

高齢者の体力および身体運動トレーニングに対する身体機能改善効果を規定するミトコンドリアゲノム多型の探索

東京都老人総合研究所 福 典 之
(共同研究者) 同 田 中 雅 嗣

Identify of Physical Fitness Associated Mitochondrial DNA Polymorphisms or Haplogroups

by

Noriyuki Fuku, Masashi Tanaka
Genomics for Longevity and Health,
Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

ABSTRACT

Japan currently has approximately 27,000 centenarians who are 100 years old or older. Women account for around 85 percent of this group. Japan has the world's highest longevity rate. What is the secret to the Japanese' long-lasting health? The answer may be in their dietary habit, physical exercise and positive attitude toward life. Thus, centenarians serve as a prime example of successful aging. On the other hand, longevity is associated not only with environment factors but also with genetic factors. **PURPOSE:** To examine of this hypothesize, we sequenced 192 complete mitochondrial DNA (mtDNA) of unrelated Japanese individuals stratified into two equal sized groups by the phenotypes: centenarians and healthy controls. **METHODS:** Each phenotype had 96 samples over 12 known haplogroups: A, B, C, F, M*, M7a, M7b, D4, D5, G, N9a, and N9b. **RESULTS:** The frequency of mitochondrial haplogroups D5 and M7b in centenarians was significantly higher than that in controls. On the other hand, the frequency of mitochondrial haplogroup M* in centenarians was significantly lower than that in controls. **CONCLUSIONS:** These results suggest that mitochondrial DNA polymorphisms were associated with longevity.

There is possibility that some mitochondrial DNA polymorphisms are important as candidate genes for physical fitness.

要 旨

本研究では、高齢でも高い体力を維持している百寿者を対象として、ミトコンドリアDNA (mtDNA) の全塩基配列を決定し、体力に関連する可能性のある多型の検索を試みた。対象は、百寿者96名およびコントロール96名であり、それぞれの被検者の静脈血をサンプルとして総DNAを抽出した。その後、既報のダイレクトシーケンス法によりmtDNA全塩基配列を決定した。それぞれの塩基配列を改訂版ケンブリッジシーケンスと比較し多型を抽出した。その結果、ハプログループD5およびM7bの頻度は、コントロール群より百寿者群において有意に高かった(オッズ比8.6, $p < 0.05$)。一方、ハプログループM*の頻度においては、コントロール群より百寿者群において有意に低かった(オッズ比0.2, $p < 0.01$)。ある種のmtDNA多型は長寿に関連し、これらの多型は体力を規定する候補遺伝子として重要である可能性がある。

緒 言

厚生労働省が平成15年に発表した「平成15年簡易生命表」によると、0歳の平均余命である平均寿命は、男性で78.36年、女性で85.33年である。昭和22年の同様の調査では、男性の平均寿命は50.06年、女性の平均寿命は、53.96年であったので、その差は歴然である。また、平均寿命が調査されている諸外国と比較すると、女性ではわが国が第1位となっており、男性においてはアイスランドが第1位で78.7年であり日本はついで第2位となっている。このように、近年、わが国の平均寿命は急速に延び、世界有数の長寿国となった。一方、近年の食生活の欧米化や産業のオートメー

ション化による不活動により、糖尿病(740万人)、高血圧(3,300万人)、肥満(2,300万人)、高脂血症(2,000万人)といった生活習慣病の患者数が急速に増加している。このような現象は医療費を高騰させるなどの経済に好ましくない影響を及ぼす一因となっている可能性がある。したがって、わが国の対策として、ただ単に長寿を目指すのではなく、自立した“健康長寿”を獲得することが重要であると考えられる。

