

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500607

研究課題名（和文） DNA修復システムに対する運動と摂取カロリー制限の相互作用

研究課題名（英文） Interaction of regular exercise and caloric restriction for the DNA repair system.

研究代表者

小山 勝弘（KOYAMA KATSUHIRO）

山梨大学・教育学研究科・教授

研究者番号：30313779

研究成果の概要（和文）：

低強度運動と40%のカロリー制限を12週間継続した場合、単独では核DNAの酸化ストレスレベルを増大させたが、両者の併用によってそれは消失した。またミトコンドリアDNAにおいては、カロリー制限とは無関係に、継続的な運動が酸化損傷レベルを大きく減弱させた。しかし代表的なDNA修復酵素のmRNA発現は、12週間の介入による顕著な変動を見せなかった。習慣的な運動やカロリー制限はDNA修復システムの中で、修復酵素の応答性には影響を及ぼさない可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to investigate the interaction of low intensity regular exercise and 40% caloric restriction for DNA repair system. Oxidative stress level in nuclear DNA was elevated by exercise or caloric restriction alone, and it disappeared by the combination of both. Additionally, a regular exercise itself markedly attenuates oxidative damage in mitochondrial DNA, regardless of a caloric restriction. However, there were no significant changes in DNA repair enzyme expression by the 12-week intervention. It is conceivable that the habitual low intensity exercise and caloric restriction may not have an influence on the responsiveness of the enzyme expression in a DNA repair system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

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：スポーツ生化学，運動，カロリー制限，DNA修復システム

1. 研究開始当初の背景

疫学的研究成果の蓄積により、運動が酸化ストレスに関係する様々な疾患の発生を抑える効果を有することが証明されてきた。と

ころが運動そのものは有酸素的、あるいは無酸素的に代謝レベルを増大させる行為であり、その結果として必然的に活性酸素種（ROS, reactive oxygen species）生成を増大させ

ることも疑いようのない事実である。この点に関して、運動は ROS 生成を促進させるが、同時に抗酸化酵素などの生体防御系を賦活させるトリガーとなっており、習慣的な運動刺激は ROS に対する耐性を高める適応反応をもたらすと解されるようになってきている。

さらに ROS に対する最終防御系として存在する、酸化された生体分子の除去修復システムの重要性が認識され、特に習慣的運動と DNA 修復系との関連についても検討されるようになってきた。しかしながらそれらの研究はまだ途に就いたばかりであり、習慣的運動の定義においてさえ、運動強度や時間、頻度や期間、あるいは検討対象となった動物種や組織、その年齢の相違など、様々な要因が制御されていないため、十分なコンセンサスを得る段階には至っていないのが現状である。

また先行研究では、酸化ストレスに対する運動の効果を単独で捉えようとするものが多く、食、すなわち摂取カロリーや摂取栄養素の組成などと運動との相互関係を考慮に入れて検討した研究デザインはほとんど見あたらない。一方で近年は、加齢現象の遅延や、寿命延長効果が期待できるアプローチとして、摂取カロリー制限 (CR, caloric restriction) が高いエビデンスレベルを有することが実験動物を使った様々な研究で示唆されつつあり、DNA 修復系の活性化を介した機序が想定されている。そのため、運動のもたらす生体保護効果を検討する際には、摂取カロリーの影響をも加味し「動く」、「食べる」という生活者としての視点をもって解析することに真の意義があると思われる。

2. 研究の目的

疾病や加齢現象に密接に関わる DNA 修復系に対して、運動や摂取カロリー制限は共に大きな影響力を有していることが明らかにされてきたにもかかわらず、両者の DNA 修復機構への相互作用を検討した研究は、研究代表者の文献渉猟の範囲では皆無である。単純に運動と CR が相加的、あるいは相乗的な影響をもたらす可能性も想定されるが、逆に、運動というエネルギー代謝を亢進させる行為と CR という代謝レベルを減じる行為とが競合的に作用して、それぞれ単体で得られる DNA 修復システムの亢進が相殺されてしまう可能性も考えられる。

