

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580145

研究課題名(和文) 活性酸素の生成機構の解明とその応用

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanism for generation of reactive oxygen species and its application.

研究代表者

藤井 道彦 (Fujii, Michihiko)

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

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*や出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*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*C. elegans*の酸化ストレス高感受性遺伝子を新たに同定し、また、*S. cerevisiae*の酸化ストレス抵抗性遺伝子の機能解析を行った。また、*C. elegans*を用いて抗酸化ストレス活性を示す機能性物質のスクリーニングを行い、有望な候補を見出した。

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 analyzed the genes involved in the generation or the quenching of ROS in the nematode *Caenorhabditis elegans* and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as model organisms. In this study, we have successfully identified the gene involved in the regulation of oxidative stress sensitivity in *C. elegans* and characterized the function of the gene, which confers oxidative stress resistance, when overexpressed, in *S. cerevisiae*. We also screened for bioactive compounds that show a protective effect on oxidative stress in *C. elegans*.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：活性酸素 老化

1. 研究開始当初の背景

酸素の一部は代謝の過程で活性酸素へと変化する。活性酸素の過剰な産生は老化や疾病などの生命機能の劣化を引き起こすが、活性酸素の生成機構については不明な点が多い。活性酸素の大部分は様々な代謝反応の副産物として生じる。しかし、それらの反応やそこに関係する遺伝子の多くは明らかでない。そこで、私たちは活性酸素の生成に関わる反応や遺伝子に着目し研究を行ってきた。私たちはこれまで、モデル生物から活性酸素の生成に関わる重要な遺伝子を同定してきた。私たちは、モデル生物の線虫 *Caenorhabditis elegans* や出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて活性酸素感受性に変化を示す突然変異体を取得し、その解析を行ってきた。たとえば、*C. elegans* の活性酸素感受性変異体 *mev-1*、*mev-4*、*oxy-4*、*oxy-5*、*rad-8* などの原因遺伝子の同定に成功した。さらに、RNAi 法を用いて、活性酸素の生成に関わる遺伝子の網羅的な探索も行い、9 個の活性酸素高感受性遺伝子を同定した。

2. 研究の目的

酸素は多くの生物の生存に必須であるが、酸素の一部は代謝の過程で活性酸素へと変わる。そして、活性酸素の過剰な産生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。本研究では、活性酸素の生成機構を明らかにし、さらに、活性酸素の障害を防ぐ機能性物質を発見することで、人々の健康増進（老化や疾病の予防など）に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は以下の2つを主要な研究課題とする。

(1) 遺伝子の機能解析を通じた活性酸素の生成機構の解析

C. elegans や *S. cerevisiae* を用いて活性酸素生成に関わる遺伝子の同定および機能解析を試みる。

これまでに同定された活性酸素生成の制御に関わる遺伝子の過剰発現による、活性酸素抵抗性や寿命延長への効果を検討する。

(2) 突然変異体を用いた活性酸素障害を防ぐ機能性物質の探索

活性酸素高感受性突然変異体を用いて、活性酸素の障害を防ぐ機能性物質を探索する。機能性物質は、インド地方の伝承医学で用いられる約 200 種類の葉草の抽出液をスクリーニングし、見つけ出す。

有効な抽出液から HPLC を利用し、抽出液の分画と測定を繰り返すことで有効成分を精製する。

4. 研究成果

(1) 遺伝子の機能解析を通じた活性酸素の生成機構の解析

C. elegans の突然変異体 *oxy-8* の解析を進めた。*oxy-8* 突然変異体は酸化ストレスに高感受性で、かつ短寿命を示す。遺伝学的手法を用い、原因遺伝子のマッピングを行い、原因遺伝子を染色体 LG IV のある領域に絞り込んだ。そして、種々の解析を組み合わせ、原因遺伝子の同定に成功した。

