

厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

ストレスの老化に及ぼす影響と  
その生体応答に関する研究

平成 13 年度 総括、分担研究報告書

主任研究者 磯部健一

平成 14 (2002) 年 3 月

# 目次

I、総括研究報告書	
ストレスの老化に及ぼす影響とその生体応答に関する研究	1
主任研究者 磯部健一	
II、分担研究報告書	
1. ストレスと老化	13
磯部健一	
2. 老化促進ストレスとシグナル伝達	18
中島 泉	
3. 老化における抗酸化酵素の破綻およびその防御機構	23
谷口直之	
4. ミクログリアとストレス	27
澤田 誠	
5. 老化促進ストレスと神経細胞死	31
祖父江 元	
6. 生体防御の異常と老化ストレスに関する研究	36
谷口維紹	
III、研究成果の刊行に関する一覧表	39

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業）

総括研究報告書

ストレスの老化に及ぼす影響とその生体応答に関する研究

主任研究者 磯部健一

（国立長寿医療研究センター老化機構、部長）

研究要旨：本研究はストレス刺激が生体にあたえる変化、それを防御する機構をシグナル伝達系、遺伝子発現制御を中心に詳細に検討する。今年度は活性酸素に関しては、ストレス刺激が細胞膜に作用して、活性酸素を産生すること、その活性酸素の量により、ミクログリアの神経細胞への作用が、保護からアポトーシスに変化すること、活性酸素による神経細胞のアポトーシスを SOD1、HSP40、HSP70 が抑制することを新たに見い出した。また、NO は HB-EGF 発現を上げて、アポトーシスの抑制に働くことを見い出した。もう1つのストレスである DNA 傷害性ストレス刺激は GADD34 と結合する ZBP-89、GAHSP40、MSP58 の発現を上昇させることを新たに見い出した。GADD34 と ZBP-89 の遺伝子欠損マウスの実験が最終段階にきている。IRF-7<sup>-/-</sup>マウスはウイルス感染に対する IFN- $\alpha/\beta$ の転写誘導が十分に起こらない。また、IRF-7欠損により、抗原提示細胞の活性化に異常が生じ、抗体応答が適切に起こらなくなることを示した。

分担研究者氏名 磯部健一；国立長寿医療研究センター老化機構研究部、部長  
中島 泉；名古屋大学大学院医学研究科免疫学教授  
谷口維紹；東京大学大学院教授  
谷口直之；大阪大学 大学院 教授  
祖父江 元；名古屋大学神経内科教授  
澤田誠；藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・教授

A. 研究目的

人は紫外線、放射線、感染、熱等種々の外的ストレス刺激にさらされている。またこれらの刺激はラジカルを産生するし、代謝によっても内部でラジカルが産生される。本研究はストレス刺激が生体にあたえる変化をシグナル伝達系遺伝子

発現制御を中心に詳細に検討し、それが老化をどのように引き起こすかを検索する。一方生体は老化促進ストレス刺激に対し、防御的に作用する機構を備えている。ラジカル消去酵素（SOD、カタラーゼ等）、HSP70 等シャペロン、さらには DNA 傷害を監視する様々な蛋白は異なった機構でストレスから生体を防御していると考えられる。さらに、サイトカイン、免疫系は高度な防御機構を備えている。本研究はこれら防御機構を分子レベルで詳細に解析すると同時にその生体における老化防御としての役割を遺伝子欠損マウス、老化マウスを使用し研究する。さらに高等動物であるひとはサイトカインネットワークを構築しストレス刺激に対応している。この破綻が老化に結びつくと考えられる。本研究によりストレスの老化に及ぼす影響とその防御

過程を分子レベルから個体レベルで総合的に研究することで老化防御のための理想的生活習慣を提示することが可能になると期待される。

## B. 研究方法

### 1、細胞膜、細胞内シグナル伝達系の解析

細胞に各種刺激（アルキル化剤 MMS、紫外線、カルボニル化合物、増殖因子、NO 産生試薬 SNAP 等）を加え、細胞表面の膜蛋白とラフトを、蛍光抗体法等により 2 重染色し、蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。また、細胞抽出物を SDS-PAGE に流し、シグナル伝達系の抗体、リン酸化抗体を使用したウエスタンブロット法および試験管内キナーゼアッセイなどにより測定した。また、シグナル伝達分子の特異性は各種 inhibitor で解析した。

### 2、遺伝子発現制御；

目的の遺伝子の mRNA 発現は細胞あるいはマウスより RNA を調整し、ノザンハイブリダイゼーションで検索した。マウスゲノムライブラリーよりゲノム遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定後、ルシフェラーゼアッセイ用の PGL3 レポーターベクターに組み込んだ。組み換え技術を用いて、予想されるプロモーター領域、エンハンサー領域の各種欠失変異体、ミュータントを作製した。NIH3T3 細胞を代表とする培養細胞株に遺伝子移入し、転写活性をルシフェラーゼアッセイにて測定した。また、転写因子をコードする cDNA を発現ベクターに組み込み細胞に遺伝子移入した。細胞から核蛋白質を抽出し、ゲルシフト法にて転写因子の

検討を行った。転写因子の特異性を知るために、抗体にてスーパーシフトアッセイを行った。

### 3、マウス個体を使用した実験と組織染色

C57BL/6 マウス各年齢は長寿医療研究センター長寿ファームより得た。IRF-7 欠損マウスは東京大学谷口研で確立された。GADD34 と結合する ZBP-89 ノックアウトマウスは ES 細胞からキメラマウスをつくる途中で hetero 欠損マウスが不妊となった。これらのマウスの病態解明のため、組織染色、免疫染色、in situ hybridization を行った。

（倫理面への配慮）動物実験はマウス個体を使用した。長寿医療研究センター、東京大学、大阪大学、名古屋大学、藤田保険衛生大学医学部のそれぞれの動物施設実験指針に従って研究を行った。

