

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 14 年度
総括、分担研究報告書

主任研究者 磯部健一

平成 15 (2003) 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	9
磯部健一	
2、老化における抗酸化酵素の破綻およびその防御機構	14
谷口直之	
3、老化促進ストレスとシグナル伝達	19
中島 泉	
4、老化促進ストレスと神経細胞死	23
祖父江 元	
5、ミクログリアとストレス	27
澤田誠	
6、生体防御の異常と老化ストレスに関する研究	31
丸山光生	
III 研究成果の刊行に関する一覧表	35

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；総括

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した。最終年度 DNA 傷害性アルキル化剤に対する生体応答、酸化ストレスに対する生体応答の基礎研究を行い、新しいストレス応答蛋白 zfp148 の機能を明らかにした。また、酸化ストレスは抗酸化酵素 GPx、TR の活性を低下させるものの、生体はそれを防御する機構を持つことを明らかにした。また、酸化ストレスはシステインを介してシグナル伝達系を正に制御することを示した。老化に伴い異常蛋白が蓄積し、ある時は ER ストレスを誘起する。ER ストレスに反応し、GADD34 発現が上昇し、ER ストレスによる蛋白合成のシャットオフを GADD34 が防御することが判明した。また、CAG リピート病は核内に異常蛋白が蓄積することでストレスが誘起されるが、HSP70 が病気の防御に働くことを証明した。ミクログリアは ROS 産生が高いと神経細胞傷害活性が強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
丸山光生；国立長寿医療研究センター老化機構研究部、室長
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

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、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。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。本年度は過去3年間の研究の一応の区切りをつけ、新たな研究の方向性を探った。

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。これらを我々は老化促進ストレス刺激と呼び、これ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

B. 研究方法

1. 各種ストレスのシグナル解析

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 SIN-1 等、Thapsigargin 等 ER ストレス) 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

エスタンプ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。また、精製蛋白に MG 等を反応させたのち、ペプチド断片にし、MALDI-TOF-MS にて質量分析した。

2、マウス個体を使用した実験と組織染色

GADD34 ノックアウトマウスはかけ合わせにより、+/+, +/-, -/-の系統を樹立し、その組織あるいは胎児より MEF (線維芽細胞) を培養し、実験に使用した。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。

3、遺伝子クローニング、発現解析

cDNAライブラリーから記憶B細胞のシグナル伝達をコードする遺伝子をサブトラクション法でクローニングし、脾臓に発現の強いクローンの遺伝子解析を行った。

(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、大阪大学、名古屋大学、藤田保健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)

Zfp148 が DNA 傷害性ストレス刺激、血清除去で誘導されることを見出した。Zfp148(ZBP-89)遺伝子欠損マウスは ES からキメラ作製の段階で精子形成不全をきたしその後の遺伝子欠損マウス作製が困難になった。そのため、ES 細胞からキメラマウスを作り、胎生期のフェノタイプ、あるいはテトラプロイドのフェノタイプを解析した。すると、zfp148 のヘテロ欠損マウスでは、神経管閉鎖不全と始

原生殖細胞の細胞死を示した。Zfp148 は PGC が分裂を停止する時期に発現してくること、同時に p53 がリン酸化をうけること、zfp148 のヘテロ欠損マウスでは p53 のリン酸化が低下することを見出した (Nature Genetics 2003)。

2、UPR (unfolded protein response)の基礎 (磯部) と神経変性疾患 (祖父江)

