

## 第5章 本研究に付随した新たな発見

### 第1節 alternative deletion の発見

#### (1) はじめに

この一連の研究では、持久的運動負荷によって白血球の mtDNA に欠失変異が出現し、数日間の休養後には欠失が消失する機序を追跡していたが、その実験中に、異なる2名の被験者から検出の目標としていた common deletion とは異なる長さのバンドを発見した。そこで、シーケンス分析を行い、既知の mtDNA のシーケンスと比較し、この欠失の塩基配列の構造を探った。

#### (2) 方法

##### 1) 被験者およびインフォームドコンセント

本研究で用いた血液サンプルは、若く健康な2名の被験者から採取された。被験者の1人は20歳の女性（以下被験者A）で、もう1人は21歳の男性（以下被験者B）であった。両被験者は実験内容について説明を受けた後、参加同意書に署名し、また医師のチェックにより運動の実施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) 運動と採血

本研究では、2名の被験者に対して異なる実験プロトコルが行われた（Fig. 5-1）。

被験者Aに対して行われた実験プロトコルは次の通りである。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、通常の日常生活を心がけた。そして、運動前にまず第1回目の採血を行った。そして、採血後とその翌日の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 Wの強度で60 RPMの速度を保ち、30分間の運動を行った。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、運動後2日目と3日目、および6日目に採血を行った。

次に、被験者Bに対して行われた実験プロトコルは次の通りである。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、通常の日常生活を心がけた。そして、運動前にまず第1回目の採血を行った。そして、採血後翌日から2日間、運動を実施した。まず、1日目はコンディショニングを整えるため、トレッドミルを用いて非常に軽い負荷のランニングを15分間行った。そして、2日目には、文部科学省で実施している体力・運動能力テストの種目の1つであるシャトルランテストを実施した。運動期間後は、通常の日常生活

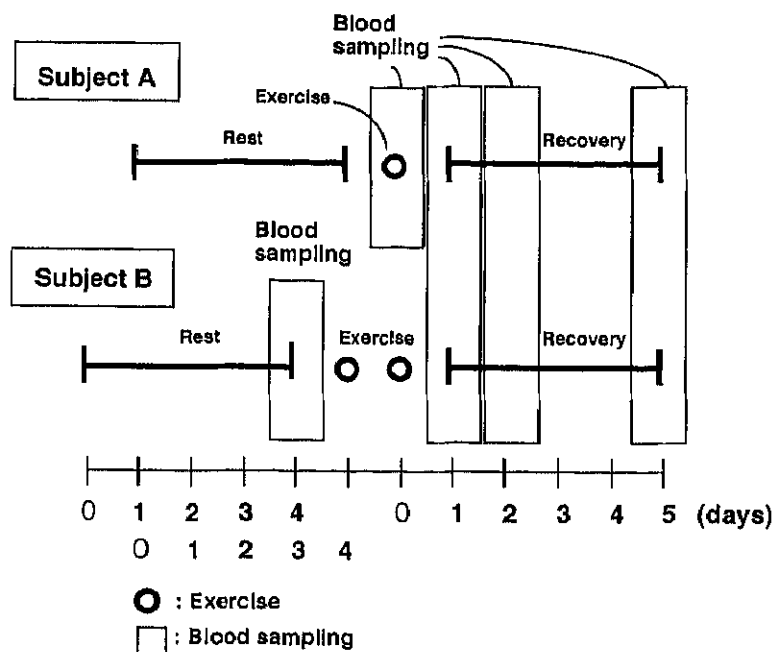


Fig. 5-1 Experimental design. Two subjects performed exercise. Four blood samples were withdrawn from each subject, once before exercise and three times thereafter.

を心がけ、それ以外の運動を行わなかった。そして、運動後1日目と2日目、および5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

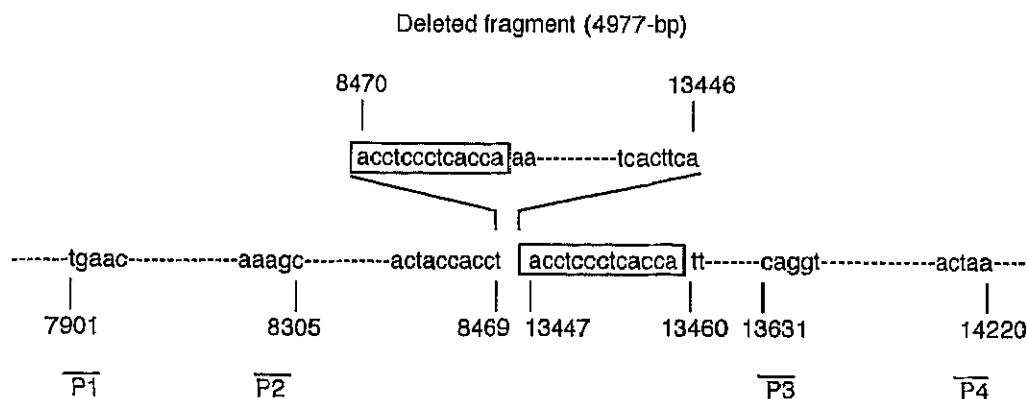
被験者から採血された末梢血液の白血球細胞よりトータルDNA (核DNA + mtDNA) を抽出した。トータルDNAの抽出にはDNA Extractor WB Kit(和光純薬工業, 日本)を用いた。

### 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。プライマーとオリゴヌクレオチドのサイトは、Fig. 5-2に示している。プライマーは、P1 (ヌクレオチドポジション:7,901-7,920) と P4 (14,220-14,201) , および P3 (8,282-8,305) と P4 (13,650-13,631) の2つの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 (mtDNA<sup>4977</sup>) 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-



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. 5-2 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.

Taq ポリメラーゼ (宝酒造, 日本) を含んだ 10  $\mu$ 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, 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。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。

Common deletion 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の位置との比較によって行った。なお, ポジティブコントロールは, 慢性進行性外眼筋麻痺症患者 (CPEO) の筋から採取されたものを用いた。

## 6) シークエンス分析

さらに, DNA シークエンス分析を行い, common deletion の塩基配列, および異なる長さの欠失の塩基配列を決定した。なお, シークエンス分析は, サワデーテクノロジー社に依頼した。

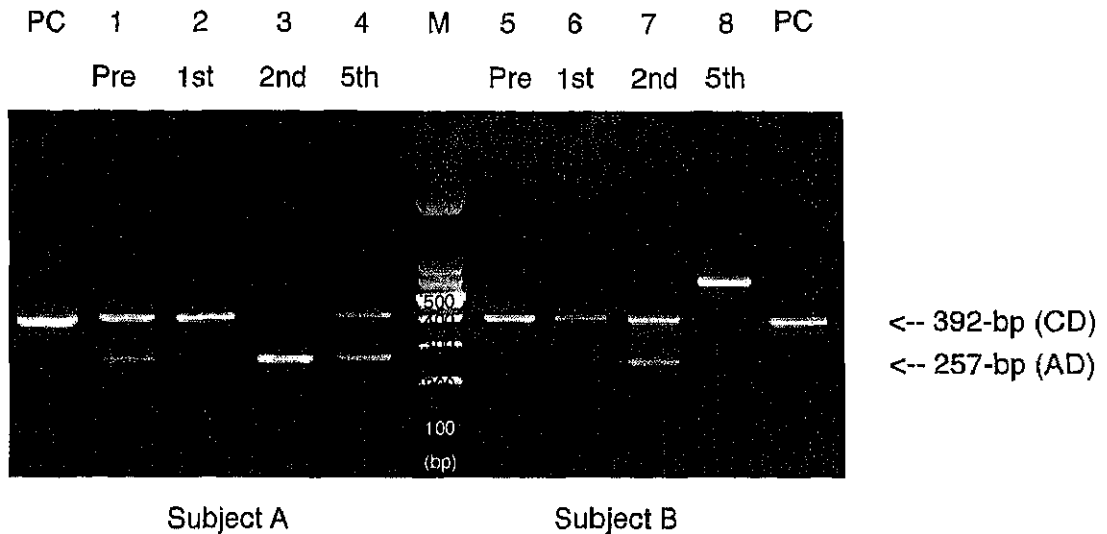


Fig. 5-3 mtDNA amplification products by PCR.

