

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11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

2000年3月

主任研究者 石井直明

(東海大学医学部)

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。線虫の一種、*C. elegans* の *mev-1* はランダムな細胞死を起こす、酸素依存性短寿命突然変異体であり、遺伝学的研究から *mev-1* の短寿命の原因の一部が、ランダムな細胞死によるものであることを明らかにした。この *mev-1* の酸素高感受性の原因がエネルギー代謝回転の障害によることが示唆された。

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、その過程は依然明かにされていない。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。ランダムな細胞死を引き起こす *mev-1* は酸素に高い感受性を示す短寿命な突然変異体であることから、酸素ストレスを原因とする細胞死や、細胞死と老化の関係を解明するために最適な突然変異体である。

本研究の中で、細胞死の実行に必要な *ced-3* 遺伝子が欠損した突然変異体と *mev-1* の二重変異体を作成すると、野生株の中でも見ることができるプログラムされた細胞死だけでなく、*mev-1* のみに見ることができランダムな細胞死も生じないことを明らかにした。これは *mev-1* で出現するランダムな細胞死の実行にもプログラムされた細胞死の過程が必要であることを示している。本年度は細胞死の機能を遺伝的に消失させた *mev-1* の寿命と、*mev-1* そのものの寿命を比較することにより、細胞死が寿命に及ぼす影響を調べた。

さらに本研究の中で昨年、*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り (Nature 1998)、*mev-1* が酸素に高感受性になる原因を特定できる可能性がでてきた。1つの可能性として、複合体 II には電子伝達系において電子をコハク酸から CoQ に流す機能を持つ。*mev-1* の異常が電子の逸脱を生じ、これが酸素に渡されて活性酸素を生じるために、酸素高感受性や短寿命になることが考えられる。さらにもう1つの可能性として、複合体 II は TCA サイクルの中でコハク酸をフマル酸に変換するコハク酸脱水素酵素としての役目を持つために、複合体 II の機能が落ちている *mev-1* では TCA サイクルにも影響が出ていいると考えられる。これが ATP 産生を低下させ、エネルギー代謝を低下させる可能性がある。これは副産物である活性酸素の生成量に影響をあたえ、その結果、抗酸化に関わる遺伝子の発現に変化が生じる可能性がある。

さらに *mev-1* ではゲノム DNA に高い頻度で突然変異を生じることを本研究の中で見出した。DNA の変異が細胞の機能を低下させ、その結果細胞死を生じる原因になることが考えられることから、この突然変異頻度の原因を、酸化ストレスにより生じる DNA 中の 8-OH-dG の量と、紫外線による DNA 修復能の両面から調べた。

B. 研究方法

1. 細胞死と寿命に関わる実験

mev-1unc-50 (マーカー遺伝子) と *ced-3(n717)* をかけ合わせて、*mev-1ced-3unc-50* の二重突然変異体を作成し、野生株、*unc-50*,

mev-1unc-50, *mev-1ced-3unc-50* のそれぞれの寿命を測定した。

2. 活性酸素発生量

mev-1 におけるミトコンドリアからの活性酸素の発生量を調べた。虫の細胞をホモジナイザーで破壊し、ミトコンドリア分画を分離した。ここにコハク酸または HADH の基質と MCLA (ウミホタル・ルシフェリン誘導体) を添加し、 $O_2^{\cdot-}$ の発生を化学発光法で定量した。

3. エネルギー代謝の機能

虫の細胞をホモジナイザーで破壊し、細胞質分画を用いて乳酸、ピルビン酸、ATP、クエン酸、コハク酸、グルタミン酸の各濃度を測定した。

4. 8-OH-dG 濃度と DNA 修復能力

- (1) 孵化後、5日目、10日目、15日目まで大気中で飼育、あるいは孵化から10日目まで30%酸素濃度で飼育した虫から DNA を抽出し、8-OH-dG の量を HPLC 分析法により測定した。
- (2) 孵化後2日目の幼虫に紫外線 (60 J/m²) 照射してから飼育を続けた、0時間、5時間、12時間、24時間後に虫を凍結した。DNA を分離し、ピリミンジン・ダイマー (CPD) と 6-4 photo product (6-4 PP) の修復能をそれぞれの抗体を用いて測定した。