一般的に老化により筋力・持久力など、いわゆる体力は低下する。高齢者における体力の低下は、生活習慣病に易罹患性だけでなく、多くの問題を惹起する。例えば、下肢筋力の低下は転倒¹⁸⁻²⁰⁾、バランス感覚¹⁹⁾、および階段の上り下りの能力を低下させる^{19, 21-22)}。したがって、高齢者にとって体力を維持することはQOL・ADLの維持のために重要であると考えられる。実際、Blairら²³⁾のアメリカ人13000名を対象とした調査によると、体力レベルは死亡率と関連すると報告されている。このような事実を踏まえると、百寿者は高齢期を高い体力レベルに維持していた集団と考えることができる。高齢者における、体力レベルや生活習慣病への易罹患性などは個体差が大きい。80歳で寝たきりの人もいれば、100歳を過ぎても身の回りのことは全て自分でやる人もいる。低体力レベルの人や生活習慣病へのリスクを多く有する人には適切な食事指導や運動指導が必要となる。

食事療法や運動療法は、生活習慣病の発症・進行を抑制するばかりでなく、薬物療法に比べやり方によっては非常に安価な治療法といえる。しかしながら、生活習慣病は、生活習慣要因の乱れのみでなく遺伝的要因、すなわち遺伝子多型がその発症や進行に関与しているために、食事療法や運動療法によって生じる生活習慣病改善の程度に個

体差を生じさせる。この個体差を埋めるためにオーダーメイド医療が注目を浴びており、一部の疾病に関しては成果を上げようとしている。核遺伝子多型に関しては、疾患と運動療法後の改善の程度に及ぼす影響に対して、わが国においてもいくつかの報告がある⁴⁻⁷⁾。しかし、ミトコンドリア DNA (mtDNA) 多型については、一部の報告にとどまっておらず未知な部分が多い^{8,12)}。

ミトコンドリアは核とは別に独自の遺伝情報を持っている。これを mtDNA という。mtDNA は、16,569 塩基対からなる環状二重鎖 DNA であり、ミトコンドリア電子伝達系の呼吸鎖酵素複合体の機能的に重要な 13 種のサブユニットをコードしている。mtDNA の進化速度は核 DNA の進化速度の 5~10 倍高い。また、mtDNA は二本鎖間における塩基組成および変異発生頻度の非対称性が高く^{2,16)}、個体間での塩基配列の多様性は顕著である。さらに、mtDNA は母系遺伝するため、母親の遺伝子のみが子に伝わる。DNA は RNA と比較し非常に安定であり塩基置換が生じにくい、ある一定の頻度で塩基置換が生じる。mtDNA の遺伝様式は片親 (母) 由来なので、その多型のセットをハプロタイプという。個人の有するハプロタイプは個体間で多様性が非常に高く、類似したハプロタイプをグループ化してミトコンドリアハプログループと呼んでいる。

本研究は、高齢になっても高い体力を維持している百寿者を対象として、mtDNA 多型を分析し、若年健常者であるコントロール群と比較し、体力に関連する可能性のある遺伝子多型を探索することを試みた。

1. 対象および方法

対象は、96 名の百寿者 (100 歳以上の人) およびコントロールとして健常者 96 名 (18-25 歳) の計 192 名であった。それぞれの被検者から本研究に参加することの同意を得て、書面にて署名され

た。また、本研究の対象者が mtDNA の塩基配列を決定することについては慶応義塾大学および名古屋大学の倫理委員会において承諾を得ている。ここではダイレクトシーケンス法の概要を述べる。被検者の静脈血より総 DNA を抽出し、16,569 塩基対の mtDNA を約 3000 塩基対の 6 本の互いにオーバーラップする断片 (A~F) として一次増幅する。断片 A~F のそれぞれから 600~1000 塩基対からなる 10 本のセグメントを二次増幅する。それぞれの個体あたり 10₆=60 本の DNA 断片の塩基配列を決定する。1 群を 96 個体としているので、Applied Biosystems 社の Prism 3100 を用いて 96 穴のプレート 60 枚を分析すると、1 群の塩基配列決定が完了する。