The alternative deletion (AD) is represented by a 257 bp band. The common deletion (CD; represented by a 392 bp) was amplified from muscle of a patient with progressive ophthalmoplegia and serves as the positive control (PC). Amplification products from Subject A prior to exercise (Lane 1), one day after exercise (Lane 2), two days after exercise (Lane 3), and five days after exercise (Lane 4). Amplification products from Subject B prior to exercise (Lane 5), one day after exercise (Lane 6), two days after exercise (Lane 7), and five days after exercise (Lane 8). List the lengths for the bands of the marker (Lane M).

### (3) 結果

2名の被験者に対して持久性の運動を実施した結果、両被験者ともに mtDNA の欠失の出現と消失のダイナミックな動態が認められた。Fig. 5-3 には PCR 分析の結果を示している。

まず、被験者 A では、運動実施前の DNA サンプルからすでに common deletion のバンド、および common deletion とは異なる長さのバンドがみられた。図中では、common deletion は 392 bp、異なる長さの欠失は 256 bp で示されている。そして、運動後 2 日目の DNA サンプルにおいては、common deletion のバンドは残存し、異なる長さのバンドは消失した。そして、運動後 3 日目の DNA サンプルからは common deletion のバンドが消失したが、異なる長さのバンドが再び出現した。そして、6 日目のサンプルには、再びこれらの 2 つの欠失が現れた。

次に、被験者 B では、欠失の出現と消失は被験者 A とはやや異なる動態を示した。まず、運動前のサンプルからは、common deletion が示された。また、運動後翌日のサンプルからも、common deletion のみが見られた。しかし、運動後 2 日目のサンプルには、common deletion および異なる長さ欠失の 2 種類の欠失が認められた。そして、運動後 5 日目のサンプルからは、これらの 2 つの欠失は両方とも消失した。なお、図中には、それ以外にも異なる長さのバンド（たとえばレーン 8）が見られているが、これは mtDNA の欠失では

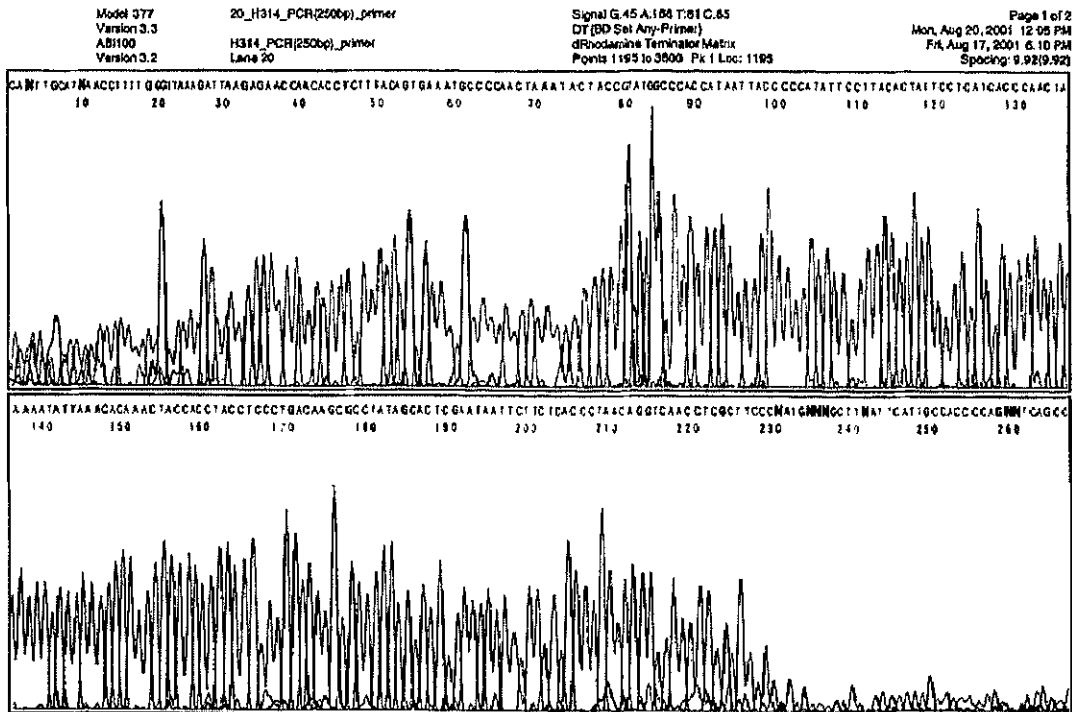


Fig. 5-4 Sequence of alternative deletion.

Sample was obtained from three days after exercise of the Subject A. In the part of 8 bp base sequence surrounded in the square, deletion has been generated.

なく、プライマーが核 DNA の mtDNA 様配列に反応した結果であり、これについては他の論文で詳しく報告されている (岩井ら, 2002b)。したがって、被験者 B の場合、運動後 5 日目のサンプルからは欠失が消失した状況を示している。

本研究で注目したのは common deletion のバンドとは別に出現・消失した異なる長さの欠失のほうである。このバンドは、ポジティブコントロール (PC) と比較することにより、明らかに mtDNA の common deletion とは異なる長さの欠失であることがわかる。しかも、両被験者とも同一の長さのバンドであるという状況が示された。

そこで、DNA シークエンス分析を行い、これらの 2 つの欠失の塩基配列を決定した。Fig. 5-4 には、被験者 A における異なる長さの欠失のシークエンス結果を示している。なお、シークエンス分析の結果、被験者 B においても、この領域における塩基配列は全く一致した。

シークエンス分析の結果から、common deletion と思われる欠失の場合には、確かに 4,977 bp の欠失であったことが確認された。一方、異なる長さの欠失は 5,112 bp の欠失であった (Fig. 5-5)。2 つの欠失の塩基配列を詳細に見ると、common deletion は 13 bp のダイレクトリピートの部分で発生しているのに対し、異なる長さの欠失は 8-bp の部分でミスリーディングが発生している点が異なっている (Fig. 5-6)。そして、この 5,112 bp の欠失は、common deletion と同時に出現する場合と、common deletion に代わって単独で出現する場合があった。そこで、我々は、この 5,112 bp の欠失を alternative deletion と命名した。

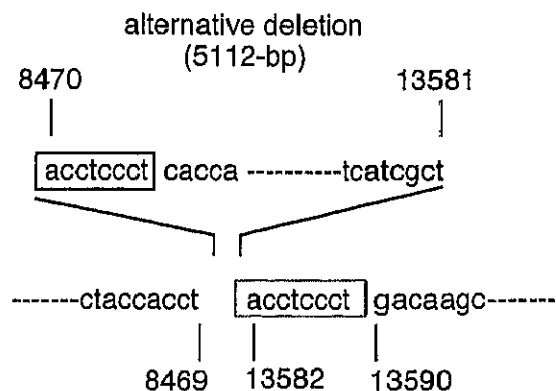


Fig. 5-5 Position and partial sequence of the alternative deletion.