C. 研究結果

1. 細胞死と寿命に関わる実験

二重突然変異体を分離するために必要な *unc-50* マーカーそのものの寿命が野生株よりも少し延長していた。*unc-50* に比べて *mev-1unc-50* は短寿命である。*mev-1ced-3unc-50* の寿命曲線は若い時期には *unc-50* の寿命曲線に乗っており、老齢期になると *mev-1unc-50* の寿命曲線に乗り換えるような形になった。

2. 活性酸素発生量

複合体 II から生成される $O_2^{\cdot-}$ を測定するためにコハク酸を添加すると、 $O_2^{\cdot-}$ の産生が見られなかった。複合体 I の基質である HADH を添加すると、期待とは逆に *mev-1* の $O_2^{\cdot-}$ の発生量が野生株に比べて半分に低下していた。

3. エネルギー代謝の機能

- (1) ATP 産生は *mev-1* では野生株に比べて 15~25%低下していた。
- (2) 乳酸の量は 20~30%増加しており、乳酸/ピルビン酸値が 14~20%増加していた。
- (3) クエン酸の量に変化はなかったが、コハク酸、グルタミン酸量が優位に減少していた。

4. 8-OH-dG 濃度と DNA 修復能力

(1) 8-OH-dG の量

大気中、高酸素濃度に関わらず、8-OH-dG の量は野生株と変わらなかった

(2) 紫外線に対する DNA 修復能

CDP および 6-4 PP の修復能は野生株、*mev-1* に差がなく、紫外線照射後 24 時間目には約半分の傷害が修復されていた。

D. 考察

1. 細胞死と寿命の関係

野生株ではプログラムされた細胞死により、131個の細胞が消滅する。この死細胞は胚発生期の卵をノマルスキー型顕微鏡で観察するとボタン状の形態をとり正常細胞と区別することができる。それぞれの死細胞は隣接の細胞により貪食され約30分後に消滅する。野生株では1度平均3.8個の死細胞が見られるが、*mev-1* では8.4個と野生株では見られないランダムな細胞死が観察される。この *mev-1* と、細胞死の実行に必要な *ced-3* との二重突然変異体を作成し、寿命を測定した。結果は、*mev-1ced-3* の寿命曲線は若い時期には野生株の寿命曲線に乗っており、老齢期になると *mev-1* の寿命曲線に乗り換えるような形になった。このことは、*mev-1* の短寿命の一因がランダムな細胞死によるものであることを示唆している。前年後の研究で、野生株では細胞死が寿命に影響を及ぼさないことから、*mev-1* で生じた死細胞は正常細胞に悪い影響を与えている可能性がある。現に細胞の貪食に関係する遺伝子 *ced-1* の突然変異体 (死細胞の貪食ができない) と *mev-1* の二重突然変異体は致死となった。

2. 活性酸素発生量とエネルギー代謝

mev-1 の酸素高感受性の原因が *mev-1* の原因遺伝子である *cyt-1* を含むミトコンドリア内に存在する電子伝達系酵素である複合体 II からの電子の逸脱によるものと考えたが、結果はこれとは逆で、*mev-1* における $O_2^{\cdot-}$ の

産生量は野生株の半分に減少していた。複合体 II は電子伝達系において電子をコハク酸から CoQ に流す機能を持つ一方で、TCA サイクルの中でコハク酸をフマル酸に変換するコハク酸脱水素酵素としての役目を持つために、複合体 II の機能が落ちている *mev-1* では TCA サイクルにも影響が出ていると考えられる。これが ATP 産生低下させ、最終的に *mev-1* に認められる酸素高感受性を引き起こすことが考えられる。そこで ATP 産生量や TCA サイクルの機能を測定した。その結果、ATP の量が *mev-1* で優位に低下していたのを初め、乳酸/ピルビン酸値が優位に増加していたことから、*cyt-1* の障害は複合体 II における TCA サイクルに影響を与え、*mev-1* をアシドーシスの状態に陥らせていることが考えられる。この状態の細胞は弱体化し、酸素ストレスに感受性になっている可能性がある。またエネルギー代謝の低下は、その副産物である活性酸素の生成量を減少させる可能性がある。その結果、抗酸化に関わる遺伝子発現の量を減少させるために酸素高感受性になっていると考えられる。現にすでに報告したように、抗酸化酵素であるスーパー・オキシドデスムターゼの活性や抗酸化物質であるグルタチオンの濃度が野生株の半分にまで低下していた。