## C. 研究結果

### 1、DNA 傷害性ストレス刺激に対する生体応答 (磯部)

本年は DNA 傷害性アルキル化剤に対する生体応答に焦点を絞って研究を進めた。DNA 傷害性ストレス刺激 MMS は ERK あるいは p38 といった MAP キナーゼ経路を通り、CREB、cJUN 転写因子を活性化し、GADD34 プロモーター活性を上昇させる。ZBP-89 の生体内機能解析はテトラプロイド、キメラ解析によりすすめた。ZBP-89 は、精子形成過程の初期すなわち、PGC 形成期に発現し、p53 と共同して、PGC の発生、分化に重要な役割を持つことが判明した。あらたな MMS 反応性蛋白として、GADD34 と結合する蛋白

のうち、GAHSP40, ZBP-89, MSP58 は DNA 傷害性ストレス刺激 MMS により発現が上昇することが判明した。

## 2、酸化ストレスとシグナル伝達系 (中島)

細胞を重金属等により刺激すると、細胞表面蛋白とラフトの凝集に伴って細胞内に活性酸素が産生されることを認めた。重金属等を細胞に作用させると、一方で受容体型および非受容体型のチロシンキナーゼがキナーゼドメインの特定のシステインを標的とする構造修飾によって活性化するとともに、カスパーゼの活性化や DNA の断片化を伴って細胞のアポトーシスが誘導された。このいずれも還元活性を持つ cysteine や N-acetylcysteine を重金属等やカルボニル化合物に先立って作用させると阻止されたこと等から、いずれに対してもラフトに依存してつくられる活性酸素がセカンドメッセンジャーとして働くことが示唆された。

## 2、酸化ストレスと生体防御 (谷口直)

血管平滑筋細胞を SNAP で刺激すると、HB-EGF mRNA が誘導された。HB-EGF のプロモーター領域に AP-1 site が存在することが報告されていることから、JNK1/c-Jun の活性化を検討した。SNAP 添加後 30 分より c-Jun の発現が上昇した。また c-Jun/AP-1 のインヒビターである curcumin は NO による HB-EGF の発現誘導を抑制した。さらに SNAP 添加後 30 分より JNK が活性化された。JNK1 の dominant negative (T183A/Y185F) を平滑筋

細胞に導入した結果、HB-EGF の誘導は抑制された。以上のことから JNK1/c-Jun の活性化を介して HB-EGF が誘導されることが明らかとなった。次に誘導される HB-EGF のアポトーシスに対する影響を検討した。TNF- $\alpha$  + actinomycin (AcD) を平滑筋細胞に添加すると、アポトーシスが誘導されるが、SNAP を 15 時間前に処理するとアポトーシスは抑制された。また血清除去による平滑筋細胞の viability の低下は、SNAP 添加により抑制されたが、HB-EGF の antisense oligonucleotide の添加により viability はさらに低下した。以上のことから SNAP により誘導される HB-EGF は平滑筋細胞において抗アポトーシス作用があることが明らかとなった。

## 3、ミクログリアとストレス (澤田)

刺激して活性化されたミクログリアには神経保護作用を示すものと傷害された神経の細胞死を促進するものがあることがわかった。すなわち、ミクログリア Ra2 は無刺激時、刺激時において無血清によって誘導した神経細胞死を抑制する一方、ミクログリア 6-3, 6-1 などは神経細胞死を促進することがわかった。さらに保護的である Ra2 に HIV 由来 nef 遺伝子を強制発現させた細胞は作用が逆転し無血清によって誘導した神経細胞死を促進する事がわかった。このとき、活性酸素産生量は神経細胞死を促進するものでは産生量が高いことがわかった。

## 4、老化促進ストレスと神経細胞死 (祖父江)

神経細胞株 Neuro2a に CMV promotor で発現される SOD1 の野生株(WT)および変異株 G93A を遺伝子移入した。G93A 導入細胞の約 20%に凝集体を認めるも WT 群では全く認めなかった。また 72 時間後の死細胞数も G93A 群は約 30%認めるが WT 群ではほとんど認めなかった。また 48 時間後の神経突起含有細胞率は G93A 群で減少していた。この系に HSP70,HSP40 を単独および相互に G93A と共に遺伝子移入した。48 時間後の凝集体陽性率は +HSP70/HSP40 群で著明であった。

5、生体防御の異常と老化（谷口維）  
生体は複雑なサイトカインネットワークを形成し恒常性を保っているがストレスによるこれらの破綻が老化を導くと考えられる。ウイルス感染を初めとする様々なストレスを受けた際に、インターフェロン (IFN) - $\alpha/\beta$ の転写が誘導される。IFN 転写誘導に関わる転写因子としての IRF-7 に注目し、IRF-7 欠損マウスを作製し解析した。IRF-7 欠損マウスはウイルス感染に対する (IFN) - $\alpha/\beta$ の産生が著しく減弱していた。更に、TKP- KLH に対する IgG 産生が低下していた。また病原体関連分子刺激時の樹状細胞の活性化も減弱していた。

#### D. 考察

様々な外的ストレス刺激に対し生体は応答したしていると考えられた。

細胞の生死をうまくコントロールしていると考えられる。

今年度は

1、重金属ストレスが細胞膜のラフトに作られた HSP40, MSP58 は GADD34 同様 DNA

し、活性酸素を産生させる。

2、DNA 傷害性ストレス刺激が MAP キナーゼを活性化させ、GADD34 を発現させる。

3、DNA 傷害性ストレス刺激が GADD34 と結合する新しい蛋白 GAHSP40、ZBP-89、MSP58 の発現を上昇させる。

ことを見出した。ストレス刺激による生体応答の分子レベルの解明に貢献すると考えられる。このことが、老化にどのように関係するかを各種年齢マウスを使い次年度解析する。また、GADD34 の生体における役割の解明は次年度遺伝子欠損マウスで明らかになる。

