

酸素依存性短寿命突然変異体を用いた 細胞死と寿命解析

(研究課題番号：H10—長寿—055)

平成10年度 厚生科学研究費用補助金

(長寿科学総合研究事業)

研究報告書

1999年3月

主任研究者 石井直明
(東海大学医学部)

厚生大臣 宮下創平 殿

住 所
 フリカ'ナ イシイ ナオアキ
 研究者 氏 名 石井 直明
 (所属施設 東海大学 医学部)

平成 10 年度厚生科学研究費補助金(長寿科学総合 研究事業)に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名(課題番号) : 酸素依存性短寿命突然変異体を用いた細胞死と寿命解析 (H10-長寿-065)

国庫補助金精算所要額 : 金 7,000,000 円也

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク (別添1のとおり)
2. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書 (別添2のとおり)
3. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書 (該当なし)
4. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名(雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊 行 書 店 名	執筆者氏名
J.Gerontology: Biol Sci, 53A, No.4 Effects of oxygen on protein carbonyl and aging in Caenorhabditis elegans mutants with long (age-1) and short (mev-1) life span	1998年4月	The Gerontological Society of America	Adachi H, Fujiwara Y Ishii N
Nature, 394, No.6694 A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes	1998年8月	Macmillan Magazines Ltd.	Ishii N, Fujii M Hartman PS, Tsuda M Yasuda K, Senoo-Matsuda N, Yanase S, Ayusawa D, Suzuki K
遺伝子医学、3巻、No.1、ミトコンドリアに発見された老化関連遺伝子	1999年1月	メディカルドゥ	石井直明、藤井道彦 津田道雄
新老年学 第2版、第4章 老化遺伝子 2.老化研究のモデル、 2.2 センチュウ	1999年1月	東京大学出版会	石井直明
J. Gerontology: Biol Sci, 54A, No. 2 Protein carbonyl accumulation in aging dauer formation-defective (daf) mutants of Caenorhabditis elegans	1999年2月	The Gerontological Society of America	Yasuda K, Adachi H, Fujiwara Y, Ishii N
J. Radiation Resaerch, 40, Cloning of the oxidative stress-responseive genes in Caenorhabditis elegans	1999年3月	The Japan radiation Research Society	Yanase S, Ishii N

5. 研究成果による特許権等の知的財産権の取得状況

なし

酸素依存性短寿命突然変異体を用いた細胞死と寿命解析

主任研究者 石井 直明 東海大学医学部助教授

研究要旨 酸素ストレスが関与する細胞死と個体老化の関係を明らかにするために、線虫の一種、*C. elegans*の酸素高い感受性突然変異体を用いて解析を行った。この中で *mev-1* はランダムな細胞死やゲノム DNA の突然変異頻度の増加、細胞内抗酸化物質の濃度低下など、一般の老化で観察される現象を多面的に現わすことを明らかにした。

A. 研究目的

細胞の損傷や、それに伴う細胞死が組織・器官の機能低下を招き、それが個体の老化や死に反映されると考えられているが、その過程は以前明かとなっていない。ここにはさまざまな環境因子や遺伝子が複雑に関与しているものと考えられる。そこで本研究において、遺伝学的技術が確立し、細胞系統樹が完成している線虫の一種、*C. elegans* を用いてこれらの環境因子や遺伝子を明かにし、細胞損傷から細胞死を経て個体の死に至るまでの老化の過程を分子レベルで明らかにすることを目的とする。特に最近、この細胞死や老化の過程に酸素ストレスが深く関与していることが示唆されている。そこで酸素依存的に寿命が著しく変動する短寿命突然変異体である *mev-1* と *rad-8* を用いて、酸素ストレスが関与する細胞死や老化に至る過程を明らかにする。

本研究の中で昨年、*mev-1* の遺伝子クローニングに成功し、これがミトコンドリア内膜に存在する電子伝達系の複合体 II を構成するシトクローム b560 であることを突き止めた。これはエネルギー産生の異常が酸素高感受性や細胞死、寿命短縮を起こすことを示唆した画期的な成果である (Nature 1998)。本年度は、1) *mev-1* で胚発生期にランダムな細胞死が生ずる過程の遺伝学的解析、2) *mev-1* におけるゲノム DNA の不安定性の遺伝学的解析、3) *mev-1* と *rad-8* における抗酸化物質（細胞中のグルタチオン濃度）の測定、4) 酸化的スト

レスに対する防御機構を解析するために、酸素で誘導される遺伝子の単離 (J. Radiat. Res. 1999) を行い、野生株と酸素感受性突然変異体において、酸化ストレスが関与すると考えられる細胞構成成分の動態を調べた。これにより *mev-1* の中で酸素高感受性や細胞死、寿命短縮が起こる原因や過程が明らかになると考える。さらに *rad-8* の遺伝子単離を試みた。

