

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07764

研究課題名(和文) 活性酸素の老化調節機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the regulatory mechanisms of aging by reactive oxygen species

研究代表者

藤井 道彦 (Fujii, Michihiko)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科(八景キャンパス)・教授

研究者番号：80285155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：酸素は多くの生物の生存に必須であるが、酸素の一部は代謝の過程で、反応性の高い活性酸素へと変わる。活性酸素の生成機構や作用機構には依然として不明な点が多い。本研究では、線虫 *Caenorhabditis elegans* の活性酸素感受性突然変異体の解析を行い、活性酸素の生成機構や老化に与える影響を調べた。また、活性酸素感受性突然変異体の原因遺伝子を同定し、その機能を解析した。加えて、過剰な活性酸素が細胞毒性を示すことに間違いはないことから、活性酸素の毒性を低減する有用物質の探索を、ヒト培養細胞を用いて行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性酸素は、私たちの体を構成する様々な生体分子を傷つけ、老化や疾病などの生命機能の劣化を引き起こす。その一方で、活性酸素は生命機能に有用な役割を果たすことがあることも明らかになりつつある。このように、実際の活性酸素の生成機構やその作用機構は複雑で、多くの点が未解明である。本研究は、活性酸素の生成機構や作用機構を解析し老化の機構を理解すること、および、活性酸素の毒性を低減する有用物質を探索することを目的としている。それらにより、人々の老化予防や疾病予防、そして健康長寿の実現に広く貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Oxygen is essential for aerobic organisms but it generates reactive oxygen species (ROS) in the metabolic pathways. However, the mechanisms underlying the generation and functions of ROS are not understood well. Here we analyzed the ROS-sensitive mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans* to study the mechanisms of aging. We also identified the responsible genes for the ROS-sensitive mutants and analyzed their functions. Additionally, since excessive generation of ROS is harmful for organisms, we screened for the compounds that decrease the toxicity of ROS with human cells in culture.

研究分野：老化

キーワード：C. elegans 老化 活性酸素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酸素は多くの生物の生存に必須であるが、酸素の一部は代謝の過程で活性酸素へと変わる。活性酸素は老化や疾病などの生命機能の劣化を引き起こす一方で、生命機能に有用な役割を果たすことも明らかになりつつある。しかし、活性酸素の生成機構や作用機構には依然として不明な点が多い。私たちは、モデル生物の線虫 *Caenorhabditis elegans*、酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、および、哺乳動物培養細胞を用いて活性酸素感受性に变化を示す突然変異体を取得し、その解析を行ってきた。例えば、*C. elegans* の活性酸素感受性変異体 *mev-1*、*mev-4*、*oxy-4*、*oxy-5*、*rad-8* などの原因遺伝子の同定に成功した。さらに、RNAi 法を用いた活性酸素の生成に関わる遺伝子の網羅的な解析にも成功し、培養細胞の細胞老化における活性酸素の役割についても明らかにした。これらを通じて、活性酸素の生成機構や作用機構の解析を行ってきた。

2. 研究の目的

酸素の一部は代謝の過程で活性酸素へと変化する。私たちは、活性酸素の生成機構や作用機構の解析を行ってきた。活性酸素は老化や疾病などの生命機能の劣化を引き起こす負の作用が有名であるが、生命機能に有用な役割を果たす正の作用もある。しかし、実際の活性酸素の生成機構やその生体への作用は複雑であり、未解明な点が多い。そこで、本研究では、活性酸素の生成機構や作用機序を解析し、それを通じて老化の調節機構を明らかにする。また、過剰な活性酸素が細胞毒性を示すことに間違いはないことから、活性酸素を低減する有用物質の探索を行う。これらの研究を通じて、人々の健康長寿に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 活性酸素の生成機構・老化調節機構の解明

これまでの研究で同定した *C. elegans* 突然変異体や遺伝子を用いて、活性酸素による寿命調節の機構を調べる。まず、*oxy-4*、*oxy-5*、*rad-8* 遺伝子の過剰発現体を取得し、それらの寿命測定や活性酸素感受性測定を行う。また、*C. elegans* の活性酸素高感受性突然変異体 *oxy-7* (以前は、*oxy-8* と表記していたが、以降、*oxy-7* に変更する。) の原因遺伝子を同定し、機能解析を行う。*oxy-7* 遺伝子を GFP で標識し、組織や細胞内局在を観察する。また、活性酸素を検出できる蛍光試薬である 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA) を用いて、*oxy-7* の活性酸素生成量を測定する。*oxy-7* 変異体に加えて、活性酸素高感受性変異体の一つである *oxy-6* の原因遺伝子の同定も試みる。