4、NO は血管平滑筋の HB-EGF 発現を上げて、アポトーシスの抑制に働く。このことは NO が老化の防御作用を持つことを示した。

5、ミクログリアは神経保護作用と神経細胞死誘導作用を持つ。このことは活性酸素の量による。

6、SOD1 は神経細胞死に関し保護的に働くまた、HSP40, HSP70 は協調して神経のアポトーシスを抑制する。

これらの解明は神経変性疾患、アルツハイマー病の解明につながる。神経細胞死のメカニズムは依然不明である。

7、IRF-7 欠損マウスはウイルス感染に対する IFN の産生、抗原特異的抗体産生、樹状細胞の活性化が減弱していた。IRF-7 は IFN  $\alpha/\beta$ シグナルを制御することにより、病原体感染ストレスに対する免疫系の誘導において、重要な役割を果

#### E. 結論

1、GADD34 と結合する ZBP-89,

1、GADD34 と結合する ZBP-89, MSP58 は GADD34 同様 DNA

傷害性ストレス刺激で発現が上昇した。  
2、ZBP-89はヘテロ欠損で胎生致死となる非常に強い機能を持つ。  
3、外的ストレス刺激が細胞膜のラフトに作用し、活性酸素を放出する。  
4、NOは血管平滑筋のHB-EGF発現を上げて、アポトーシスの抑制に働く。  
5、ミクログリアは状態により、神経保護作用あるいは神経死誘導作用を持つ。  
7、SOD1、HSP40、HSP70は神経細胞死を抑制する。  
8、IRF-7-/-マウスはウイルス感染に対するIFN- $\alpha/\beta$ の転写誘導が十分に起こらない。また、IRF-7欠損により、抗原提示細胞の活性化に異常が生じ、抗体応答が適切に起こらなくなる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### (1) 論文発表

Li Q., Xiao H., Isobe K., The Histone Acetyltransferase activities of CREB Binding Protein (CBP) and p300 in Tissues of Fetal, Young and Old Mice. *J. Gerontology* in press

Yamamoto K., Takeshita K., Shimokawa T., Yi H., Isobe K., Loskutoff DJ., and Saito H., Plasminogen activator inhibitor-1 is a major stress-regulated gene: Implications for stress-induced thrombosis in aged individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*

Hamajima F., Hasegawa T. and

Nakashima I. and Isobe K. Genomic Cloning and Promoter Analysis of the GAHSP40 Gene. *J. Cellular Biochem.* 2002;84(2):401-7..

Ishida Y, Shirokawa T, Miyaishi O, Komatsu Y, Isobe K. Age-dependent changes in noradrenergic innervations of the frontal cortex in F344 rats. *Neurobiol Aging*;22(2):283-286, 2001.

Oh-hashii K, Maruyama W, Isobe K. Peroxynitrite induces gadd34, 45 and 153 via p38 MAPK in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Free Rad. Biol. Med.* 30: 213-221, 2001.

Takeuchi A., Miyaishi O., Kiuchi, K., Isobe K. Macrophage colony-stimulating factor is expressed in neuron and microglia after focal brain injury. *Journal of Neuroscience Research*, 65,: 38-44., 2001.

Nozawa K, Maehara K, Isobe K. Mechanism for the reduction of telomerase expression during muscle cell differentiation. *J Biol Chem.* ;276:22016-23. 2001.

Ishida Y, Shirokawa T, Komatsu Y, Isobe K. in cortical noradrenergic axon terminals of locus coeruleus neurons in aged F344 rats. *Neurosci Lett.* 307:197-9.2001;

Maehara K, Oh-Hashi K, Isobe K. Early growth-responsive-1-dependent manganese superoxide dismutase gene transcription mediated by platelet-derived growth factor. *FASEB J.* 15:2025-6. 2001.

Nakashima, I., Suzuki, H., Akhand, A.A. and Kato, M.: Redox control of T cell death. *Antioxidants & Redox Signaling*, in press.

Nakashima, I., Kato, M., Akhand, A.a., Suzuki, H., Takeda, K., Hossain, K. and Kawamoto, Y.: Redox-linked signal transduction pathway for protein tyrosine kinase activation. *Antioxidants & Redox Signaling*, in press.

Akhand, A.A., Du, J., Liu, W., Hossain, K., Miyata, T., Nagase, F., Kato, M., Suzuki, H. and Nakashima, I.: Redox-linked cell surface-oriented signaling for T-cell death. *Antioxidants & Redox Signaling*, in press.

Kamei, K., Nimura, Y., Nagino, M, Aono, K. and Nakashima, I.: Surgical stress reduces mortality from endotoxin shock, *Langenbeck's Archives of Surgery*, in press.

Akhand, A.A., Hossain, K., Kato, M., Miyata, T., Du, J., Suzuki, H., Kurokawa, K. and Nakashima, I.: Glyoxal and methylglyoxal induce aggregation and inactivation of ERK in human endothelial cells. *Free Radical Biol. & Med.* 31:20-30, 2001.

Dai Y, Kato M, Takeda K, Kawamoto Y, Akhand AA, Hossain K, Suzuki H, Nakashima I. T-cell-immunity-based inhibitory effects of orally administered herbal medicine juzen-taiho-to on the growth of primarily developed melanocytic tumors

in RET-transgenic mice. *J Invest Dermatol.* 117:694-701, 2001.

Liu, W., Kato, M., Itoigawa, M., Murakami, H., Yajima, M., Wu, J., Ishikawa, N. and Nakashima, I.: Distinct involvement of NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in serum deprivation-mediated stimulation of inducible nitric oxide synthase and its inhibition by 4-hydroxynonenal. *J. Cell. Biochem.* 83:271-280, 2001.

Du, J., Suzuki, H., Nagase, F., Akhand, A.A., Ma, Z., Yokoyama, T., Miyata, T. and Nakashima, I.: Superoxide-mediated early oxidation and activation of ASK1 are important for initiating methylglyoxal-induced apoptosis process. *Free Rad. Biol. Med.* 31:469-478, 2001.