二次増幅に用いる L 鎖 (light strand) のプライマーの 5' 端には 18 塩基のユニバーサル配列 (Forward primer sequence -21-M13) を付加している。この FL プライマーを用いて増幅することにより、二次増幅産物の 5' 端にユニバーサル配列が入るので、全ての塩基配列決定作業に同じプライマーを用いた。mtDNA の L 鎖はアデニン (A) とシトシン (C) が豊富であり、一方 H 鎖はチミン (T) とグアニン (G) に富む。通常 DNA ポリメラーゼではグアニン (G) の連続を読みにくいので、主として L 鎖の塩基配列を読むことにした。必要に応じて H 鎖の塩基配列の分析も併用している。

分析ソフト Sequencher を用いて 600 塩基×60 本=36,000 塩基の分析データを重ね合わせて、16,569 塩基のゲノム情報を確定する。イギリス人の標準参照配列 (revised Cambridge reference sequence, rCRS) (1) と比較して mtDNA 多型を抽出した。2 種類のプライマー対で独立に増幅された PCR 産物において塩基置換が存在することを目視によって確認して、多型を抽出した。

表1 百寿者群およびコントロール群におけるハプログループの頻度

ハプログループ	百寿者		コントロール		オッズ比	95%信頼区間	有意確立
	頻度	%	頻度	%			
A	8	8.3	4	4.2	2.1	0.6-7.2	ns
B	11	11.5	10	10.4	1.1	0.5-2.8	ns
C	1	1.0	1	1.0	1.0	0.06-16.2	ns
D4	38	39.6	33	34.4	1.3	0.7-2.2	ns
D5	8	8.3	1	1.0	8.6	1.06-70.5	p<0.05
F	4	4.2	11	11.5	0.3	0.1-1.0	ns
G	6	6.3	7	7.3	0.8	0.3-2.6	ns
M*	2	2.1	11	11.5	0.2	0.04-0.7	p<0.01
M7a	8	8.3	10	10.4	0.8	0.3-2.1	ns
M7b	8	8.3	1	1.0	8.6	1.06-70.5	p<0.05
N9a	2	2.1	4	4.2	0.5	0.09-2.7	ns
N9b	0	0	3	3.1	-	-	ns
Total	96	100	96	100			

2. 分子系統解析

mtDNA多型は、母親からのみ伝えられる（片親由来）ので、ハプロタイプである。古い祖先において生じた多型は多くの個体に共通に見られる。ハプログループは、ミトコンドリアゲノムの遺伝子型を分類した群である。mtDNAは事実上組換えがないので、mtDNA上の多型はすべて連鎖している。したがってmtDNAの型をハプロタイプと呼ぶ。個々の個体でmtDNAの塩基配列は多様性が高いので、類似したハプロタイプをグループ化してアルファベットA～Zを割り当て、ハプログループとした。mtDNAの分析に、当初は制限酵素切断片多型（RFLP）とD-loopの可変領域（hypervariable region）の塩基配列が用いられた。アメリカ原住民のハプログループをA～Dとしたが、命名に関して、統一的なルールがないために複雑になっている。日本人のハプロタイプは、大きくマクロハプログループMとマクロハプログループNに大別される。個体の中ではそれぞれのmtDNA多型はホモプラズミーとして存在する。従って、あるmtDNA多型の影響は個体の全臓器に及んでいる。われわれは日本人672名のmtDNA全塩基配列の分子進化系統樹を解析し、110種類のサブハプログループに分類した¹³⁾。この分類法をもちいて百寿者群及びコントロール群

のmtDNA塩基配列をハプログループに分類した。

3. 統計

百寿者とコントロールで見いだされたハプログループの頻度比較は χ^2 乗検定で行った。有意差はp<0.05以下とした。

4. 結果

表1に百寿者群およびコントロール群におけるミトコンドリアハプログループの頻度分布を示す。これらの群においてミトコンドリアハプログループは大きく12、すなわちハプログループA, B, C, D4, D5, F, G, M*, M7a, M7b, N9a, およびN9bに分類された。この中で、ハプログループD5の頻度は、コントロール群より百寿者群において有意に高かった（オッズ比8.6, p<0.05）。また、ハプログループM7bの頻度においても、コントロール群より百寿者群において有意に高かった（オッズ比8.6, p<0.05）。一方、ハプログループM*の頻度は、コントロール群より百寿者群において有意に低かった（オッズ比0.2, p<0.01）。図1にハプログループDの分子系統樹を示す。日本人の分子系統樹は大きくマクロハプログループNおよびMに分類される。さらにマクロハプログループMにハプログループDの分岐がある。ハプログループDは、日本人の約40%を占め、