(2) 活性酸素への防御効果を示す有用物質の同定

インド亜大陸の伝統医学であるアーユルヴェーダの二つの代表的な処方である Triphala と Chyawanprash が、それぞれマウス個体の放射線防御と皮膚の光老化防止に効果を示すことを見出している。これらの効果には抗酸化活性が関与しており、両処方にはアーユルヴェーダの最も有名な薬草 (ハーブ) の一種である *Emblica Officinalis* が含まれる。*E. Officinalis* は古くより優れた熱耐性の抗酸化物質を含むことが知られているが、その成分は明らかにされていない。そこで、*E. Officinalis* に含まれる抗酸化成分を HPLC にて精製する。アッセイには HeLa 細胞を用い、*E. Officinalis* 抽出液および HPLC の分画液を HeLa 細胞に投与したのちパラコート (活性酸素放出剤) で処理し、細胞の生存率を測定することで有効画分を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 活性酸素の生成機構・老化調節機構の解明

oxy-4、*oxy-5*、*rad-8* 遺伝子を各々のプロモーターより発現するコンストラクトを作成し、野生型 *C. elegans* に可視マーカー遺伝子 *rol-6* とともにマイクロインジェクション法により導入

した。UV 照射により染色体への安定挿入体を取得し、それらの寿命や活性酸素感受性の測定を行った。野生型と比較して、寿命延長効果や活性酸素抵抗性が見られる株が存在した。しかし、各遺伝子につき、さらに複数の安定発現株を取得し解析したところ、それらの発現株の間にも差が見られた。各株における導入遺伝子の発現レベルが違うためか、あるいは、UV 照射により生じた副次的な変異や遺伝子の挿入部位の違いが影響しているためと考えられた。現在、これら取得した株の野生型 *C. elegans* に対する戻し交配を繰り返し行っている。その後、導入遺伝子の発現レベルを検討し、再度、実験を行う予定である。他の活性酸素感受性変異体の寿命測定も試みたが、得られたデータの解釈が難しかった。原因の一つに、用いた野生型 *C. elegans* との間の微妙な遺伝的な差異が考えられたので、用いる野生型株と戻し交配を行った直後に、再度寿命を測定することとした。

突然変異体 *oxy-7* の全ゲノム配列を決定し、*oxy-7* 遺伝子のマップされた領域の遺伝的変異を調べたところ、遺伝子コード領域への変異(ナンセンス変異)を一ヶ所見出した。この遺伝子を発現する、複数種類のコンストラクトを作成し、マイクロインジェクション法で *oxy-7* 変異体に導入した。得られた遺伝子導入体の活性酸素高感受性が回復したことから、この遺伝子が *oxy-7* 変異体の原因遺伝子であると結論した。Feeding RNAi 法を用いて、*oxy-7* 遺伝子をノックダウンし、活性酸素感受性を測定したが、有意な差は検出されなかった。ノックダウンの効率が十分でないことが原因と考えられる。また、酵母の *oxy-7* と最も高い相動性を示す遺伝子の欠損株は、有意な活性酸素感受性変化を示さなかった。したがって、*oxy-7* の機能は *C. elegans* と酵母において保存されていないと考えられた。

酸素濃度を変化させ(1%と21%) *oxy-7* 変異体の寿命を測定した。*oxy-7* 変異体は21%酸素下では寿命が短縮するが、1%酸素下ではその短縮が軽減された。したがって、*oxy-7* 変異体の寿命短縮には酸化ストレスが関与することが示された。また、*oxy-7* 変異体の活性酸素生成について定量的な解析を試み、*oxy-7* 変異体では野生型と比較し、活性酸素生成量が上昇していることを見出した。このことより、*oxy-7* 変異体の活性酸素感受性の増大は、細胞内の活性酸素生成量の増大に起因すると考えられた。