S. cerevisiae の酸化ストレス抵抗性遺伝子の解析を行った。この遺伝子は *S. cerevisiae* に過剰発現させると酸化ストレス抵抗性を示す。試行錯誤を繰り返したが、電子伝達系の活性調節に関わることを見出した。

これまでの研究で同定された活性酸素感受性を制御する遺伝子 (*oxy-4*、*oxy-5*、*rad-8*) を発現ベクターに組み込み、pRF4 プラスミドとともに野生型 *C. elegans* に導入した。UV 照射ののち、Rol 表現型を示す個体を多数選び、その後何世代にもわたり Rol 表現型が安定的に維持されるか調べた。安定的に Rol 表現型を示す個体、つまりゲノム中に安定的に

組み込まれていると考えられる株の取得に成功した。現在それらの詳細な表現型を調べている。

(2) 突然変異体を用いた活性酸素障害を防ぐ機能性物質の探索

C. elegans のミトコンドリアの SOD を欠失した突然変異体 *sod-2* を用いて、活性酸素の障害を防ぐ機能性物質を探索した。*sod-2* 突然変異体は酸化ストレスに高感受性を示す。この性質を利用し、活性酸素高感受性を抑制することが出来る機能性物質の探索を試みた。インド地方の伝承医学で用いられる薬草の中から約 200 種類を選び、その抽出液を作成し、*sod-2* 突然変異体に投与した。高濃度酸素中で培養することで *sod-2* 突然変異体に酸化ストレスを付与した。この状態で *sod-2* 突然変異体の成育を可能にする抽出液をスクリーニングし、5 種類の候補を見出した。現在、これの機能性物質の精製を進めている。

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 3 件)

- 1) Y. Yamakami, K. Miki, R. Yonekura, I. Kudo, M. Fujii, D. Ayusawa, Molecular basis for premature senescence induced by surfactants in normal human cells, *Biosci Biotechnol Biochem* (2014) 1-8, 10.1016/j.bbrc.2012.03.032, 査読有
- 2) 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, 10.1016/j.bbrc.2012.03.032, 査読有
- 3) Y. Kobayashi, S.S. Lee, R. Arai, K. Miki, M. Fujii, D. Ayusawa, ERK1/2 mediates unbalanced growth leading to senescence induced by excess thymidine in human cells,

Biochem Biophys Res Commun 425 (2012) 897-901, 10.1016/j.bbrc.2012.08.006, 査読有

[学会発表](計 26 件)

- 1) 三木 健輔、米倉 佑香、高氏 裕貴、Mohammad N Hossain、鮎沢 大、藤井 道彦、「育毛効果を有するアーユルヴェーダハーブの探索」、日本農芸化学会2015年度大会、2015年3月27日、岡山
- 2) 森野 香子、山上 義巳、三木 健輔、Mohammad N Hossain、鮎沢 大、藤井 道彦、表皮角化細胞の増殖を促進するアマラキ (*Embllica officinalis*) 含有成分の解析、2015年度大会、2015年3月27日、岡山
- 3) 高氏 裕貴、和田 卓巳、工藤 生、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢 大、「タンパク質合成制限によるヒト細胞老化の抑制」、2015年度大会、2015年3月27日、岡山
- 4) 新井 留実、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢 大、「細胞老化における核膜タンパク質の役割」、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月27日、横浜
- 5) 末松 佑理、山上 義巳、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢 大、「5-プロモデオキシウリジンで誘導されたヒト老化細胞におけるヌクレオソーム構造変化の解析」、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月27日、横浜
- 6) 高氏 裕貴、和田 卓巳、工藤 生、新井 留実、圓 敦貴、山上 義巳、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢 大「高分子合成不均衡の是正によるヒト細胞老化の抑制」、第37回日本分子生物学会、2014年11月26日、横浜
- 7) 工藤 生、野沢 愛実、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢大、「細胞老化におけるMAPキナーゼおよび細胞周期チェックポイント機構の役割」、第37回日本分子