In the part of 8 bp base sequence surrounded in the square, deletion of 5,112 bp length was generated.

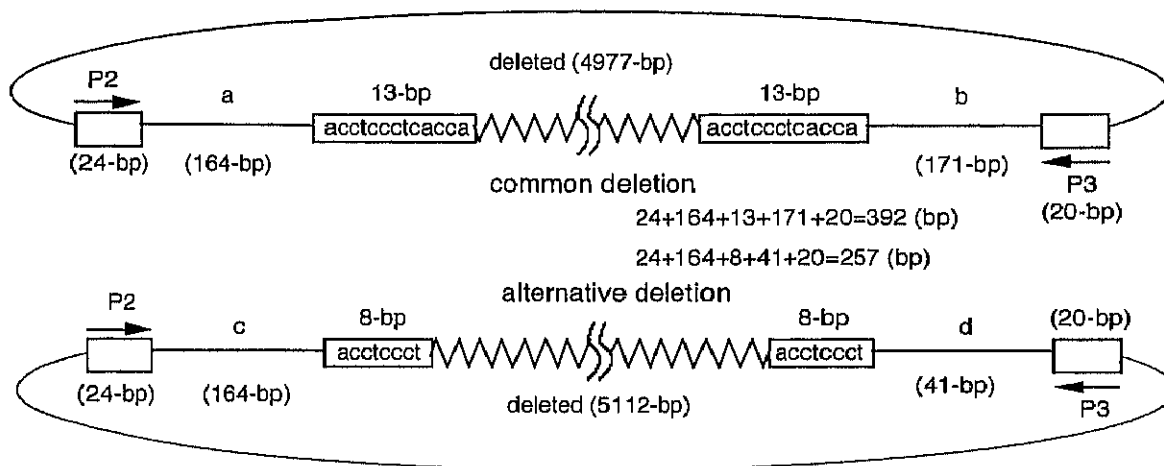


Fig. 5-6 The length of the band of common deletion and alternative deletion.

The length of the band of common deletion becomes 392 bp by adding a, b and direct repeat (13 bp) with the length of two primers. The length of the band of alternative deletion becomes 257 bp by adding c, d and direct repeat (8 bp) with the length of two primers.

#### (4) 考 察

ミトコンドリア病と呼ばれる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ため、現在ではこのような mtDNA の変異が老化の原因の 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)。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、数日間の休息で消失することを報告している。つまり、健康な若者の場合、common deletion は運動後に出現するものの、蓄積はしないことが示された。さらに、Iwai ら (2003a) は、

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 がみられる者がおり、それらの者が持久的な運動を行うことによって、数日後には common deletion が消失したことを報告している。その要因として、適度な運動を行うことによって欠失を消去する酵素の活性が高まる可能性を指摘した。本研究の結果においても、運動前に見られていた common deletion が、被験者 A では 3 日後、被験者 B では 5 日後に消失しており、Iwai ら (2003a) の結果を支持する結果を示している。

本研究で、様々なタイプの持久性の運動による common deletion の出現や消失の一連の動態を調べている際に、common deletion とは異なる長さのバンドが 2 名の被験者に共通してみられることを発見した。そこで、シークエンス分析を行い、この欠失の塩基配列を決定した。そして、mtDNA の塩基配列の中に同一の配列が存在しており、その部分を読み違えることにより変異を起こした欠失であることを明らかにした。つまり、この欠失が出現する機序は common deletion の出現の場合と同様であるが、読み違える同一配列の長さや位置が異なることにより、長さの異なる欠失が出現したものであることがわかった。したがって、持久性の運動によって出現する欠失は common deletion だけではなく、様々な長さの欠失が同時に出現している状況が明らかになった。

なお、被験者 A では、6 日後には再び common deletion と alternative deletion が出現している。運動による影響だけを観察するため、被験者に対して、運動期間の前後には特別な運動を控え、通常の日常生活を送るよう指示していたが、この被験者の場合、運動前の血液サンプルからも欠失が見られていることから、これは日常生活程度の運動負荷によっても欠失が出現する可能性が示唆される。このような状況は、Iwai ら (2003a) の報告でもみられている。Iwai ら (2003a) は、この原因として、かなり低いレベルの閾値の存在の可能性、あるいは他の要因による影響の可能性などを提案している。これは、今後の研究の進展によって明らかにされなければならない重要な問題である。

本研究では、alternative deletion の塩基配列の構造については解明することができたが、これらの被験者の場合にはなぜ common deletion ではなく alternative deletion が出現したのかという問題は残されたままである。2 名の被験者のうち、被験者 B の運動負荷は、行った運動テストの性格から最大酸素摂取量の 100% に近いものであったと推察されるが、被験者 A の運動強度については残念ながら今回は正確には測定されていなかった。しかし、被験者 A の場合、運動前の状態においても common deletion と alternative deletion が両方とも見られていたことから推察すると、激しい運動を行なうことによって、common deletion だけではなく alternative deletion まで出現したとは考えにくい。また、この 2 名の被験者は、alternative deletion を出現しやすい素因を持っている可能性も考えられるが、alternative deletion は、今回我々が初めて見つけた欠失であり、この欠失に関する報告は存在しない。この問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見られることから、common deletion と呼ばれている。common deletion の出現と消失の状況を調べるため、様々な持

久性運動後に出現する common deletion を追跡している時、5,112 bp の長さを持った新しい欠失を発見した。この欠失は、common deletion の代替として現れる状況がみられたため、この欠失を “alternative deletion” と命名した。2名の若く健康な被験者から運動前と運動後3回にわたって採血し、白血球から抽出された mtDNA をネスト PCR 法によって分析した。1名の被験者は運動前に、common deletion および alternative deletion のバンドが見られた。運動終了から1日後には、alternative deletion は消失したのに対し、common deletion は残存した。さらに、運動終了から2日後には、common deletion は消失したが、alternative deletion は再び現れた。運動終了から5日後には、再び2つの欠失が出現した。もう1人の被験者の場合、運動前と運動終了から1日後の白血球 mtDNA に common deletion がみられた。運動終了から2日後には、common deletion と alternative deletion の2つが出現した。そして、運動終了から5日後には、2つの欠失は消失した。これらの結果は、common deletion と alternative deletion のビヘビアはダイナミックであることを示している。また、2つの欠失の塩基配列の比較結果によると、common deletion が13 bp のダイレクトリピート領域で読み違いが発生しているのに対し、alternative deletion は8 bp の領域での読み違いであることが示された。



## 第2節 核 DNA における mtDNA 様配列の発見

### (1) はじめに

ヒトにおいて、ミトコンドリアは 16,569 bp 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) はコンパクトであり、イントロンを含んでおらず、13 種類のたんぱく質、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 をコードしている (Anderson, et al., 1981; Chomyn, et al., 1985; Attardi, et al., 1988)。