OXY-7 タンパク質は金属イオントランスポーター様の構造をもつことから、*oxy-7* 変異体における種々の金属イオンの関与を調べた。興味深いことに、*oxy-7* 変異体はいくつかの金属イオンに高い感受性を示すことを見出した。OXY-7 タンパク質と GFP を融合タンパク質として発現するコンストラクトを作成した。金属イオンや活性酸素の付与により OXY-7 タンパク質に変化がみられるか調べている。活性酸素の調節機構について新たな知見が得られることを期待している。

oxy-7 と同様な手法で、*oxy-6* 遺伝子の原因遺伝子の同定に成功した。*oxy-6* は機能未知な遺伝子をコードしており、その機能に興味もたれれる。

(2) 活性酸素への防御効果を示す有用物質の同定

ヒト培養細胞(HeLa 細胞)とパラコートを用いた簡便なアッセイ系を確立できた。しかし、実際は、葉草のロットによる影響や、血清のロットによる影響が実験に大きく影響し、試行錯誤を繰り返した。葉草は現地(バングラデシュ)より複数ロット取り寄せ、効果を確認する必要があった。収穫時期や栽培地域などの違いが影響するのであろうか。現在、活性をもつ葉草抽出液を HPLC にて分画している。老化防止につながるような物質の発見を期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 En Atsuki, Takauji Yuki, Ayusawa Dai, Fujii Michihiko	4. 巻 390
2. 論文標題 The role of lamin B receptor in the regulation of senescence-associated secretory phenotype (SASP)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 111927 ~ 111927
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2020.111927	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamada Natsuki, Miki Kensuke, Yamaguchi Yoko, Takauji Yuki, Yamakami Yoshimi, Hossain Mohammad Nazir, Ayusawa Dai, Fujii Michihiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Extract of <i>Plumbago zeylanica</i> enhances the growth of hair follicle dermal papilla cells with down regulation of 5 reductase type II	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cosmetic Dermatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jocd.13355	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 En Atsuki, Takauji Yuki, Miki Kensuke, Ayusawa Dai, Fujii Michihiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Lamin B receptor plays a key role in cellular senescence induced by inhibition of the proteasome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 237 ~ 250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12775	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamakami Yoshimi, Morino Kyoko, Takauji Yuki, Kasukabe Ryuichiro, Miki Kensuke, Hossain Mohammad Nazir, Ayusawa Dai, Fujii Michihiko	4. 巻 17
2. 論文標題 Extract of <i>Embllica officinalis</i> enhances the growth of human keratinocytes in culture	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Integrative Medicine	6. 最初と最後の頁 141 ~ 146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.joim.2019.01.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Arai Rumi, En Atsuki, Takauji Yuki, Maki Keisuke, Miki Kensuke, Fujii Michihiko, Ayusawa Dai	4. 巻 178
2. 論文標題 Lamin B receptor (LBR) is involved in the induction of cellular senescence in human cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mechanisms of Ageing and Development	6. 最初と最後の頁 25 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mad.2019.01.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Gyoichi ASANO, Shin KUBOTA, Yoshimi YAMAKAMI, Michihiko FUJII	4. 巻 14
2. 論文標題 Identification of manubrium pigments in two species of Turritopsis medusae (Cnidaria, Hydrozoa) in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Kuroshio Biosphere	6. 最初と最後の頁 10-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuo Ryo, Mizobuchi Shogo, Nakashima Maya, Miki Kensuke, Ayusawa Dai, Fujii Michihiko	4. 巻 63
2. 論文標題 Central roles of iron in the regulation of oxidative stress in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Current Genetics	6. 最初と最後の頁 895 ~ 907
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00294-017-0689-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takauji Yuki, Kudo Ikuru, En Atsuki, Matsuo Ryo, Hossain Mohammad Nazir, Nakabayashi Kazuhiko, Miki Kensuke, Fujii Michihiko, Ayusawa Dai	4. 巻 95
2. 論文標題 GNG11 (G-protein subunit 11) suppresses cell growth with induction of reactive oxygen species and abnormal nuclear morphology in human SUSM-1 cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 517 ~ 523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1139/bcb-2016-0248	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taoka Masato, Fujii Michihiko, Tsuchiya Masahiro, Uekita Takamasa, Ichimura Tohru	4. 巻 9
