

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05537

研究課題名(和文)エルゴチオネイン生合成トランスジェニックマウスの開発と応用

研究課題名(英文)Development and application of ergothioneine biosynthetic transgenic mice

研究代表者

坂井 隆浩 (Sakai, Takahiro)

高崎健康福祉大学・薬学部・助教

研究者番号：10418618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒドロキシラジカル( $\cdot\text{OH}$ )は、生体内で生合成される活性酸素種(ROS)の中で、最も酸化力が強い。酸化ストレス関連疾患の発症・悪化に多大な影響を与えると考えられている。しかし、 $\cdot\text{OH}$ は生体内において非酵素依存的に生合成されるため、遺伝子ノックアウト法等の適切な解析方法がない。そのため、未だに生体内における $\cdot\text{OH}$ の機能は不明瞭な点が多い。このことから本研究では、生体内における $\cdot\text{OH}$ の機能を明らかにするため、 $\cdot\text{OH}$ を特異的に消去するエルゴチオネイン(EGT)に着目し、EGTを生合成するトランスジェニックマウス(Egt-Tgマウス)を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ROSは、細胞を酸化損傷することによって酸化ストレスを誘導する。生体内のROSのうち $\text{O}_2^-$ および $\text{H}_2\text{O}_2$ は、これらの還元酵素が生体内に存在するため、遺伝子KO法によって、様々な機能が解明されてきた。しかしながら、ROSの中でも酸化力が最も強く、酸化ストレスの根源とされる $\cdot\text{OH}$ は、フェントン反応等の生体内金属触媒反応によって生成されることに加え、 $\cdot\text{OH}$ を生体内で消去する還元酵素が無い。そのため、生体内における $\cdot\text{OH}$ の機能は未だに不明瞭な点が多い。このことから、本研究で開発したEgt-Tgマウスは、*in vivo*において $\cdot\text{OH}$ の詳細な機能を解明できる極めて有用な解析ツールである。

研究成果の概要(英文)：Hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ) has the strongest oxidative power among active oxygen species (ROS) that are biosynthesized *in vivo*, and is thought to have a great effect on the onset and exacerbation of oxidative stress-related diseases. However, since  $\cdot\text{OH}$  is biosynthesized *in vivo* in a non-enzyme-dependent manner, there is no appropriate analysis method such as a gene knockout method. Therefore, there are still many unclear points about the function of  $\cdot\text{OH}$  in the living body. Therefore, in this study, we focused on ergothioneine (EGT), which specifically eliminates  $\cdot\text{OH}$ , in order to clarify the function of  $\cdot\text{OH}$  *in vivo*, and we developed a transgenic (Egt-Tg) mouse that biosynthesizes EGT.