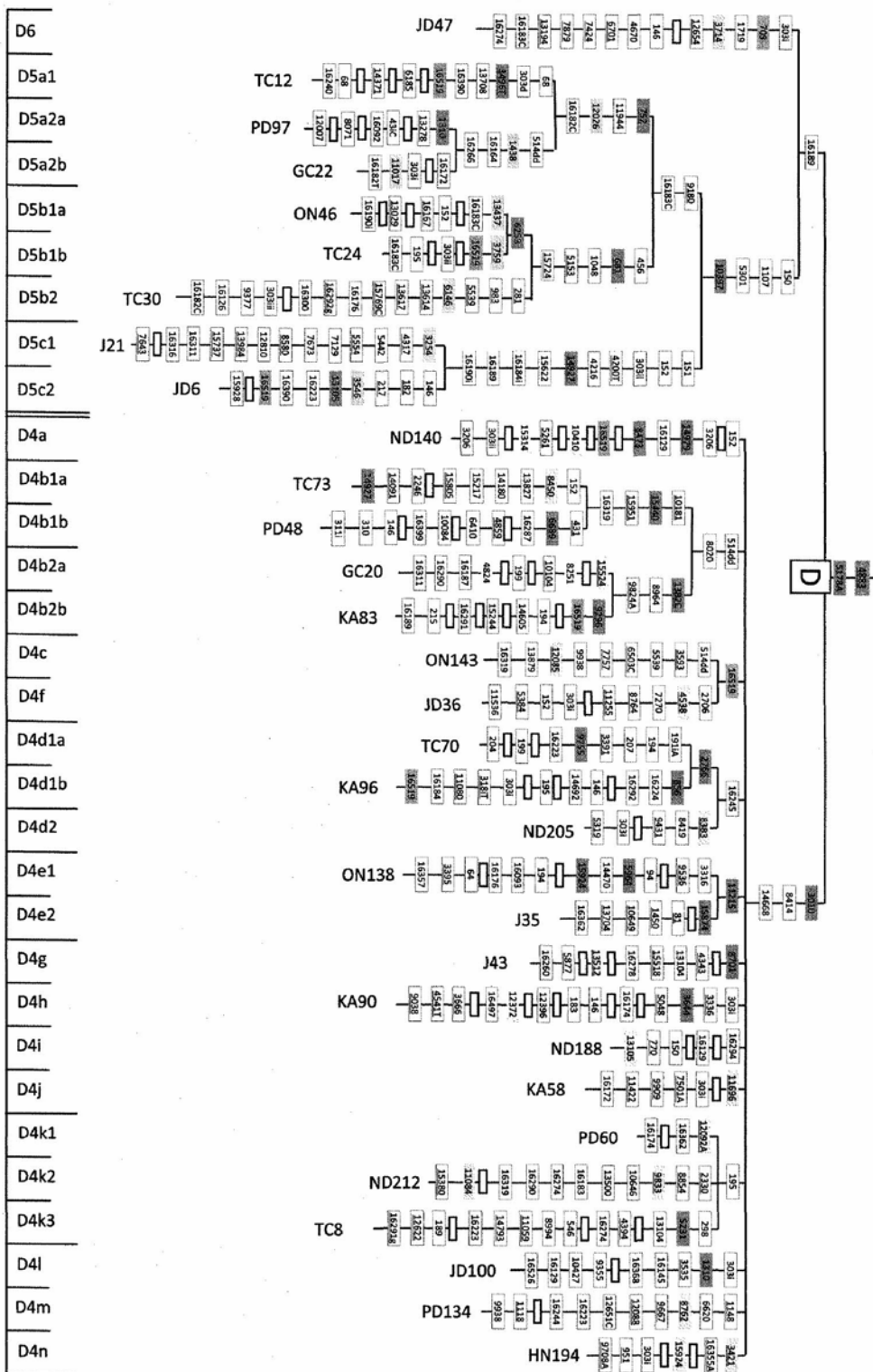


図1 日本人672名のmtDNA全塩基配列情報をもとに解析した分子進化系統樹(文献13を一部改変)。日本人は大きくマクロハプログループNとMに分類される。マクロハプログループNは、さらにハプログループF, B5, B4, A, N9a, およびN9bなどに分類される。マクロハプログループMは、さらにハプログループM7, M8, Z, C, G, およびDなどに分類される。また、ハプログループDは、日本人の約30~40%を占めるハプログループであるが、さらにハプログループD6, D5, およびD4に分類される。それぞれのハプログループはさらにサブハプログループに分類でき、日本人はおおよそ110種類のサブハプログループに細かく分類できる。系統樹中の数字はmtDNA多型の塩基番号を示す。数字のみの記載は多型がtransition(転位)であることを示し、番号にA, G, C, およびTの塩基の記載が付加されている多型はtransversion(転換)であることを示す。また、数字に付加されているdはその多型が欠失、iは挿入であることを示す。下線はハプログループ特異的な多型である。□はさらにそこからの別の分岐が発生していることを示している。各枝下には個体識別番号を示す(JD47など)。下段のアルファベットと数字の組み合わせ(D6, D5a1)は各々のサブハプログループ名である。

図1に示すように、さらにサブハプログループD4, D5, D6に分類される。本研究において、ハプログループD6を有する人は検出されなかった。また、百寿者群において頻度の高かった、ハプログループD5 (図1) とハプログループM7b¹³⁾ は、マクロハプログループMに含まれていた。

5. 考 察

