

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20700600

研究課題名（和文） 酵母テスター株を用いた食品、天然物由来の抗老化物質の探索

研究課題名（英文） Screening for anti-aging substances from food and natural product extracts using *Saccharomyces cerevisiae* mutation assay.

研究代表者

清水 雅富（SHIMIZU MASATOMI）

東京医療保健大学・医療保健学部・講師

研究者番号：90389841

研究成果の概要（和文）：

天然物及び食品中からの抽出物について抗老化作用の検討を行った結果、ピーナッツ渋皮抽出物、トマト抽出物、かぼちゃ抽出物について出芽酵母に起こる突然変異を抑制する傾向が見られた。一方、茶葉抽出物については、突然変異を促進させる傾向が見られた。さらに突然変異に関わる候補物質の特定を行ったところ、ピーナッツ渋皮抽出物等に多く含まれているレスベラトロールに抗老化作用があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene; RSV) is a polyphenol found in particularly high concentrations in peanut skin and vine. Here we investigated the anti-mutagenic effects of RSV in *Saccharomyces cerevisiae* strain 7B. Our results showed that RSV pretreatment for 24 h decreased mutagenesis. Thus the exposure of *S. cerevisiae* 7B to RSV induces an anti-aging effect. This result raises intense interest for the potentially beneficial effects of RSV on human health.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総 計	2,400,000	750,000	3,250,000

研究分野：食生活学

科研費の分科・細目：生活科学・生活科学一般

キーワード：抗老化物質、DNA 損傷、ミトコンドリア、天然物、出芽酵母、食品、抗変異原物質、突然変異

1. 研究開始当初の背景

現在、わが国は世界でも有数の“長寿国”として知られている。その一方で、65歳以上の高齢者人口は年々増加傾向にあり、2030

年には国民の3人に1人が高齢者という、かつてどの国も経験しなかった高齢社会を迎えることが予想されている。このような急速な高齢化は、医学、医療、福祉の領域にとど

まらず、経済、文化にまで大きなインパクトを与える。加齢自体は誰しも避けられないことではあるが、加齢に伴う老化症状の遅延や老化に関連した疾病の予防に効果的な対策が必要である。現在、健康増進という観点から、老化や生活習慣病の予防に役立つ食品、すなわち食経験豊富で且つ安全性が高い機能性食品の開発が求められている。食品や天然物から老化抑制効果を持つ物質が同定できれば、安全性の高い機能性食品の開発や、それらの効果的な摂取法の考案につながる事が期待される。

2. 研究の目的

老化現象は生活習慣病と同じように、遺伝的要因（老化遺伝子、抗老化遺伝子）と環境要因（食事、運動、ストレス）によってもたらされると考えられている。それら要因に関与するDNA損傷が老化を引き起こすことが多くの研究によって報告されている。

ヒトが生きていく上で「食」は必要不可欠であり、それ故に「食」を通じ、常に多くの物質に曝露されている状態にある。食事によって摂取される多種類の物質の中には、DNA損傷を誘発するものもあるが、逆に抑制するものも含まれている。そこで、本研究では、DNA損傷によって起こる遺伝子突然変異に注目し、出芽酵母の *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) を遺伝子突然変異解析用に改良したテスター株を用い、老化や生活習慣病を予防する新規な物質を効率的にスクリーニングすることを目的に実験を行う。更に、ミトコンドリアDNA損傷を標的とした検出系を開発するため、既存の酵母テスター株をミトコンドリアDNA損傷に対し感受性の高い株に改良し、ミトコンドリア機能低下から引き起こされるDNA損傷を標的とした老化や生活習慣病を予防する新規な物質についてもスクリーニングを行ない、その有効性、機能性についても明らかにしていく。

3. 研究の方法

酵母は単細胞真核生物でありながら重要な細胞機能の多くがヒトなどの高等生物と共通であるという特徴を持ち、古くから分子生物学的手法のモデル生物として取り扱われている。本研究では、*S. cerevisiae* をテスター用に改良した株 *S. cerevisiae* 7B (*MATa CAN1 his7-2 leu2-3, 112 ura3-Δ trp1-289 ade2-1 lys2-B12*) を用いる。