以前から、核 DNA 中に mtDNA のマスターコピーがあるのではないかとの推測のもとに核 DNA が調べられたが、そのようなものは見いだされず、核 DNA 中には mtDNA の鋳型は存在しないものと考えられてきた (平良ら, 1985)。しかし、近年では、制限酵素の発見、サザンブロット法 (Southern, 1975) や遺伝子クローニング技術 (Alitalo, et al., 1983) の開発によって、下等真核生物からヒトに至るまで、広く真核細胞の核 DNA 中には mtDNA 様配列が存在していることが明らかになった (Farrelly, et al., 1983; Gellissen, et al., 1983; Wright, et al., 1983; Jacobs, et al., 1983; Kemble, et al., 1983; Hadler, et al., 1983; Tsuzuki, et al., 1983; Fukuda, et al., 1985)。Fukuda ら (1985) は、ヒトの核 DNA 中に mtDNA 様配列が数百コピー程度散在していることを明らかにし、これらの配列のいくつかをクローニングして塩基配列構造を決定した。その結果、mtDNA が完全な形で核 DNA に組み込まれているのではなく断片化されていること、塩基配列が現在の mtDNA のものとはかなり違っていること、違いの程度はクローン化された DNA 断片ごとにまちまちであることなどが明らかになった。したがって、これらのヒトの核 DNA 中に存在している mtDNA 様配列が遺伝子として機能している可能性は低いものの、mtDNA の一部が進化の過程で絶えずそして現在もまた引き続いて核 DNA 中に組み込まれている事実が明らかになったと考えられている。

核 DNA 中の mtDNA 様配列はすでに多くの研究者により特徴が報告されたが、これらの mtDNA 配列のどれが書き写され、そして生物学的な機能を持っているかどうかについてはこれまであまり明確には示されていない (Gellissen, et al., 1987)。Shay ら (1987) をはじめとして、多くの研究者は、正常な細胞の自食作用の間に不完全な消化の結果として生じている mtDNA の断片は、可働的な遺伝子の要素として作用するかもしれないことを提案した (Healer, et al., 1971; Richter, et al., 1988; Linnane, et al., 1989; Bandy, et al., 1990; Shay, et al., 1990; Shay, et al., 1991)。さらに、それらは染色体の核 DNA に挿入され、そして加齢やがんの発生に影響を及ぼすかもしれないと報告されている (Shay, et al., 1990)。また、核の中への細胞質的な遺伝情報の移入は驚くほど高い頻度で起こるかもしれない (Thorsness, et al., 1990) が、それによって外部の DNA 情報が核 DNA の不可欠な部分になる構造は未知である。

持久的運動負荷によって白血球の mtDNA に欠失が出現し、数日後には消失する機序を追跡していたが、その実験中に、異なる 2 名の被験者から核 DNA に割り込んでいる mtDNA 様配列の挿入が認められるバンドを発見した。そこで、シーケンス分析を行い、既知の mtDNA のシーケンスと比較するとともに、さらにコドンの解析を行い、mtDNA 様配列

の構造を探った。

## (2) 方法

### 1) 被験者およびインフォームドコンセント

本研究は、若く健康な2名の被験者を対象に実施された。被験者の1人は19歳の女性（以下被験者A）で、もう1人は20歳の女性（以下被験者B）であった。両被験者は実験内容について説明を受けた後、参加同意書に署名し、また医師のチェックにより運動の実施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、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) 運動と採血

実験のプロトコールは Fig. 5-7 に示した。

まず、2名の被験者は運動実施前に5日間の休息を確保した。この期間は通常の日常生活を心がけた。そして、運動前にまず第1回目の採血を行った。なお、採血量は2 ml とし、抗凝固剤として2Na-EDTAを用いた。そして、採血後とその翌日の2日間、自転車エルゴメータを用いた持続性の運動を実施した。運動負荷は、60 Wの強度で60 RPMの速度を保ち、30分間の運動を行った。運動期間後は、両被験者とも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、運動後には、運動の翌日（1日目）と3日目に2回の採血を行った。

### 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。トータルDNAの抽出にはDNA Extractor WB Kit（和光純薬工業, 日本）を用いた。

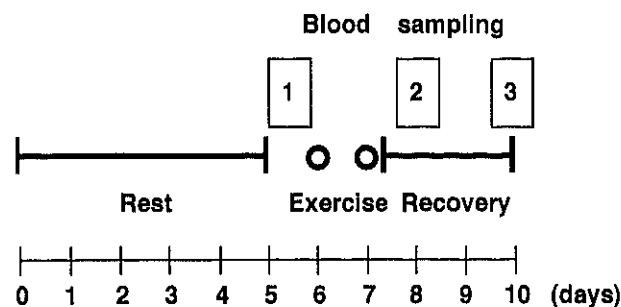


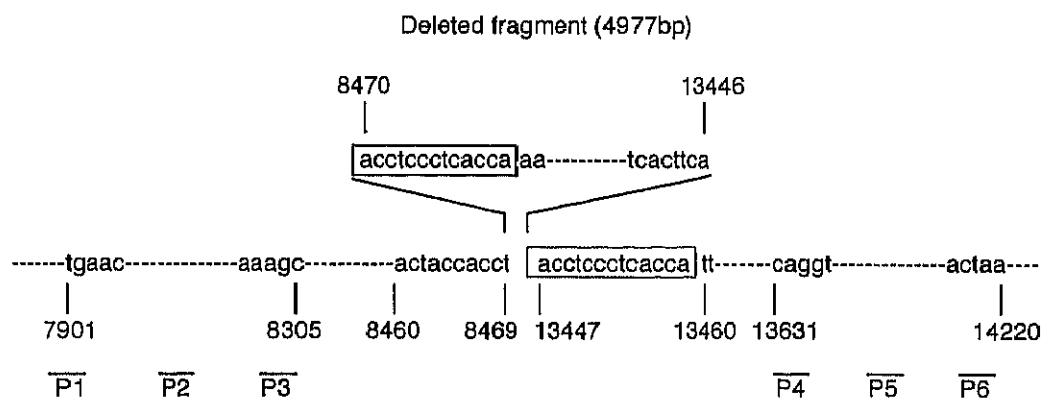
Fig. 5-7 Experimental design. Two subjects performed exercise. Three blood samples were withdrawn from each subject, once before exercise and two times thereafter.

#### 4) プライマー

本研究で用いたプライマーとオリゴヌクレオチドのサイトは、先行研究 (Anderson, et al., 1981; Ikebe, et al., 1990; Kubota, et al., 1997; Soong, et al., 1992) で用いられたものと同様であり、Fig. 5-8 に示している。プライマーは、P3 (8,282-8,305) と P4 (13,650-13,631), P2 (8,201-8,220) と P5 (13,851-13,832), および P1 (7,901-7,920) と P6 (14,220-14,201) の3つのセットが用いられた。

#### 5) Polymerase Chain Reaction (PCR) 分析

common deletion と呼ばれるわずかな量の変異 mtDNA を発見するため、20 ng のトータルDNAは、0.5  $\mu$  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  $\mu$  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された。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 段階では、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, そしてさらに 3 段階として、94°C で 30 秒, 67°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。このようにして増幅された PCR 産物を用い、0.1  $\mu$  g/ml の臭化エチジウムを含む 2.5% のアガロースゲル上で電気泳動を行っ



Primers	Sequence 5' → 3'	Complementary site
1	TGAACCTACGAGTACACCGA	7,901 to 7,920
2	TTCATGCCCATCGTCCTAGA	8,201 to 8,220
3	CCCCTCTAGAGCCCACTGTAAAGC	8,282 to 8,305
4	GGGGAAGCGAGGTTGACCTG	13,650 to 13,631
5	GTTGAGGTCTAGGGCTGTTA	13,851 to 13,832
6	TTAGTAGTAGTACTGGTTG	14,220 to 14,201

Fig. 5-8 Positions and oligonucleotide sequences of the primers used in PCR amplification. Primers 1, 2 and 3 were used to amplify light strand mtDNA, and primers 4, 5 and 6 were used to amplify heavy strand mtDNA.