3. ゲノム DNA の突然変異頻度上昇の原因
mev-1 ではゲノム DNA の高突然変異頻度が高く、これが細胞死を引き起こしている可能性がある。そこで酸化ストレスにより生じる 8-OH-dG の量を測定した、同時に紫外線により生じる CDP および 6-4 PP の修復能を測定した。しかし、8-OH-dG、DNA 修復能ともに野生株と *mev-1* に差がなく、*mev-1* においてゲノム DNA の突然変異頻度が上昇する原因は不明である。

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起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ずることが明かとなった。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、ミトコンドリアを起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。

今回、*mev-1* の原因遺伝子である *cyt-1* の機能不全が、*cyt-1* を含む複合体 II 全体の機能不全を導き、それが TCA サイクルに影響を与え、酸化ストレスを生じていることを見出した。TCA サイクルに異常を生じた細胞は機能不全を起こし、その中であるものは細胞死に至ると考えられる。*mev-1* で生じるランダムな細胞死が *mev-1* の寿命短縮の一因であることを明らかにしたことは、酸素ストレスのような条件下では細胞老化が個体老化に関係することを示唆するものであり、老化研究に対するこの研究の意義は大きい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Goto S, Namkamura A, Radak Z, Nakamoto H, Takahashi R, Yasuda K, Sakurai S, Ishii N, Carbonylated proteins in aging and exercise: immunoblot approaches, Mech, Ageing Develop., 107, 245-253, 1999
- 2) 津田道雄、石井直明、ミトコンドリアの異常による細胞障害と老化、日本医事新報、No.3912
- 3) Yanase S, Hartman P, Ito A, Ishii N, Oxidative stress pretreatment increase the X-radiation resistance of the nematode *Caenorhabditis elegans*, Mutation Research, 426, 31-39, 1999
- 4) Hartman P, Ishii N, Isolating mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans* that are hypersensitive to DNA-damaging agents, Method in Molecular Biology, Vol. 113, 11-16, 1999
- 5) 石井直明、センチユウの全ゲノム解析、遺伝、53 (5), 9-10, 1999
- 6) 津田道雄、石井直明、ミトコンドリアから生じる酸化ストレスと老化、生化学、71(7), 546-550, 1999
- 7) 石井直明、線虫を用いた老化研究、ファラマシア、35(9), 904-908, 1999
- 8) 石井直明、老化遺伝子とフリーラジカル、The Bone, 13(3), 57-62, 1999
- 9) 石井直明、線虫の老化とその規定遺伝子、日本老年医学会、36(3), 613-619, 1999