2. 論文標題 A Sensitive Microbead-Based Organic Media-Assisted Method for Proteomics Sample Preparation from Dilute and Denaturing Solutions	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 42661 ~ 42667
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsami.7b16095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計24件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 渡邊 一皓, 圓 敦貴, 堤 杏子, 高氏 裕貴, 藤井 道彦
2. 発表標題 出芽酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> における5-プロモデオキシウリジンの作用機構の解明
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 夏井真衣子, 西本暢亮, 高氏裕貴, 山上義巳, HOSSAIN MN, 三木健輔, 鮎沢大, 藤井道彦
2. 発表標題 線虫 <i>Caenorhabditis elegans</i> を用いたタンパク質凝集を抑制するアーユルヴェーダハーブの探索
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井紗恵莉, 高氏裕貴, 藤井道彦
2. 発表標題 細胞老化におけるタンパク質蓄積の役割
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山上義巳, 圓 敦貴, 早川清, 早川靖彦, 三木健輔, 鮎澤大, 藤井道彦
2. 発表標題 NEPA21、ELEPO21及びNEPA Poratorを用いた電気パルス法による動物細胞、大腸菌及び酵母への遺伝子導入
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊 一皓, 圓 敦貴, 堤 杏子, 高氏 裕貴, 藤井 道彦
2. 発表標題 5-プロモデオキシウリジンによる細胞老化誘導機構の解明
3. 学会等名 日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 夏井真衣子, 西本暢亮, 高氏裕貴, 高氏裕貴, 山上義巳, HOSSAIN Mn, HOSSAIN Mn, 三木健輔, 三木健輔, 鮎沢大, 鮎沢大, 藤井道彦
2. 発表標題 線虫C.elegansを用いたタンパク質凝集を抑制するアーユルヴェーダハーブの探索
3. 学会等名 日本農芸化学学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井紗恵莉, 高氏裕貴, 高氏裕貴, 藤井道彦
2. 発表標題 細胞老化におけるタンパク質恒常性異常の解析
3. 学会等名 日本農芸化学学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 眞木啓佑、新井留実、圓敦貴、高氏裕貴、三木健輔、鮎澤大、藤井道彦
2. 発表標題 Lamin B receptor (LBR)の細胞老化における役割
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田なつき、高氏裕貴、三木健輔、鮎澤大、藤井道彦
2. 発表標題 ヒト細胞の増殖を調節するアーユルヴェーダハーブの探索
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹本健太郎、圓敦貴、高氏裕貴、鮎澤大、藤井道彦
2. 発表標題 ヒトSUSM-1細胞株における細胞不死化機構の解析
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高梨朱央、齋藤優樹、高氏裕貴、三木健輔、鮎澤大、藤井道彦
2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> の活性酸素感受性変異体の解析
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 圓敦貴、高氏裕貴、藤井道彦
2. 発表標題 プロテアソーム阻害剤を用いた細胞老化誘導機構の解析
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山上義巳, 早川清, 早川靖彦, 三木健輔, 鮎澤大, 藤井道彦
2. 発表標題 NEPA21を用いた電気パルス法による細胞への遺伝子導入
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高氏裕貴、西本暢亮、夏井真衣子、三木健輔、 Mohammad N Hossain、鮎沢大、藤井道彦
2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> を用いた老化防止効果を有するアーユルヴェーダハーブの探索
3. 学会等名 日本アーユルヴェーダ学会研究総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三木健輔、高氏裕貴、Mohammad N Hossain、美馬博史、藤井道彦、鮎沢大
2. 発表標題 自然妊娠力を高めるアーユルヴェーダ処方への検討
3. 学会等名 日本アーユルヴェーダ学会研究総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鮎沢大、山上義巳、高氏裕貴、三木健輔、Mohammad N Hossain、藤井道彦
2. 発表標題 アマラキの細胞増殖促進因子の同定
3. 学会等名 日本アールヴェーダ学会研究総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田なつき、高氏裕貴、三木健輔、鮎沢大、藤井道彦
2. 発表標題 がん細胞に高い増殖阻害活性を示すアールヴェーダハーブの探索
3. 学会等名 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高氏裕貴、山田なつき、鮎沢大、藤井道彦
2. 発表標題 培地中アミノ酸量は細胞老化の誘導に影響を与える
3. 学会等名 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高梨朱央、齋藤優樹、高氏裕貴、三木健輔、鮎沢大、藤井道彦
2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> の活性酸素感受性変異株の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堤杏子、圓敦貴、高氏裕貴、三木健輔、鮎澤大、藤井道彦
2. 発表標題 出芽酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> を用いた5-プロモデオキシウリジン作用機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 圓敦貴、新井留実、藤井道彦
2. 発表標題 細胞老化における lamin B receptor の役割
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高氏裕貴、山田なつき、鮎澤大、藤井道彦
2. 発表標題 培地中アミノ酸量は細胞老化の誘導に影響を与える
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三木健輔、高氏裕貴、Mohammad N Hossain、藤井道彦、鮎沢大
2. 発表標題 育毛効果を有するアーユルヴェーダ植物の探索
3. 学会等名 日本アーユルヴェーダ学会研究総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高氏裕貴、三木健輔、Mohammad N Hossain、山内正剛、鮎沢大
2. 発表標題 アーユルヴェーダハーブの放射線防御効果
3. 学会等名 日本アーユルヴェーダ学会研究総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

横浜市立大学長寿科学研究室 http://antiage.sci.yokohama-cu.ac.jp/
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考