た。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。

Common deletion 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の位置との比較によって行った。なお、ポジティブコントロールは、進行性外眼筋麻痺症 (CPEO) 患者の筋から採取されたものを用いた。

## 6) シークエンス分析

さらに、DNA シークエンス分析を行い、mtDNA 配列の挿入があったと思われる領域の塩基配列を決定した。なお、シークエンス分析は、サワデーテクノロジー社に依頼した。

## (3) 結果

2名の被験者に対して自転車エルゴメータを用いた持久性の運動を実施した結果、両被験者ともに mtDNA の欠失変異 (common deletion) が認められた。Fig. 5-9 には被験者 A の結果を示している。まず、運動実施前の DNA サンプル (レーン 1) からは common deletion を示すバンドはみられなかった。しかし、運動後 1 日目の DNA サンプル (レーン 2) においては、明らかに common deletion を示す長さのバンドが出現した。そして、運動後 3 日目の DNA サンプル (レーン 3) からは、再び common deletion のバンドが消失した。なお、被験者 B の結果については改めて示してはいないが、common deletion の出現および消失の状況は、両被験者とも全く同様であった。

本研究で注目したのはこれらの common deletion のバンドではなく、Fig. 5-9 のレーン 1 およびレーン 3 にみられたバンドの方である。ポジティブコントロール (PC) と比較したところ、明らかに mtDNA の common deletion とは異なる長さの欠失であったことが示さ

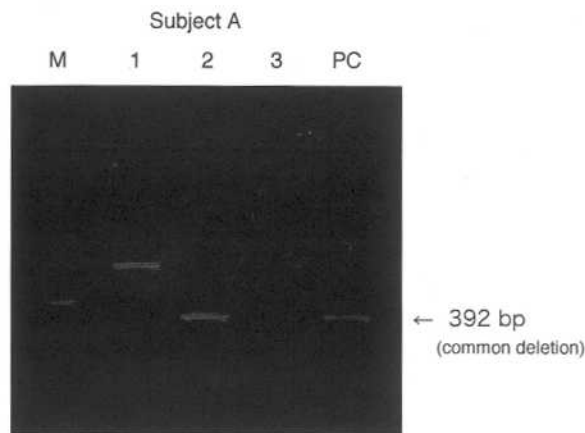


Fig. 5-9 Detection of mtDNA deletion by PCR.

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. Each lane on the picture for Subject A shows the following condition: Lane 1, before exercise; Lane 2, one day after exercise; Lane 3, three days after exercise.

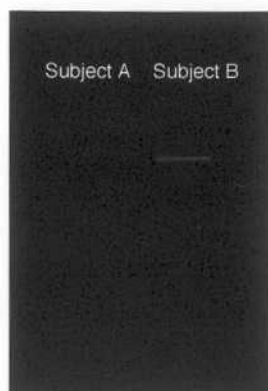


Fig. 5-10 Detection of mtDNA-like sequence.

The mtDNA-like sequence from which left-hand side was detected by the Subject A, and right-hand side was detected by the Subject B are shown. The sequence of the same length is detected from both subjects.

れている。しかも、両被験者とも全く同一の長さのバンドであるという状況が示された (Fig. 5-10)。

そこで、我々は、DNA シークエンス分析を行い、mtDNA 配列の挿入があったと思われる領域の塩基配列を決定した (Fig. 5-11)。シークエンス分析の結果、この領域における 2 名の被験者の塩基配列は全く一致した。

そしてさらに、今回の研究でシークエンス分析により決定された塩基配列とすでに知られている mtDNA シークエンス (Anderson, et al., 1981) との比較解析を行い、塩基配列のホモロジー (相同性) がどの程度であるかを確認した。その結果、両シークエンスの塩基配列はかなりの部分で一致しており、88%の類似度があることが明らかになった (Fig. 5-12)。

塩基配列の重要な情報の 1 つにアミノ酸配列への翻訳がある。我々は、次の課題として、決定された塩基配列をもとにコドンの解析を行った。3 塩基の組ごとに 1 アミノ酸、もしくは停止コドンに対応するが、このコドン表は特殊な例を除いて生物すべてに共通である。なお、塩基配列からアミノ酸へ翻訳する場合に読み枠 (open reading frame, ORF) が 3 つある。3 塩基ごとに 1 アミノ酸を対応させていくため、ORF を 1 つずらすとまったく違ったアミノ酸配列が得られる。もし、アミノ酸の配列がランダムだとすれば、64 種類の組み合わせのうち 3 種類の停止コドンが存在するため、アミノ酸の配列はそれほど長くは続かずに短い鎖となってしまう。通常、mRNA でコードされるタンパク質の残基数は最少でも 150 はあるため、塩基配列の持つ情報が機能を持っていることを示す証拠として、その ORF には停止コドンがなかなか出現しないという特徴を持つ。したがって、もし ORF 解析で連続したアミノ酸配列に翻訳されるなら、その塩基配列は何らかのタンパク質の遺伝子か擬遺伝子 (pseudogene) であろうと推測される。ORF を 1 つずつずらし、さらに A-T, G-C の塩基対による相補鎖についても同様に検討した計 6 つのパターンについて、アミノ酸配列への翻訳結果を Fig. 5-13 に示している。ただし、相補鎖の場合には、鎖の向きは 3' 側から 5' 側に向かっている。

我々は、上記の方法で ORF 解析を行った。もし、たとえば ORF 解析で 100 以上のアミノ酸配列に翻訳されるなら、その塩基配列は何らかのタンパク質の遺伝子である可能性が高