そこで本研究では、まずこれまでに得られた成果を進展させ、運動に伴う ROS 生成亢進刺激に対して DNA 修復系の応答が顕著に発現する運動期間を探索した。次にこれらの結果を元にして、習慣的運動による DNA 修復系の挙動に対して CR が有する修飾作用を検討し、DNA 酸化障害が発生しにくい、予防医学的価値の高い適正な運動と食のあり方について論究するための基礎的知見を得ることを目

的とした。

3. 研究の方法

(1) 運動トレーニング期間と DNA 修復系
被験動物として 7 週齢 Wistar 系雄ラットを用いた。環境馴化を図るため、12h L-D サイクルの 1 週間の予備飼育を行った。この間、小動物用トレッドミル上での運動学習

(5m/min, 10min/day) をすべてのラットに行わせた。予備飼育終了後、被験動物を無作為に 2 群に分類し、コントロール群 (n=21) と運動群 (n=21) とした。

8 週齢から、運動群は低～中強度の運動 (最大酸素摂取量の約 50-55% 程度) を週 5 日の頻度で実施した (10m/min, 30min/day, 斜度 5%)。コントロール群に関しては、トレッドミル上に同一の時間、および頻度で載せ置くことでハンドリングストレスの影響を統一した。また実験期間中、飼料と水は自由摂取とし、摂餌量については正確に秤量した。実験は 12 週間継続し、4 週目、および 8 週目の段階で DNA 修復系の評価を行った (両群共に n=7)。試料採取は運動終了 48 時間後、ジエチルエーテル麻酔下に腹腔動脈からの採血により脱血死させ、速やかに実施した。採取した試料の中から、肝臓に焦点を当て、核、およびミトコンドリア DNA の抽出分離を行った後、DNA 酸化損傷のバイオマーカーとして 8-hydroxy deoxyguanosine (8-OHdG) 含有量を ELISA 法によって測定した。

(2) DNA 修復系に対する習慣的運動と摂取カロリー制限の影響

7 週齢 Wistar 系雄ラット (n=28) を自由摂餌 & 非運動群 (Con), 自由摂餌 & 運動群 (Ex), カロリー制限 & 非運動群 (CR), カロリー制限 & 運動群 (ExCR) の 4 群 (各群 n=7) に分類した。実験期間は (1) の観察結果を元に 12 週間とし、運動群には週 5 日の走運動を行わせた。運動負荷 (30 分間) は走速度 10 m/min, 斜度 5° の低強度運動 (約 50-55 % V02max 相当) とし、カロリー制限は自由摂餌群が示した摂餌量の 60% とした。試料は最終運動終了 48 時間後に採取した。

血液サンプルは総抗酸化力 (biological antioxidant potential: BAP) と酸化ストレス度 (reactive oxygen metabolites: d-ROMs) を測定した。肝臓について、核、およびミトコンドリア DNA の抽出を行い、それぞれ 8-OHdG 含有量を定量した。また酸化 DNA の主要な修復酵素として OGG1 (8-oxoG-DNA glycosylase), および MTH1 (mut T homologue 1) を取り上げ、転写活性化補助因子 PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α) や長寿遺伝子 SIRT1 (Sirtuin1) などと共に、mRNA 発現レベルを Real-time PCR 法により解析した。

また運動誘発性酸化ストレスに対する他部位の生体適応を総合的に検討するため、海馬における脳由来神経栄養因子 (BDNF, brain-derived neurotrophic factor) と脂質過酸化マーカーとしての 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) についても定量評価した。

