは再び common deletion がはっきりと現れた。また、合宿後の回復期の状況については、2 日後のサンプルには common deletion が認められたが、5 日後のサンプルからは common deletion が消失した。

被験者 B の場合、トレーニング開始から 4 日目のサンプルでは common deletion が残っているものの、バンドの濃度はかなり薄くなった。そして、トレーニング開始から 7 日目のサンプルでは再び common deletion がはっきりと現れた。また、合宿後の回復期の状況については、2 日後のサンプルには common deletion が認められた。5 日後のサンプルでは common deletion が残っているものの、バンドの濃度がかなり薄くなっており、mtDNA の欠失がしだいに消失する傾向がうかがえた。

被験者 C の場合、トレーニング開始から 4 日目のサンプルでは common deletion が消失した。そして、トレーニング開始から 7 日目のサンプルでは再び common deletion が現れた。また、合宿後の回復期の状況については、2 日後のサンプルには common deletion が認められたが、5 日後のサンプルからは common deletion が消失した。

これらの結果より、バスケットボールのトレーニングおよび合宿を実施したことにより、被験者全員において mtDNA に common deletion が出現することが明らかとなった。また合宿終了後 2 日目のサンプルには欠失が現れているが、さらに休息を確保することに

より、5日目ごろには欠失が消失する傾向がうかがえた。このように、一連の実験による mtDNA の common deletion の出現と消失のパターンは、3名の被験者においてほぼ同様であった。

(4) 考 察

これまでもラットを用いた高負荷の運動による骨格筋の細胞の損傷に関して、酸化ストレスの影響に焦点を当てたいくつかの研究が実施されている (Gee, et al., 1981; Alessio, 1988)。しかしながら、これらの研究では、生化学あるいは組織化学の側面からの検討にとどまっていた。一方、Sakai ら (1999) は、ラットを用いた実験を行い、強い一過性の運動負荷がヒラメ筋および前脛骨筋の mtDNA で common deletion を引き起こすことを報告した。そして、強い運動負荷による酸化ストレスが、このような mtDNA の欠失変異の出現に影響を及ぼしたと結論づけた。

本研究では、ヒトの白血球細胞から mtDNA を抽出し、合宿練習を含むバスケットボールの激しいトレーニングを行うことにより、mtDNA に common deletion が出現することを明らかにした。バスケットボールの練習は、ダッシュ、ジャンプ、方向変換など様々な動作が含まれており、また長時間継続して運動を行うことから無酸素性運動の側面と有酸素性運動の側面を併せ持っている。本研究において、バスケットボールトレーニング後に common deletion が観察された要因としては、運動中に酸素摂取量が増大し、その結果としてミトコンドリア内に活性酸素が大量に発生するため、その酸化ストレスにより mtDNA に欠失変異が起こったものと考えられる。

本研究では、日常的にトレーニングを行っている被験者から、運動期間前、運動期間中、および運動期間後と継続的に血液サンプルを採取することができた。それにより、mtDNA の欠失の動態について、より詳細な状況を把握することができた。欠失は、練習を継続的に実施している期間においては続けて出現していたが、連続的な休養期間を設けることにより、欠失は蓄積することなく、運動期間後5日ほどで消失するか、あるいは消失する傾向がうかがえた。この状況は、iwai ら (2002a; 2003a) の報告とほぼ同様であるといえる。

なお、今回の結果から、バスケットボールのトレーニングを継続的に行った場合、白血球の mtDNA の common deletion は増加・減少しながら推移していることがうかがえた。これは、common deletion の出現と消失が同時に起こり、欠失の状態は非常にダイナミックに変化していることが推察された。

(5) 小 括

バスケットボールの合宿練習を含む激しいトレーニングを行った場合において、ヒトの白血球中の mtDNA で欠失の出現と消失の時間経過を調べた。バスケットボール競技経験年数が約10年と、よくトレーニングされた若く健康なバスケットボール選手3名を被験者とした。血液サンプルは合宿前のトレーニング開始の直前に1回、合宿前のトレーニング期間中に2回、および合宿練習終了後に2回、計5回採取された。なお、合宿前のトレーニング期間前、および合宿練習終了後には、特別な運動を避け、通常の日常生活を送るよう心がけ