Akhand, A.A., Hossain, K., Mitsui, H., Kato, M., Miyata, T., Inagi, R., Du, J., Takeda, K., Kawamoto, Y., Suzuki, H., Kurokawa, K. and Nakashima, I.: Glyoxal and methylglyoxal trigger distinct signals for MAP family kinases and caspase activation in human endothelial cells. *Free Rad. Biol. Med.* 31:20-30, 2001.

Takeda, K., Kato, M., Wu, J., Iwashita, T., Suzuki, H., Takahashi, M. and Nakashima, I.: Osmotic stress-mediated activation of RET kinases involves intracellular disulfide-bonded dimer formation. *Antioxidants & Redox Signaling.* 3:473-482, 2001.



- Takeuchi, K., Kato, N., Suzuki, H., Akhand, A.A., Wu, J., Hossain, K., Miyata, T., Matsumoto, Y., Nimura, Y. and Nakashima, I.: Acrolein induces activation of the epidermal growth factor receptor of human keratinocytes for cell death. *J. Cell. Biochem.* 81: 679-688, 2001.
- Taniguchi T, Takaoka A.; The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. (2002) *Curr. Opin Immunol.*, 14, 111-6
- Sato K, Hida S, Takayanagi H, Yokochi T, Kayagaki N, Takeda K, Yagita H, Okumura K, Tanaka N, Taniguchi T, Ogasawara K; Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. (2001) *Eur J Immunol.*, 31, 3138-46.
- Mitani Y, Takaoka A, Kim SH, Kato Y, Yokochi T, Tanaka N, Taniguchi T.; Cross talk of the interferon-alpha/beta signalling complex with gp130 for effective interleukin-6 signalling. (2001) *Genes Cells*, 6, 631-40.
- Hata N, Sato M, Takaoka A, Asagiri M, Tanaka N, Taniguchi T.; Constitutive IFN-alpha/beta signal for efficient IFN-alpha/beta gene induction by virus. (2001) *Biochem Biophys Res Commun.* 285, 518-25.
- Nakaya T, Sato M, Hata N, Asagiri M, Suemori H, Noguchi S, Tanaka N, Taniguchi T.; Gene induction pathways mediated by distinct IRFs during viral infection. (2001) *Biochem Biophys Res Commun.*, 283, 1150-6.
- Taniguchi T, Takaoka A.; A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited. (2001) *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2, 378-86.
- Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N.; IRF family of transcription factors as regulators of host defense. (2001) *Annu Rev Immunol.*, 19, 623-55.
- T. Fujii, J. Fujii and T. Taniguchi: Augmented expression of peroxiredoxinVI in rat lung and kidney after birth implies an antioxidative role. , *Eur. J. Biochem.*, 268, 218-224, 2001.
- N. Fujiwara, T. Fujii, J. Fujii and N. Taniguchi: Roles of n-terminal active cysteines and c-terminal cysteine-selenocysteine in the catalytic mechanism of mammalian thioredoxin reductase. , *J. Biochem.*, 129, 803-812, 2001.
- K. Hisamoto, M. Ohmichi, H. Kurachi, J. Hayakawa, Y. Kanda, Y. Nishio, K. Adachi, K. Tasaka, E. Miyoshi, N. Fujiwara, N. Taniguchi and Y. Murata: Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. , *J. Biol. Chem.*, 3459-3467, 2001.
- K. Hisamoto, M. Ohmichi, Y. Kanda, K.

Adachi, Y. Nishio, J. Hayakawa, S. Mabuchi, K. Takahashi, K. Tasaka, Y. Miyamoto, N. Taniguchi and Y. Murata: Induction of endothelial nitric oxide synthase phosphorylation by the raloxifene analog LY117018 is differentially mediated by Akt and extracellular signal-regulated protein kinase in vascular endothelial cells. , *J. Biol. Chem.*, in press, 2001.

Y. H. Koh, K. Suzuki, W. Che, Y. S. Park, Y. Miyamoto, S. Higashiyama and N. Taniguchi: Inactivation of glutathione peroxidase by NO leads to the accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the induction of HB-EGF via c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase in rat aortic smooth muscle cells. , *FASEB J.*, 1472-1474, 2001.

Y. H. Koh, W. Che, S. Higashiyama, M. Takahashi, Y. Miyamoto, K. Suzuki and N. Taniguchi: Osmotic Stress Induces HB-EGF Gene Expression via Ca<sup>(2+)</sup>/Pyk2/JNK Signal Cascades in Rat Aortic Smooth Muscle Cells. , *J. Biochem.*, 130, 351-358, 2001.

Kobayashi Y, Sobue G: Protective effect of chaperones on polyglutamine diseases. *Brain Res Bull*, 56(3-4): 165-8, 2001

Hishikawa N, Hashizume Y, Yoshida M, Sobue G: Widespread occurrence of argyrophilic glial inclusions in Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 27(5): 362-72, 2001

Mori K, Koike H, Misu K, Hattori N, Ichimura M, Sobue G: Spinal cord magnetic resonance imaging demonstrates sensory neuronal involvement and clinical severity in neuropathy associated with Sjogren's syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 71(4): 488-92, 2001

Yamamoto M, Li M, Mitsuma N, Ito S, Kato M, Takahashi M, Sobue G: Preserved phosphorylation of RET receptor protein in spinal motor neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis: an immunohistochemical study by a phosphorylation-specific antibody at tyrosine 1062. *Brain Res*, 912(1): 89-94, 2001

Koike H, Misu K, Hattori N, Ito S, Ichimura M, Ito H, Hirayama M, Nagamatsu M, Sasaki I, Sobue G: Postgastrectomy polyneuropathy with thiamine deficiency. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 71(3): 357-362, 2001

Koike H, Mori K, Misu K, Hattori N, Ito H, Hirayama M, Sobue G: Painful alcoholic polyneuropathy with predominant small-fiber loss and normal thiamine status. *Neurology*, 56(12): 1727-1732, 2001