B. 研究方法

1. 胚発生中期の卵を生きたままノマルスキー型微分干渉顕微鏡で観察し、そこに存在する死細胞の数を数えた。細胞死の過程を明らかにするために、プログラムされた細胞死の実行に必要な遺伝子 *ced-3* の突然変異体と *mev-1* の二重変異株を作成して死細胞の数を測定し、*mev-1* 単独の胚中の死細胞の数と比較した。

2. ゲノム DNA 中の突然変異頻度を測定するために、*mev-1fem-3* の二重変異株を作成した。*fem-3* は機能獲得型の温度感受性不妊突然変異体であるが、突然変異剤により染色体の一方に突然変異が生じたヘテロな遺伝子を持つ虫は卵を産むことができることを利用した。野生株、*mev-1*、*rad-8* をさまざまな酸素濃度で飼育し、突然変異の頻度を測定した。

3. 抗酸化物質の1つであるグルタチオンの細胞内濃度を生化学的に測定し、*mev-1* における抗酸化能力を調べた。

4. 酸化に関与する遺伝子を調べるため

に、高い酸素で誘導される遺伝子を RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction (RAP-PCR) 法により分離した。野生株を 90% 酸素下で 1 時間、3 時間、5 日間培養後 mRNA を分離し、適当な primer を用いて PCR を行った後にアガロースゲル電気泳動を行った。ゲルから大気中より高い酸素で発現が増加しているバンドを切り出し、塩基配列を決定して遺伝子の同定を行った。

5. *rad-8* は第 1 染色体上の *unc-40* と *bli-4* 突然変異体マーカーの間に存在するが、他に適当な突然変異体マーカーがないことから一般的な方法ではこれ以上の詳細な解析は不可能であった。そこで今回は Polymorphic Sequence-Tagged Sites 法により、さらに詳細な位置を決定した。この方法はトランスポゾンの挿入により、通常研究に使われている野生株 (N2) には含まれない DNA 断片を持つ野生株 (BO) と *rad-8* との組換え体を作成し、*rad-8* 近辺に存在する BO 由来の DNA 断片をマーカーとして、その存在の有無を調べることにより *rad-8* の位置を決定した。遺伝子クローニングを行うために、ここに存在する野生型の DNA を *rad-8* に導入し、その子孫の酸素耐性復帰を調べることにより遺伝子単離を試みている。外来 DNA の導入の有無を確認するためにグリーン蛍光遺伝子 (GFP) を同時に導入しているが、これを確認するために今回導入した蛍光実体顕微鏡 (MZFL III) を使用した。

C. 研究結果

1. *mev-1* が起こすランダムな細胞死の過程を遺伝学的に解析した：胚中期における細胞死を観察すると、野生株では平均 3.8 個であったものが、*mev-1* では 8.4 個と増加していた。細胞死の実行に必要な遺伝子 *ced-3* の突然変異体と *mev-1* の二重変異体は、細胞死がほとんど見られなくなった (0.1 個以下)。その結果、*mev-1* で生じるランダムな細胞死は *C. elegans* で一般的に見ることができるプログラムされた細胞死と同じ過程をたどり、*ced-3* の上流で働いていることを見出した。

2. *mev-1* がゲノム DNA に高い突然変異を生ずることを見出した。この頻度は大気中でも野生株より高く、酸素濃度が高くなるにしたがって野生株でも高くなるが、*mev-1* では

それが顕著に高くなった。しかし *rad-8* はその頻度は野生株と同程度であった。

3. *mev-1* では抗酸化剤であるグルタチオン濃度が野生株の 60% 程度まで減少していることを見出した。

4. *rad-8* の染色体上の位置を約 250 kb の範囲に限定した。また酸素耐性に復帰した虫は得られず、遺伝子クローニングは成功していない。

5. 今回、野生株より酸素で誘導される遺伝子を 4 つ (rRNA, 2 つの熱ショックタンパク質: *hsp16-1*, *hsp16-48*, vacuolar ATPase G サブユニット) を分離した。このうち rRNA は 5 日間の高酸素暴露で始めて発現誘導がされ、それ以外は 3 時間以内に発現が高くなっていた。