4. 研究成果

(1) 運動トレーニング期間と DNA 修復系

12 週間の体重変化は、コントロール群と運動群の間で有意な差は無かった。同様に給餌量についても、期間の主効果が認められたものの ($P < 0.01$), 群間に有意な差は観察されなかった。したがって、本研究の運動負荷は、体重、および摂餌量に有意な影響を与えない強度で、極めて低い負荷であったと考えられる。しかしながら、肝臓の核、およびミトコンドリア DNA の 8-OHdG レベルは運動によって有意に変動し、特に 8 週間の段階で、ミトコンドリア DNA の酸化的損傷が、運動群でコントロール群と比べて有意に高くなるといった変化が観察された。すなわち、極めて低い強度の負荷であっても、8 週間の運動トレーニング継続によって DNA 修復系酵素 (OGG1, MTH1) 発現レベルが変動する可能性が考えられた。

(2) DNA 修復系に対する習慣的運動と摂取カロリー制限の影響

① 肝臓 DNA 酸化ストレスマーカー

肝臓における 8-OHdG レベルを、核 DNA とミトコンドリア DNA に分離して検討した結果、Ex と CR で、Con に比し有意な増大が観察された (図 1)。Ex が酸化損傷レベルを増大することは予想された結果であるが、CR 単独の効果としても同様の傾向が認められた。この結果は、CR による餌の探索行動の増加を指摘できる可能性があるが、詳細については明らかにできなかった。また驚くべきことに、ExCR では 8-OHdG の増加がほぼ完全に打ち消された (図 1)。運動とカロリー制限単独で観察された酸化マーカーの上昇が、それらを併用した際には消失したことになり、両者の刺

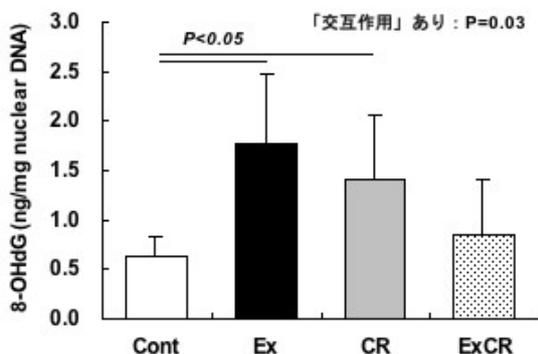


図1. 核DNA中の8-OHdG含有量

激が相乗的に作用して、何らかの生体保護作用が発動される可能性を示唆している。一方ミトコンドリア DNA については、運動介入の主効果が確認された (図 2)。つまり、食事条件によらず、習慣的な運動はミトコンドリア DNA の酸化損傷を、コントロール条件よりもさらに抑制するものと考えられる。この点は、単回の運動に伴う酸化ストレスに対する適

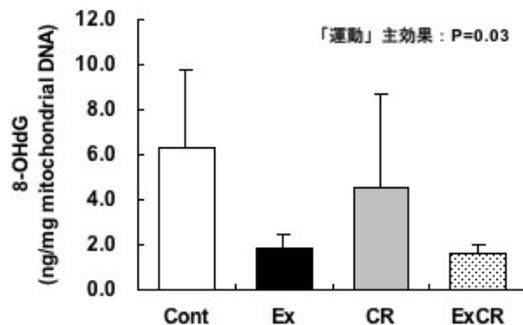


図2. ミトコンドリアDNA中の8-OHdG含有量

応性が、習慣的な運動刺激によって獲得されることを示唆しているのかも知れない。

② DNA 修復酵素

酸化損傷を受けた DNA (核とミトコンドリア) が修復される際に中心的に働く OGG1 発現を観察したところ、有意な主効果が確認できず、4 群間の比較でも差異は認められなかった (図 3)。また損傷塩基が DNA に取り込まれるのを未然に防ぐ、いわゆるヌクレオチド除去修復を担う MTH1 の発現についても同様に、12 週間の運動とカロリー制限の影響を受けないという結果となった (図 4)。

