

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 7 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21580115

研究課題名（和文） 活性酸素の生成や消去に関わる遺伝子の同定と解析

研究課題名（英文） Identification and characterization of the genes involved in generation or quenching of reactive oxygen species

研究代表者

藤井 道彦 (Michihiko Fujii)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・准教授

研究者番号：80285155

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、その一部は活性酸素へと変化し、老化や疾病などの生命機能の劣化を引き起こす。私たちは、モデル生物の線虫 *Caenorhabditis elegans* を用い、活性酸素の生成や消去に関わる遺伝子を研究している。本研究では OXY-5、RAD-8 タンパク質の発現パターンを調べ、また、*C. elegans* の第 1 番染色体上の遺伝子の網羅的な解析から、活性酸素高感受性をもたらす遺伝子を同定した。

研究成果の概要（英文）：Oxygen is essential for aerobic organisms, but generates reactive oxygen species (ROS), which can cause cellular dysfunction that would accelerate aging and diseases. We have studied the genes involved in the generation or the quenching of ROS with use of the nematode *Caenorhabditis elegans* as a model organism. In this study, we analyzed the expression patterns of OXY-5 and RAD-8 in *C. elegans*, and identified genes that, when down regulated, cause an increased sensitivity to ROS by systematic screening of the genes located on linkage group I.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成 22 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成 23 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：代謝生理、活性酸素

1. 研究開始当初の背景

生物は酸素を利用することで、エネルギーを効率的に獲得できるようになった。しかし、酸素の一部は、代謝の過程で活性酸素へと変わる。活性酸素は免疫機能などに関与する一方で、生体分子を攻撃する危険因子にもなる。現在、活性酸素は老化や疾病を含めた種々の

生命機能の劣化を引き起こすと考えられている。活性酸素の生成や消去に関わる遺伝子として、NADPH-オキシダーゼ、SOD、カタラーゼなどがよく知られているが、それら以外にも数多くの遺伝子が関与する。そのことは、私たちの研究より比較的高頻度で活性酸素感受性変異体が得られることから裏付け

られるが、遺伝子の多くは未同定である。これらの分子機構を詳細に解明できれば、人類の健康増進（老化防止や疾病予防など）に大きく貢献できる。

2. 研究の目的

酸素は多くの生物の生存に必須であるが、その一部は代謝の過程で活性酸素へと変化し、老化や疾病など種々の生命機能の劣化を引き起こす。しかし、細胞レベルにおける活性酸素の生成機構やその消去機構については不明な点が多い。これらの分子機構を解明し、人類の健康増進（老化防止や疾病予防など）に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

私たちはこれまで、モデル生物の線虫 *Caenorhabditis elegans* を用い、活性酸素感受性の変化を指標にして、活性酸素の生成や消去に関わる遺伝子を同定してきた。

本研究ではこれら変異体の原因遺伝子の機能解析を行い、活性酸素の生成や消去の分子機構の解明を行う。さらに、RNAi法を用いて、活性酸素の生成や消去に関わる遺伝子の網羅的な探索も行う。

4. 研究成果

(1) *C. elegans* の活性酸素感受性変異体 *oxy-5*、*rad-8* の原因遺伝子の機能解析

OXY-5、RAD-8タンパク質のC末端に蛍光タンパク質 (GFP) を融合させ、*C. elegans*内に発現させることで、*C. elegans*組織での発現パターンや細胞内局在を調べた。OXY-5タンパク質は、神経系および咽頭に強い発現がみられた。RAD-8タンパク質は神経系を含む様々な組織で発現がみられた。細胞内での局在についても調べた。OXY-5、RAD-8両タンパク質とも、ミトコンドリアへの局在シグナルペプチドをN末端にもつと推測され、実際にミトコンドリアをマイトトラッカーで標識することで、タンパク質がミトコンドリアに局在することを示した。

*rad-8*遺伝子の機能解析を行った。*rad-8*突

然変異体が、ミトコンドリアの形態異常を示すこと、呼吸鎖の活性低下、アポトーシスの上昇を示すことを示した。これらの結果より、*rad-8*遺伝子はミトコンドリアの機能に関係することを示した。

(2) *C. elegans*の活性酸素高感受性をもたらす遺伝子の網羅的探索

RNAi法として、簡便な2本鎖RNAを餌の大腸菌内で発現させるfeeding RNAiを用いる。*C. elegans*の第1番染色体上の遺伝子を対象としたRNAiライブラリー（約2,400遺伝子、Geneservice社）を用いて、遺伝子を1つずつノックダウンし、活性酸素感受性を高める遺伝子を同定した。第1番染色体上の遺伝子を対象とした探索を完了させ、さらに、同定された遺伝子をノックダウンした際の感受性の変化を定量的に測定した。また、酸化タンパク質のレベルを測定することで、遺伝子ノックダウンにより、線虫が高レベルの酸化ストレスを受けていることを示した。

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. S. Ueno, K. Yasutake, D. Tohyama, T. Fujimori, D. Ayusawa, M. Fujii, Systematic screen for genes involved in the regulation of oxidative stress in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Biochem Biophys Res Commun* 420 (2012) 552-557. (査読有) DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.03.032
2. Y. Yamakami, K. Miki, M. Endoh, R. Yonekura, R. Ukekawa, Y. Kobayashi, M. Fujii, D. Ayusawa, Sublethal doses of surfactants induce premature senescence in normal human skin cells, *Biosci Biotechnol Biochem* 75 (2011) 1395-1398. (査読有) DOI: 10.1271/bbb.110179
3. S. Takayama, M. Fujii, Y. Nakagawa, K.

- Miki, D. Ayusawa, N-terminal short fragment of TUP1 confers resistance to 5-bromodeoxyuridine in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem Biophys Res Commun* 411 (2011) 25-31. (査読有) DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.06.064
4. M. Fujii, K. Yasuda, P.S. Hartman, D. Ayusawa, N. Ishii, A mutation in a mitochondrial dehydrogenase/reductase gene causes an increased sensitivity to oxidative stress and mitochondrial defects in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Genes Cells* 16 (2011) 1022-1034. (査読有) DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01547.x
5. M. Fujii, K. Shikatani, K. Ogura, Y. Goshima, D. Ayusawa, Mutation in a mitochondrial ribosomal protein causes increased sensitivity to oxygen with decreased longevity in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Genes Cells* 16 (2011) 69-79. (査読有) DOI: 10.1111/j.1365-2443.2010.01469.x
6. K. Miki, M. Shimizu, M. Fujii, S. Takayama, M.N. Hossain, D. Ayusawa, 5-bromodeoxyuridine induces transcription of repressed genes with disruption of nucleosome positioning, *Febs J* 277 (2010) 4539-4548. (査読有) DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07868.x
7. M. Fujii, K. Miki, S. Takayama, D. Ayusawa, Identification of genes that affect sensitivity to 5-bromodeoxyuridine in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Genet Genomics* 283 (2010) 461-468. (査読有) DOI: 10.1007/s00438-010-0535-6
8. E. Toyoda, A. Kurosawa, M. Fujii, N. Adachi, Heterozygous disruption of the DNA topoisomerase I gene confers cellular resistance to camptothecin in human cells, *Biol Pharm Bull* 32 (2009) 724-727. (査読有) DOI: 10.1248/bpb.32.724
9. M. Fujii, N. Adachi, K. Shikatani, D. Ayusawa, [FeFe]-hydrogenase-like gene is involved in the regulation of sensitivity to oxygen in yeast and nematode, *Genes Cells* 14 (2009) 457-468. (査読有) DOI: 10.1111/j.1365-2443.2009.01282.x
10. M. Endoh, Y. Kobayashi, Y. Yamakami, R. Yonekura, M. Fujii, D. Ayusawa, Coordinate expression of the human pregnancy-specific glycoprotein gene family during induced and replicative senescence, *Biogerontology* 10 (2009) 213-221. (査読有) DOI: 10.1007/s10522-008-9173-3
- [学会発表] (計 23 件)
1. 杉本 量平、三木 健輔、山上 義巳、Mohammad Nazir Hossain、山下 律郎、藤井 道彦、鮎沢 大、アマラキ (*Emblia officinalis*) の不死化ヒト表皮角化細胞に対する生理作用、(日本農芸化学会、2012年3月24日、京都)
2. 新井 留実、谷脇 歩美、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢 大、ヒト老化細胞における核内構造の変化、(日本農芸化学会、2012年3月24日、京都)
3. 山口 葉子、Mohammad N Hossain、三木 健輔、山下 律郎、藤井 道彦、鮎沢 大、ヒ

- ト毛乳頭細胞におけるアーユルヴェーダハーブの生理作用 (日本農芸化学会、2012年3月24日、京都)
4. 三木 健輔、三田 充真、藤井 道彦、Mohammad N Hossain、山下 律郎、鮎沢 大、アーユルヴェーダハーブによるヒト線維芽細胞の増殖効果 (日本農芸化学会、2012年3月24日、京都)
 5. 山上 義巳、藤井 道彦、鮎沢 大、準致死量の界面活性剤によるヒト正常細胞の未成熟老化の誘導機構 (日本農芸化学会、2012年3月24日、京都)
 6. 工藤 生、伊藤 陽平、古賀 慎太郎、Mohammad N Hossain、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢 大、G タンパク質 γ サブユニット GNG11 の細胞老化における役割 (日本農芸化学会、2012年3月24日、京都)
 7. 溝渕 翔吾、藤井 道彦、鮎沢 大：出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた活性酸素抵抗性遺伝子の単離と解析、(分子生物学会、2011年12月14日、横浜)
 8. 川口 竜、中川 優、藤井 道彦、鮎沢 大：出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における 5-ブロモデオキシウリジンの作用機構の解析、(分子生物学会、2011年12月14日、横浜)
 9. 三木 健輔、山本 祐介、早川 清、早川 靖彦、藤井 道彦、鮎沢 大：電気パルス法を用いた接着細胞への *in situ* 遺伝子導入、(分子生物学会、2011年12月14日、横浜)
 10. 三木健輔、山本裕介、早川清、早川靖彦、藤井道彦、鮎沢大、電気パルス法を用いた遺伝子導入効率の最適化 (分子生物学会、2010年12月14日、神戸)
 11. 上野 峻介、藤井道彦、鮎沢大、(線虫 (*Caenorhabditis elegans*) における高濃度酸素感受性遺伝子の探索、(分子生物学会、2010年12月15日、神戸)
 12. 工藤 生、伊藤 陽平、古賀 慎太郎、Mohammad N HOSSAIN、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢 大、G タンパク質 γ サブユニット GNG11 の細胞老化における役割、(分子生物学会、2010年12月15日、神戸)
 13. 中川 優、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢 大、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における 5-ブロモデオキシウリジン耐性機構の解析、(日本農芸化学会 2010年3月26日、東京)
 14. 山上 義巳、藤井 道彦、鮎沢 大、界面活性剤の細胞毒性、(日本農芸化学会 2010年3月26日、東京)
 15. 杉本 量平、三木 健輔、山上 義巳、Mohammad N Hossain、山下 律郎、藤井 道彦、鮎沢 大、表皮角化細胞の増殖を促進するアマラキ (*Embllica officinalis*) 含有成分の同定、(日本農芸化学会 2010年3月26日、東京)
 16. 三木 健輔、勝又三映子、Mohammad N HOSSAIN、山下律郎、藤井道彦、鮎沢大、メラノサイト機能へ影響を及ぼすアーユルヴェーダハーブの探索、(日本農芸化学会 2010年3月26日、東京)
 17. 根本英比古、山上義巳、三木健輔、Mohammad N Hossain、山下律郎、藤井道彦、鮎沢大、がん細胞特異的な増殖阻害活性を示すアーユルヴェーダ植物の探索、(日本農芸化学会 2010年3月26日、東京)
 18. 米倉 隆造、松本 祐子、小林 裕介、藤井 道彦、鮎沢 大、高濃度の塩化ナトリウムによる細胞の老化誘導、(日本農芸化学会 2010年3月26日、東京)
 19. 工藤 生、伊藤 陽平、古賀 慎太郎、Mohammad N HOSSAIN、三木 健輔、藤井

- 道彦, 鮎沢 大、G タンパク質γサブユニット GNG11 の細胞老化における役割、(日本農芸化学会 2010年3月26日、東京)
20. 小林 裕介、蕭 淑麗、藤井 道彦、鮎沢 大、細胞老化における MAPK の役割、(日本農芸化学会 2010年3月26日、東京)
21. 山本 裕介、澁谷 大輔、三木 健輔、早川 靖彦、藤井 道彦、鮎沢 大、電気パルス法を用いた遺伝子導入効率の最適化、(日本農芸化学会 2010年3月26日、東京)
22. 藤井道彦、鹿谷一樹、鮎沢大、線虫 *C. elegans* の酸化ストレス高感受性変異体 *oxy-4* の解析 (日本農芸化学会 2010年3月27日、東京)
23. 藤井道彦、鹿谷一樹、鮎沢大、線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いた酸化ストレス高感受性変異体 *oxy-4* の解析、(日本基礎老化学会、2009年6月17日、横浜)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者、
藤井 道彦 (Michihiko Fujii)
横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・准教授
研究者番号：80285155

- (2) 研究分担者
()

研究者番号：

- (3) 連携研究者
()

研究者番号：