

平成22年 6月 9日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20880044  
 研究課題名（和文） ビタミンC合成不全マウスを用いた機能性食品の抗酸化能評価システムの開発  
 研究課題名（英文） Evaluation of antioxidant capability in functional foods by using vitamin C-depleted mice.  
 研究代表者  
 近藤 嘉高 (KONDO YOSHITAKA)  
 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員  
 研究者番号：20507397

研究成果の概要：ビタミンCを合成できないSMP30/GNLノックアウトマウスは、活性酸素種(ROS)の産生が亢進するかどうか、機能性食品の抗酸化能を評価できるかどうかを検討した。VC欠乏マウスの全身組織におけるROS産生は、顕著に増加した。また、ROS消去能をもつ水素水の投与は、VC欠乏マウスの脳におけるROS産生を抑制した。本研究から、VC欠乏マウスを用いた機能性食品の抗酸化能評価システムが確立された。

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,340,000 | 402,000 | 1,742,000 |
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 2,540,000 | 762,000 | 3,302,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：ビタミンC、アスコルビン酸、機能性食品、抗酸化、ノックアウト、SMP30/GNL、脳、活性酸素種、水素水

## 1. 研究開始当初の背景

SMP30 (加齢指標タンパク質30)/ グルコノラクトナーゼ (GNL)は、私たちの研究グループが発見し遺伝子をクローニングした加齢に伴い減少するタンパク質である。私たちは2006年に、SMP30がビタミンC(VC)生合成経路に必須の酵素グルコノラクトナーゼであることを明らかにした。ヒトはビタミンC生合成の最終酵素L-グルコラクトン酸化酵素に多数の変異が入っているため、VCを体内で作れない。しかし、マウスやラット等多くの動物は、正常に合成できる。一方、私たちが

開発したSMP30/GNLノックアウト(KO)マウスは、VCを合成できず、骨形成不全などのVC欠乏症状(壊血病)を呈する。また、壊血病にはならない少量のVCを与えて飼育したSMP30/GNL-KOマウスは、体重の増加率が低く平均寿命は短縮した。死亡時の解剖所見からは、炎症やガンといった疾患は認められず、臓器の委縮などヒトの老衰に似た症状を呈した。

VCは、水溶性の強力な抗酸化物質である。最近私たちは、ラットにおいて肝臓および腎臓のVC濃度が加齢に伴い減少することを見

出した。ヒトにおいても血中 VC 濃度は加齢で減少する。現在、老化の主因は、活性酸素種 (ROS) であると考えられている。加齢に伴う VC の減少は ROS 産生を亢進させ、老化および寿命短縮をもたらすと考えられる。

## 2. 研究の目的

巷にはサプリメントや機能性食品があふれており、抗酸化物質を含むものが多い。In vitro で抗酸化能を持つという報告は多いが、in vivo で抗酸化能を発揮するという科学的な証拠は乏しい。従って、簡便かつ有用な機能性食品の抗酸化能評価システムの確立が待ち望まれている。VC が不足した SMP30/GNL-KO マウスは、ROS 産生が亢進することが期待されることから、機能性食品の抗酸化能評価に利用できると考えられる。しかし、実際に VC 不足マウスにおける ROS 産生が亢進しているかどうかは、不明である。

私たちが所属する東京都健康長寿医療センター研究所で開発されたリアルタイムバイオグラフィー法は、脳における ROS 産生をリアルタイムに捉える新規のシステムである。本研究ではまず、(1)リアルタイムバイオグラフィー法および SMP30/GNL-KO マウスを用いて、VC 欠乏マウスは ROS 産生が亢進するかどうかを検討した。

水素ガスは、弱い還元力を有しており、選択的に ROS、特に毒性の強いヒドロキシラジカルヒドロキシシルラジカルを消去することが報告されている。そこで、(2)リアルタイムバイオグラフィー法を用いて、水素水を投与して飼育した VC 欠乏マウスの脳における ROS 産生は、減少するかどうかを検討した。

機能性食品に含まれる有効成分は、必ずしも脳に移行するとは限らない。従って、全身組織における抗酸化能の簡便な評価系が求められる。(3) VC 欠乏マウスの各組織 (胃、十二指腸、精巣、脳、膵臓、心臓、足底筋、平目筋、腎臓) における ROS 産生能を解析した。

## 3. 研究の方法

(1) 4 週齢の SMP30/GNL-KO マウスと野生型マウスを VC 欠乏飼料にて飼育し、飲料水からマウスが 1 日に必要とする VC 量 (VC, 約 7 mg) を与える群と与えない群の 4 群 (各群 5 匹) に分けた。VC 投与、非投与 4 週間後、8 週間後、マウス脳を摘出した後、すぐに脳スライスを作製した。ROS の一種であるスーパーオキシドアニオンと反応し化学発光する試薬 Lucigenin を含む培地中に脳スライスを置き、酸素ガスバブリング下、 $O_2^-$

