

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580170

研究課題名(和文) 遺伝子改変動物を用いた新たな食品評価系の開発

研究課題名(英文) Development of Novel Antioxidant-screening System Using genetically modified animal

研究代表者

井内 良仁 (IUCHI, YOSHIHITO)

山口大学・農学部・准教授

研究者番号：60272069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：抗酸化酵素SOD1を欠損する細胞(SOD1 KO MEF)を用いて、抗酸化物質の新規評価法の確率を試みた。まずSOD1 KO MEFが死滅する20%酸素濃度下で細胞増殖するかどうかを指標に、既知のモデル化合物を用いて検討した。その結果、アスコルビン酸添加により細胞増殖が観察され酸化ストレスに脆弱なSOD1 KO MEFの維持増殖が可能な抗酸化物質が存在することがわかった。さらに、従来の評価法と今回確立した新評価法をカテキンを用いて比較検討した結果、新評価法が、より鋭敏にカテキンの抗酸化能を検出可能であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aim to establish a new antioxidant-screening system using SOD1-deficient MEFs. At first, we tested some model compounds known as the antioxidant and observed whether the SOD1-deficient MEFs can live under the 20% O<sub>2</sub>. As a result, SOD1-deficient MEFs in ascorbic acid-containing medium exhibited marked cell proliferation. Glutathione, Coenzyme Q10 and Catechin were also effective and suppressed cell death. At the same time any compounds promoted cell death in high concentrations. These results suggest the possibility that SOD1-deficient MEFs may be applicable for the screening of the unknown antioxidants.

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：食品科学

キーワード：SOD1欠損細胞 新規評価法 抗酸化物質

### 1. 研究開始当初の背景

食品中の機能性物質あるいは有害性物質の評価には、動物実験が最も信頼できる。しかし動物実験にはコストがかかり、投与する物質も大量に必要とする事、結果が得られるまでに時間がかかる事などから、多種類の物質の評価には適さない。したがって動物実験の前の段階として、培養細胞を用いるバイオアッセイ系が用いられるが、一般に行われている通常の細胞培養では 5% CO<sub>2</sub>を除く 95% を空気で賄っているにも関わらず、空気中の酸素が有害な影響を及ぼす事には注意が払われてこなかった。すなわち、通常培養ではこのような酸素濃度(20%)を正常酸素濃度と呼び、それよりも低い酸素濃度、例えば1~2%酸素濃度を低酸素と呼ぶ。しかし、皮膚や肺胞上皮など以外の臓器や末梢血中では2%酸素濃度以下が通常値である。これは、生体内環境に比べて通常培養は極端な高酸素状態に当たり、酸素毒性の高い状態で培養している事を意味している。その結果、通常培養を行った細胞では、抗酸化酵素の発現が上昇しているなど、体内とは異なる発現様式が見られる。20%の通常酸素濃度で生育可能な細胞は酸化ストレスに強い抵抗性を有する事を意味しており、このような細胞に人為的に酸化ストレスを与えた後に投与する事で選別されてきた抗酸化物質は必要以上に強い抗酸化活性を持つと考えられる。近年、細胞は自ら微弱な活性酸素を産生し、細胞シグナルとして利用していることが明らかになってきている。強すぎる抗酸化活性はこのような活性酸素の持つ有効性をも打ち消してしまい、生体に副作用を及ぼす可能性も考えられる。これは、生体内環境に比べて通常培養は極端な高酸素状態に当たり、酸素毒性の高い状態で培養している事を意味している。よって、より生体内に近い条件でかつ微量な活性酸素種を鋭敏に検出するアッセイ系を開発する必要がある。

### 2. 研究の目的

我々は近年、抗酸化酵素スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)1欠損マウスから単離した細胞がこの目的に有効な事を発見した。SOD1欠損細胞は空気中の酸素濃度(20%)を酸化ストレスとして感知し生育できない。この性質を利用して天然あるいは人工の化合物が有する有効な抗酸化活性に関して、今までではできなかった鋭敏な検出系を確立できるのではないかと考えた。すなわち、SOD1欠損細胞が死滅する20%酸素濃度下で細胞を生存増殖させられるかどうかを指標にすることによって有効な抗酸化物質のスクリーニングに適用できる。SOD1欠損線維芽細胞