細胞内で異常蛋白がつくられると細胞はストレスとして UPR 反応を ER (endoplasmic reticulum) で起こす。この反応はいつは ER ストレスとして蛋白合成の阻害をおこし、もう一方では HSP 蛋白が異常蛋白をときほぐす役割を持つと同時に、ユビキチン化を介して異常蛋白を分解する。GADD34 はストレス刺激で上昇する蛋白ということが知られてきたが、個体での機能は今だあきらかではなかった。GADD34 ノックアウトマウス、胎児線維芽細胞を ER ストレス (タブシガルギン) で刺激すると wild type マウスでは GADD34 の発現に従い、ER ストレスによる eIF2a のリン酸化から回復が見られたが、GADD34 ノックアウトマウスでは eIF2a のリン酸化が遷延し、蛋白合成のシャットオフからの回復が遅れた (分子生物学会ワークショップ発表、論文提出中) (磯部)。球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) は、アンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子内の CAG リピートの異常延長により、異常蛋白が核内に蓄積することで、運動ニューロンなどが特異的に変性死に陥る。すなわち細胞にストレス応答を誘起する。CAG が 97 回繰り返し替えした AR-97 遺伝子導入マウスは変異 AR の高発現が認められ、進行性の運動障害が認められた。このマウスを去勢すると病状が回復した。また、このマウスと HSP70 高発現マウスをかけ合わせると病状が回復した (祖父江)。

3、酸化ストレスとシグナル伝達、生体防御（中島、谷口）

受容体型チロシンキナーゼである RET の遺伝子を移植した NIH3T3 細胞にシステイン基を介する蛋白質架橋剤である 1,4-butanediyl-bismethanetiosulfonate BMTS を作用させると、細胞内蛋白質のチロシンリン酸化が誘導されること、そして、BMTS は RET 分子を重合させて、そのキナーゼ活性を増強させることを明らかにした。細胞外ドメインを欠失するミュータント分子の遺伝子である RET-PTC-1 を移植した細胞では、BMTS によるキナーゼ活性の増強は認められず、BMTS が反応する標的システインは RET の細胞外ドメインにあると考えられた。一方、このミュータント分子に試験管の中で直接 BMTS を作用させると、キナーゼ活性が増強された（中島）。

生体内の物質による酸化ストレスの誘導メカニズムと、それに対する防御機構について検討した。一酸化窒素(NO)や、メチルグリオキサール(MG)等のジカルボニル化合物は細胞に酸化ストレスを誘導する。MG の GPx に対する作用を検討した結果、MG は GPx のグルタチオンの結合部位に不可逆的に結合し、GPx 活性を低下させた。血管内皮細胞にパーオキシナイトライトを添加するとチオレドキシシンレダクターゼ(TR)活性が低下する。しかし TR 活性の低下に伴う酸化ストレスにより代償性に TR それ自身の発現が誘導された。以上のことから GPx や TR などの抗酸化酵素は生体内の様々な物質により不活化されるが、血管平滑筋細胞や血管内皮細胞には、細胞内のレドックス状態を変化させ、細胞の生存、維持に重要な遺伝子や抗酸化酵素の発現を調節していることが示唆された（谷口）。

4、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。ミクログリア Ra2 は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。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 N18 神経細胞死を促進する事がわかった。それらの ROS 産生量を測定したところ、nef 発現量に依存した ROS 産生の増大が観察できた。

5、免疫記憶に関する分子のクローニング（丸山）

免疫記憶の維持に携わる細胞、分子機構について胚中心の機能に焦点をあて、記憶 B 細胞が誘導され、維持されていく間に特異的に働く分子の解明を試みた。EST (expressed sequence tag) に対して検索を行った結果、クローン 10C については相同性の高い cDNA 配列が存在し、2,073 アミノ酸よりなるタンパクをコードしていることが明らかになった。クローン 10C タンパクについて、モチーフ検索を行ったところはアミノ酸 167 番目~273 番目に pleckstrin homology (PH)ドメインを有すること、ヒト、線虫、ショウジョウバエに存在すること X 染色体上に存在し、49 個のエクソンより構成されていることが明らかになった。