依存性 Lucigenin 化学発光を高感度 CCD カメラでリアルタイムに撮影した。インキュベーション中にいわゆる”虚血-再灌流”に似た操作を行い、ROS 産生を誘導した。即ち、窒素ガスで培地中の酸素を追い出した後、再び酸素ガスでバブリングした。還元型および酸化型 VC 濃度は、HPLC-電気化学検出器法により定量した。また、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性、ウエスタン法により Mn-SOD, Cu, Zn-SOD, カタラーゼの各タンパク質量を測定した。

(2) SMP30/GNL-KO マウスを 4 週齢で離乳後、水素水を与えた群 (水素水投与群)、VC 水を与えた群 (VC 投与群)、水のみを与えた群 (水投与群) の 3 群 (各群 5 匹) に分けて飼育した。水素ガスは揮発性が高いため、飲料水は 1 日 2 回交換した。飼育 4 週間後、マウスの脳を薄切して脳スライスを作成した。前述の方法と同様に、脳スライスの VC 濃度および ROS 産生を測定した。

(3) 4 週齢の SMP30/GNL-KO マウスと野生型マウスを VC 欠乏飼料にて飼育し、飲料水からマウスが 1 日に必要とする VC 量 (7 mg) を与える群と与えない群の 4 群 (各群 5 匹) に分けた。VC 投与、非投与 7 週間後、14 週間後に各マウスを解剖し、全身の組織を摘出した。各組織 (胃、十二指腸、精巣、脳、膵臓、心臓、足底筋、平目筋、腎臓) における ROS 産生能は、組織破砕液を ROS 検出試薬 carboxy- $H_2$ DCFDA と混合した後、蛍光強度を 37°C で 60 分間測定して算出した。

## 4. 研究成果

(1) VC 非投与 4 週間後、8 週間後の SMP30/GNL-KO マウス脳における総 VC 濃度は、VC 投与群に比べてそれぞれ 6%、2% にまで低下していた。SMP30/GNL-KO マウスの脳における Lucigenin 化学発光量 (ROS 産生量) は、VC 非投与 4 週間、8 週間後において、VC 投与群に比べて 2.5 倍、2.1 倍にそれぞれ有意に増加した。また、VC 非投与 4 週間、8 週間後の SMP30/GNL-KO マウスの脳における総 SOD 活性、Mn-SOD, Cu, Zn-SOD, カタラーゼの各タンパク質量は、VC 投与群に比べて有意な差が認められなかった。以上の結果から、VC 欠乏マウスの脳における ROS 産生は、増加することが明らかとなった。

(2) 水素水および水投与群の脳における VC 濃度は、VC 投与群に比べて 6% 以下であった。

水素水投与群マウスの脳における Lucigenin 化学発光量は、水投与群に比べて有意に 27% 減少した。これらの結果は、水素水の飲用は ROS 産生を抑制することを示している。VC 欠乏マウスは、機能性食品の抗酸化能評価に有用である。

(3) VC 非投与 7 週間および 14 週間後において、SMP30/GNL-KO マウスの各組織中総 VC 濃度は、VC 投与群に比べて 1-9%の低値を示した。SMP30/GNL-KO マウス VC 非投与群の脾臓および腎臓における ROS 産生能は、VC 非投与 14 週間後において VC 投与群に比べて 31-34% 有意に増加した。また、7 週間および 14 週間後において、SMP30/GNL-KO マウス VC 非投与群の胃、十二指腸、精巣 脳、心臓、足底筋、平目筋における ROS 産生能は、VC 投与群に比べて 27-108%の有意な増加が認められた。本研究から、VC が欠乏した SMP30/GNL-KO マウスの様々な組織において、ROS 産生は増加することが示された。同試験系を用いることにより、全身の各組織における機能性食品の抗酸化能は、より簡便に評価できると期待される。