た。白血球から抽出された mtDNA はネスト PCR 法を使って分析された。トレーニング期間前の mtDNA サンプルでは、全被験者で common deletion が確認された。各被験者とも、トレーニング期間中ではこの common deletion はほとんど消失しなかったものの、common deletion を示すバンドの濃度が薄くなるなど、欠失 mtDNA の状態に変動がうかがえた。合宿練習期間が終了した後のサンプルについては、合宿練習の終了から 2 日後では全員に common deletion が残っていた。しかし、合宿練習の終了から 5 日後のサンプルからは、全員の血液サンプルから白血球 mtDNA の common deletion が消失した。また、3 人中 2 人のサンプルには、岩井らが alternative deletion (Iwai, et al., 投稿中) と名付けた欠失が見られた。このように、合宿練習終了から 5 日後に全被験者の common deletion が消失したことが明らかになったが、その解釈には注意が必要である。これらの結果は、白血球での common deletion が強い負荷のバスケットボール練習を継続的に行った場合には、欠失の量は多少変化している様子うかがえるが、完全に消失はしないことを示している。これは、白血球の mtDNA で common deletion の出現と消失が同時に起こっている可能性が考えられる。このように、白血球における一連の mtDNA の common deletion の出現と消失の状態は非常にダイナミックであることが明らかになった。

第3節 異なる負荷の筋力トレーニングによる 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、この欠失 mtDNA の量は老化に伴って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、酸化的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)。特に、運動時の酸素消費量は安静時の 10 ~ 40 倍に増加するため、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。このような環境下において、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、mtDNA には核 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 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)。これらの事実から類推すると、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、ウイスター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が mtDNA に欠失をもたらすことが報告された (Sakai, et al., 1999)。また、Iwai ら (2002a; 2003a) は、持久性の運動によってヒトの mtDNA にも欠失が出現すること、さらにその欠失の動態について報告した。しかし、持久性ではない運動を行った場合については、これまで全く報告がない。

そこで、本研究では、ヒトの白血球から抽出した mtDNA を分析し、筋力トレーニングによって mtDNA の欠失が出現するかどうかを探った。そしてさらに、その時間経過に沿って追跡することにより、mtDNA 欠失のダイナミックな変化を観察した。

(2) 方法

1) 被験者およびインフォームドコンセント

被験者は4名の健康な男性であった (平均年齢 21.8 ± 0.7 歳)。

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おいて審査を受け、承認され

た (承認番号: No. 64)。また、本研究は人間の被験者を対象とするため、ヘルシンキ宣言のガイドラインに従って実施された。すべての被験者は、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。また、実験前に医師による事前の健康チェックを受け、一連の実験を行うことに支障がないことを確認した。

2) 運動と採血

実験のプロトコルは、Fig. 4-7 に示した。

各被験者は、あらかじめ運動実施前に4日間の休息を確保した。この期間にはできるだけ運動を避け、通常の日常生活を送るよう心がけた。

運動は、筋力トレーニングマシン (Cybex 社製) を用いて、レッグ・プレスとベンチ・プレスの2種類の筋力トレーニングを2日間連続で実施した。筋力トレーニングの負荷は、およそ10 RMの重量としたが、各被験者が実施した実際の運動負荷はTable 4-1 に示している。トレーニングの実施にあたっては、1回の試技に対して6秒 (positive: 2秒, negative: 4秒) を費やすペースで行い、10回の試技を1セットとし、これを3セット行った。また、各セット間のインターバルは2分間とした。2日間のトレーニング後については休息を確保し、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。

採血は、運動開始前に1回、また運動後については運動を終了した翌日、2日後、および5日後の3回、計4回行い、それぞれ2 ml ずつ採取した。

Table 4-1 The load weight and the number of times of enforcement of weight training.

Subjects	Bench Press			Leg Press		
	負荷×回×セット (kg)	1 RM (kg)	負荷/1 RM (%)	負荷×回×セット (kg)	1 RM (kg)	負荷/1 RM (%)
Subject-A	37.0 kg x 10 x 3	57.4	64.5	75.5 kg x 10 x 3	120.0	62.9
Subject-B	26.0 kg x 10 x 3	41.1	63.3	51.0 kg x 10 x 3	97.3	52.4
Subject-C	27.0 kg x 10 x 3	38.6	70.0	75.5 kg x 10 x 3	110.7	70.0
Subject-D	33.5 kg x 10 x 3	55.0	60.9	80.3 kg x 10 x 3	135.7	59.2

* In 1RM, It is the maximum weight which can be carried out only once.