D. 考察

3年間の最後の年に数々の成果を得てこの班を終了できた。特に、p53 から p21/WAF1 といった一般的なストレス応答蛋白と関係するが全く新しいストレス応答蛋白 zfp148 の機能をキメラマウス解析で明らかにしたこと (Nature Genetics)、長らく機能不明であったストレス応答蛋白 GADD34 の機能が ER ストレスを明らかにできたことはストレス応答の新しい側面を切り開いた点で重要であると思う。老化、老化関連疾患への関与が次ぎの問題である。異常蛋白蓄積によって起こるストレスは CAG リピ

ート病に関与し、HSP70 が進行性病変を抑えること、

男性ホルモンが関与することを明らかにした点は一貫してYamamoto K, Shimokawa T, Yi H, Isobe K, Kojima T, Loskutoff DJ, Saito H. Aging and obesity augment the stress-induced expression of tissue factor gene in the mouse. *Blood*. 2002

1;100(12):40

E. 結論

1、DNA 傷害性ストレスは zfp148 の発現を上げ、p53 を介して細胞の増殖停止に関与する。

2、ER ストレスは GADD34 を上昇させ、ER 蛋白質合成のシャットオフからの回復を担う。

3、CAG リピート病は異常蛋白質の核内への蓄積により起こる。男性ホルモンの関与、HSP-70 が病気の進行を抑えることを証明した。

4、酸化ストレスは GPx, TR の活性化を低下させる。ただし、TR の発現を上昇させる。

5、ミクログリアは ROS 産生が高いと神経細胞傷害活性が強くなる。

6、蛋白質のシステインが酸化ストレスにさらされるとシグナル伝達系が正のシグナル増強を受ける。

Maehara K, Uekawa N, Isobe K. Effects of histone acetylation on transcriptional regulation of manganese superoxide dismutase gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 5;295(1):187-92, 2002.

Yamamoto K, Takeshita K, Shimokawa T, Yi H, Isobe K, Loskutoff DJ, 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*. 22;99(2):890-5. 2002

T. Fujii, T. Endo, J. Fujii and N. Taniguchi: Differential expression of glutathione reductase and cytosolic glutathione peroxidase, GPX1, in developing rat lungs and kidneys. *Free Rad. Res.*, 36, 1041-49, 2002.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

Takeuchi A., Mishina Y., Miyaishi O., Kojima E., Hasegawa T. and Isobe K. Heterozygosity for Zfp148 causes complete loss of fetal germ cells during mouse embryogenesis. *Nature Genetics* 33;172-176, 2003.

Yamamoto K, Shimokawa T, Yi H, Isobe K, Kojima T, Loskutoff DJ, Saito H. Aging accelerates endotoxin-induced thrombosis : increased responses of plasminogen activator inhibitor-1 and lipopolysaccharide signaling with aging. *Am J Pathol*. 2002 ;161(5):1805-14.

Y. Miyamoto, Y. H. Koh, W. Che, Y. S. Park, N. Fujiwara, T. Ookawara, K. Suzuki and N. Taniguchi: Dysfunction of antioxidative enzymes and redox regulation under nitrosative stress and glycoxidative stress. *International Congress Series*, 1245, 23-30, 2002.

M. Xian, N. Fujiwara, Z. Wen, T. Cai, S. Kazuma, A. J. Janczuk, X. Tang, V. V. Telyatnikov, Y. Zhang, X. Chen, Y. Miyamoto, N. Taniguchi and P. G. Wang: Novel Substrates for Nitric Oxide Synthases. *Bioorg. Med. Chem.*, 10, 3049-55, 2002.

H. Eguchi, Y. Ikeda, S. Koyota, K. Honke, K. Suzuki, J. M. Gutteridge and N. Taniguchi: Oxidative Damage Due to Copper Ion and Hydrogen Peroxide Induces GlcNAc-Specific

Cleavage of an Asn-Linked Oligosaccharide. *J. Biochem.*, 131, 477-84, 2002.