- Watanabe H, Ieda T, Katayama T, Takeda A, Aiba I, Doyu M, Hirayama M, Sobue G: Cardiac (123)I-meta-iodobenzylguanidine (MIBG) uptake in dementia with Lewy bodies: comparison with Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 70(6): 781-783, 2001
- Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, Yasukawa T, Sudo H, Ito Y, Kita Y, Kawasumi M, Kouyama K, Doyu M, Sobue G, Koide T, Tsuji S, Lang J, Kurokawa K, Nishimoto I: A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and A<sub>β</sub>. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(11): 6336-41, 2001
- Yamamoto M, Ito Y, Mitsuma N, Li M, Hattori N, Sobue G: Pathology-related differential expression regulation of NGF, GDNF, CNTF, and IL-6 mRNAs in human vasculitic neuropathy. *Muscle & Nerve*, 24(6): 830-833, 2001
- Adachi H, Kume A, Li M, Nakagomi Y, Niwa H, Do J, Sang C, Kobayashi Y, Doyu M, Sobue G: Transgenic mice with an expanded CAG repeat controlled by the human AR promoter show polyglutamine nuclear inclusions and neuronal dysfunction without neuronal cell death. *Hum Mol Genet*, 10(10): 1039-1048, 2001
- Niwa J, Ishigaki S, Doyu M, Suzuki T, Tanaka K, Sobue G: A novel centrosomal ring-finger protein, dorfin, mediates ubiquitin ligase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 281(3): 706-13, 2001
- Doyu M, Sawada K, Mitsuma N, Niwa J, Yoshimoto M, Fujii Y, Sobue G, Kato K: Gene expression profile in Alzheimer's brain screened by molecular indexing. *Brain Res, Mol Brain Res*, 87(1): 1-11, 2001
- Takeda A, Wakai M, Niwa H, Dei R, Yamamoto M, Li M, Goto Y, Yasuda T, Nakagomi Y, Watanabe M, Inagaki T, Yasuda Y, Miyata T, amyloid polyneuropathy in Japan: clinical and genetic heterogeneity. *Neurology*, in press, 2002
- Mori K, Hattori N, Sugiura M, Koike H, Misu K, Ichimura M, Hirayama M, Sobue G: Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy presenting with features of GBS. *Neurology*, in press, 2002
- Yamamoto M, Ito Y, Mitsuma N, Li M, Hattori N, Sobue G: Parallel expression of neurotrophic factors and their receptors in chronic inflammatory demyelinating

polyneuropathy. *Muscle & Nerve*, in press, 2002

Yoshihara T, Ishigaki S, Yamamoto M, Liang Y, Niwa J, Takeuchi H, Doyu M, Sobue G: Differential expression of inflammation- and apoptosis-related genes in spinal cord of a mutant SOD 1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, in press, 2002

Watanabe H, Saito Y, Terao S, Ando T, Kachi T, Mukai E, Aiba I, Abe Y, Tamakoshi A, Doyu M, Hirayama M, Sobue G: Progression and prognosis in multiple system atrophy: An analysis of 230 Japanese patients. *Brain*, in press, 2002

Hideyuki Takeuchi, Yasushi Kobayashi, Tsuyoshi Yoshihara, Jun-ichi Niwa, Manabu Doyu, Kenzo Ohtsuka, Gen Sobue: Hsp70 and Hsp40 improve neurite outgrowth and suppress intracytoplasmic aggregate formation in cultured neuronal cells expressing mutant SOD1. *Brain Res*, in press, 2002

Iwai K, Yamamoto M, Yoshihara T, Sobue G: Anticipation in familial amyotrophic lateral sclerosis with SOD1-G93S mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, in press, 2002

Dei R, Takeda A, Niwa H, Li M, Nakagaomi Y, Watanabe M, Inagaki T, Washimi Y, Yasuda Y, Horie K, Miyata T, Sobue G: Lipid peroxidation and advanced glycation endproducts in the brain in normal aging and in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, in press

Suzuki, H., Imai, F., Kanno, T., Sawada, M.: Preservation of neurotrophin expression in microglia that migrate into the gerbil's brain across the blood brain barrier. *Neurosci. Lett.* 312:95-98, 2001.

Iwata, A., Miura, S., Kanazawa, I., Sawada, M., Nukina, N.:  $\alpha$ -Synuclein forms a complex with transcription factor Elk-1. *J. Neurochem.* 77; 239-252, 2001.

Katoh, Y., Niimi, M., Yamamoto, Y., Kawamura, T., Morimoto-Ishizuka, T., Sawada, M., Takemori, H., Yamatodani, A.: Histamine production by cultured microglial cells of the mouse. *Neurosci. Lett.* 305; 181-184, 2001.

Ishiguro, H., Yamada, K., Sawada, H., Nishii, K., Ichino, N., Sawada, M., et al (other 7 persons): Age-dependent and tissue-specific CAG repeat instability occurs in mouse knock-in for a mutant Huntington's disease gene. *J. Neurosci. Res.* 65; 289-297, 2001.

Imamura, K., Sawada, M., Ozaki, N.,

Naito, H., Iwata, N., Ishihara, R., Takeuchi, T., Shibayama, H.: Activation mechanism of brain microglia in patients with diffuse neurofibrillary tangles with calcification: a comparison with Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 15; 45-50, 2001

## (2) 学会発表

磯部健一、野沢桂；マウステロメラゼ遺伝子のプロモーター解析（細胞の分化にともなう活性低下を担う転写因子）

城川哲也、石田佳幸、磯部健一、青斑核ニューロン軸索終末の加齢変化に対する脳由来神経栄養因子の効果第24回日本基礎老化学会 6月 大阪

丸山和佳子、直井 信、赤尾幸博、磯部健一 Propargylamine 化合物、rasagiline による神経保護作用の機序の検討第24回日本基礎老化学会 6月 大阪

前原佳代子、磯部健一；ヒストンアセチル化とマンガンスーパーオキシドジスムターゼ (Mn-SOD) 遺伝子の発現.第24回日本基礎老化学会 6月、大阪

Isobe K., Takeuchi A., Mishina Y., Miyaishi O. HAPLO-INSUFFICIENCY OF SPD, A ZN-FINGER TRANSCRIPTION FACTOR, CAUSES LOSS OF PRIMORDIAL GERM CELLS AND NEURAL TUBE DEFECT IN MALE MICE. *Mechanisms of Eukaryotic Transcription*. Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. August 29-Sept. 2.