D. 考察

前年度の研究において、野生株と酸素感受性短寿命突然変異体である *mev-1* は共に、成熟後は加齢にしたがってランダムな細胞死が生じていることを明かにしたが、*mev-1* が野生株よりも早い時期から細胞死を生じている証拠は測定技術の難しさから今だ実証するに至っておらず、今後の課題である。また *mev-1* は *C. elegans* の発生の過程で見られるプログラムされた細胞死の他に、胚発生期においてランダムな細胞死が生ずることを見出した。この細胞死を起こす細胞の種類や数は個体によりまちまちであった。この *mev-1* におけるランダムな細胞死の実行には、プログラムされた細胞死の実行に必要な遺伝子である *ced-3* を必要とすることから、この過程はプログラムされた細胞死と同じ過程を経ることを明かにした。今後、この *mev-1* における胚発生期における細胞死と *mev-1* が示す寿命短縮との関係を調べる予定である。

mev-1 のゲノム DNA に高頻度で突然変異を生ずることを見出した。*mev-1* の原因遺伝子はミトコンドリア内の電子伝達系タンパク質の 1 つシトクローム b560 をコードしているが、ミトコンドリア内で生じた傷害がゲノム DNA を変化させることを明かにした意義は大きく、「老化の体細胞変異説」を実証する可能性を含んでいる。

mev-1 では、もう 1 つの酸素依存性短寿命突

然変異体 *rad-8* と共に細胞中のグルタチオン濃度が顕著に減少していた。これは *mev-1* の細胞では酸化ストレスを受けやすい状態に陥っていることを示しており、*mev-1* の代謝に幅広い変化が生じていることを示唆するものである。

Polymorphic Sequence-Tagged Sites 法による遺伝子解析により、*rad-8* が *unc-40* と *stP124* マーカー遺伝子の間 (約 250kb) に存在していることを見出したが、遺伝子クローニングは成功していない。今後さらなる解析を行う予定である。

抗酸化ストレスの役割をしていると考えられる、酸素で導される遺伝子を野生株より数種単離した。rRNA は発現誘導されるために 5 日間という長い期間が必要である。これは細胞に傷害が生じた結果であり、酸化ストレスに対する防御機構とは別のものであると考えられる。他の遺伝子には熱耐性遺伝子が含まれており、酸化ストレスに対する防御機構が、熱などのストレスに対する機構と共有していることが示唆された。またエネルギー代謝に関係がある遺伝子が単離されたことから、エネルギー産生が酸化ストレスと関係があることを示唆している。今後これらの遺伝子が *mev-1* や *rad-8* でどのような発現を行っているかを調べる必要がある。

mev-1 の細胞死や寿命短縮を引き起こす原因がミトコンドリア内から生じた活性酸素の生成量の増大によるものと考えられる。しかし一方で、シトクローム b560 を含む複合体 II は電子伝達系のみならず、TCA 回路における役割を担っていることから、エネルギー産生の異常が代謝に変化を与え、その結果、細胞が酸素傷害を受けやすい状態になっていることも考えられる。今後、この両者について調べ、原因を明かにする必要がある。

E. 結論

線虫の一種、*C. elegans* の酸素依存性短寿命突然変異体 *mev-1* は、その原因遺伝子がミトコンドリア内膜に存在する電子伝達系の複合体 II を構成するシトクローム b560 である。このミトコンドリアを原因とした傷害が個体を酸素高感受性にしたり、寿命を短縮させたりするばかりか、細胞の中でもゲノム DNA に突

然変異を生じたり細胞死を生ずるなど、細胞内で多面的な変化を生じていることが明らかとなった。これは一般的な哺乳類の細胞内で生じる老化の多面発現の現象に酷似していることから、ミトコンドリアを原因とする酸化ストレスが老化の一般的な原因になりうることを強く示唆するものである。

今後、*mev-1* や *rad-8* の胚発生期で見られるランダムな細胞死が、その後の寿命にどのような影響を与えるかを明かにする必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Adachi H, Fujiwara Y, Ishii N, Effects of oxygen on protein carbonyl and aging in *Caenorhabditis elegans* mutants with long (*age-1*) and short (*mev-1*) life span, J. Gerontology: Biol. Sci., 53A, No.4, B240-B244, 1998.
- 2) Ishii N, Fujii M, Hartman PS, Tsuda M, Yasuda K, Senoo-Matsuda N, Yanase S, Ayusawa D, Suzuki K, A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes, Nature, 394, No.6694, 694-697, 1998.
- 3) 石井直明、藤井道彦、津田道雄、ミトコンドリアに発見された老化関連遺伝子、遺伝子医学、メディカルドゥ、3 巻、1 号、151-153、1999
- 4) 石井直明、センチウ、新老年学 第 2 版、東京大学出版会、pp237-246、1999
- 5) Yasuda K, Adachi H, Fujiwara Y, Ishii N, Protein carbonyl accumulation in aging dauer formation-defective (*daf*) mutants of *Caenorhabditis elegans*, J. Gerontology: Biol. Sci., 54A, No.2, B47-B51, 1999
- 6) Yanase S, Ishii N, Cloning of the oxidative stress-responsive genes in *Caenorhabditis elegans*, J. Radiat. Res., 40, 39-47, 1999