(1) 酵母テスターを用いた新規な老化抑制物質（食品、天然物由来）のスクリーニング
出芽酵母の生育を阻害するカナバニンはアルギニンの構造類似体である。通常野生株はカナバニンの入った培地では生育できないが、カナバニンを細胞内に運ぶ arginine

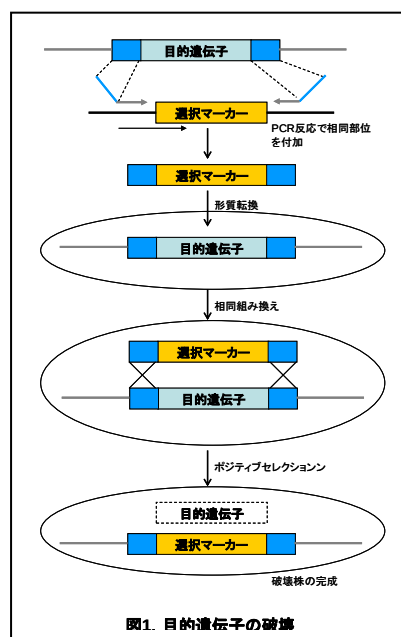
permease 遺伝子に変異が生じると、カナバニンの入った培地上でもコロニーを形成する。テスター株のみと、テスター株に食品および天然物由来の抽出物を混合したもので変異頻度を比較し、変異抑制効果をもたらす物質を探索していく。

(2) Azidoglycerol (AG)の突然変異スペクトラム解析

アジ化ナトリウムは、生体内においてミトコンドリア内の酵素の働きを阻害し活性酸素産生を増大させることが知られている。アジ化ナトリウムを代表とするアジ化物は、多くの生物にとって変異原性を有することが報告されているが、そのメカニズムについてはあまり報告されていない。そこで本研究では、酵母に強い変異原性をもたらすアジ化物の一つである AG について、変異スペクトラムを解析しそのメカニズムを明らかにする。

(3) 新規酵母テスター株の作成

出芽酵母の塩基除去修復（ウラシル DNA グリコシラーゼ）酵素をコードしている遺伝子（*ung 1*）を破壊すると、ミトコンドリアDNA変異が3倍以上に増加することを報告している。このことから、ミトコンドリア中のDNA損傷と老化や生活習慣病の密接な関連は明らかである。本研究では、*S. cerevisiae* 7Bを用いて図1の手法にて *ung 1* 遺伝子を破壊し、ミトコンドリアDNA損傷に対し感受性の高い株を作成する。また、培地にエリスロマイシンを混合することで、一領域のミトコンドリアDNA変異の検出も可能になる。これらを用い、ミトコンドリアDNA損傷を標的とした、老化抑制物質のスクリーニングをも行なう。



4. 研究成果

(1) *S. cerevisiae* を遺伝子突然変異解析用に改良したテスター株 *S. cerevisiae* 7B を用い、91 種類の天然物及び食品中からの抽出物が突然変異に及ぼす影響について検討を行った。

そのうち、ピーナッツ種皮エキス粉末、トマト果皮抽出物には、*S. cerevisiae* 7B に起こる突然変異頻度を抑制する傾向が見られた。一方、茶抽出物、カボチャ種子抽出物については、突然変異を促進させる傾向が見られた。

(2) 突然変異抑制に関わる候補物質を特定するために、ピーナッツ種皮エキス粉末に多く含まれるレスベラトロール (RSV) について同様の実験を行なった結果、突然変異抑制作用が見られた。その作用機序を詳細に検討するため、AG によって誘発される突然変異に対する RSV の突然変異抑制効果について検討した。その結果、RSV と AG の同時処理では、特に突然変異抑制効果は見られなかったのに対し、RSV で 24 時間処理後、AG で処理した場合では突然変異は抑制された。AG からの突然変異誘発機構では、点突然変異の増加が知られており、その変異はヌクレオチド除去修復で抑制されることが報告されている。今回の実験結果から RSV には DNA 修復の一つである、ヌクレオチド除去修復の向上効果が考えられた。また、その突然変異抑制機構は、AG との同時処理では相殺されることから、前もっての防御システム (修復システム) の準備が必要だと考えられた。

