

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25年 5 月 31 日現在

機関番号：14401
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23770227
研究課題名（和文）ミトコンドリア由来活性酸素に依存した酸化ストレス応答機構の解明
研究課題名（英文）Study of the molecular mechanism of oxidative stress response induced by mitochondrial ROS
研究代表者
渋谷 利治（SHIBUYA TOSHIHARU）
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：70448033

研究成果の概要（和文）：

ミトコンドリア内で ROS を人工的に発生誘導することが可能な動物培養細胞とトランスジェニック線虫を構築した。この実験システム系を用いることで、in vitro および in vivo におけるミトコンドリア由来 ROS により誘導される細胞内ストレス応答の経時的流れの一端を解き明かした。ミトコンドリア膜の透過性調節に関与する因子（シクロフィリン D とカルシウムイオン）がストレス応答の一部に寄与している事を見いだした。また、ミトコンドリア由来 ROS は線虫の発生に影響を及ぼす事を発見した。

研究成果の概要（英文）：

An experimental assay system was employed to generate excessive ROS in the mitochondria in a precisely controlled spatio-temporal manner. Using mammalian cells and worm *C. elegans* generating mitochondrial ROS, I analyzed the stress response and the molecular mechanism induced by mitochondrial ROS in vitro and in vivo. I revealed that factors involved in the mitochondrial permeability transition (Cyclophilin D and Ca⁺⁺) were contributed to the mitochondrial oxidative stress response and that mitochondrial ROS affected the development of *C. elegans*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：酸化ストレス、ミトコンドリア、細胞内情報伝達、細胞死、線虫、ヒト培養細胞

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスに関する研究は、世界中の多くの研究機関、製薬／医療業界で精力的に行われており、これまで多くの因子が酸化ストレス関連因子として単離・同定され、様々な異なるシグナル伝達機構（酸化ストレス応答）の存在が明らかとなっている。しかしながら、個々の因子の詳細な相互作用、修飾の分子レベルでのメカニズム、並びにその時間的制御については、ほとんどわかっていない。さらに、ROS の発生部位の違いによる種々の異なる酸化ストレス-シグナル伝達の分子機構の解明はあまり進展しておらず、また、本研究課題である ROS の最大発生源であるミトコンドリアに起因する酸化ストレス応答に関する研究の情報も、ほとんどないのが現状である。さらに、in vivo における詳細な解析が不足している。

ミトコンドリアに起因する酸化ストレス応答に関する研究戦略は以下の2つの方法が従来から行われて来た。しかしながら、これら2つの実験戦略にはいくつかの問題点がある。(i)細胞又は実験モデル生物を過酸化水素に代表される ROS で処理し、その変化・応答を解析する、(ii)薬剤、又は変異の導入により細胞内の種々の酵素活性機能を人為的に操作することで ROS を発生させ、それによる変化・応答を解析する。(i)の実験では、外部より導入した ROS が細胞内の様々な場所（細胞内小器官）に広く行き渡り、それら多くの場所で異なる酸化ストレス-シグナル応答を“同時に”発動させてしまうため、解析と解釈を複雑かつ困難にしている。同様に、(ii)の薬剤や変異による処理も、ROS による応答のみならず、酵素活性等の異常による応答も引き起こされるため、細胞内の真の酸化ストレス応答を解析するには至っていない。それゆえ、ミトコンドリア由来酸化ストレス研究の進展のためには、変異操作などにより種々の機構を阻害する事なく、かつ ROS をミ

トコンドリア特異的に発生させることのできるアッセイ系の確立が不可欠だと考えられた。そこで、過去の研究戦略の問題点を打破する画期的かつ独創的な研究戦略（光学的技術を利用した「時空間的 mtROS 発生系」）を実施した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「ミトコンドリア由来の ROS (以下 mtROS と記載)により、どのような細胞内ストレス応答が生じ、どのように細胞が死へと導かれるのか?さらに、その機構にどのような分子（タンパク質、イオン、膜物質、核酸分子など）が関与しているか?」を解明することである。加えて、これまで解析の進んでいない in vivo における現象の解明にも取り組む。