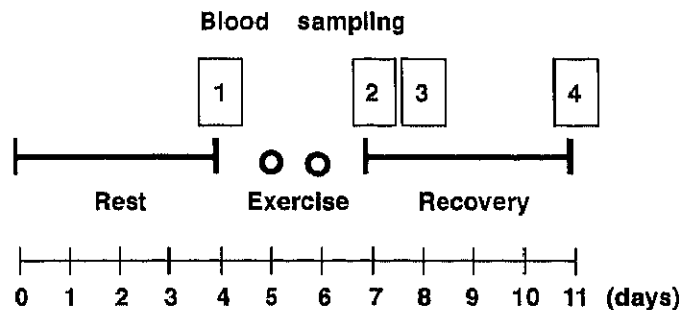


Fig. 4-7 Experimental design.

All subjects performed exercise on two day. Four blood samples were withdrawn from each subject, once before exercise and three times thereafter.

3) DNA の抽出

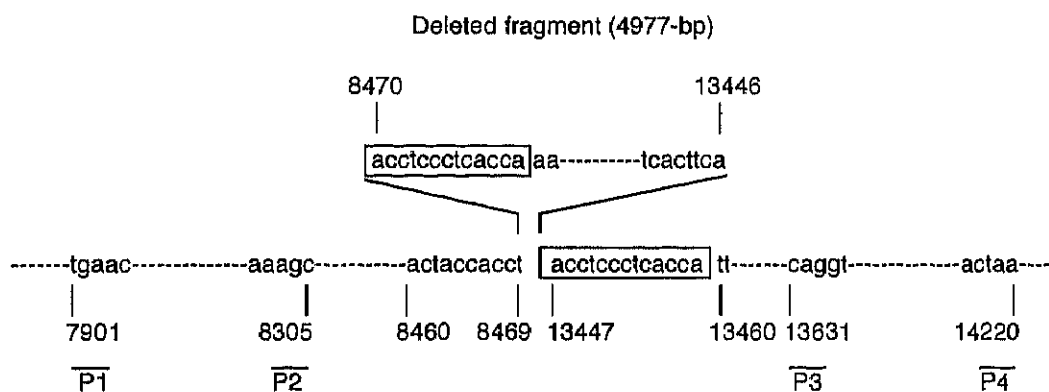
末梢血白血球から DNA Extractor WB Kit (和光純薬, 日本) を用いて, トータル DNA (核 DNA + mtDNA) を抽出した。

4) PCR 分析のためのプライマーセット

この研究で用いられたプライマーは先行研究と同様であった (Holt, et al., 1988; Shoffner, et al., 1989; Iwai, et al., 2002)。プライマーとオリゴヌクレオチド配列のサイトは, Anderson ら (1981) によって記述された mtDNA の塩基配列に沿って, Fig. 4-8 に示した。

5) 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, 20 ng のトータル DNA (核 DNA + mtDNA) を, 0.5 μM 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 μl 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。



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

Fig. 4-8 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) 電気泳動

このようにして増幅された PCR 産物を用い、 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 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、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

mtDNA の欠失の有無については、Fig. 4-9 に示した。被験者によっては、common deletion とは異なる長さの欠失である alternative deletion (Iwai, et al., 投稿中) が見られることがあったが、これらの両欠失を合わせて mtDNA の欠失とした。そして、それらの欠失の出現の有無をまとめ、Fig. 4-10 に示した。

