

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18700528

研究課題名（和文） 運動負荷に対するDNA修復システムの応答

研究課題名（英文） The effect of exercise on DNA repair system

研究代表者

小山 勝弘（KOYAMA KATSUHIRO）

山梨大学・教育人間科学部・准教授

研究者番号：30313779

研究成果の概要：

運動の予防医学的効果として、発癌抑制が知られている。本研究ではDNA損傷の修復システムが中強度以下の運動によってどのように変動するかを検討した。その結果、骨格筋や肝臓において6週間の習慣的な運動に伴い、修復システムの有意な変動が無くとも安静時のDNA損傷は減少する傾向が示された。つまり継続的な中強度以下の運動は、抗酸化システムの活性化を促し、修復システムの応答に依存せずに発癌を予防する可能性があることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,300,000	0	2,300,000
2007年度	700,000	0	700,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	180,000	3,780,000

研究分野：スポーツ生理学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学，スポーツ科学

キーワード：運動，酸化ストレス，抗酸化システム，DNA修復システム，OGG1，MTH1，8-OHdG

1. 研究開始当初の背景

日常的な運動習慣が肥満予防，耐糖能向上，動脈硬化の抑制などをもたらす，虚血性心疾患などの生活習慣病のリスクを減じる役割を果たすことが多くの疫学研究から証明されている。しかし，運動そのものはミトコンドリアでのエネルギー代謝を亢進させ，時には虚血-再灌流現象や炎症反応を惹起させる行為であり，体内での活性酸素種（ROS，reactive oxygen species）の生成を促進する振る舞いであることも事実である。疫学的研究

で確認されてきた運動の恩恵（例えば，運動によるインスリン抵抗性の改善やHDLコレステロールレベルの上昇を伴う粥状硬化の抑制など）を，人類が安全に，確実に享受していくためには，運動により生じる酸化ストレスレベルを制御できる具体的な運動方法の提言が緊要であると思われる。

運動に伴い発生するROSの傷害作用は多岐に及ぶが，最も甚大な被害を生体に与えるのはDNAの酸化的損傷である。幾重にもわたる抗酸化機構が具備されているにも関わ

らず、ヒト細胞では運動を行わなくても1日に1~15万のDNA酸化損傷が作られると考えられている。すでにDNAの酸化損傷は、遺伝子に突然変異を引き起こさせる可能性を高めると考えられており、発癌リスクを上げることが意味している。したがって、健康維持・増進を意図した運動の場合、DNAの酸化損傷が惹起されても突然変異を未然に防ぐための、速やかな損傷修復システムが発動されるものが求められる。しかしながら運動に伴う抗酸化システムや損傷修復システムの挙動を、DNAの酸化損傷という視点から検討した先行研究はほとんど存在せず、基礎的情報の絶対量が不足している。

2. 研究の目的

本研究では、急性・慢性運動負荷に伴い、DNA酸化損傷やDNA修復系酵素の応答変化がどのように生じるかを動物実験により検討し、突然変異を引き越す危険性が少なく、予防医学的価値の高い適正な運動方法を探索するための基礎的知見を得ることを目的とする。

具体的には核DNA、ミトコンドリアDNAへの酸化ヌクレオチド取り込みを回避するMTH1 (MutT homologue)、およびDNAの直接酸化で生じた8-oxoGを切り出すOGG1 (8-oxoG DNA glycosylase)の2つの修復系酵素に着目し、急性運動負荷、あるいは慢性運動負荷後の遺伝子発現、抗酸化システム(特に抗酸化酵素の活性レベル)、酸化DNA損傷の変動に及ぼす影響に関して検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 急性運動負荷に対する応答

被験動物に8週齢Wistar系雄ラット(n=24)を用い、コントロール群(n=6)と運動群(n=18)とに分類した。運動群はさらに、運動負荷後12, 24, 48時間の回復時間を設ける3群に分類した。全てのラットに、小動物用トレッドミルを使った予備的な走行学習を行わせ(60 min/day, 5 days/week, for 1 week)本実験を開始した。運動群に負荷する急性高強度運動として、1-20分間は25 m/minの走速度で固定し、20-28分間は30 m/minから2 m/2 minのペースで負荷を漸増するプロトコルを採用し、疲労困憊にまで追い込んだ。

運動前安静時、運動負荷12, 24, 48時間後に、長指伸筋EDL、およびヒラメ筋Soleusを採取し、OGG1 mRNA発現レベルをReverse transcription-polymerase chain reaction

(RT-PCR)法により評価した。またDNAの酸化損傷マーカーである8-OHdG

(8-hydroxy-deoxyguanosine)レベルについても同時に検討した。

(2) 慢性運動負荷に対する応答

被験動物は8週齢Wistar系雄ラットとし、1週間の予備飼育中、小動物用トレッドミルを用いて走行学習を行った(10 m/min, 10 min/day, 5 days/week)。その後、コントロール群(n=6)、低強度運動群(n=7)、中強度運動群(n=7)に分類した。中強度運動群には週5日間、約65%最大酸素摂取量に相当する強度(20 m/min)で、1日60分間の運動を6週間行わせ、低強度運動群には強度と時間を中強度運動群の半分にした運動を行わせた(10 m/min, 30 min/day)。6週間の実験期間後、安静状態(運動群は最終運動後48時間)において骨格筋(ヒラメ筋)と肝臓を採取した。

骨格筋、および肝臓における8-OHdG量、さらにはOGG1、およびMTH1のmRNA発現レベルをRT-PCRにより測定した。また韓サンプルに関しては、塩基欠落部AP siteや抗酸化酵素のsuperoxide dismutase (SOD)活性を併せて評価し、抗酸化システムへの影響を総合的に検討した。

4. 研究成果

(1) 急性運動負荷に対する応答

8-OHdGは運動負荷後12時間において上昇する傾向が確認された。しかし両筋サンプルにおいて、運動後にOGG1発現の増大傾向が示されたものの、それぞれのコントロール群と比べて有意な差異は認められなかった。速筋線維の構成比が高い代表的な筋であるEDLに関しては、Soleusと比較すると運動負荷によりOGG1 mRNA発現が顕著に増大した。

これらの結果から、急性の高強度運動負荷により骨格筋内のROS生成は運動中や運動後に増大すると思われるが、酸化DNA修復酵素のOGG1発現は賦活されないか、わずかに変動する程度であると思われる。国内外における先行研究に目をやると、対象組織や運動負荷の内容が統一されていないため単純比較はできないが、急性運動負荷後に修復酵素の遺伝子発現亢進を観察している報告が多い。本研究のように骨格筋における応答を検討した報告はほとんど存在しないため、組織毎に応答が異なる可能性も含め、さらに基礎データの収集が必要である。また同じ骨格筋であっても、構成する線維組成や筋の活動様式の相違などが、DNA損傷修復システムの応答に影響を及ぼす可能性もある。すなわちSoleusは抗重力筋として、平常時であっても一定頻度で損傷されると仮定すると、運動負荷による修復酵素の活性や発現の増大が表出しにくい特性を持つ可能性もあり、本研究の結果を説明できるかも知れない。

(2) 慢性運動負荷に対する応答

①骨格筋(ヒラメ筋)

運動群（低強度運動群と中強度運動群）で、8-OHdG レベルがコントロール群に比し有意に低いことが示された（図1）。さらに DNA 修復系酵素（OGG1 と MTH1）の発現レベルは、低強度運動群で他の2群に比べて高い傾向が示され、特に OGG1 mRNA 発現量に関してはコントロール群、あるいは中強度運動群と比し有意な高値となった（図2）。これらのことから、6週間に及ぶ慢性的な運動負荷が DNA 修復系酵素発現をアップレギュレートし、その運動強度は従来から各種生活習慣病予防に有用と想定されているものよりも、幾分低くても十分である可能性が示唆された。

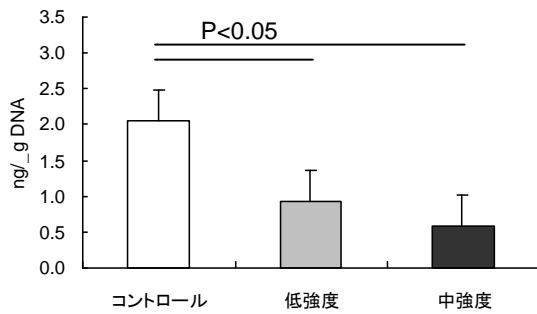


図1. 慢性運動後の安静時ヒラメ筋8-OHdG含有量

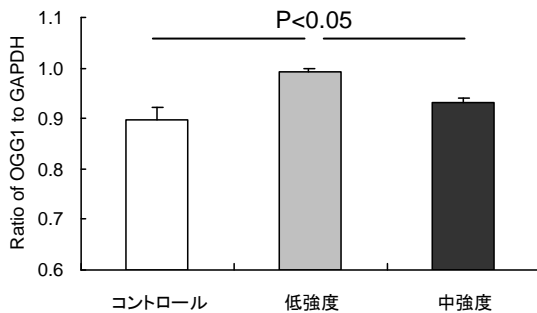


図2. 慢性運動後の安静時ヒラメ筋OGG1 mRNA発現

本研究で中強度運動群に設定した運動強度はラットの65%最大酸素摂取量に相当するとされており、乳酸閾値 (lactate threshold : LT) 付近だと推測される。今回用いた2種類の運動強度を比較すると、低強度運動群は運動速度、および運動時間が中強度運動群の2分の1であった。理論上、低強度運動群の運動量は中強度運動群の4分の1となり、ROS生成も大幅に抑えられると考えられる。さらに低強度運動では、運動中の強制的な走行補助刺激もほとんど必要ないため、いわゆる自発運動に非常に近いモデルになると推察される。このように運動負荷方法の相違を考慮した検討も求められるが、少なくとも、LTレベルを大きく下回る低強度の慢性的運動であっても、DNA 損傷修復酵素 (OGG1) の発