近年、高齢者におけるミトコンドリアの機能と生活習慣病および体力との関連について注目を浴びている。われわれも、これまでに中高年者の生活習慣病患者のmtDNA多型を解析し、2型糖尿病³⁾、メタボリックシンドローム¹⁴⁾、および循環器病¹⁰⁾に関連するミトコンドリアハプログループについて報告してきた。一方、高齢者における体力や筋力トレーニングなどによるトレーナビリティを規定する遺伝子多型を解析することは、高齢者の生活の質を効率良く向上させるために必要不可欠である。核DNA多型に関しては多くの研究が存在するが¹¹⁾、mtDNA多型に関する研究は少ない。

そこでわれわれは、高い体力を有する百寿者96名およびそのコントロールとして健常者96名のmtDNA全塩基配列を決定した。この塩基配列からミトコンドリアハプログループに分類し、2群間におけるハプログループの頻度の比較を行った。その結果、ミトコンドリアハプログループD5およびM7bは百寿者において非常に高頻度であった。

1998年に共著者の田中ら¹⁵⁾は、5178A多型が日本人の長寿と関連し、5178C多型は成人発症性疾患に関連していることを示した。この多型はmtDNAにおける塩基番号5178のNADH脱水素酵素複合体サブユニット2 (ND2) 遺伝子領域内にあるシトシン (C) がアデニン (A) への塩基転換 (transversion) によって、237番目のアミノ酸であるロイシン (Leu) がメチオニン (Met)

に置換される多型であり、ハプログループDに分類される。一方、本研究で解析した百寿者群とコントロール群において、ハプログループDの頻度は百寿者群で高値傾向を呈したが、有意の差異を認めなかった。しかしながら、ハプログループDに属するD5は百寿者群に有意な高頻度であった。ハプログループD5に共通する多型として150C>T多型が存在する。この多型はミトコンドリアゲノムの転写・複製を制御する領域 (control region) に存在するのでミトコンドリアの機能に影響を及ぼす可能性がある。しかも、この150C>T多型はヨーロッパ人の長寿者 (90歳以上の人) と日本人の百寿者に共通して見いだされた⁹⁾。このように、制御領域における150C>T多型もミトコンドリアの酸化的リン酸化系の機能に重要な影響を及ぼす可能性がある。