核とミトコンドリアを分離して修復酵素の発現を評価し、その変動を報告した先行研究があるが、本研究では肝細胞の総 DNA 中の発現レベルを観察したため、両者の応答が相互に相殺しあった可能性が考えられる。また、12 週間の介入過程で OGG1 や MTH1 以外の修復酵素群や抗酸化分子がアップレギュレートされ、総体として高い抗酸化システムが構築された結果、12 週間の段階では修復酵素発現の変化が顕在化しなかったという可能性もあり、さらなる検討が求められる。

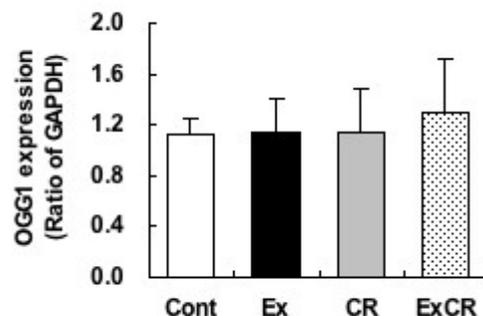


図3. 肝臓OGG1 mRNA発現レベル

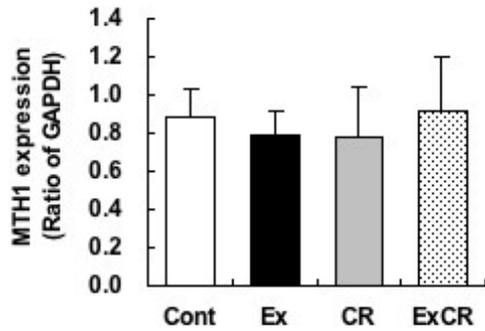


図4. 肝臓MTH1 mRNA発現レベル

③運動やカロリー制限で変動する因子

運動やカロリー制限が健康増進に寄与する機序の中心に位置すると考えられている、PGC-1 α やSIRT1のmRNA発現レベルについて検討した。その結果、いずれの発現にも運動効果は全く認められず、カロリー制限が顕著にその亢進を促進させることが明らかとなった(図5, 図6)。PGC-1 α やSIRT1は、DNA修復酵素(OGG1やMTH1)の遺伝子発現に対する間接的な調節因子であると考えられるが、運動やカロリー制限に対する応答性は必ずしも一致しないということが示唆された。

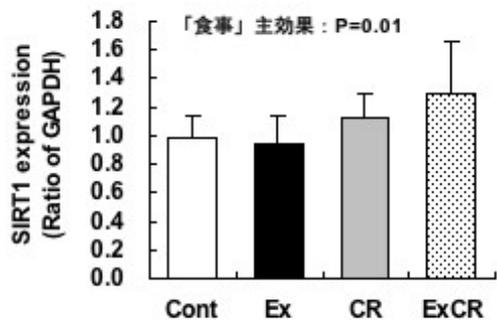


図5. 肝臓SIRT1 mRNA発現レベル

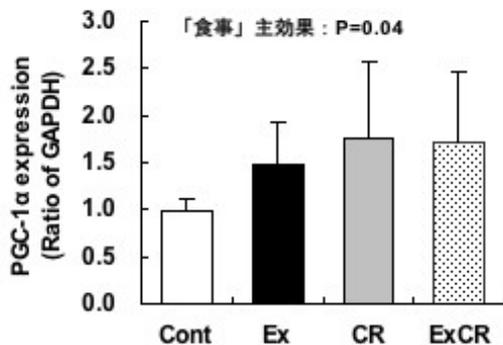


図6. 肝臓PGC1- α mRNA発現レベル

④海馬の酸化ストレスとBDNF

運動による酸化ストレスなどの刺激がト

リガーとなって、生体保護作用が誘引されるというホルミシス仮説に従うと、習慣的な運動とカロリー制限の併用は、より効率的にDNA修復酵素をアップレギュレートし、DNA酸化ストレスレベルを低減すると考えられた。しかし本研究では、DNA修復酵素の発現レベルに有意な変化を見出すことはなかった。そこで、同様にホルミシス効果として増大すると考えられている海馬BDNFレベルの挙動についても追加検討を行った。