(3) 突然変異促進に関わる候補物質を特定するために、茶抽出物に多く含まれるエピガロカテキンガレート (EGCG) について、同様の実験を行なった結果、突然変異を促進する作用が見られた。その作用機序を詳細に検討するため AG によって誘発される突然変異への影響についても検討した。その結果、EGCG には AG に対する突然変異抑制効果は認められず、むしろ、濃度依存的に AG から誘導される突然変異頻度を上昇させる傾向が見られた。カテキン類は、近年の研究では高濃度で酸化 DNA 損傷をもたらす可能性があることが報告されている。しかし、今回の実験では EGCG 単独処理による突然変異頻度の上昇は認められず、EGCG と AG の同時処理でのみ濃度依存的に突然変異が高くなる傾向が見られた。このことから、EGCG による突然変異誘導メカニズムについては、AG から誘導される突然変異修復機構阻害による影響、もしくは EGCG により誘導される DNA 損傷による影響であることが推察された。

(4) AG から誘導される突然変異について、突

然変異の種類および変異スペクトラムを詳細に分析するために、*S. cerevisiae* 7B 中の *CAN1* 遺伝子のシーケンス解析を行なった。その結果、G→A 67 %、C→T 29 %、A→G 5 %であった。本研究により、AG による *S. cerevisiae* 7B 株における *CAN1* 遺伝子座に起こる突然変異の約 95 %が G:C→A:T の Transitions 型の突然変異であり、このことから AG の遺伝子突然変異メカニズムとして、G:C→A:T 変異を特異的に誘発させることが示唆された。

(5) 出芽酵母の塩基除去修復 (ウラシル DNA グリコシラーゼ) 酵素をコードしている遺伝子 (*ung1*) を破壊することで、ミトコンドリア DNA 損傷に対し感受性の高い株の作成を試みており現在も継続中である。新規酵母テスター株を樹立し、ミトコンドリア DNA 損傷を標的とした検出系を確立させれば、食品や天然物からより効果的で即効性の高い老化抑制効果を持つ物質の同定が可能となる。

研究代表らは、近年の研究において実験コストが低く、扱いが容易であり、短時間で結果が得られる酵母テスター株を使用したスクリーニング方法を構築した。本研究の基礎データが応用研究への重要な位置付けを占めていることは明らかであり、それゆえ本研究の成果を基に今後、安全性の高い機能性食品やそれらの、効果的な摂取法の開発につながり、国民生活の質の向上のみならず医療分野において大きく寄与していくものと考えられる。

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 2 件)

① 清水雅富、Petr Grúz、碓井之雄、The effect of resveratrol on mutagenesis induced by azidoglycerol in *Saccharomyces cerevisiae* 7B、東京医療保健大学紀要、査読有、3 巻、2008、23-28

② Grúz Petr、Masatomi Shimizu、Origins of age-related DNA damage and dietary strategies for its reduction、Rejuvenation Research、査読有、13 巻、2010、285-287

〔学会発表〕 (計 4 件)

① 清水雅富、鐵真弓、大内美香、植原沙織、佐野恵美、駿河友子、朴良枝、Petr Grúz、碓井之雄、出芽酵母を用いた新規抗変異原物質のスクリーニング、第 62 回日本栄養食糧学会、2008 年 5 月 4 日、埼玉県 (女子栄養大学)

②片渕淳、佐々彰、清水雅富、益谷央豪、花岡文雄、能美健彦、ヒトポリメラーゼ η R61 残基の 8oxodGTP 取り込み特異性への寄与、第 51 回日本放射線影響学会、2008 年 11 月 20 日、福岡県(北九州国際会議場)

③Grúz, P., Shimizu, M., Usui, Y、Origins of age-related DNA damage and dietary strategies for its reduction、Strategies for Engineered Negligible Senescence (SENS), Fourth Conference、2009 年 9 月 3 日～7 日、Cambridge, England (Queens' College)

④ Exclusive induction of G:C to A:T transitions in azide mutagenesis、Tatsuya Nishizawa, Natsuki Oyama, Yumiko Kashiwabara, Yuko Nagai, Akemi Hosoda, Masayo Ikeda, Petr Grúz, Masatomi Shimizu, Yukio Usui、第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 10 日、神奈川県(パシフィコ横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 雅富 (SHIMIZU MASATOMI)

東京医療保健大学・医療保健学部・講師

研究者番号：90389841