また、ハプログループM7bの頻度も百寿者群で高頻度であった。ハプログループM7bに共通の多型としてもハプログループD5と同様に150C>T多型が認められた。今後の機能解析などによりそのメカニズムを検討する必要がある。

一方、ハプログループM*の頻度は百寿者において低頻度であった。M*はマクロハプログループMに属する低頻度のハプログループの集合体でありその意義付けは難しい。

このように、ミトコンドリアハプログループD5とM7bは、百寿者において高頻度であった。百寿者はサクセスフルエイジングの典型例であり、後期高齢期を高い体力水準で維持していた集団である。したがって、これらのハプログループは高齢者の体力を起因している多型の可能性がある。また、既にわれわれはハプログループM7b2が若年者のBMIに関連することを報告している¹⁷⁾。BMIは一般的に肥満の指標であるが、ハプログループM7b2を有する人は筋量が多いためにBMIと関係しているのかもしれない。今後、DXAなどを用いた研究によりBMIの構成要素である骨量、

筋量および脂肪量とミトコンドリアハプログループとの関係についてもさらに検討していく必要があり、今後のわれわれの検討課題である。

結 語

ある種の mtDNA 多型およびミトコンドリアハプログループは長寿に関連し、これらの多型およびハプログループ体力を規定する候補遺伝子として重要である可能性がある。

謝 辞

本研究の実施にあたり、ご協力を賜りました慶應義塾大学医学部付属病院老年内科広瀬信義部長に厚く御礼申し上げます。また、本研究への助成を賜りました財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に深く感謝いたします。研究の進行上、重大な障害が生じたために不十分な結果となりましたことを深くお詫び申し上げます。

文 献

- 1) Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F., Lightowlers R.N., Turnbull D.M., and Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature genetics*, 23: 147 (1999)
- 2) Fuku N., Oshida Y., Takeyasu T., Guo L.J., Kurata M., Yamada Y., Sato Y., and Tanaka M., Mitochondrial ATPase subunit 6 and cytochrome B gene polymorphisms in young obese adults. *Biochemical and biophysical research communications*, 290: 1199-1205 (2002)
- 3) Fuku N., Park K.S., Yamada Y., Nishigaki Y., Cho Y.M., Matsuo H., Segawa T., Watanabe S., Kato K., Yokoi K., Nozawa Y., Lee H.K., and Tanaka M., Mitochondrial haplogroup N9a confers resistance against type 2 diabetes in Asians. *American journal of human genetics*, 80: 407-415 (2007)
- 4) Iemitsu M., Maeda S., Otsuki T., Sugawara J., Tanabe T., Jesmin S., Kuno S., Ajisaka R., Miyauchi T., and Matsuda M., Polymorphism in endothelin-related genes limits exercise-induced decreases in arterial stiffness in older subjects. *Hypertension*, 47: 928-936 (2006)
- 5) Kahara T., Hayakawa T., Nagai Y., Shimizu A., and Takamura T., Gln27Glu polymorphism of the beta2 adrenergic receptor gene in healthy Japanese men is associated with the change of fructosamine level caused by exercise. *Diabetes research and clinical practice*, 64: 207-212 (2004)
- 6) Kahara T., Takamura T., Hayakawa T., Nagai Y., Yamaguchi H., Katsuki T., Katsuki K., Katsuki M., and Kobayashi K., PPARgamma gene polymorphism is associated with exercise-mediated changes of insulin resistance in healthy men. *Metabolism: clinical and experimental*, 52: 209-212 (2003)
- 7) Kimura T., Yokoyama T., Matsumura Y., Yoshiike N., Date C., Muramatsu M., and Tanaka H., NOS3 genotype-dependent correlation between blood pressure and physical activity. *Hypertension*, 41: 355-360 (2003)
- 8) Murakami H., Soma R., Hayashi J., Katsuta S., Matsuda M., Ajisaka R., Okada M., and Kuno S., Relationship between mitochondrial DNA polymorphism and the individual differences in aerobic performance. *The Japanese journal of physiology*, 51: 563-568 (2001)
- 9) Niemi A.K., Moilanen J.S., Tanaka M., Hervonen A., Hurme M., Lehtimaki T., Arai Y., Hirose N., and Majamaa K., A combination of three common inherited mitochondrial DNA polymorphisms promotes longevity in Finnish and Japanese subjects. *Eur. J. Hum. Genet.*, 13: 166-170 (2005)
- 10) Nishigaki Y., Yamada Y., Fuku N., Matsuo H., Segawa T., Watanabe S., Kato K., Yokoi K., Yamaguchi S., Nozawa Y., and Tanaka M., Mitochondrial haplogroup N9b is protective against myocardial infarction in Japanese males. *Human genetics*, 120: 827-836 (2007)
- 11) Rankinen T., Bray M.S., Hagberg J.M., Perusse L., Roth S.M., Wolfarth B., and Bouchard C., The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2005 update. *Medicine and science in sports and exercise*, 38: 1863-1888 (2006)
- 12) Soma R., Murakami H., Hayashi J., Ito S., Nagai J., Sugita M., Kuno S., and Okada M., The effects of cytoplasmic transfer of mtDNA in relation to whole-body endurance performance. *The Japanese journal*