Mehara K. and Isobe K. Transcriptional regulation of Manganese Superoxide dismutase gene mediated by histone deacetylase inhibitor. *Cold Spring Harbor Laboratory*, 2001. August 29-Sept. 2

前原佳代子、磯部健一 ヒストンアセチル化とマンガンスーパーオキシドジスムターゼ遺伝子

の発現；第24回日本分子生物学会年会 2000年 12月9-12日、横浜

八木文子、長谷川忠男、錦見昭彦、肖 恒怡、小島英嗣、長谷川好規、磯部健一 応答蛋白 GADD34 と結合する新しい蛋白の同定と機能解析；第24回日本分子生物学会年会 2000年 12月9-12日、横浜

中島 日出夫、磯部健一 2B4 を介したシグナル伝達の解析、第28回日本免疫学会年会 12月11~13日 大阪

小島英嗣、磯部健一、武内章英、山木健市 GADD34 の免疫系における発現、第28回日本免疫学会年会 12月11~13日 大阪

Hossain, K., Nakashima, I. et al: Arsenite triggers a redox-linked Akt pathway in a membrane raft-dependent way. 第31回日本免疫学会総会、大阪、2001

Akhand, A.A., Nakashima, I. et al.: 1,4-butanediyl-bis methanethiosulfonate (BMTS) induces apoptosis of murine T lymphocytes accompanying aggregation of membrane rafts and ROS production. 第31回日本免疫学会総会、大阪、2001

Akhand A. A., Nakashima I. et al.: Glyoxal and methylglyoxal trigger distinct signals for MAP family kinases and caspase activation in human endothelial cells. *The 11th International Congress of Immunology*, Stockholm, July 22-27, 2001.

川本善之、中島泉等：細胞膜脂質ラフトにおける酸化ストレスによるチロシンキナーゼの活性化と機序。第31回日本免疫学会総会、大阪、2001

Hossain, K., Nakashima I. et al.: Arsenite triggers membrane rafts-linked apoptotic and

anti-apoptotic signals. the 11th International Congress of Immunology , Stockholm, July 22-27, 2001.

Nakashima I: Oxidative stress and protein tyrosine kinase activation. ICRO International Symposium: Molecular aspects of modern biology, Shanghai, China, Lecture Hall on Campus in 320 Yue Yang Road, 20 April (Friday), 2001

Nakashima, I et al.: Melanoma deveopment

in RET-transgenic mice. The Fifth World Conference on Melanoma, Venice, Feb. 28-Mar. 3, 2001.

## 分担研究報告書

### ストレスと老化

分担研究者 磯部健一

(国立長寿医療研究センター老化機構、部長)

研究要旨：ストレス刺激が生体にあたえる変化をシグナル伝達系、遺伝子発現系を中心に詳細に検討し、それが老化をどのように引き起こすかを検索する。一方生体は老化促進ストレス刺激に対し、防御的に作用する機構を備えている。本年はDNA傷害性アルキル化剤に対する生体応答に焦点を絞って研究を進めた。DNA傷害性ストレス刺激 MMS は ERK あるいは p38 といった MAP キナーゼ経路を通り、CREB、cJUN 転写因子を活性化 GADD34 プロモーター活性を上昇させた。あらたな MMS 反応性蛋白として、GADD34 と結合する蛋白のうち、GAHSP40, ZBP-89, MSP58 は DNA 傷害性ストレス刺激 MMS により発現が上昇することが判明した。その1つ、ZBP-89 の生体内機能解析をテトラプロイド、キメラ解析によりすすめた。ZBP-89 は、精子形成過程の初期すなわち、PGC 形成期に発現し、p53 と共同して、PGC の発生、分化に重要な役割を持つことが判明した。

を絞って研究を進めた。

#### A. 研究目的

人は紫外線、放射線、感染、熱等種々の外的ストレス刺激にさらされている。またこれらの刺激はラジカルを産生するし、代謝によっても内部でラジカルが産生される。本研究はストレス刺激が生体にあたえる変化をシグナル伝達系、遺伝子発現系を中心に詳細に検討し、それが老化をどのように引き起こすかを検索する。一方生体は老化促進ストレス刺激に対し、防御的に作用する機構を備えている。ラジカル消去酵素 (SOD, カタラーゼ等)、HSP70 等シャペロン、さらには DNA 傷害を監視する p53, GADD 等は異なった機構でストレスから生体を防御していると考えられる。本年は DNA 傷害性アルキル化剤に対する生体応答に焦点

#### B. 研究方法

1、DNA 傷害性ストレス刺激に対するシグナル伝達系の解析

細胞に、アルキル化剤 MMS 刺激を加え、細胞抽出物を SDS-PAGE に流し、シグナル伝達系の抗体、リン酸化抗体を使用したウエスタンブロット法により測定した。また、シグナル伝達分子の特異性は各種抑制因子で解析した。

2、遺伝子発現制御；

マウスゲノムライブラリーよりゲノム遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定後、ルシフェラーゼアッセイ用の PGL3 レポーターベクターに組み込んだ。組み換え技術を用いて、予想されるプロモ-

ター領域、エンハンサー領域の各種欠失変異体、ミュウタントを作製した。NIH3T3 細胞を代表とする培養細胞株に遺伝子移入し、転写活性をルシフェラーゼアッセイにて測定した。また、転写因子をコードする cDNA を発現ベクターに組み込み細胞に遺伝子移入した。細胞から核蛋白質を抽出し、ゲルシフト法にて転写因子の検討を行った。転写因子の特異性を知るために、抗体にてスーパーシフトアッセイを行った。

