

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1日現在

機関番号：33101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710225

研究課題名（和文） 発現クローニング法により同定された細胞死抑制遺伝子の解析

研究課題名（英文） Characterization of a cell death-inhibiting gene identified by expression cloning

研究代表者

伊藤 美千代（長野 美千代）(NAGANO-ITO MICHIO)

新潟薬科大学・応用生命科学部・助教

研究者番号：80350718

研究成果の概要（和文）：酸化ストレスは細胞死を引き起こすことにより様々な疾患の原因になっている。私はこれまでに活性酸素種による細胞死を抑制すると考えられる数種類の遺伝子を得ている。本研究では、このうち1種類の遺伝子に着目し解析を行った。まず、この遺伝子を高発現する細胞株では幾つかの因子の発現量やリン酸化レベルが変動していることが明らかになった。次に、この遺伝子を高発現するトランスジェニックマウスは白内障を引き起こすことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Oxidative stress induces cell death, leading to various diseases. We have previously identified cDNAs that inhibit cell death induced by reactive oxygen species (ROS). In this study, we focused on one of the isolated cDNAs and characterized. First, expression and phosphorylation of some factors altered in the cells overexpressing this gene. Next, we observed that transgenic mice overexpressing this gene developed cataract.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：細胞死、トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

活性酸素種は、酸化ストレスシグナル伝達経路を通して細胞死を引き起こすことにより様々な疾患の原因になっている。活性酸素種による酸化ストレスは、様々な細胞内シグ

ナルを誘導し、転写因子の活性化による遺伝子発現を誘導し、細胞死を引き起こすことが知られている。近年になり、このシグナル伝達経路の過程でレドックス制御が関わっていることも明らかになってきている。また、

酸化ストレスはミトコンドリアから cytochrome c の放出を促進し、caspase を活性化し、アポトーシスを促進することも報告されている。活性酸素種への防御方法としては主に、生成した活性酸素を分解消去する、あるいは活性酸素種によってすでに引き起こされた細胞死シグナルを抑制する、という戦略が考えられる。活性酸素種を分解する因子としてはすでにいくつかの因子が報告されている。ポリフェノール、フラボノイド、ビタミンCなどの物質や、SOD (superoxide dismutase)、catalase、GPx (glutathione peroxidase) などの酵素は特に有名な因子である。しかし一方で、すでに活性酸素種によって引き起こされた細胞死シグナルを抑制する因子およびその分子機構に関しては、未だ不明な点が多い。すでに酸化ストレスにより発症した様々な疾患の治療を考える上で、細胞死シグナルを抑制する機構を解明することは非常に重要であると考えられる。

2. 研究の目的

私はこれまでに、レトロウイルスを用いた発現クローニング法を用いて、マウス cDNA ライブラリーを NIH/3T3 細胞に導入し、酸化ストレスによる細胞死を抑制する遺伝子群の探索を行い、過酸化水素による細胞死に抵抗性を示す細胞株 200 株を樹立した。得られた細胞株から導入された遺伝子を回収、解析し、現在までに、過酸化水素による細胞死を抑制すると考えられる数種類の遺伝子を得ている。このうち 5 種類の遺伝子については、過酸化水素による細胞死を抑制するという報告を行った (Nagano-Ito, M. *et al.* FEBS Letters 2009, 583, 1363-1367)。本研究では、発現クローニング法により得られた数種類の遺伝子のうち 1 種類の遺伝子に着目し、その作用機序について明らかにすることを目的とする。私はこれまでに、この遺伝子を一過性発現および安定発現させた細胞において、過酸化水素による細胞死を抑制することを確認しており、またこの遺伝子の siRNA を一過性発現させた細胞においては細胞死が起きることを明らかにしている。

3. 研究の方法

- (1) 既知の細胞死関連因子の発現量の解析
得られた遺伝子の cDNA を動物細胞に導

入し過剰発現させ、RT-PCR 法やウェスタンブロット法を用いて、細胞死に關与する既知の因子の発現量の変化について解析を行った。以前、発現クローニング法により遺伝子を単離してきた過程で、人工的な酸化ストレスのモデルとして過酸化水素を用いたことから、ここで解析する既存の因子としては、過酸化水素による細胞死を誘導することがすでに報告されている因子を中心に行った。過酸化水素による酸化ストレスは、レドックス制御を含む様々な細胞内シグナルを誘導し、転写因子の活性化による遺伝子発現を誘導し、細胞死を引き起こすことが知られている。したがって、ここで解析する因子としては、レドックス制御として重要な役割を担う因子について解析を行った。また、これらの因子によって活性化される転写因子についても解析を行った。さらに、過酸化水素による酸化ストレスは、ミトコンドリアから cytochrome c の放出を促進し、caspase を活性化し、アポトーシスを促進する経路も報告されている。したがって、過酸化水素が引き起こすアポトーシスに關与する因子についても解析を行った。

(2) 細胞死抑制経路の解明

過酸化水素による細胞死誘導に關与する既存の因子のうち、上記の実験結果にもとづき、本遺伝子の過剰発現により発現量が大きく変動する因子を特定した。過酸化水素による細胞死には、いくつかの経路が報告されているが、同定した遺伝子がいずれの経路においても共通に關与する因子であるのか、または、特定の経路にのみ作用する因子であるのかについて解析を行った。また、この遺伝子が過酸化水素以外の細胞死についても抑制するか検討を行った。

(3) 動物個体を用いた機能解析

得られた細胞死抑制遺伝子の動物個体における影響を調べた。得られた遺伝子の高発現マウスを作製し、様々な疾患への影響について検討を行った。トランスジェニックマウスの作製は、受託作製を行っている会社に委託した。まず、得られた遺伝子の DNA 溶液を委託先の会社に送り、次に、委託先の会社において、受精卵前核に DNA 溶液をインジェクションし、この受精卵を偽妊娠状態にした雌マウスの卵管へ移植した。仮親雌マウスの帝王切開により産仔を摘出し、離乳後、離乳したマウスを委託

先の会社から受け取った。その後、研究室内において、PCR 法およびサザンブロット法により、遺伝子が導入されたマウスのスクリーニングを行った。この方法により、目的の遺伝子を高度に発現しているトランスジェニックマウスの作製を行った。作製したトランスジェニックマウスを解析することで疾患への影響について検討を行った。

4. 研究成果

(1) 既知の細胞死関連因子の発現量の解析

得られた遺伝子の cDNA を動物細胞に導入し過剰発現させ、ウェスタンブロット法を用いて、細胞死に関与する既知の因子の発現量について解析を行った。以前、発現クローニング法により遺伝子を単離してきた過程で、活性酸素種の一つである過酸化水素を用いたことから、過酸化水素による細胞死に関係することがすでに報告されている因子を中心に解析を行った。その結果、得られた遺伝子を高発現する細胞株においては、幾つかの既知の因子の発現量やリン酸化レベルが変動していることが明らかになった。また、この遺伝子が過酸化水素以外の細胞死についても抑制するかへキスト染色法を用いて検討を行った結果、セカンドメッセンジャーであるセラミドによる細胞死についても抑制することが明らかになった。一方、トポイソメラーゼIの阻害剤であるカンプトテシンやRNA合成を阻害するアクチノマイシンDによる細胞死に対しては抵抗性を示さなかった。

(2) 動物個体を用いた機能解析

得られた細胞死抑制遺伝子の動物個体における生物学的な役割について解明するため、得られた遺伝子を高度に発現するトランスジェニックマウスの作製を行った。作製したトランスジェニックマウスからゲノム DNA を抽出し PCR 法により発現コンストラクトが導入されたマウスのスクリーニングを行った。その結果、約 15% がファウンダートランスジェニックマウスであることが明らかになった。次に、サザンブロット法を用いてゲノム内に取り込まれた導入遺伝子の検出を行った。また、交配により導入遺伝子を高度に発現する系統の樹立を行った。さらに、トランスジェニックマウスの様々な組織から RNA を抽出し、RT-PCR 法により内在の遺伝子

および導入遺伝子の組織における発現量について解析を行った。その結果、内在の遺伝子と導入遺伝子はいずれの組織においても発現していたが、内在の遺伝子は眼球における発現量が少なかったが、導入遺伝子は眼球における発現量が多いことが明らかになった。トランスジェニックマウスの眼が白く濁ることから、眼球の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色を行ったところ、トランスジェニックマウスは白内障を引き起こすことが明らかになった。眼の水晶体を形成している繊維細胞は、分化の過程でアポトーシスによりオルガネラが分解・除去されると考えられている。作製したトランスジェニックマウスは、水晶体繊維細胞のアポトーシスを抑制しているのではないかと考えられる。

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 1 件)

- ① Nagano-Ito, M. and Ichikawa, S. “Biological effects of mammalian Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) on cell death, proliferation, and tumorigenesis”, *Biochemistry Research International* (2012) doi: 10.1155/2012/204960. 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

- ① 長野一伊藤 美千代、中里 優介、市川 進一：過酸化水素が引き起こす細胞死を抑制する遺伝子の解析、第 132 年会 日本薬学会、札幌、2012 年 3 月 29 日
- ② 長野一伊藤 美千代、中里 優介、市川 進一：酸化ストレスが引き起こす細胞死を抑制する遺伝子の解析、第 34 回 日本分子生物学会年会、横浜、2011 年 12 月 16 日
- ③ Nagano-Ito, M., Nakazato, Y. and Ichikawa, S.: Characterization of a gene that suppresses oxidative stress-induced cell death, The 7th Asia Pacific IAP Congress, Taiwan, 2011, May 21-24
- ④ 長野一伊藤 美千代、市川 進一：過酸化水素による細胞死を抑制する遺伝子の解

析、第 131 年会 日本薬学会、静岡、2011
年 3 月 30 日

- ⑤長野—伊藤 美千代、中里 優介、市川 進
一：酸化ストレス抵抗性遺伝子の解析、
第 33 回 日本分子生物学会年会、第 83 回
日本生化学会大会 合同大会 (BMB2010)、
神戸、2010 年 12 月 8 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 美千代 (長野 美千代)
(NAGANO-ITO MICHIO)
新潟薬科大学・応用生命科学部・助教
研究者番号：80350718

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

市川 進一 (ICHIKAWA SHINICHI)
新潟薬科大学・応用生命科学部・教授
研究者番号：10223083
中里 優介 (NAKAZATO YUSUKE)
新潟薬科大学・応用生命科学部・卒業生
小池 茜 (KOIKE AKANE)
新潟薬科大学・応用生命科学部・大学院生