- 生物学会年会、2014年11月27日、横浜
- 8) 末松 佑理、山上 義巳、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢 大、「5-プロモデオキシウリジンによる老化応答遺伝子のヌクレオソーム構造の変化」、日本農芸化学会2014年度大会、2014年3月28日、東京
 - 9) 高氏 裕貴、森野 香子、三木 健輔、山内 正剛、Hossain Mohammad N、藤井 道彦、鮎沢 大、「DNA損傷に対するアーユルヴェーダハーブの防御効果」、日本農芸化学会2014年度大会、2014年3月29日、東京
 - 10) 武田 あすか、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢 大、「線虫の脂肪蓄積を抑制するアーユルヴェーダハーブの探索」、日本農芸化学会2014年度大会、2014年3月29日、東京
 - 11) 米倉 佑香、Hossain Mohammad N、三木 健輔、山下 律郎、藤井 道彦、鮎沢 大、「アーユルヴェーダハーブのヒト毛乳頭細胞における遺伝子発現への効果」、日本農芸化学会2014年度大会、2014年3月30日、東京
 - 12) 十文 字浩美、三木 健輔、Hossain Mohammad N、山下 律郎、藤井 道彦、鮎沢 大、「メラノサイトの機能に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2014年度大会、2014年3月30日、東京
 - 13) 山上 義巳、早川 清、早川 靖彦、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢 大、「エレクトロポレーション法による様々な生物種への遺伝子導入」、日本農芸化学会2014年度大会、2014年3月30日、東京
 - 14) 和田 卓己、高氏 裕貴、山上 義巳、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢 大、「細胞老化を導く不均衡増殖の是正」、日本分子生物学会第36回年会、2013年12月3日、神戸
 - 15) 新井 留実、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢 大、「細胞老化に伴う核内及び核膜構造の変化」、日本分子生物学会第36回年会、2013年12月3日、神戸
 - 16) 工藤 生、伊藤 陽平、古賀 慎太郎、Hossain Mohammad N、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢 大:「Gタンパク質 サブユニット GNG11 の細胞老化における役割」、日本分子生物学会第36回年会、2013年12月3日、神戸
 - 17) 高氏 裕貴、森野 香子、三木 健輔、山内 正剛、Hossain Mohammad N、藤井 道彦、鮎沢 大「アーユルヴェーダハーブのDNA損傷防護作用」、日本分子生物学会第36回年会、2013年12月3日、神戸
 - 18) 山上 義巳、早川 清、早川 靖彦、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢 大、「NEPA21を用いた電気パルス法による細胞への遺伝子導入」、日本分子生物学会第36回年会、2013年12月4日、神戸
 - 19) 山上 義巳、三木 健輔、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2013年度大会、2013年3月26日、仙台
 - 20) 三木 健輔、粕谷 裕樹、Mohammad N HOSSAIN、山下律郎、藤井道彦、鮎沢大、「メラノサイト機能に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2013年度大会、2013年3月26日、仙台
 - 21) 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 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2013年度大会、2013年3月27日、仙台
 - 22) 新井 留実、三木 健輔、藤井 道彦、鮎

沢 大、「細胞老化に伴う核内及び核膜構造の変化」、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 27 日、仙台

- 23) 杉本 量平、野沢 愛美、米倉 隆造、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢 大、「チェックポイントキナーゼ (Chk1, 2) の過剰チミジンによる細胞老化誘導における役割」、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 27 日、仙台
- 24) 和田 卓巳、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢 大、「細胞老化の不均衡増殖モデルの検証」、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 27 日、仙台
- 25) 高氏 裕貴、尾崎 洋子、三木 健輔、山内 正剛、Mohammad Nazir Hossain、藤井 道彦、鮎沢 大、「アーユルヴェーダハーブの放射線防護効果」、日本農芸化学会 2013 年度大、2013 年 3 月 27 日、仙台
- 26) 米倉 佑香、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 2013 年度大会、2013 年 3 月 27 日、仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://antiage.sci.yokohama-cu.ac.jp/>

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：