を用いて天然成分の抗酸化活性と酸素毒性の新しい評価法を確立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

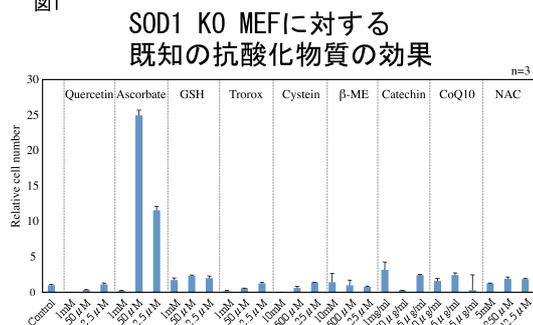
培養条件を確立した SOD1 欠損細胞の通常酸素培養と低酸素培養を用いて、抗酸化活性と活性酸素産生に関わる毒性の検出系を確立する。その際、モデル化合物を用いて検出系の精度と再現性などに関して多面的な検証を行う。

最初に、既知の抗酸化物質としてケルセチン、アスコルビン酸、グルタチオン、トロロックス、システイン、メルカプトエタノール、カテキン、コエンザイム Q10、N-アセチルシステインを準備し、正常細胞と SOD1 KO MEF に対して濃度を割り振って添加し細胞の増殖能を評価する。その時、SOD1 KO MEF 細胞の増殖に関して効果的な化合物についてそれぞれ従来の方法と比較して、新法の検出感度を評価する。

### 4. 研究成果

まず SOD1 KO MEF が死滅する 20 %酸素濃度下で細胞増殖するか否かを指標に、既知のモデル化合物を用いて検討した。その結果、アスコルビン酸添加により細胞増殖が観察された。グルタチオン、カテキン、コエンザイム Q の添加群でも細胞死の抑制が見られた。このことから、酸化ストレスに脆弱な SOD1 KO MEF の維持増殖が可能な抗酸化物質が存在することがわかり、今後未知な化合物の抗酸化能評価に応用可能であることがわかった(図1)。

図1

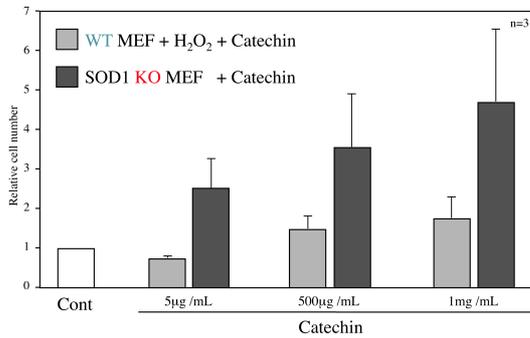


さらに、WT MEF に酸化剤と抗酸化物質を添加する従来の評価法と、今回確立した SOD1 KO MEF に抗酸化物質を加える評価法を、代表的な抗酸化物質であるカテキンを用いて比較検討した。その結果、SOD1 KO MEF を用いる本法が、より鋭敏にカテキンの抗酸化能を検出可能であることが明らかになった。

本研究により、SOD1 KO MEF を用いた抗酸化物質の新たな評価法が確立でき、その鳳法が既知の抗酸化物質の再評価ならびに未知の抗酸化物質の評価に応用可能であることがわかった(図2)。

図2

今回確立したSOD1 KO MEFを用いる方法と従来の評価法との比較



## 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 0 件)

[学会発表](計 14 件)

Tasaki Eisuke, Sakurai Hiroki, Nitao Masaru, Matsuura Kenji, Iuchi Yoshihito: Protective role of uric acid as antioxidant in termite, *Reticulitermes speratus*. 17<sup>th</sup> Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International. 京都国際会館(京都市), March 24, 2014