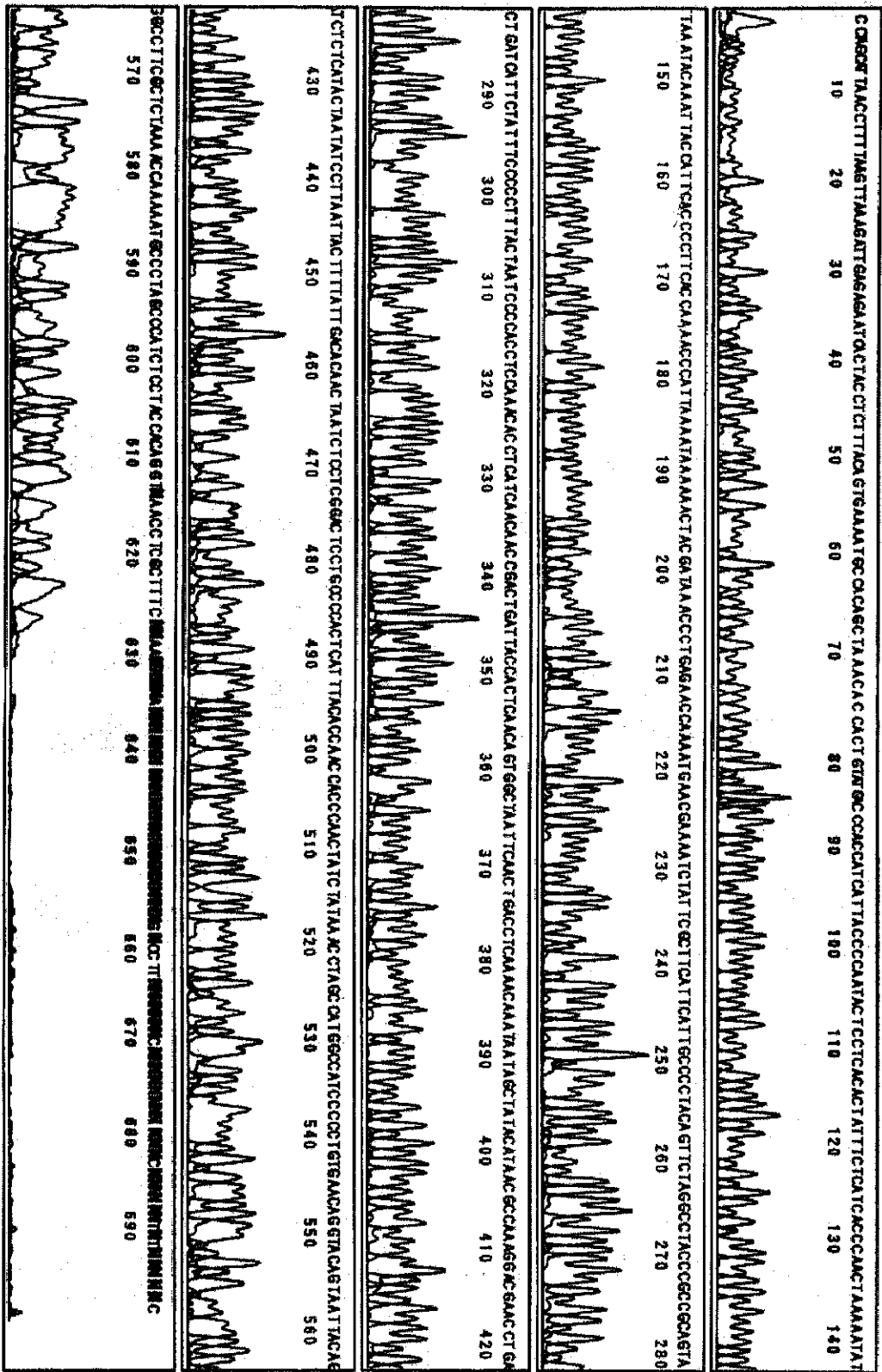


Fig. 5-11 Identification of mtDNA-like sequence by DNA sequence analysis.

mtDNA-like sequence were completely identified, when those decided by DNA sequence analysis.

```

8309          ct tagcattaac cttttaagtt aaagattaag
              -c -----
8341 agaaccaaca cctctttaca gtg aaatgcc ccaactaaat actaccgtat ggcccaccat
      ----t--ct- ----- ---a----- a--g-----c --c--t---- -a-----
8401 aattaccccc atactcctta cactattcct catcacccaa ctaaaaatat taaacacaaa
      c-----a -----c- -----t-- ----- -t-----
8461 ctaccaccta cctccctcac caaagcccat aaaaataaaa aattataaca aaccctgaga
      t----cat-c a-c--t---- ---a----- t----- --c--cg-t- -----
8521 accaaaatga acgaaaatct gttcgettca ttcattgccc ccacaatcct aggcctacc
      ----- a----- ----- -t--g-t- -----
8581 gccgcagtac tgatcattct atttcccct ctattgatcc ccacctcaa atatctcatc
      ----- t--c-a---- ----- -c-c-----
8641 aacaaccgac taatcaccac ccaacaatga ctaatcaaac taacctcaa acaaatgata
      ----- -g--t----- t----g--g -----tc--- -g----- -----a---
8701 accatacaca aactaaagg acgaacctga tctcttatac tagtatcctt aatcattttt
      g-t-----t- --g-c----- -----c---- --a----- ---t-c----
8761 attgccacaa ctaacctcct cggactcctg cctcactcat ttacaccaac caccacaacta
      ----a----- ----t----- ----- --c----- -----
8821 tctataaacc tagccatggc catcccctta tgagcgggcA cagtgattat aggccttccgc
      ----- -----c-g ---a-a--t- ----a----c ----c-----
8881 tctaagatta aaaatgccct agcccacttc ttaccacaag
      -----a-cc- -----tct- c-----g-

```

Fig. 5-12 Comparison of the base sequence between the sequence of a mtDNA and those of a mtDNA-like sequence.

The upper row shows the base sequence of a mtDNA and the lower berth shows the base sequence of a mtDNA-like sequence. It was clarified that this sequence was agreed with mtDNA sequence (homology to mtDNA: 88%).

まるため、6種類の翻訳パターンについてそのようなアミノ酸配列の存在を探った。その結果、いずれの翻訳パターンにおいても停止コドンが現れており、アミノ酸配列は必ずしも完全に連続するものではなかったが、6つのパターンとも比較的長いアミノ酸配列がみられた。Fig. 5-14には、各翻訳パターンの中でみられた最も長いアミノ酸配列を示している。特に、6番目の翻訳パターンでは、79個の連続したアミノ酸配列がみられた。

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
P S I N L L S _ R L R E S L P L Y S E N A T A K H H C M T H H H Y P
L A L T F _ V K D _ E N H Y L F T V K M P Q L N T T V _ P T I I T
_ H _ P F K L K I E R I T T S L Q _ K C H S _ T P L Y D P P S L P
CCTAGCATTAACCTTTTAAAGTTAAAGATTGAGAGAACTACTACTCTTTACAGTGAAAATGCCACAGCTAAACACCACCTGTATGACCACCATCATTACC
GGATCGTAATTTGAAAAATTCATTTCTAACTCTCTTAGTGATGGAGAAATGTCACCTTTACGGTGTGCGATTTGGTGTGACATACTGGGTGGTAGTAATGG
R A N V K _ T L S Q S F _ R K V T F I G C S F V V T H G V M M V
L M L R K L _ L N L S D S G R _ L S F A V A L C W Q I V W W _ _
_ C _ G K L N F I S L I V V E K C H F H W L _ V G S Y S G G D N G

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
N T P H T I S H H P T K N I K Y K L P F T P S P K P I K I K N Y D
P I L L T L F L I T Q L K I L N T N Y H S P L H Q N P L K _ K T T I
Q Y S S H Y F S S P N _ K Y _ I Q I T I H P F T K T H _ N K K L R
CCAATACTCCTCACACTATTCTCATCACTAAATAATTAATAACAATTACCAATTCACCCCTTACCACAAACCCATTAATAAAAACTACGA
GGTTATGAGGAGTGTGATAAAGAGTAGTGGTGGATTTTATAAATTTATGTTTAAATGGTAAGTGGGGAAGTGGTTTGGGTAAATTTTATTGATGCT
G I S R V S N R M V W S F I N F V F _ W E G R _ W F G N F Y F V V
G L V G _ V I E _ _ G V L F I L Y L N G N V G E G F G M L I F F _ S
W Y E E C _ K E D G L _ F Y _ I C I V M _ G K V L V W _ F L F S R