### 3、マウス個体を使用した実験と組織染色

ZBP-89 ノックアウト ES 細胞からキメラマウス、テトラプロイドマウスを作製した。これらのマウスの病態解明のため、組織染色、免疫染色、in situ hybridization を行った。

(倫理面への配慮) 動物実験はマウス個体を使用した。長寿医療研究センター動物施設実験指針に従って研究を行った。

## C. 研究結果.

### 1、GADD34 の発現制御とシグナル伝達系

前年度 MMS 刺激による GADD34 のプロモーター解析を行い、MMS 反応性領域が TATA box 上流 55 bp 内にあること、そのシスエレメントとして CREB, GC-rich 領域が必要であることを示した。今年度はさらに発展させて、その領域に結合する転写因子の時間的変化と

上量の解析を行った。その結果、CREB 領域には CREB とリン酸化 c-Jun が結合し、4 時間をピークに結合活性が上昇すること、GC-rich な領域には SP1 が結合するが結合活性の変化はみられないことが判明した。また、ERK 抑制因子 PD 98059 と p38 抑制因子 SB 202190 が MMS 反応性プロモーター活性を抑制するが PKA 抑制因子 KT5720 はプロモーター活性を抑制しないことが判明し、MMS 誘導性 GADD34 転写の上流には ERK、p38 が存在することが判明した。現在 GADD34 の生体内における働きを調べる目的でノックアウトマウスの確立をめざしている。また、GADD34 の老化マウスにおける MMS 反応性の変化と上流のシグナル伝達系との関係を次年度に計画している。

### 2、ZBP-89 の生体における働きの解析

ZBP-89 (BFCOL-1) のノックアウトマウスはヘテロ欠損の段階で精子形成不全を呈した。そのため、ホモ欠損マウスを誕生させることは不可能となり、キメラ解析により、胎生期のかなり早期に精子形成不全となることを前年度示した。今年度は精子形成時期を詳細に調べること、他の異常の有無を検索した。正常の精子形成前駆細胞は ZBP-89 を in situ hybridization で検索すると、胎生 12.5 日に発現し、13.5 日には発現が低下した。



ヘテロ ZBP-89 欠損マウス (テトラプロイド、キメラ) では発現が半減すると同時に 13.5 日に精子がほとんど見られなくなった。

### 3、DNA 傷害性ストレス刺激で発現が上昇する新しい蛋白

私達は DNA 傷害性ストレス刺激で発現が上昇する蛋白として GADD 系蛋白を研究してきた。今年度は GADD34 と結合する蛋白のうち、MMS 刺激で GAHSP40、ZBP-89 といった我々が研究対象としてきた蛋白の遺伝子発現が上昇することを見出した。さらに、GADD34 と結合することが新たに判明した MSP58 も MMS 刺激で発現が上昇した。

## D. 考察

### 1、DNA 傷害性ストレス刺激と GADD 蛋白

GADD シリーズの蛋白質は DNA 傷害性ストレス刺激で発現が上昇し、細胞の生死に関係することが示唆されているが、今だその機能に関しては不明な点が多い。得に GADD34 に関しては細胞のアポトーシスを促進する、蛋白の shut-off に関係するといった論文が見られるがいずれも確証に至っていない。我々は GADD34 の MMS 刺激に反応する遺伝子発現制御に MAP キナーゼ系の ERK あるいは p38 が関与することを示した。MAP キナーゼ系は細胞の増殖とアポトーシスに関係することが知られており、GADD 系と MAPK 系を結び付ける有力な結果

を得た。来年度は GADD34 のノックアウトマウスの解析を行う予定であり、GADD34 の生体における役割の解明と老化に果たす役割が明らかになるものと考えている。

### 2、ZBP-89 の機能

ZBP-89 は抑制性転写因子として各種遺伝子の発現を抑制することが知られている。ZBP-89 ノックアウトマウスはヘテロの段階で発生時に精子形成過程に影響をあたえることで子孫が得られないため、その他の臓器への作用を知ることは現時点でわからない。我々の予想では ZBP-89 が前臓器に発現することから様々な臓器に重要な役割を持つと考えられる。

### 3、新しい MMS 反応性蛋白

我々は MMS に反応して発現が上昇する蛋白として、GAHSP40、ZBP-89、MSP58 を見出した。これらの機能は今だ明らかでないが、それぞれ転写因子としての機能を持つことは明らかになりつつある。また、どれも細胞の増殖、アポトーシスに関与する可能性が高い。来年度さらに検索を進める予定である。

## E. 結論

1、DNA 傷害性ストレス刺激 MMS は ERK あるいは p38 といった MAP キナーゼ経路を通り、CREB、cJUN 転写因子を活性化し、GADD34 プロモーター活性を上昇させる。

### 2、ZBP-89 の生体内機能解析

テトラプロイド、キメラ解析により、ZBP-89 は、精子形成過程の初期す

なわち、PGC 形成期に発現し、p53 と共同して、PGC の発生、分化に重要な役割を持つことが判明した。  
3、あらたな MMS 反応性蛋白 GADD34 と結合する蛋白のうち、GAHSP40, ZBP-89, MSP58 は DNA 傷害性ストレス刺激 MMS により発現が上昇することが判明した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### (1) 論文発表

1、Li Q., Xiao H., Isobe K., The Histone Acetyltransferase activities of CREB Binding Protein (CBP) and p300 in Tissues of Fetal, Young and Old Mice. J. Gerontology in press

2、Yamamoto K., Takeshita K., Shimokawa T., Yi H., Isobe K., Loskutoff DJ., and Saito H., Plasminogen activator inhibitor-1 is a major stress-regulated gene: Implications for stress-induced thrombosis in aged individuals. Proc Natl Acad Sci U S A

3、Hamajima F., Hasegawa T. and Nakashima I. and Isobe K. Genomic Cloning and Promoter Analysis of the GAHSP40 Gene. J. Cellular Biochem. 2002;84(2):401-7..

4、Ishida Y, Shirokawa T, Miyaishi O, Komatsu Y, Isobe K. Age-dependent changes in noradrenergic innervations of the frontal cortex in F344 rats. Neurobiol Aging;22(2):283-286, 2001.