脂質の酸化ストレス指標としての4HNEは、ExとCRでConに比し顕著に増大したが、ExCRでは不変であり、むしろExよりも有意な低値を示した(図7)。運動とカロリー制限の相乗(加)効果が酸化ストレスレベルを低下させる機序は不明であるが、肝臓核DNAで認められた結果と同様の傾向である。海馬BDNF量は、4-HNEの有意な増大が観察されたExでのみ有意な高値を示し、CRとExCRではConとの差異は見られなかった(図8)。これらの結果は先述のホルミシス仮説を支持するものである。今後は、核DNAの8-OHdGレベルが増大したExやCRでDNA修復酵素の発現が変動しなかった根拠、さらに運動単独で低減されるミトコンドリアDNA損傷レベルと修復システムの関連など、部位特異性などの視点を加味しながら検討していくことが求められる。

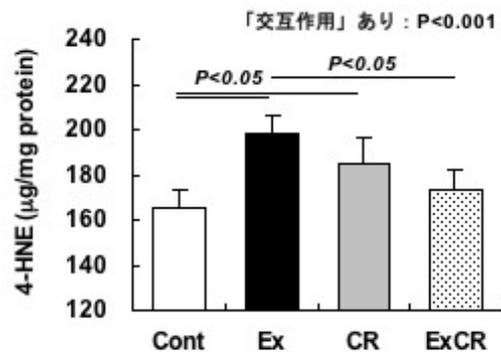


図7. 海馬4-HNE量

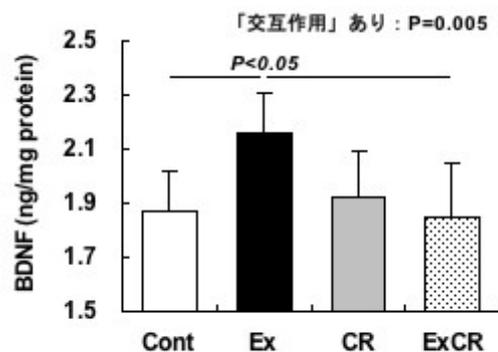


図8. 海馬BDNF量

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)

[雑誌論文] (計1件)

- ①饗場千夏, 韓宝宝, 木内政孝, 安藤大輔, 山北満哉, 小山勝弘, 「高強度運動時における抗酸化物質投与が海馬脳由来神経栄養因子 (BDNF) 発現に及ぼす影響」, 体力科学, 査読有, 61 巻 1 号, 2012, 111-117
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jspfsm/61/1/61_1_111/_article/-char/ja/

[学会発表] (計3件)

- ①宮田実紀子, 土屋吉史, 饗場千夏, 木内政孝, 村山晴夫, 安藤大輔, 山北満哉, 小山勝弘, 「長期的な低強度運動と摂取カロリー制限が若齢ラット海馬内脳由来神経栄養因子へ及ぼす影響」, 第67回日本体力医学会大会, 2012年9月15日, 長良川国際会議場
- ②土屋吉史, 宮田実紀子, 木内政孝, 村山晴夫, 安藤大輔, 山北満哉, 小山勝弘, 「長期的な低強度運動とカロリー制限が Adiponectin レベルに及ぼす影響」, 第67回日本体力医学会大会, 2012年9月15日, 長良川国際会議場
- ③宮田実紀子, 饗場千夏, 韓宝宝, 土屋吉史, 木内政孝, 安藤大輔, 山北満哉, 小山勝弘, 「長期的な低強度運動が老化制御遺伝子の発現レベルに及ぼす影響」, 第66回日本体力医学会大会, 2011年9月17日, 海峡メッセ下関

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 勝弘 (KOYAMA KATSUHIRO)
山梨大学・教育学研究科・教授
研究者番号: 30313779

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし