加齢に伴う心機能の低下とミトコンドリア DNA 変異

Mechanism responsible for age-related deterioration of cardiac performance

— Aging of mitochondrial DNA —

名古屋大学 第二生化学

杉山 理・早川 美佳・服部 和樹・小澤 高将

Department of Biomedical Chemistry, Faculty of Medicine, University of Nagoya. Satoru Sugiyama, Mika Hayakawa, Kazuki Hattori, Takayuki Ozawa

〔はじめに〕

加齢に伴う臓器機能の低下の防止は高齢化社会を迎えた今、現代医学の主要なテーマの一つとなっている。加齢に伴い心機能もまた低下することが知られている。心筋の収縮にはエネルギーが必要であるが、そのほとんどはミトコンドリアによって作られている。ミトコンドリアはそれ自身 DNA を有し、そこにはミトコンドリアエネルギー産生系の約60のサブユニットのうち13のサブユニットの情報が納められている(図1)。ミトコンドリア DNA (mtDNA) は核 DNA よりはるかに変異を起こし易く、一世代中にも変異を起こすことも知られている¹⁾。そして mtDNA の変異が加齢現象の原因として注目されてきている²⁻⁵⁾

Cytosolic side

Matrix side

図1 ミトコンドリアエネルギー産生系の分子構築とミトコンドリア DNA の構造

下段にエネルギー産生系の分子構築, 右上にミトコンドリア DNA の構造を示した。エネルギー産生系は複合体 I-V から成り, 白色の13のサブユニットの遺伝子が右上に示した環状二重鎖のミトコンドリア DNA 上に存在する。ミトコンドリア DNA にはイントロンが無く, 調節領域である D-loop と各遺伝子はアミノ酸の tRNA によって区切られた極めてコンパクトな構造をしている。

[mtDNA の変異と加齢]

Trounce ら⁶⁾はミトコンドリアのモノアミンオキシダーゼ活性は加齢によっても変化しないが, チトクローム c オキシダーゼ活性は加齢とともに低下することを観察し, これは前者は核 DNA の情報だけによって作られるのに対して, 後者は mtDNA にコードされた蛋白質を含むことから, mtDNA が加齢にともない障害を受けることによるとしている. 我々も, 加齢ラット (100週齢) の心筋ミトコンドリア機能は, mtDNA にコードされた蛋白質を含む complex I の活性は低下するが, mtDNA にコードされた蛋白質を含まない complex II の活性は加齢によっても変化しないことを認めている (図 2 A, B).

図 2 A, B ラット心筋ミトコンドリアの complex I 活性(A)と complex II 活性(B)

mtDNA にコードされた蛋白質を含む complex I 活性は加齢によって低下するが mtDNA にコードされた蛋白質を含まない complex II 活性は加齢によっても変化しない. (* P < 0.01)

[加齢に伴うヒト mtDNA 変異]

そこで, ヒト mtDNA 変異が加齢に伴い変化するかどうかについて検討を加えた. 無作為に集めた50人 (年齢: 3歳-97歳, 男性: 26人, 女性: 24人) の患者剖検心筋から総 DNA を抽出し, PCR (polymerase chain reaction) 法を用いて加齢と mtDNA 欠失との関係を調べた. 高齢者心筋 mtDNA には, いくつかの mtDNA 欠失が認められたが, このうち7,436塩基対の欠失を持った mtDNA が高齢者間に共通に認められた. この欠失は, ATPase 6 遺伝子と D-ループ領域に共通する5'-CATCAACAACCG-3' という順方向繰り返し配列の所で DNA 複製の際に乗り換え (一種の複製ミス) が生じた結果であることが明らかにされた⁷⁾. この結果, 8,649番の塩基から16,084番の塩基までの情報を失っている. この欠失 mtDNA は complex I の5つのサブユニット, complex III の1つのサブユニット, complex IV の1つのサブユニット, complex V の1つのサブユニットの

情報を失っている. 図 3 に年齢別にこの欠失の出現頻度を示した. 30歳以下では0%, 30歳代では25%, 40歳代では30%, 50歳代では67%, 60歳代では75%, 70歳以上では全例に7.4kbp の mtDNA の欠失を認め, その出現頻度は加齢とともに増加した. ミトコンドリアの特徴の一つは, 1個のミトコンドリオンが2-3組の mtDNA を有することである. 1個の細胞には, 数千組の mtDNA が存在する. 従って, 変異 mtDNA 量と機能障害発生との関連が重要である.

図 3 欠失 mtDNA の出現頻度と年齢の関係

30歳以下では欠失 mtDNA の出現は0%, 30歳代では25%, 40歳代では30%, 50歳代では67%, 60歳代では75%, 70歳以上では全例に7.4kbp の mtDNA の欠失が認められた. 即ち, 欠失の出現頻度は年齢に依存している.

[変異 mtDNA の定量的解析]

そこで我々は, 変異 mtDNA の定量的解析法を考案した^{8, 9)}. この方法は, PCR の増幅回数を変えることを利用したものである. 反応液中に, α -³²P-デオキシシトシン 3 リン酸を加え, mtDNA の増幅を行なう. 欠失 mtDNA では, プライマー対は L853-H38を用い, PCR 増幅をそれぞれ28, 30, 32, 34, 36, 38, 40回行ない1.0 kbp の異常断片を増幅した. コントロールでは, プライマー対 L625-H726を用い, PCR 増幅をそれぞれ10, 12, 14, 16, 18, 20回行ない, 1.0 kbp の正常断片を増幅した. 増幅された PCR 産物は1%のアガロースゲルにて100Vで30分間電気泳動し, 標識された DNA 断片の放射活性を, レーザーイメージアナライザーにて測定した. 正常 mtDNA から増幅された断片と, 欠失 mtDNA から増幅された断片の放射活性を PCR の増幅回数毎にプロットして得られた直線と0増幅時の交点の値の比から増幅前の正常 mtDNA に対する欠失 mtDNA の比率が算定される. 一例を図 4 に示す. この例では, 正常 mtDNA に対する欠失 mtDNA の

比率は0.2%である。各年齢13例の心筋 mtDNA の定量的解析結果を図5に示す。変異 mtDNA 量は年齢とともに指数関数的($\log y = -2.92 + 0.039x$, $r = 0.90$)に増加し, 80歳で約1.7%, 90歳で約4.1%に達する。

Ozawa ら⁸⁾は定量的解析法を用い, パーキンソン病患者の黒質線条体 mtDNA の変異は, 健常者0.3%に対し, 5%と報告している。ここで得られた式から推定すると心筋では92歳以上で変異 mtDNA が5%を越す。加齢に伴う心機能の低下は, 安静時には認められず, 運動負荷時に, 負荷に応じた心拍出量の増加, 心筋酸素消費量の増加が認められないのが特徴の一つである。また臨床上一定の年齢を越えると心機能低下が急速に進展することを経験するが, これは mtDNA 変異量が80歳前後から急速に増加する事実によって良く説明される。

図4 定量的PCR解析法

欠失 mtDNA では, PCR 増幅をそれぞれ28, 30, 32, 34, 36, 38, 40回行ない1.0kbの異常断片を増幅した。コントロールでは, PCR 増幅をそれぞれ10, 12, 14, 16, 18, 20回を行ない, 1.0kbの正常断片を増幅した。増幅された PCR 産物は1%のアガロースゲルにて100Vで30分間電気泳動し, 標識された DNA 断片の放射活性を, レーザーイメージアナライザーにて測定した。正常 mtDNA から増幅された断片と, 欠失 mtDNA から増幅された断片の放射活性を PCR の増幅回数毎にプロットして得られた直線と0増幅時の交点の値の比から増幅前の正常 mtDNA に対する欠失 mtDNA の比率が算定される。この例では, 正常 mtDNA に対する欠失 mtDNA の比率は0.2%である。

[加齢にともなう mtDNA 変異の増加の原因]

老化に過酸化が大きな役割を果たしていると考えられている。最近 DNA のデオキシグアノシン (dG) が過酸化されて作られる8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OH-dG) の産生が老化に関連して注目されている¹⁰⁾。8-OH-dG は DNA の複製時に他の塩

図5 変異 mtDNA 量と年齢の関係

変異 mtDNA 量は加齢とともに指数関数的($\log y = -2.92 + 0.039x$, $r = 0.90$)に増加し, 80歳で約1.7%, 90歳で約4.1%に達する。