研究分野：実験動物学、食品機能学

キーワード：酸化ストレス 活性酸素種 ヒドロキシラジカル トランスジェニックマウス 炎症 細胞老化

## 1. 研究開始当初の背景

活性酸素種 (ROS) は、細胞を酸化損傷することによって酸化ストレスを誘発する。酸化ストレスは、多くの疾患の発症・悪化に多大な影響を及ぼす。このことから、これまでに ROS は、生体内において負の作用を引き起こす「悪者」とされてきた。しかしながら近年、ROS は胚発生の制御や生体の恒常性維持等において、多くの正の機能を担う重要な役割があることが分かってきた。生体内の ROS は、スーパーオキシド ( $O_2^-$ ) を出発点に、過酸化水素 ( $H_2O_2$ )、ヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ ) の 3 種類が順に生合成される。 $O_2^-$  および  $H_2O_2$  は酸化力が弱いため、細胞を酸化損傷する力は弱く、免疫応答やレドックスシグナル因子として、正の役割を担うことが分かっている。その一方で  $\cdot OH$  は、他の ROS よりも著しく反応性が高く、酸化力が強力であることから、細胞の酸化損傷に多大な影響を及ぼし、酸化ストレスを誘導する中心的な役割を担うと考えられているが、未だにその機能は不明瞭な点が多い。これに加え、 $\cdot OH$  もレドックスシグナル因子としての正の作用および機能があることが推測されているが、これに関する報告もこれまでにほとんど無い。このように、未だに  $\cdot OH$  の正および負の機能が不明瞭な理由は、 $\cdot OH$  がフェントン反応等の生体内金属触媒反応によって生成されることに加え、 $\cdot OH$  を生体内で消去する還元酵素が無いためである。これに加え、多くの抗酸化剤のほとんどは、全ての ROS に無作為に反応するため、これらを利用した検討では、 $\cdot OH$  の機能を解明できない。これとは別に、尿素のような  $\cdot OH$  を特異的に消去する抗酸化物質は、著しい細胞毒性を示すことが知られている。これらの背景から、これまでに申請者は、これらの既存の抗酸化剤の問題点を解決した新規  $\cdot OH$  標的抗酸化剤 TA293 等を開発し、これらを利用した検討から、*in vivo* および *in vitro* における  $\cdot OH$  の機能を検討してきた。その結果、 $\cdot OH$  は細胞内の DNA やタンパク質の酸化には直接関与しないが、脂質成分を特異的に酸化することにより、細胞老化、炎症反応および細胞老化を引き起こすことを見出した一方で、ミトファジーを誘導することによって炎症や線維化の悪化を抑制する正の役割を示すことを明らかにした。しかしながら、TA293 等の抗酸化剤をマウスに投与する実験方法では、生体内において全ての臓器・組織に移行しないため、これらを利用した方法では、*in vivo* における  $\cdot OH$  の機能を完全に解明することができない。これに加え、TA293 等の抗酸化剤は、投与後、経時的に代謝されるため、恒常的に  $\cdot OH$  を生成し続ける酸化ストレス関連疾患モデルマウス等の *in vivo* モデルにおいては、継続的に生体内の  $\cdot OH$  を消去し続けることが困難であり、生体内における  $\cdot OH$  の正確な機能を明らかにすることができない。

この問題を解決するために、申請者は、キノコ類などの菌類が生成する抗酸化物質エルゴチオネイン (EGT) に着目した。EGT は、EGT 合成酵素によって生合成される。EGT の興味深い特徴は、pH が弱酸性から中性では、ビタミン E の約 7000 倍もの強力な抗酸化力を示し、非選択的に全ての ROS を消去する。その一方で、弱アルカリ性の生体内では、チオール型 (R-S-H) からチオン型 (R=S) に平衡が傾き、二重結合によって硫黄 S が強く結合することから、還元力が著しく弱くなり、酸化力の強い  $\cdot OH$  だけを特異的に消去する。このことから、生体内で EGT を生合成するマウスを開発すれば、生体内の  $\cdot OH$  の作用および機能を解明できると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、酸化ストレス関連疾患や生体の恒常性維持における  $\cdot OH$  の機能を解明することである。そのために、生体内の  $\cdot OH$  を安定的に消去する EGT を生合成するトランスジェニックマウス (Egt-Tg マウス) を開発し、これを利用した検討によって、これまでに不明瞭であった生体内の  $\cdot OH$  の機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) EGT 合成酵素遺伝子発現ベクターの作製

*Mycobacterium smegmatis* における EGT 合成酵素遺伝子である *gshA*、*egtB*、*egtC*、*egtD* および *egtE* の塩基配列をデータベースから入手した。次に、哺乳類細胞において、これらの遺伝子を適切に発現させるために OptimumGene™ を用いて哺乳類仕様の GC 含量に調整し、コドンの最適化を行った。次に、これらの各遺伝子が均一に発現するために、P2A 配列を設置した。これらの塩基配列は人工合成により合成した。さらに、これを pCAGGS ベクターに挿入することによって、EGT 合成酵素遺伝子発現ベクターを作製した。作製した EGT 合成酵素遺伝子発現ベクターは、制限酵素処理および電気泳動を行い、予想される構造の DNA 切断パターンを示すことを確認した。