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
K P _ E P K _ T K I Y S L H S L P L Q F _ A Y P P Q Y _ S F Y F P
N P E N Q N E R K S I R F I H C P Y S S R P T R R S T D H S I S P
_ T L R T K M N E N L F A S F I A P T V L G L P A A V L I I L F P P
TAAACCTGAGAACCACAAATGAACGAAATCTATTGCTTTCATTCATTCGCCCTACAGTTCTAGGCCTACCCGCCGACTGATCATTCTATTCCCC
ATTTGGGACTCTTGGTTTACTTGTCTTTAGATAAGCGAAGTAAGTAACGGGGATGTCAGATCCGGATGGGCGGCTCATGACTAGTAAGATAAAGGGG
I F G S F W F S R F D I R K M _ Q G _ L E L G V R R L V S _ E I E G
L G Q S G F H V F I _ E S _ E N G R C N _ A _ G G C Y Q D N _ K G
Y V R L V L I F S F R N A E N M A G V T R P R G A A T S I M R N G

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
L Y _ S P P P N T S S T T D _ L P L N S G _ F N _ P Q N K _ _ L Y I
F T N P H L Q T P H Q Q P T D Y H S T V A N S T D L K T N N S Y T
L L I P T S K H L I N N R L I T T Q Q W L I Q L T S K Q I I A I H
CTTTACTAATCCCACTCAACACCTCATCAACACCGACTGATTACCACTCAACAGTGGCTAATCAACTGACCTCAAAACAATAATAGCTATACA
GAAATGATTAGGGGTGGAGTTTGTGGAGTAGTTGTTGGCTGACTAATGGTGAGTTGTCAACCGATTAAGTTGACTGGATTTTGTATTATCGATATGT
K V L G W R W V G _ _ C G V S _ W E V T A L E V S R L V F L L _ V
R _ _ D G G G F V E D V V S Q N G S L L P _ N L Q G _ F L Y Y S Y
G K S I G V E L C R M L L R S I V V _ C H S I _ S V E F C I I A I C

410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
T P K D E P D L S Y _ Y P _ L L L L T Q L I S S D S C P T H L H Q
_ R Q R T N L I S H T N I L N Y F Y _ H N _ S P R T P A P L I Y T N
N A K G R T _ S L I L I S L I T F I D T T N L L G L L P H S F T P
TAACGCCAAAGGACGAACCTGATCTCTCATACTAATATCCTTAATTAATTTTATGACACAATAATCTCCTCGGACTCCTGCCCACTCATTTACACCA
ATTGCGGTTTCCCTGCTTGGACTAGAGATATGATTATAGGAATTAATGAAAATACTGTGTTGATTAGAGGAGCCTGAGCAGCGGTTGATTAATGTGGT
Y R W L V F R I E _ V L I R L _ K _ Q C L _ D G R V G A G S M _ V
M V G F S S G S R E Y _ Y G _ N S K N V C S I E E S E Q G V _ K C W
L A L P R V Q D R M S I D K I V K I S V V L R R P S R G W E N V G

510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
P P N Y L _ T _ P W P S P C E Q V Q _ L Q A F A L K P K M P _ P I
H P T I Y K P S H G H P P V N R Y S N Y R P S L _ N Q K C P S P S
T T Q L S I N L A M A I P L _ T G T V I T G L R S K T K N A L A H L
ACCACCAACTATATAAACTAGCCATGGCCATCCCCCTGTGAACAGGTACAGTAATACAGGCCTTCGCTCTAAAACCAAAATGCCCTAGCCCATC
TGGTGGGTTGATAGATATTTGGATCGGTACCGGTAGGGGACACTGTCCATGTCATTATGTCGGAAGCGAGATTTGGTTTTACGGGATCGGGTAG
L W G V I _ _ L G L W P W G G T F L Y L L _ L G E S _ F W F H G L G D
G G L _ R Y V _ G H G D G Q S C T C Y N C A K A R F G F I G _ G M
V V W S D I F R A M A M G R H V P V T I V P R R E L V L F A R A W