運動前のサンプルでは、被験者 B および D に common deletion がみられた。

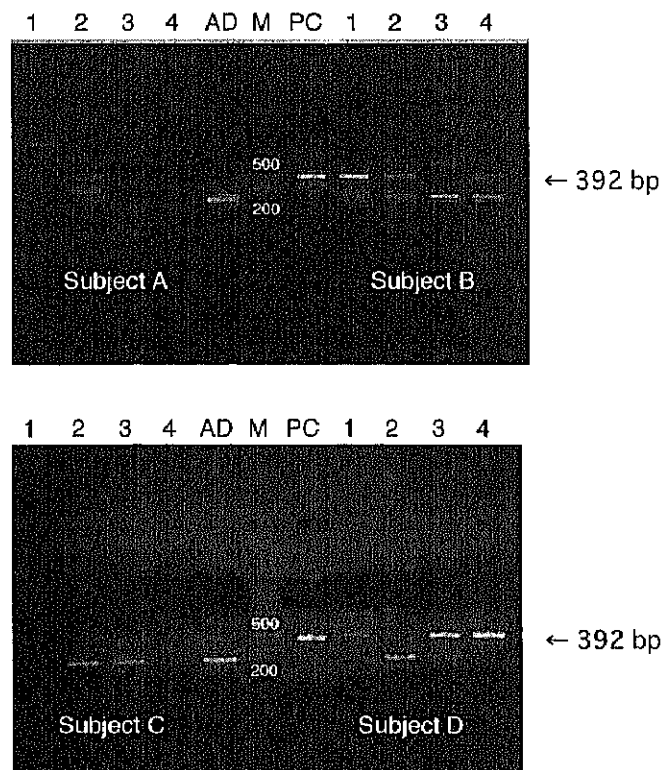


Fig. 4-9 Detection of mtDNA deletion by PCR.

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. Alternative deletion is shown in (AD). 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, one day after exercise; Lane 3, two days after exercise; Lane 4, five days after exercise.

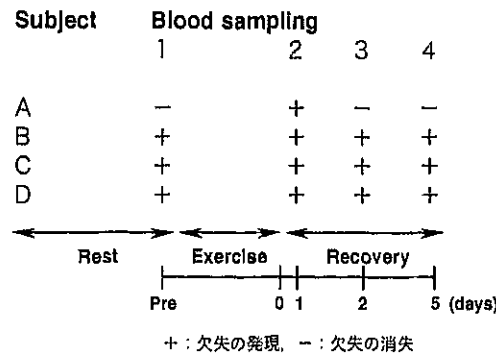


Fig. 4-10 Appearance and disappearance of mtDNA deletion, and its dynamic change (summary).

Appearance of mtDNA deletion is shown in (+), and disappearance of mtDNA deletion is shown in (-).

被験者Aの場合、筋力トレーニングの負荷は、ベンチ・プレスでは1RMの64.5%、レッグ・プレスでは1RMの62.9%に相当した。運動前のサンプルには欠失は見られなかったが、運動期間終了から1日後に欠失が認められた。その後の経過としては、運動終了から2日後のサンプルで欠失が消失し、5日後にも欠失は出現しなかった。

被験者Bの場合、筋力トレーニングの負荷は、ベンチ・プレスでは1RMの52.4%、レッグ・プレスでは1RMの63.3%に相当した。運動前から欠失が見られていたが、運動期間終了から1日後、2日後、および5日後のサンプルにも引き続き欠失が見られ、欠失は消失しなかった。

被験者Cの場合、筋力トレーニングの負荷は、ベンチ・プレス、レッグ・プレスとも1RMの70.0%に相当した。運動前のサンプルには欠失は見られなかったが、運動期間終了から1日後のサンプルに欠失が認められた。その後の経過としては、運動終了から2日後のサンプルにも欠失が残存したが、5日後のサンプルから欠失は消失した。

被験者Dの場合、筋力トレーニングの負荷は、ベンチ・プレスでは1RMの60.9%、レッグ・プレスでは1RMの59.2%に相当した。運動前から欠失が見られており、運動期間終了から1日後、2日後、および5日後のサンプルにも引き続き欠失は見られ、欠失は消失しなかった。このパターンは、被験者Bと同様であった。

これらの結果から、全員に共通してみられたのは運動期間終了後1日目のサンプルに欠失が認められたことである。その後、被験者Aと被験者Cでは欠失が一度消失したが、この2名の被験者に共通する点としては、トレーニング負荷が65～70%と比較的高かった。一方、トレーニング前後を通じて欠失がみられた2名の被験者（B、D）では、トレーニング負荷が2種目とも63.0%とやや低かった。

(4) 考 察

これまでにも、ヒトを対象に持続的な運動を実施することによって白血球のmtDNAにcommon deletionが出現したことが報告されている(Iwai, et al., 2002a; Iwai, et al., 2003a)。本研究では、短期間・高負荷の筋力トレーニングという全く異なるタイプの運動を

行ったが、このような運動によっても、運動後に白血球の mtDNA に欠失が出現することが明らかになった。

短時間・高強度の運動中の ATP 供給に占める有酸素的代謝経路と無酸素的代謝経路の割合は、0～30 秒の運動では 20：80、60～90 秒の運動では 55：45、120～180 秒の運動では 70：30 であるとされている。したがって、今回のトレーニング負荷の場合は、無酸素的代謝と有酸素的代謝の 2 つの経路がほぼ同程度に ATP を供給していると考えられる。無酸素的代謝経路では ATP 供給の際に乳酸が大量に蓄積し、この乳酸を分解するために大量の酸素が消費される。一方、有酸素的代謝経路では、ミトコンドリア内で行われる酸化リン酸化反応によって ATP が合成されるが、このときにも大量の酸素が消費される。安静時においては、身体に取り込んだ酸素のうち、2～5% が活性酸素になることが明らかになっている。運動時においては、大量の酸素を摂取することから、ミトコンドリア内で発生する活性酸素の量もかなり増加することになる。その結果として、酸化ストレスにより mtDNA に欠失変異が出現したものと推察される。

これまで、酸化 DNA 損傷の指標としては 8-OH-dG 排泄量が用いられている。酸素消費量の増加が尿中 8-OH-dG 排泄量の増加に関連していることから、運動によって酸素摂取量が増大するのに伴って活性酸素の生成が促進され、その結果 DNA の酸化損傷を引き起こしているものと考えられている。Inoue ら (1996) は、剣道部男子学生を対象として、リンパ球中の核 DNA 中の 8-OH-dG に及ぼす運動強度の影響を調べ、最大運動では運動直後と 1 時間後の 8-OH-dG 量が運動前より 16～14% 高い値を示し、24 時間後には運動前よりも 14% 低下していたことを報告した。そして、40% VO_2max の運動の場合には、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と報告している。一方、ヒトの一過性の疲労困憊運動において運動後の尿中 8-OH-dG 排泄量は変化せず、尿中 8-OH-dG 排泄量からの DNA の酸化損傷は認められないとする報告もある。

Inoue ら (1996) の報告からは、酸化 DNA 損傷の修復が適度の運動により促進される可能性が考えられる。本研究においても、運動負荷が軽い被験者の場合には、5 日間のリハビリ期間後にも mtDNA の欠失が消失しない状況が認められており、筋力トレーニングを実施した場合においても一定レベル以上の運動負荷により、欠失を持った mtDNA の消去・再生を行う酵素の活性が促進される可能性がうかがえた。

本研究の場合、被験者が 4 人と少なかったため、今回の結果のみで推論するのは必ずしも十分ではないが、筋力トレーニングの際にも適度な負荷を設定することにより、健康を維持する効果が期待できるかもしれない。

(5) 小 括

本研究では、筋力トレーニングマシンを用いたアイソトニック運動によって起こされた欠失 mtDNA の出現と消失の経時的変化を調べた。4 人のトレーニングしていない健康な男性 (年齢：21.8 ± 0.7 歳) が筋力トレーニングマシンを用いて、レッグプレスとベンチプレスの 2 種目の筋力トレーニングを 2 日間連続で実施した。各被験者の血液サンプルは、運動前と運動後 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 法を用いて分析された。運動開始前の段階で、4 名中 2 名にすでに欠失が見られた。運動終了から

1日後の mtDNA サンプルからは、全員に欠失が認められた。その後、2名は運動終了から2日後、あるいは5日後のサンプルで欠失が消失した。一方、2名の被験者では、運動前後を通じて、一貫して欠失が認められた。

実験前の仮説では、運動中に大量の酸素を消費するタイプの運動ではないため、運動の実施によって欠失が出現しない可能性もあると考えていたが、実験の結果では全員で欠失が認められた。なお、運動後2日目、あるいは5日目に欠失が消失した2名の被験者については、他の2名よりもやや運動負荷が高かったことから、一定レベル以上の負荷の運動を行ったことにより、欠失 mtDNA を持った白血球細胞を消去し、新たな細胞を造血によって新生するメカニズムが活性化した可能性も考えられる。