### (2) *In vitro* における EGT 合成酵素遺伝子発現の検討

HEK293T 細胞を 6 well plate に  $1 \times 10^5$  cells/well 播種した後、Lipofectamine® LTX Reagent with Plus™ Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて EGT 合成酵素遺伝子発現ベクターを HEK293T 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入から 2 日後に回収した HEK293T 細胞は、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) および RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて、DNA および mRNA を抽出した。抽出した DNA は、KOD FX (TOYOBO) および *gshA*、*egtB*、*egtC*、*egtD* および *egtE* 検出用プ

ライマーを用いた PCR 反応を行い、細胞内に Egt 合成酵素遺伝子が挿入されていることを確認した。さらに、mRNA は、DNase (Thermo Fisher Scientific) で処理した後、SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) と *gshA*、*egtB*、*egtC*、*egtD* および *egtE* 検出用プライマーを用いて cDNA 合成および RT-PCR を行い *gshA*、*egtB*、*egtC*、*egtD* および *egtE* の発現を確認した。

### (3) Egt-Tg マウスの作製

Pac、Sfi および Pvu により EGT 合成酵素遺伝子発現ベクターを制限酵素処理した後、電気泳動によりプラスミド・ベクター配列を分離し、発現カセット部分 (約 8.2 kbp) のゲル抽出および DNA 精製を行った。得られた直鎖状 DNA 断片をトランスジーンとし、インジェクションバッファーで希釈調製した後、これを 202 個の C57BL/6J 系統由来前核期受精卵にマイクロインジェクションした。その後、状態が良好な 2 細胞期胚 192 個を ICR 系統の子宮に移植し、50 匹の F0 個体を産出した。これらのうち、9 匹が離乳前に死亡したが、残りの 41 匹 (30 匹、11 匹) が離乳に至った。離乳した 41 匹の F0 個体の体組織から DNA を採取および抽出し、CAG promoter 上流および rabbit beta-globin 3' flanking region にプライマーを設置することによって、トランスジーン (7.9 kbp) を増幅し、トランスジーンが挿入された F0 個体を同定した。さらに、これらの個体は、C57BL/6J と交配し、F1 個体を作出した後、これらの個体の体組織から DNA を採取および抽出し、PCR によるジェノタイプングを行い、トランスジーンの有無を確認することによって EGT-Tg マウスを同定した。

## 4. 研究成果

本研究では、*Mycobacterium smegmatis* 由来の EGT 合成酵素遺伝子である *gshA*、*egtB*、*egtC*、*egtD* および *egtE* を均一に発現する EGT 合成酵素遺伝子発現ベクターを作製した。EGT 合成酵素遺伝子発現ベクターを HEK293T 細胞に遺伝子導入した RT-PCR を行った結果、*gshA*、*egtB*、*egtC*、*egtD* および *egtE* は、ほぼ均一に発現していることが観察された。さらに、この細胞を ROS 誘導剤で刺激した後、ROS 除去活性を検討した結果、O<sub>2</sub> および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> には消去活性を示さない一方で、特異的に・OH だけを消去することが明らかになった。

次に、この EGT 合成酵素遺伝子発現ベクターをトランスジーンとして遺伝子導入した Egt-Tg マウスを開発した。このマウスから採取した Egt-Tg マウス由来 Mouse Embryo Fibroblast (MEF) を ROS 誘導剤で刺激した後、ROS 除去活性を調べた結果、・OH だけを特異的に消去することが明らかになった。これに加え、Egt-Tg マウスに ROS 誘導剤を投与し、各臓器の ROS 除去活性を調べた結果、調査した全ての臓器において、・OH だけを特異的に消去することが明らかになった。これらのことから、Egt-Tg マウスは *in vivo* において・OH の機能を調べることのできる解析ツールになりうることを示唆された。