#### 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 10 件)

1. Koike, K., Kondo, Y., Sekiya, M., Sato, Y., Tobino, K., Iwakami, S., Goto, S., Takahashi, K., Maruyama, N., Seyama, K. and Ishigami, A. : Complete lack of vitamin C intake generates pulmonary emphysema in senescence marker protein-30 knockout mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 298(6), 784-792 (2010) 査読有
2. Hasegawa, G., Yamasaki, M., Kadono, M., Tanaka, M., Asano, M., Senmaru, T., Kondo, Y., Fukui, M., Obayashi, H., Maruyama, N., Nakamura, N. and Ishigami, A. : Senescence Marker Protein-30/Gluconolactonase deletion worsens glucose tolerance through impairment of acute insulin secretion. *Endocrinology* 151(2), 529-536 (2010) 査読有
3. Kashio, A., Amano, A., Kondo, Y., Sakamoto, T., Iwamura, H., Suzuki, M., Ishigami, A. and Yamasoba, T. : Effect of vitamin C depletion on age-related hearing loss in SMP30/GNL knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390(3), 394-398 (2009) 査読有
4. Arai, Y.K., Sato, Y., Kondo, Y., Kudo, C., Tsuchiya, H., Nomura, Y., Ishigami, A., and Nishiyama, T. : Effects of vitamin C deficiency on the skin of the senescence marker protein-30 (SMP30) knockout mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385, 478-483 (2009) 査読有
5. Kondo, Y., Sasaki, T., Sato, Y., Amano, A., Iwama, M., Handa, S., Shimada, N., Fukuda, M., Akita, M., Lee, J., Jeong, K.S., Maruyama, N., Ishigami, A. : Vitamin C depletion increases superoxide generation in brains of SMP30/GNL knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 291-296 (2008) 査読有
6. Sato, Y., Kajiyama, S., Amano, A., Kondo, Y., Sasaki, T., Handa, S., Takahashi, R., Fukui, M., Hasegawa, G., Nakamura, N., Fujinawa, H., Mori, T., Ohta, M., Obayashi, H., Maruyama, N., Ishigami, A. : Hydrogen-rich pure water prevents superoxide formation in brain slices of vitamin C-depleted SMP30/GNL knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375, 346-50 (2008) 査読有
7. Furusawa, H., Sato, Y., Tanaka, Y., Inai, Y., Amano, A., Iwama, M., Kondo, Y., Handa, S., Murata, A., Nishikimi, M., Goto, S., Maruyama, N., Takahashi, R. and Ishigami, A. : Vitamin C is not essential for carnitine biosynthesis in vivo: Verification in vitamin C-depleted SMP30/GNL knockout mice. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 1673-1679 (2008) 査読有
8. 古澤元、佐藤安訓、田中康一、井内陽子、天野晶子、岩間水輝、近藤嘉高、半田節子、村田晃、錦見盛光、後藤佐多良、丸山直記、高橋良哉、石神昭人 : カルニチン生合成系へのビタミンCの関与. *ビタミン* 83, 287-289 (2009) 査読有
9. 近藤嘉高、石神昭人、丸山直記 : 老化とバイオマーカー. *医学のあゆみ* 227 563-566 (2008) 査読有
10. 近藤嘉高、石神昭人 : ヒト赤血球では stomatin が Glut1 と結合することによりデヒドロアスコルビン酸を取り込む. *ビタミン* 82 : 510-513, (2008) 査読有

[学会発表] (計 36 件)