Iuchi Yoshihito, Sakurai Hiroki<sup>1</sup> Tasaki Eisuke, Nitao Masaru, Matsuura Kenji: Involvement of uric acid in predominant antioxidant activity of long-lived termite, *Reticulitermes speratus*. 17<sup>th</sup> Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International. 京都国際会館 (京都), March 24, 2014

櫻井宏樹, 田崎英祐, 仁田尾優, 赤壁義彦, 松井健二, 松浦健二, 井内良仁: ヤマトシロアリの高い抗酸化能を担う物質としての尿酸. 第 36 回 日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場 (神戸市), 2013 年 12 月 5 日

田崎英祐, 櫻井宏樹, 仁田尾優, 藤田晃大, 松浦健二, 井内良仁: 長寿命昆虫ヤマトシロアリの抗酸化システムにおける尿酸の役割. 第 36 回 日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場 (神戸市), 2013 年 12 月 5 日

田崎英祐, 山本結花, 末広亘, 松浦健二, 井内良仁: 代謝に注目したシロアリの長寿命の解析. 第 36 回 日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場 (神戸市), 2013 年 12 月 5 日

松本勝太郎, 多田久志, 藤井順逸, 井内良仁: 精巣特異的ペルオキシレドキシ 4b の機能解析. 2013 年度日本農芸化学会中四国支部 合同広島大, 広島, 2013 年 9 月 5, 6 日

多田久志, 内海俊彦, 藤井順逸, 井内良仁: 小胞体で機能するペルオキシレドキシ 4a の局在変化. 2013 年度日本農芸化学会中四国支部 合同広島大会, 県立広島大 (広島市), 2013 年 9 月 5, 6 日

井内良仁, 柳井彩, 井料由香里, 藤井順

逸: 抗酸化酵素 SOD1 を欠損する細胞を用いた抗酸化物質の新規評価法. 日本農芸化学会 2013 年度大会, 東北大学 (仙台市), 2013 年 3 月 24 -28 日

田崎英祐, 仁田尾優, 赤壁義彦, 松井健二, 井内良仁: ヤマトシロアリ (*Reticulitermes speratus*) 兵隊アリに新規に見出された抗酸化物質. 日本農芸化学会 2013 年度大会, 東北大学 (仙台市), 2013 年 3 月 24 -28 日

井内良仁, 柳井彩, 井料由香里, 藤井順逸: SOD1 欠損細胞を用いた抗酸化物質の新規評価系の開発. 第 35 回 日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡市), 2012 年 12 月 13 日

田崎英祐, 山本結花, 末広亘, 松浦健二, 井内良仁: 抗酸化システムに注目したシロアリの長寿命の解析. 日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡市), 2012 年 12 月 13 日

井内良仁, 柳井彩, 井料由香里, 藤井順逸: SOD1 欠損線維芽細胞を用いた抗酸化物質の新規評価系の開発. 日本農芸化学会中四国支部会 34 回講演会 & シンポジウム. 山口大 (宇部市), 2012 年 9 月 21 - 22 日

田崎英祐, 赤壁義彦, 井内良仁: ヤマトシロアリ兵隊アリが有する抗酸化物質の単離・同定の試み. 日本農芸化学会中四国支部会 34 回講演会 & シンポジウム. 山口大 (宇部市), 2012 年 9 月 21 - 22 日

Iuchi Y. Implication of oxidative stress as a cause of autoimmune hemolytic anemia. The EPS Montreal Modern Medical Forum 2011, September, 2011 in Montreal, Montreal (Canada), September 7 - 8, 2011.

[図書](計 3 件)

井内良仁: 昆虫食の新たな可能性. ニューフードインダストリー 56(1), 35-41, 2014-01 食品資材研究会 2013 年

井内良仁: 酸化ストレスと精子形成. HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY, 19: 53-58. 2012 年

Iuchi Yoshihito: Anemia Caused by Oxidative Stress. Anemia. INTECH, Chapter 4: pp. 49-62 (Eds. Silverberg, D. S.) ISBN 9789535101383. 2012 年

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.yamaguchi-u.ac.jp/member/iuchi/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

井内 良仁 (IUCHI, Yoshihito)

山口大学農学部・准教授

研究者番号：60272069