さらに、ROS 誘導剤で刺激した Egt-Tg マウス由来 MEF において、酸化ストレス、細胞老化およびミトファジーに及ぼす影響を調べた。その結果、Egt-Tg マウス由来 MEF は、酸化ストレス、細胞老化およびミトファジーを抑制することが明らかになった。これに加え、Egt-Tg マウスに ROS 誘導剤を投与し、各臓器の酸化ストレス、炎症反応、細胞老化およびミトファジーに及ぼす影響を検討した。その結果、調査した全ての臓器において、酸化ストレス、炎症反応、細胞老化およびミトファジーを抑制することが明らかになった。これらの結果から Egt-Tg マウスは、TA293 等の・OH 標的抗酸化剤と同様に、酸化ストレス、炎症反応、細胞老化およびミトファジーを抑制することが示唆された。

これらの結果から現在、Egt-Tg マウスを酸化ストレス、炎症反応および細胞老化可視化マウスと交配した個体を作出し、各酸化ストレス関連疾患において、・OH がこれらに及ぼす影響を経時的に解析できる新たな実験方法を構築している。今後、これらのマウスに種々の酸化ストレス関連疾患を誘導した後、長期間における経時的な *in vivo* イメージング解析することによって、・OH が各酸化ストレス関連疾患に及ぼす影響をより詳細に解明することを目指している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Takahiro Sakai, Hidetsugu Takagaki, Noriyuki Yamagiwa, Michio Ui, Shinichi Hatta, Jun Imai	4. 巻 10(9)
2. 論文標題 Effects of the Cytoplasm and Mitochondrial Specific Hydroxyl Radical Scavengers TA293 and mitoTA293 in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis Model Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1398
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox10091398.	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 該当する
1. 著者名 Imai Jun, Ohashi Sayaka, Sakai Takahiro	4. 巻 12(2)
2. 論文標題 Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation-Dependent Processing in Cross-Presentation and Its Potential for Dendritic Cell Vaccinations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 153
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics12020153	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 該当する
1. 著者名 Imai Jun, Koganezawa Yuta, Sakai Takahiro	4. 巻 40(6)
2. 論文標題 Dendritic cells as a detecting unit for beneficial anti-allergy microbes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Allergy in practice	6. 最初と最後の頁 13-17
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 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 Imai Jun, Koike Eriko, Sakai Takahiro	4. 巻 40(10)
2. 論文標題 Detections of beneficial anti-allergy microbes by dendritic cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Allergy in practice	6. 最初と最後の頁 829-834
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 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 Imai Jun , Ohashi Sayaka, Sakai Takahiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Distinct Subcellular Compartments of Dendritic Cells Used for Cross-Presentation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20225606	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 該当する

1. 著者名 Imai Jun, Koganezawa Yuuta, Tuzuki Haruka , Ishikawa Ikumi , Sakai Takahiro	4. 巻 43
2. 論文標題 An optical and noninvasive method to detect the accumulation of ubiquitin chains	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Biology International	6. 最初と最後の頁 1393-1406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbin.11186	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 該当する

1. 著者名 Sakai Takahiro, Imai Jun, Takagaki Hidetsugu, Ui Michio, Hatta Shinichi	4. 巻 221
2. 論文標題 Cytoplasmic OH scavenger TA293 attenuates cellular senescence and fibrosis by activating macrophages through oxidized phospholipids/TLR4	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 284 ~ 292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2019.02.038	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 該当する

1. 著者名 Sakai Takahiro, Kurokawa Ryosuke, Hirano Shin-ichi, Imai Jun	4. 巻 20
2. 論文標題 Hydrogen Indirectly Suppresses Increases in Hydrogen Peroxide in Cytoplasmic Hydroxyl Radical-Induced Cells and Suppresses Cellular Senescence	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 456 ~ 456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20020456	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	今井 純  (Imai Jun)  (30342918)	高崎健康福祉大学・薬学部・准教授    (32305)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------