現が増強され、DNA 酸化的損傷が抑制されることを見出した点は大変興味深い。

一方、本研究では MTH1 に関して、有意な変動を確認できなかった。ミトコンドリアが細胞の酸素の90%以上を消費する細胞内小器官であることから、運動を行うと、核に比べてミトコンドリアにおける ROS 産生が増加すると推測される。また、MTH1 は主に核、および細胞質に局在し、全体の僅か5-10%のみがミトコンドリアに局在すると示唆されており、今回評価した MTH1 mRNA 発現は、主に核の状態を反映するものである可能性が示唆される。したがって、運動によってもたらされる ROS 産生はミトコンドリアで多いと仮定すると、核において MTH1 が積極的に働く必然性がなく、運動群で MTH1 mRNA 発現の変化が認められなかった結果に符合すると思われる。

②肝臓

骨格筋同様に、肝臓の8-OHdG量は、有意差こそ検出されなかったが運動群でコントロール群と比べて、明らかに低い傾向を示した（図3）。DNA塩基が損傷すると、酵素であるDNAグリコシラーゼによって損傷塩基が除去され修復が始動されてAP siteが生じると考えられる。本研究の運動群では、安静時AP site数がコントロール群と比較して増大しており、効率的な修復が進んだものと考えられる。

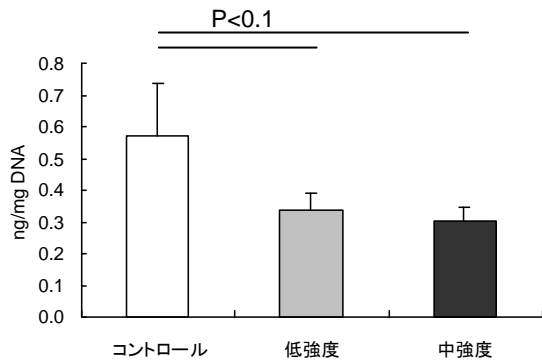


図3. 慢性運動後の安静時肝臓8-OHdG含有量

しかしながら OGG1, および MTH1 の mRNA 発現レベルは有意な変動を示さなかった。また SOD 活性は運動群、特に低強度運動群で有意な増大が認められた（図4）。なぜ低強度運動群で SOD 活性の亢進が観察されたのかについては、今後詳細な検討が必要であると思われるが、抗酸化システムのフロントラインとされる SOD は、比較的強度の低い運動であっても、それが定期的に繰り返されることで敏感に応答すると考えられる知見を示した点は意義深い。

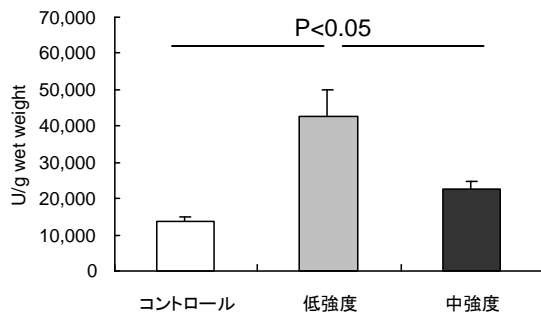


図4. 慢性運動後の安静時肝臓SOD活性

これらのことから判断して、6週間の慢性的な中強度以下の運動負荷は肝臓DNA修復システム全体をアップレギュレートし、主要なDNA修復酵素（OGG1やMTH1）の発現亢進を伴わなくても、抗酸化システム全体（代表的な抗酸化酵素SODや、他の修復系酵素など）を賦活して生体保護的に作用するものと思われる。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔学会発表〕（計3件）

- ① 小山勝弘，「運動と酸化ストレス」，第7回日本機能水学会学術大会，2008年11月7日，東京ビッグサイト
- ② 小山勝弘，「運動と活性酸素」，第10回関西ウォーター研究会，2008年7月12日，千里朝日阪急ビル
- ③ 片山愛里，後藤芳則，杉本綾，松田朋子，安藤大輔，小山勝弘，「急性運動負荷に対する骨格筋DNA修復酵素の発現応答」，第62回日本体力医学会大会，2007年9月15日，ノースアジア大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 勝弘 (KOYAMA KATSUHIRO)
山梨大学・教育人間科学部・准教授
研究者番号：30313779

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し