- 10) 石井直明、ここまで分かった老化の秘密、
市政、48(11), 90-93, 1999
- 11) 安達宏、石井直明、線虫の老化遺伝子、
BIO Clinica, 14(14), 1333-1337,
1999
- 12) Nakamura A, Yasuda K, Adachi H,
Sakurai Y, Ishii N, Goto S,
Vitellogenin-6 major in aged
nematode, *Caenorhabditis elegans*,
B.B.R.C., 254, 580-583, 1999
- 13) 石井直明、老化の正体はみえたのか、
遺伝、54(1),13-17, 2000
- 14) 石井直明、(対談)老化研究の現状と
21世紀の展望、遺伝、54(1), 36-
46,2000
2. 学会発表
- 1) Hartman S, Ponder B, Kasai H, Ishii N,
Oxygen mutagenesis in *C. elegans*,
12th International *C. elegans*
Meeting, 1999
- 2) Ishii N, Hartman S, Oxidative stress
and aging in *C. elegans*: What lessons
learned from *mev-1*?, 12th
International *C. elegans* Meeting,
1999
- 3) Senoo-Matuda N, Yoshimura S, Muto
R, Akatsuka A, Hartman P, Ishii N,
The role of *Cyt-1* in oxidative
stress-induced mitochondrial
dysfunction and apoptosis in *C.*
elegans, 12th International *C. elegans*
Meeting, 1999
- 4) Yanase S, Ishii N, Adaptive response
in *C. elegans*: Oxidative stress-
responsive genes to aging increase
life span, 12th International *C.*
elegans Meeting, 1999
- 5) Yasuda K, Hartman S, Ishii N, Effects
of temperature and oxygen on life
span in *mev-1*, 12th International *C.*
elegans Meeting, 1999
- 6) 石井直明、ミトコンドリアから生じる
酸化ストレスと老化、シンポジウム「老
化モデルの最前線」、日本基礎老化学
会22回大会、1999
- 7) 妹尾(松田)七美、吉村真一、武藤綾
子、赤塚明、Hartman P, 線虫 *C.*
elegans における酸化ストレスによる
ミトコンドリア機能不全、日本基礎老
化学会22回大会、1999
- 8) 安田佳代、築瀬澄乃、石井直明、線虫
C. elegans 酸素依存性短寿命突然変異
体の寿命に及ぼす温度と酸素ストレス、
日本基礎老化学会22回大会、1999
- 9) 石井直明、酸化ストレスと老化関連遺
伝子、Aging Science Forum「死亡の
老化と個体の老化：老化の分子機構」、
日本老年医学会21回大会、1999
- 10) 石井直明、ミトコンドリアを原因とし
た酸化ストレス・細胞死・老化、シン
ポジウム「酸化ストレスが関わる細胞
死」、日本生化学会72回大会、1999
- 11) 松田七美、吉村真一、武藤綾子、赤塚
明、Hartman P, 石井直明、線虫 *C.*
elegans の発生におけるミトコンドリ
ア複合体IIシトクロームb大サブユニ
ット(*Cyt-1*)の役割、日本生化学会7
2回大会、1999
- 12) 井原憲一、石黒寛之、大久保朋一、小
野和博、日吉峰、石井直明、吉村真
一、篠原治、津田道雄、電子伝達系阻
害剤による細胞障害の高濃度酸素によ
る増幅、日本生化学会72回大会、1999
- 13) 石井直明、ミトコンドリアを原因とす
る酸化ストレスと老化、第16回臨床f
フリーラジカル会議、2000
- 14) Ishii N, Oxidative stress and aging in
Caenorhabditis elegans, International
Symposium on "Free Radicals in Life
Science", 2000

刊行書籍、論文、雜誌

19990203

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

線虫の寿命とその規定遺伝子.

石井直明

日本老年医学会雑誌. 36巻第9号, pp.613-619, 1999

Vitellogenin-6 is a major carbonylated protein in aged nematode,
Caenorhabditis elegans.

Nakamura A, Yasuda K, Adachi H, Sakurai Y, Ishii N, Goto S.

Biochem Biophys Res Commun 1999 Oct 22 ; 264(2) : 580-3

Goto S, Namkamura A, Radak Z,
Nakamoto H, Takahashi R, Yasuda K,
Sakurai Y, Ishii N, Carbonylated
proteins in aging and exercise:
immunoblot approaches, Mech,
Ageing Develop., 107, 245-253, 1999
津田道雄、石井直明、ミトコンドリアの
異常による細胞障害と老化、日本医事新
報、No.3912

Yanase S, Hartman P, Ito A, Ishii N,
Oxidative stress pretreatment
increase the X-radiation resistance of
the nematode *Caenorhabditis elegans*,
Mutation Research, 426, 31-39, 1999
Hartman P, Ishii N, Isolating mutants
of the nematode *Caenorhabditis*
elegans that are hypersensitive to
DNA-damaging agents, Method in
Molecular Biology, Vol. 113, 11-16,
1999

石井直明、センチュウの全ゲノム解析、
遺伝、53 (5), 9-10, 1999
津田道雄、石井直明、ミトコンドリアか
ら生じる酸化ストレスと老化、生化学、
71(7), 546-550, 1999

石井直明、ここまで分かった老化の秘密、
市政、48(11), 90-93, 1999

安達宏、石井直明、線虫の老化遺伝子、
BIO Clinica, 14(14), 1333-1337,
1999

石井直明、老化の正体はみえたのか、
遺伝、54(1),13-17, 2000

石井直明、(対談) 老化研究の現状と
21世紀の展望、遺伝、54(1), 36-
46,2000

石井直明、線虫を用いた老化研究、ファ
ラマシア、35(9), 904-908,1999

石井直明、老化遺伝子とフリーラジカル、
The Bone, 13(3), 57-62, 1999