- of physiology*, 51: 475-480 (2001)
- 13) Tanaka M., Cabrera V.M., Gonzalez A.M., Larruga J.M., Takeyasu T., Fuku N., Guo L.J., Hirose R., Fujita Y., Kurata M., Shinoda K., Umetsu K., Yamada Y., Oshida Y., Sato Y., Hattori N., Mizuno Y., Arai Y., Hirose N., Ohta S., Ogawa O., Tanaka Y., Kawamori R., Shamoto-Nagai M., Maruyama W., Shimokata H., Suzuki R., and Shimodaira H., Mitochondrial genome variation in eastern Asia and the peopling of Japan. *Genome research*, 14: 1832-1850 (2004)
 - 14) Tanaka M., Fuku N., Nishigaki Y., Matsuo H., Segawa T., Watanabe S., Kato K., Yoko K., Ito M., Nozawa Y., and Yamada Y., Women with mitochondrial haplogroup N9a are protected against metabolic syndrome. *Diabetes*, 56: 518-521 (2007)
 - 15) Tanaka M., Gong J.S., Zhang J., Yoneda M., and Yagi K., Mitochondrial genotype associated with longevity. *Lancet*, 351: 185-186 (1998)
 - 16) Tanaka M. and Ozawa T., Strand asymmetry in human mitochondrial DNA mutations. *Genomics*, 22: 327-335 (1994)
 - 17) Tanaka M., Takeyasu T., Fuku N., Li-Jun G., and Kurata M., Mitochondrial genome single nucleotide polymorphisms and their phenotypes in the Japanese. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1011: 7-20 (2004)
 - 18) Gehlsen G.M., Whaley M.H., Falls in the elderly : Part II Balance, strength, and flexibility. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 71, 739-741 (1990)
 - 19) Grabiner M.D., Enoka R.M., Changes in movement capabilities with aging. *Exerc. Sport Sci. Rev.*, 23, 65-104 (1995)
 - 20) Tinetti M.E., Speechley M, Ginter SF, Risk factors for falls among elderly persons living in the community. *N. Engl. J. Med.*, 319,1701-1707 (1988)
 - 21) Bassey E.J., Fiatarone M.A., O'Neill E.F., Kelly M., Evans W.J., Lipsitz L.A., Leg extensor power and functional performance in very old men and women. *Clin. Sci. (Lond.)*, 82, 321-327 (1992)
 - 22) Rantanen T., Era P., Heikkinen E., Maximal isometric strength and mobility among 75-year-old men and women. *Age Ageing*, 23, 132-137 (1994)
 - 23) Blair S.N., Kohl H.W., 3rd paffenbarger R.S., Jr., Clark D.G., Cooper K.H., Gibbons L.W., Physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy men and women. *JAMA*, 262. 2395-2401 (1989)