1. 東千華、近藤嘉高、岩間水輝、石原克之、半田節子、丸山直記、古賀秀徳、石神昭人 : ヒトにおけるじゃがいもおよびポテトチップスに含まれるビタミンCの

- 吸収. 日本農芸化学会 2010 年度大会, 東京, 2010.3.27-30
2. Hasegawa, G., Ishigami, A., Kondo, Y., Tanaka, M., Senmaru, T., Yamasaki, M., Fukui M., Nakamura, N. : Senescence Marker Protein-30 deletion worsens glucose tolerance through impairment of acute insulin secretion. 14th International Congress of Endocrinology (ICE2010), Kyoto, Japan, 2010.3.26-30
  3. 人見嘉哲、辻本藤太郎、石神昭人、近藤嘉高、神林康弘、弘田量二、日比野由利、柴田亜樹、中村裕之 : ストレスによるマウス血漿総抗酸化能、抗酸化物質濃度の変化. 第9回分子予防環境医学研究会, 東京, 2010.1.22-23
  4. Kondo, Y. : Increased generation of reactive oxygen species in tissues of vitamin C-depleted SMP30/GNL knockout mice. 3rd Korea-Japan Joint Research Project Symposium, Anyang, Korea, 2010.1.11
  5. Koike, K., Kondo, Y., Sekiya, M., Tobino, K., Takahashi, K., Maruyama, N., Seyama, K., Ishigami, A. : Complete lack of vitamin C intake generates pulmonary emphysema in senescence marker protein-30 knockout mice. 14th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, Seoul, Korea, 2009.11.14-18
  6. 小池建吾、瀬山邦明、石神昭人、近藤嘉高、吉見格、児玉裕三、関谷充晃、丸山直記、高橋和久 : SMP30 ノックアウトマウスにおけるビタミンCの肺気腫発生予防効果の検討. 第13回東京呼吸病態研究会, 東京, 2009.11.10
  7. Kondo, Y., Sasaki, T., Handa, S., Maruyama, N., Ishigami, A. : Vitamin C depletion increases superoxide generation in brains of SMP30/GNL knockout mice. 19th International Association of Gerontology and Geriatrics World Congress of Gerontology and Geriatrics, Paris, France, 2009.7.5-9
  8. 丸山直記、ニンイソウ、近藤嘉高、石神昭人、八代田真人、大谷滋 : 産卵鶏における組織中アスコルビン酸およびSMP30 レベルに及ぼす誘導換羽の影響. 第32回日本基礎老化学会大会, 横浜, 2009.6.20
  9. 小池建吾、瀬山邦明、石神昭人、近藤嘉高、吉見格、児玉裕三、関谷充晃、丸山直記、高橋和久 : SMP30 ノックアウトマウスにおけるビタミンCの肺気腫発生予防効果の検討. 第49回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2009.6.13
  10. 佐藤安訓、近藤嘉高、天野晶子、相澤真悟、半田節子、石神昭人 : 高濃度水素溶解水によるスーパーオキシドアニオン増加抑制効果. 日本ビタミン学会第61回大会, 京都, 2009.5.31
  11. 山嵜達也、檜尾明憲、坂本幸士、岩本均、近藤嘉高、石神昭人 : マウスの老人性難聴に対するビタミンCの欠乏および補充の影響. 第9回日本抗加齢医学会総会, 東京, 2009.5.28-30
  12. Yamasoba, T., Kashio, A., Sakamoto, T., Iwamura, H., Suzuki, M., Kondo Y., Ishigami, A. : Effect of Modulating Vitamin C Levels on Age-Related Hearing Loss. Association for Research in Otolaryngology 32th Annual MidWinter Research Meeting, Baltimore, Maryland, USA, 2009.2.17
  13. 小池建吾、瀬山邦明、近藤嘉高、関谷充晃、飛野和則、丸山直記、石神昭人、高橋和久 : ビタミンC枯渇条件下ではマウス肺に肺気腫が生じる. 第78回閉塞性肺疾患研究会, 東京, 2009.1.24
  14. 近藤嘉高、佐々木徹、佐藤安訓、天野晶子、岩間水輝、半田節子、島田信子、福田貢、丸山直記、石神昭人 : ビタミンC欠乏は脳における活性酸素の生成を増加. 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会, 神戸, 2008.12.9-12
  15. 石堂一巳、宮内梨早、高橋昌江、熊坂利夫、三谷恵子、近藤嘉高、石神昭人、丸山直記、勝沼信彦 : 老化マーカータンパク質SMP30 はヒト扁平上皮癌におけるアポトーシス促進因子である. 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会, 神戸, 2008.12.9-12
  16. Kondo, Y. : Vitamin C depletion increases superoxide generation in brains of SMP30/GNL knockout mice. 1st Korea-Japan Joint Research Project Symposium, Cheju, Korea, 2008.12.1
  17. 近藤嘉高、石神昭人 : ビタミンCの持つ抗老化作用. 第15回日本未病システム学会, 東京 2008.11.1-2
  18. 岸本成史、手塚 優、西郡秀夫、石川陽平、橋爪公平、黒坂大次郎、近藤嘉高、石神昭人、山本直樹 : SMP30 欠損マウスにおける光負荷時の水晶体の変化. 第47回日本薬学会東北支部大会および東北病院薬剤師会総会, 岩手, 2008.10.26
  19. 近藤嘉高、石神昭人 : ビタミンC不足は脳における活性酸素を増加する-ビタミンCを合成できないSMP30/GNLノックアウトマウスを用いた解析-. 第127回