610
S Y H R Pattern 1
P T T Pattern 2
L P Q Pattern 3
TCCTACCACAGG
AGGATGGTGTCC (相補鎖)
G V V P Pattern 4
E _ W L Pattern 5
R R G C Pattern 6
A=Ala, C=Cys, D=Asp, E=Glu, F=Phe, G=Gly, H=His, I=Ile,
K=Lys, L=Leu, M=Met, N=Asn, P=Pro, Q=Gln, R=Arg, S=Ser,
T=Thr, V=Val, W=Trp, Y=Tyr, _=TER (terminal codon)

```

Fig. 5-13 The result of the translation from a base sequence to amino acid sequence.

Amino acid sequence was estimated on the basis of these base sequence, and the detailed structure was investigated by the open reading frame (ORF) analysis.



### Pattern 1

RLRESLPLYSENAKHHCMTHHHYPNTPHTISHHPTKNIKYKLPFTSPKPIKIKNYDK

### Pattern 2

KTINPENQNERKSIRFIHCPYSSRPTRRSTDHSISPFTNPHLQTPHQPTDYHSTVANSTDLKTNNSYT

### Pattern 3

TLRTKMNENLFASFIAPTVLGLPAAVLIILFPPLLIPTSKHLINNRLITQQWLIQLTSKQIIAIIHNAKGR

### Pattern 4

FVFNIFSWVMRNSVRSIGVMMVGHTVVVFCGIFTVKR

### Pattern 5

GIFGFRACACNYCTCSQGDGHG

FFILMGFGEGVNGNLYLIFLVG

### Pattern 6

CGRRWARAFLVLERRPVITVPVHRGMAMARFIDSWVGVNEWGRSPRRLVVSIVIKDI SMRDQVRPLALCIAIICFEVS

Fig. 5-14 Longest sequence in each pattern.

The longest sequence in each pattern is shown in the figure about the pattern of six open reading frames. The sequence of the same length was seen in the pattern 5.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6		P1	P2	P3	P4	P5	P6		P1	P2	P3	P4	P5	P6		P1	P2	P3	P4	P5	P6
Phe TTT	0	5	4	13	11	9	Leu CTT	5	2	1	1	2	0	Ile ATT	4	5	10	3	4	11	Val GTT	0	1	1	7	6	9
Phe TTC	6	1	4	5	1	1	Leu CTC	2	8	6	0	1	2	Ile ATC	3	5	5	2	0	3	Val GTC	0	0	0	3	2	1
Leu TTA	7	3	5	8	6	5	Leu CTA	6	4	12	4	1	0	Ile ATA	2	3	7	4	3	3	Val GTA	1	1	2	10	1	8
Leu TTG	3	0	0	3	6	8	Leu CTG	0	1	7	5	3	1	Met ATG	2	1	2	5	4	7	Val GTG	0	3	0	7	5	6
Ser TCT	1	6	4	2	2	0	Pro CCT	8	10	3	1	0	4	Thr ACT	4	9	4	3	0	3	Ala GCT	2	1	2	1	1	3
Ser TCC	5	1	3	0	2	0	Pro CCC	10	6	8	0	0	0	Thr ACC	5	8	13	0	1	0	Ala GCC	3	1	7	1	2	1
Ser TCA	7	3	7	5	3	3	Pro CCA	12	6	5	1	1	0	Thr ACA	3	7	7	2	0	0	Ala GCA	0	1	1	1	1	2
Ser TCG	2	1	0	0	3	1	Pro CCG	2	1	0	0	0	1	Thr ACG	2	2	0	0	0	0	Ala GCG	0	0	0	0	1	4
Tyr TAT	4	3	3	2	7	3	His CAT	5	7	4	2	2	1	Asn AAT	3	11	4	4	10	5	Asp GAT	2	3	0	3	5	5
Tyr TAC	10	8	1	1	2	1	His CAC	6	6	5	0	0	3	Asn AAC	7	9	6	0	1	1	Asp GAC	3	1	2	0	0	0
Och TAA	8	5	6	7	5	3	Gln CAA	3	8	6	3	0	0	Lys AAA	13	9	11	0	4	5	Glu GAA	5	1	1	6	4	1
Amb TAG	4	0	1	6	12	4	Gln CAG	5	1	2	0	7	1	Lys AAG	1	0	2	5	1	2	Glu GAG	0	2	1	2	6	8
Cys TGT	2	0	0	3	7	8	Arg CGT	0	0	0	2	0	2	Ser AGT	3	3	0	4	4	9	Gly GGT	0	0	1	5	13	8
Cys TGC	1	2	1	0	1	1	Arg CGC	0	4	1	0	0	0	Ser AGC	1	3	1	2	2	1	Gly GGC	1	1	2	3	7	1
Opa TGA	5	3	3	7	7	3	Arg CGA	0	1	3	2	0	1	Arg AGA	2	0	2	1	4	6	Gly GGA	0	0	2	5	3	1
Trp TGG	1	0	1	12	5	6	Arg CGG	0	1	0	2	0	1	Arg AGG	0	4	0	8	3	10	Gly GGG	0	0	0	10	8	6

Fig. 5-15 Frequency in use of a codon.

そしてさらに、ORF内のコドン使用頻度を集計した。Fig. 5-15には、6つの翻訳パターン別のコドン使用頻度を示している。その結果、各翻訳パターンのコドン使用頻度はランダムではなく、何らかの情報が含まれている可能性が認められた。

#### (4) 考 察

特定の疾患患者 (Wallace, et al., 1988; Yoneda, et al., 1989) や高齢者 (Linnane, et al., 1990; Cortopassi, et al., 1990; Hattori, et al., 1991; Corral-Debrinski, et al., 1992; Hayakawa, et al., 1992; Blanchard, et al., 1993; Hayakawa, et al., 1996) では mtDNA に common deletion の蓄積が認められることが報告され、現在ではこのような mtDNA の変異がこれらの疾患や老化の原因の 1 つであると考えられるようになってきている。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中の mtDNA に common deletion が出現し、数日後に消失することを報告した。本研究においても、同様の状況が示されている。つまり、これらの common deletion は、出現はするものの蓄積はしていないことが示された。そして、この common deletion の動態を調べている際に、2 名の被験者に共通してみられる別の長さのバンドを発見した。そして、これは、核 DNA に入り込んでいる mtDNA 由来の配列である可能性が考えられた。

これまでにも、Nomiyama ら (1985) は、ヒトの核 DNA 中に mtDNA 様配列を見い出し、Lm E-1 と Lm C-2 と命名し、それらはそれぞれヒト mtDNA と 84%、および 81% の類似度を持っていたことを報告している。今回見い出した mtDNA 様配列においても、mtDNA 配列との類似度は 88% とほぼ同程度であった。また、Fukuda ら (1985) は、ヒトの核 DNA 中に mtDNA 様配列が数百コピー程度散在していることを明らかにするとともに、これらの配列のいくつかをクローニングして塩基配列構造を決定しているが、今回我々が検討した塩基配列は、Fukuda ら (1985) が報告しているものとは異なるものであった。

さらに、Fukuda ら (1985) は、核 DNA の mtDNA 様配列に関して、mtDNA が完全な形で核 DNA に組み込まれているのではなく断片化されていることから、ヒトの核 DNA 中に存在している mtDNA 様配列が遺伝子として機能しているとは考えにくく、これらはおそらく機能を失った配列であろうと推察している。一般に、mtDNA の塩基配列は多型であり (Horai, et al., 1986)、様々な変異が見られる可能性が知られている。したがって、本研究で見い出された mtDNA 様配列が異なる 2 名の被験者において完全に一致していたという事実から考えると、この塩基配列が相当以前に mtDNA から核 DNA に組み込まれた可能性が推察される。しかも、本研究では、ORF 解析による詳細な分析を行った結果、比較的長い連続したアミノ酸配列が示されたことから、この配列が遺伝子としての機能を果たしている可能性も否定できない。しかし、この点に関しては、本研究の結果だけで結論付けるのには限界があり、今後の研究の進展が期待される。

なお、一般に哺乳動物の mtDNA が非常に速く進化することが知られており、mtDNA の断片のインテグレーションを判定することによって様々な哺乳動物が分岐した年代を推定する試みが行われている。mtDNA のカウンターパートと比べて、核にある COX I や COX II の変異は 2% 以下 (PNAS) とされているが、今回の配列は 5 倍以上 (10% <) の変異がある。このことは、生物の進化の過程でミトコンドリア DNA の遺伝子が核 DNA に挿入され、その変異が現在も引き続いて核 DNA 中に組み込まれているという事実が示されたといえる。

本研究では、3 段階の PCR を用いた高感度の検出を行うことによって、common deletion が存在しない DNA サンプルからのみ、核 DNA 中に挿入されたと考えられる mtDNA 様配列が検出された。近年、mtDNA の common deletion は様々な酸化的ストレスによっ

て出現することがしだいにわかってきているが、この common deletion を持った mtDNA が存在する場合には、そちらがまずプライマーと優先的に反応する。したがって、このような核 DNA 中の mtDNA 様配列は通常は増幅されない。しかしながら、common deletion を持った欠失を持った mtDNA が存在しない場合には、次にこの配列がプライマーと反応することによって、このようなバンドが検出されたものと考えられる。

## (5) 小 括

健康な成人を対象に、持久的運動負荷を加えることによって、白血球の mtDNA に 4,977 bp の欠失 (common deletion) が出現し、数日後にその欠失が消失することを見いだした。その一連の実験の際、2名の被験者において、common deletion の欠失配列とは異なる長さの配列が検出された。そこで、本研究では、この塩基配列の構造について詳細な分析を試みた。

まず、シーケンス分析を行い、mtDNA 様配列の塩基配列を決定したところ、2名の被験者においてこの塩基配列は全く同一であった。さらに詳細に塩基配列の検討を行ったところ、この塩基配列は mtDNA の塩基配列とかなり一致していることが明らかになった (類似度: 88%)。また、これらの塩基配列をもとにアミノ酸配列を予測し、読み枠 (ORF) 解析によりその詳細な構造を探った。これらの結果から、この mtDNA 様配列は、生物の進化の過程で mtDNA の遺伝子が核 DNA に挿入されたもので、その変異が現在まで引き続いて核 DNA 中に組み込まれている可能性が示唆された。