2. 学会発表

- 1) 石井直明、藤井道彦、Hartman PS, 津田道雄、安田佳代、妹尾一松田七美、築瀬澄乃、鮎沢大、鈴木堅之、線虫の酸

- 素依存性短寿命突然変異体の遺伝子クローニング、第21回日本基礎老化学会大会、1998年
- 2) 津田道雄、大久保朋一、安田佳代、松田七美、築瀬澄乃、日吉峰麗、藤井道彦、鮎沢大、石井直明、ミトコンドリアの電子伝達系異常は*C. elegans*の酸素依存性短寿命を引き起こす、第71回日本生化学会大会、1998年
 - 3) 石井直明、線虫の老化と酸化ストレス、ワークショップ「活性酸素の生物作用と生物の防御戦略」、第41回日本放射線影響学会大会、1998年
 - 4) 石井直明、藤井道彦、Hartman PS, 津田道雄、安田佳代、妹尾一松田七美、築瀬澄乃、鮎沢大、鈴木堅之、酸化ストレスと老化を引き起こす*C. elegans*のミトコンドリア電子伝達系遺伝子の変異、第41回日本放射線影響学会大会、1998年
 - 5) 下田耕三、張秋梅、石井直明、米井脩治、大腸菌 *oxyR* の過酸化水素感受性と相補する *C. エレガンス* の遺伝子の検索、第41回日本放射線影響学会大会、1998年
 - 6) 松本由紀子、松田美穂、張秋梅、石井直明、山本和生、米井脩治、*C. エレガンス* における7、8-ジヒドロ-8-オキグアニン-DNAゴリコシラーゼ活性の同定、第41回日本放射線影響学会大会、1998年
 - 7) 石井直明、線虫の老化における酸化ストレスの役割、ワークショップ「老化の分子生物学」、第21回日本分子生物学会大会、1998年
 - 8) 石井直明、藤井道彦、Hartman PS, 津田道雄、安田佳代、妹尾一松田七美、築瀬澄乃、鮎沢大、鈴木堅之、線虫の老化における酸化ストレスの役割、第21回日本分子生物学会大会、1998年
 - 9) 築瀬澄乃、米山葉子、石井直明、線虫 *C. エレガンス* におけるアンチセンス導による抗酸化ストレス遺伝子群の機能解析、第21回日本分子生物学会大会、1998年

19980197

報告書 P. 7-15は下記に掲載

Cloning of the Oxidative Stress-responsive Genes in *Caenorhabditis elegans*

Sumino Yanase and Naoaki Ishii

Journal of Radiation Research. Volume40, pp.39-47, 1999

19980197

報告書 P. 16-20は下記に掲載

**Protein Carbonyl Accumulation in Aging Dauer Formation-Defective (*daf*)
Mutants of *Caenorhabditis elegans***

Kayo Yasuda, Hiroshi Adachi, Yoshisada Fujiwara, and Naoaki Ishii

Journal of Gerontology. Biological Sciences. Volume54A, pp.B47-B51,
1999

19980197

報告書 P. 17-23は下記に掲載

ミトコンドリアに発見された老化関連遺伝子

石井直明, 藤井道彦, 津田道雄

遺伝子医学. 3 巻 1 号, pp.151-153, 1999

19980197

報告書 P. 24-34は下記に掲載

2.2 センチュウ. (第4章 老化遺伝子. 2 老化研究のモデル)

[石井直明]

pp.237-246

新老年学. 第2版. 東京大学出版会. 1999年1月

19980197

報告書 P. 35-37は下記に掲載

A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome *b* causes oxidative stress and ageing in nematodes

Naoaki Ishii, Michihiko Fujii, Philip S. Hartman, Michio Tsuda, Kayo Yasuda, Nanami Senoo-Matsuda, Sumino Yanase, Dai Aisaka & Kenshi Suzuki
Nature. Volume 394 No. 6694, pp.694-697, 1998

19980197

報告書 P. 38-42は下記に掲載

Effects of Oxygen on Protein Carbonyl and Aging in *Caenorhabditis elegans* Mutants With Long (*age-1*) and Short (*mev-1*) Life Spans

Hiroshi Adachi, Yoshisada Fujiwara, and Naoaki Ishii

Journal of Gerontology. Biological Sciences. Volume53A, pp.B240-B244,
1999