- ビタミンC研究委員会，東京，2008.10.18
20. 小池建吾、瀬山邦明、袁益明、秋吉妙子、岩間水輝、天野晶子、佐藤安訓、近藤嘉高、石神昭人、後藤佐多良、丸山直記、高橋和久：抗酸化剤摂取はSAMP1の老化を抑制するか？. 第23回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会研究発表会，京都，2008.7.17-18
  21. 近藤嘉高、佐々木徹、佐藤安訓、天野晶子、岩間水輝、半田節子、島田信子、福田貢、丸山直記、石神昭人：脳におけるビタミンCの活性酸素消去能の検討. 第60回日本ビタミン学会，仙台，2008.6.13-14
  22. 佐藤安訓、岸本祐樹、天野晶子、岩間水輝、近藤嘉高、高橋良哉、石神昭人：ビタミンC欠乏による肝臓での酸化ストレスの解析. 第60回日本ビタミン学会，仙台，2008.6.13-14
  23. 岩間水輝、佐藤安訓、永峰賢一、花村高行、青木仁史、天野晶子、近藤嘉高、石神昭人：SMP30/GNLノックアウトマウスを用いたビタミンC吸収効率評価系の確立. 第60回日本ビタミン学会，仙台，2008.6.13-14
  24. 花村高行、青木仁史、永峰賢一、佐藤安訓、天野晶子、近藤嘉高、石神昭人：ヒト1回摂取によるビタミンC及びアセロラビタミンCの吸収や体内動態に関する検討. 第60回日本ビタミン学会，仙台，2008.6.13-14
  25. 近藤嘉高、佐々木徹、佐藤安訓、天野晶子、岩間水輝、半田節子、島田信子、福田貢、丸山直記、石神昭人：脳におけるビタミンCの活性酸素消去能の解析. 第31回日本基礎老化学会，松本，2008.6.12-13
  26. 岩間水輝、佐藤安訓、天野晶子、近藤嘉高、岸本祐樹、町田武生、石神昭人：マウス臓器中ビタミンCの加齢変化. 第31回日本基礎老化学会，松本，2008.6.12-13
  27. 田中慎、野田万理子、天野晶子、岩間水輝、岸本祐樹、佐藤安訓、近藤嘉高、石神昭人：C57BL/6マウスの下顎骨と大腿骨の骨性状. 第31回日本基礎老化学会，松本，2008.6.12-13
  28. 田中慎、野田万理子、天野晶子、岩間水輝、岸本祐樹、佐藤安訓、近藤嘉高、石神昭人：C57BL/6マウスの下顎骨と大腿骨へのビタミンCの影響. 第31回日本基礎老化学会，松本，2008.6.12-13
  29. 田中慎、野田万理子、天野晶子、岩間水輝、岸本祐樹、佐藤安訓、近藤嘉高、石神昭人：SMP-30ノックアウトマウスの下顎骨と大腿骨の骨性状. 第31回日本基礎老化学会，松本，2008.6.12-13
  30. Hasegawa, G., Ishigami, A., Kondo, Y., Kadono, M., Asano, M., Tanaka, M., Hosoda, H., Yamasaki, M., Fukui, M., Nakamura, N. : Role of Senescence Marker Protein-30 in Glucose Homeostasis. American Diabetes Association 68th Scientific Sessions, San Francisco, California, 2008.6.6-10
  31. 新井浩司、工藤千香子、土屋博之、佐藤安訓、近藤嘉高、野村義宏、石神昭人、西山敏夫：ビタミンC欠乏は皮膚のコラーゲン含量を減少させる. 第40回日本結合組織学会，東京，2008.5.29-31
  32. Iwama, M., Kondo, Y., Sato, Y., Amano, A., Uchiki, T., Machida, T., Ishigami, A. : Age-related Changes of Vitamin C Concentration in Various Tissues from Mice. The 7th Korea-Japan Joint symposium of Biomedical gerontology, Deague, Korea, 2008.5.15-16
  33. 近藤嘉高、佐々木徹、佐藤安訓、天野晶子、岩間水輝、丸山直記、石神昭人：リアルタイムバイオグラフィー法を用いた脳におけるビタミンC活性酸素消去能の検討. 第62回日本栄養・食糧学会，埼玉，2008.5.2-4
  34. 佐藤安訓、永峰賢一、花村高行、青木仁史、天野晶子、近藤嘉高、石神昭人：ヒト経口1回摂取によるビタミンC及びアセロラビタミンCの吸収や体内動態に関する詳細な検討. 第62回日本栄養・食糧学会，埼玉，2008.5.2-4
  35. 岩間水輝、佐藤安訓、永峰賢一、花村高行、青木仁史、天野晶子、近藤嘉高、石神昭人：ビタミンC合成不全マウスを用いたビタミンC吸収効率評価系の確立 -アセロラはビタミンC吸収効率が良い-. 第62回日本栄養・食糧学会，埼玉，2008.5.2-4
  36. 天野晶子、近藤嘉高、岩間水輝、佐藤安訓、半田節子、相垣敏郎、石神昭人：ビタミンC生合成経路で働く酵素グルコノラクトナーゼ(SMP30/GNL)の加齢変化. 第62回日本栄養・食糧学会，埼玉，2008.5.2-4
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
- 近藤 嘉高 (KONDO YOSHITAKA)
- 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員
- 研究者番号：20507397

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者