基に誤読されること, 更に, 8-OH-dG の前後の塩基も誤読されることが報告され¹¹⁾, 8-OH-dG の形成は, 点変異と同義である。mtDNA 欠失には点変異が先行することから²⁾, この意味からも8-OH-dG の形成は重要な意味を持っている。我々は, micro-high performance liquid chromatography / mass spectrometry を開発し¹²⁾, 変異の定量的解析を行った13例と同じ心筋 mtDNA を用いて, mtDNA 中の8-OH-dG を定量した。結果を図6に示した。8-OH-dG 量も加齢とともに指数関数的($\log y = -4.06 + 0.046x$, $r = 0.89$)に増加し, 80歳で0.42%, 90歳で1.2%に達し, 変異 mtDNA と8-OH-dG 量間には, 有意の相関が認められた($r = 0.89$)。この結果から mtDNA の酸化障害として8-OH-dG の蓄積が mtDNA 変異の発生の鍵となっていると考えられる。8-OH-dG の蓄積の機序としては mtDNA の代謝回転の低下, 生成された8-OH-dG の排除機能の低下, 活性酸素による8-OH-dG 生成の増加などが考えられる。

[おわりに]

高齢者では加齢に伴う mtDNA 変異が蓄積し, 大なり小なりこれにともなうエネルギー産生不全が生じていると考えたほうがよい。従って, 高齢者の心機能不全には, カテコラミン系の心機能改善剤, また最近開発されているホスホジエステラーゼ阻害剤はその効果が長期的には期待できない可能性があり, 新しい治療法の組立が必要であろう。抗過酸化剤による mtDNA 保護が現時点では, 最も有効な方法のように思われる。

加齢にともなうミトコンドリアエネルギー産生機能の低下は, 各臓器間で異なる可能性がある。ラット心筋では100週齢で機能の低下が認められるのに

対し, ラット骨格筋では, 既に35週齢で機能の低下が認められる¹³⁾. こうした各臓器間でのミトコンドリア機能の老化の違いの解明が, mtDNA の老化防止の手段の開発に重要であろう.

図6 mtDNA中の8-OH-dG量と年齢の関係
mtDNA中の8-OH-dG量は加齢とともに指数関数的
($\log y = -4.06 + 0.046x$, $r = 0.89$)に増加する.

[文 献]

- 1) Ozawa T, Yoneda M, Tanaka M, Ohno K, Sato W, Suzuki H, Nishikini M, Yamamoto M, Nonaka I, Horai S. Maternal inheritance of deleted mitochondrial DNA in a family with mitochondrial myopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 154: 1240-1247.
- 2) Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, Tanaka M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet*. 1989; 1: 642-645.
- 3) Linnane AW, Baumer A, Maxwell RJ, Preston H, Zhang CF, Marzuki S. Mitochondrial gene mutation: The ageing process and degenerative diseases. *Biochem Int*. 1990; 22: 1067-1076.
- 4) Cortopassi GA, Arnheim N. Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic Acids Res*. 1990; 18: 6927-6933.
- 5) Yen TC, Su JH, King KL, Wei YH. Ageing-associated 5 kb deletion in human liver mitochondrial DNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991; 178: 124-131.
- 6) Troughton I, Byrne E, Marzuki S. Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: Possible factor in aging. *Lancet*. 1989; 1: 637-639.
- 7) Hattori K, Tanaka M, Sugiyama S, Obayashi T, Ito T, Satake T, Hanaki Y, Asai J, Nagano M, Ozawa T. Age-dependent increase in deleted mitochondrial DNA in the human heart: Possible contributory factor to presbycardia. *Am Heart J*. 1991; 121: 1735-1742.
- 8) Ozawa T, Tanaka M, Ikebe S, Ohno K, Kondo T, Mizuno Y. Quantitative determination of deleted mitochondrial DNA relative to normal DNA in Parkinsonian striatum by a kinetic PCR analysis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990; 172: 483-489.
- 9) Sugiyama S, Hattori K, Hayakawa M, Ozawa T. Quantitative analysis of age-associated accumulation of mitochondrial DNA with deletion in human hearts. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991; 180: 894-899.
- 10) Fraga CG, Shigenaga MK, Park J-W, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87: 4533-4537.
- 11) Kuchino Y, Mori F, Kasai H, Inoue H, Iwai S, Miura K, Ohtsuka E, Nishimura S. Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature*. 1987; 327: 77-79.
- 12) Hayakawa M, Ogawa T, Sugiyama S, Tanaka M, Ozawa T. Massive conversion of guanosine to 8-hydroxy-guanosine in mouse liver mitochondrial DNA by administration of azidothymidine. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991; 176: 87-93.
- 13) Torii K, Sugiyama S, Takagi K, Satake T, Ozawa T. Age-related decrease in respiratory muscle mitochondrial function in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992; 6: 88-92.