5、Oh-hashi K, Maruyama W, Isobe K. Peroxynitrite induces gadd34, 45 and 153 via p38 MAPK in human

neuroblastoma SH-SY5Y cells. Free Rad. Biol. Med. 30: 213-221, 2001.

6、Takeuchi A., Miyaishi O., Kiuchi, K., Isobe K. Macrophage colony-stimulating factor is expressed in neuron and microglia after focal brain injury. Journal of Neuroscience Research, 65,: 38-44., 2001.

7、Nozawa K, Maehara K, Isobe K. Mechanism for the reduction of telomerase expression during muscle cell differentiation. J Biol Chem. ;276:22016-23. 2001.

8、Ishida Y, Shirokawa T, Komatsu Y, Isobe K. in cortical noradrenergic axon terminals of locus coeruleus neurons in aged F344 rats. Neurosci Lett. 307:197-9.2001;

9、Maehara K, Oh-Hashi K, Isobe K. Early growth-responsive-1-dependent manganese superoxide dismutase gene transcription mediated by platelet-derived growth factor. FASEB J. 15:2025-6. 2001.

##### (2) 学会発表

磯部健一、野沢桂；マウステロメラゼ遺伝子のプロモーター解析（細胞の分化にともなう活性低下を担う転写因子）

城川哲也、石田佳幸、磯部健一、青斑核ニューロン軸索終末の加齢変化に対する脳由来神経栄養因子の効果第24回日本基礎老化学会 6月 大阪

丸山和佳子、直井 信、赤尾幸博、磯部健一 Propargylamine 化合物、rasagiline による神経保護作用の機序の検討第24回日本基礎老化学会 6月 大阪

前原佳代子、磯部健一；ヒストンアセチル化とマンガンス-パ-オキシドジスム

ターゼ (Mn-SOD) 遺伝子の発現 第 2  
4 回日本基礎老化学会 6 月、大阪

Isobe K., Takeuchi A., Mishina Y., Miyaishi  
O. HAPLO-INSUFFICIENCY OF SPD, A  
ZN-FINGER TRANSCRIPTION FACTOR,  
CAUSES LOSS OF PRIMORDIAL GERM  
CELLS AND NEURAL TUBE DEFECT IN  
MALE MICE. Mechanisms of Eukaryotic  
Transcription . Cold Spring Harbor  
Laboratory , 2001. August 29-Sept. 2.

Mehara K. and Isobe K. Transcriptional  
regulation of Manganase Superoxide  
dismutase gene mediated by histone  
deacetylase inhibitor. Cold Spring Harbor  
Laboratory , 2001. August 29-Sept. 2

前原佳代子、磯部健一 ヒストンアセチル  
ル化とマンガンスーパーオキシドジスム  
ターゼ遺伝子の発現 ; 第 24 回日本分子生  
物学会年会 2000 年 12 月 9-12 日、横浜

八木文子、長谷川忠男、錦見昭彦、肖 恒  
怡、小島英嗣、長谷川好規、磯部健一  
応答蛋白 GADD34 と結合する新しい蛋  
白の同定と機能解析、 ; 第 24 回日本分子  
生物学会年会 2000 年 12 月 9-12 日、横浜

中島 日出夫、磯部健一 2B4 を介したシ  
グナル伝達の解析、第 28 回日本免疫学  
会年会 12 月 11~13 日 大阪

小島英嗣、磯部健一、武内章英、山木健  
市 GADD34 の免疫系における発現、  
第 28 回日本免疫学会年会 12 月 11~1  
3 日 大阪

## 分担研究報告書

### 老化促進ストレスとシグナル伝達

分担研究者 中島 泉

(名古屋大学大学院医学研究科免疫学教授)

研究要旨：ラジカルと関連因子が蛋白修飾を介してどのように細胞内にシグナルを伝達するか、またそれがどのように加齢に伴う病態の形成に関わるかを、今年度は特に、これらの因子が細胞表面に作用してシグナルを起動する際の細胞膜マイクロドメイン、ラフトの働きに焦点を絞って解析した。その結果、重金属などによる酸化ストレスとカルボニル化合物によるカルボニルストレスによって、一部の細胞表面受容体分子がラフトの働きに依存してラフトとともに凝集すること、こうしたラフトの働きを介して細胞内に活性酸素の産生が誘導され、この活性酸素がセカンドメッセンジャーとして働き、一方でチロシンキナーゼ分子の細胞内ドメインの特定のシステイン残基を構造修飾して活性化するとともに、他方でアポトーシス誘導のシグナルを伝達することを明らかにした。

#### A. 研究目的

活性酸素に代表されるラジカルおよびその関連因子は、核内の遺伝子(DNA)や細胞膜脂質に作用してこれらを直接的に傷害し、傷害の修復が完全に行われない場合、傷害が蓄積して老化につながると推定されている。これとは別に筆者らはラジカルとその関連因子が、遺伝子の産物である蛋白を標的として作用し、その構造を修飾すること、これによって蛋白が持つ酵素活性などの働きが変化し、この蛋白が関わる生体のシグナル伝達が促進または抑制されることを示してきた。また、こうした蛋白の化学修飾によるシグナル伝達の修飾は、脂質や糖の代謝でつくられる glyoxal や 4-hydroxynonenal など

のカルボニル化合物によってもおこることも示した。本研究では、ラジカルとその関連因子およびカルボニル化合物がシグナル伝達にかかわるどの蛋白をどのように修飾するか、それによってどのようにシグナル伝達が修飾されて、細胞の生死と働きが変化し、老化にかかわる病態形成に至るかを解明することをめざす。本年度は特に、酸化ストレスやカルボニルストレスが細胞表面に作用してストレスシグナルが起動する仕組みにおける細胞膜ラフトの働きを中心に解析した。

#### B. 研究方法

ラジカル関連因子としての重金属(Hg, As)とカルボニル化合物(glyoxal、