近年、癌、自己免疫疾患、虚血性臓器疾患、神経性疾患、糖尿病など様々な疾患および老化に、mtROS が主原因になりうる事が示唆されている。ゆえに本研究目的の達成により得られる情報は、上記疾患の治療および治療薬開発のストラテジー構築に大きく貢献すると期待される。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成する手段として、ミトコンドリア内で ROS を光照射により人工的に発生誘導する実験系を考案した。この実験系をヒト動物培養細胞と in vivo 解析を実現するために線虫 *C. elegans* に応用した。mtROS により誘導されるストレス応答（経時的な変化）と、それに関与する因子の同定を目指し、次の3点の解析を重点的に試みる。

(1)「遺伝子レベルでの応答（遺伝子発現）変化」を検出するために RT-PCR 又は DNA マイクロアレイ解析を行う。

(2)「タンパク質レベルでの変化」を様々な抗体を用いたウエスタンブロッティングで

解析する。

(3)「細胞や細胞内小器官の形態学レベルでの変化」を、免疫染色法や電子顕微鏡により解析する。

(4)線虫の様々な表現型の追跡により *in vivo* での応答を検出する。

4. 研究成果

(1)ヒト培養細胞を用いた系により、mtROSはミトコンドリアに機能障害を及ぼす事がわかった。この傷害の一部にミトコンドリア膜透過性遷移現象(MPT)が関与する事を見だし、薬剤CsAによる機能障害の緩和効果を見つけた。また、細胞はcaspaseに依存したアポトーシス細胞死とネクローシス細胞死により、死に至る事を見いだした。

(2)線虫を用いた *in vivo* 解析系では、以下の興味深い知見を得た。

①線虫筋肉細胞内でmtROSを過剰産生させると、筋肉組織の破綻に伴う個体の行動異常が観察された。②mtROSにより線虫において顕著な発生(L1幼虫からAdultまでのDevelopment)の遅延が観察された。mtROSが線虫の個体発生に影響を与えるという事を直接的に示した初の報告である。確立した系を今後さらに継続することにより、mtROSの個体発生に対する生理学的意義ならびに、その分子メカニズムの解明へと発展していくことが期待される。

また、ミトコンドリア病の一つであるミトコンドリア筋症は、ミトコンドリアの機能破綻から生じると考えられているが、その詳細なメカニズムはわかっていない。本研究で樹立したトランスジェニック線虫はミトコンドリア筋症の病態モデルとして活用できる可能性を見いだした。

なお、以上の成果は、国内学会で報告するとともに、国際学術雑誌(JPPB)にて報告した。

現在進行中のプレリミナリーな結果を以下に述べる。

(1) mtROSにより誘発される発生遅延に対し抑制的な表現型を示す変異株のスクリーニングを実施した。これまでに、数種の変異株を単離しており、現在、その原因遺伝子の同定を試みている。今後、原因因子の同定を成功させる事により、mtROSの下流の分子カスケード(つまりは酸化ストレス応答機構)の全容解明に迫る。

(2)神経細胞ミトコンドリア特異的活性酸素発現のトランスジェニック線虫も樹立し、光操作により人工的に神経細胞異常を誘導する事に成功した。この線虫は将来的にヒト神経変性疾患の最適なモデル生物として発展・応用することが期待される。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

Deleterious effects of mitochondrial ROS generated by KillerRed photodynamic action in human cell lines and *C. elegans*.
Shibuya, T. & Tsujimoto, Y.
Journal of photochemistry and photobiology B: Biology 117C: 1-12 (2012).

[学会発表] (計 1 件)

① 渋谷利治

Deleterious effects of mitochondrial ROS generated by KillerRed photodynamic action in human cell lines and *C. elegans*.
第35回日本分子生物学会
2012年12月10日
福岡国際会議場(福岡市、福岡県)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gene/www/laboratory/shibuya1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渋谷 利治 (SHIBUYA TOSHIHARU)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70448033

(2) 研究分担者 なし