Y. S. Park, N. Fujiwara, Y. H. Koh, Y. Miyamoto, K. Suzuki, K. Honke and N. Taniguchi: Induction of Thioredoxin Reductase Gene Expression by Peroxynitrite in Human Umbilical Vein Endothelial Cell. *Biol. Chem.*, 383, 683-91, 2002.

I. Laffont, M. Takahashi, Y. Shibukawa, K. Honke, V. V. Shuvaev, G. Siest, S. Visvikis and N. Taniguchi: Apolipoprotein E activates Akt pathway in neuro-2a in an isoform-specific manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 292, 83-87, 2002.

J. Niwa, S. Ishigaki, N. Hishikawa, M. Yamamoto, M. Doyu, S. Murata, K. Tanaka, N. Taniguchi and G. Sobue: Dorfin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1-mediated neurotoxicity. *J. Biol. Chem.*, 277, 36793-98, 2002.

T. Ookawara, T. Kizaki, E. Takayama, N. Imazeki, O. Matsubara, Y. Ikeda, K. Suzuki, J. L. Li, T. Tadakuma, N. Taniguchi and H. Ohno: Nuclear translocation of extracellular superoxide dismutase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 296, 54-61, 2002.

Y. Shibukawa, M. Takahashi, I. Laffont, K. Honke and N. Taniguchi: Downregulation of hydrogen peroxide-induced PKC δ activation in N-acetylglucosaminyltransferase III transfected HeLaS3 cells. *J. Biol. Chem.*, 278(5):3197-203, 2003.

R. Takamiya, M. Takahashi, M. Theingi, Y. S. Park, N. Miyazawa, T. Endo, N. Fujiwara, H. Sakiyama, Y. Misonou, Y. Miyamoto, J. Fujii and N. Taniguchi: Glycation Proceeds Faster in Mutated Cu, Zn-Superoxide Dismutases Related to Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *FASEB J.*, in press, 2003.

Nakashima, I., Takeda, K., Kawamoto, Y. Okuno, Y., Kawamoto, Y., Akhand, A.A. and Suzuki, H.: The highly conserved

MXXCW motif initially switches on protein tyrosine kinase activity. Proceeding of the 11th Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International, in press.

Liu, W., Akhand, A.A., Takeda, K., Kawamoto, Y., Itoigawa, M., Kato, M., Suzuki, H., Ishikawa, N., Nakashima, I. : Protein phosphatase 2A-linked and -unlinked caspase-dependent pathways for downregulation of Akt Kinase triggered by 4-hydroxynonenal. *Cell Death Different.*, in press.

Nakashima, I., Liu, W., Akhand, A.A., Takeda, K., Kawamoto, K., Kato, M. and Suzuki, H.: 4-Hydroxynonenal triggers multistep signal transduction cascades for suppression of cellular functions. *J. Mol. Asp. Med.*, in press.

Hossain, K., Akhand, A.A., Kawamoto, Y., Du, J., Takeda, K., Wu, J., Yoshihara, M., Tsuboi, H., Kato, M., Suzuki, H. and Nakashima, I.: Arsenite-induced membrane rafts-dependent Akt activation of which inhibition accelerates caspase activation. *Free Rad. Biol. Med.*, in press.

Du, J., Cai, S., Suzuki, H., Akhand, A. A., Ma, X., Takagi, Y., Miyata, T., Nakashima, I. and Nagase, F.: Involvement of MEKK1/ERK/p21Waf1/Cip1 signal transduction pathway in inhibition of IGF-1-mediated cell growth response by methylglyoxal. *J. Cell. Biochem.*, in press.

Nakashima, I., Du, J., Yokoyama, T., Kawamoto, Y., Ohkusu-Tsukada, K. and Isobe, K.: Transgenic

- Akhand, A.A., Ikeyama, T., Akazawa, S., Kato, M., Hossain, K., Takeda, K., Suzuki, H., Takahashi, M. and Nakashima, I.: Evidence of both cell surface and intracellular cysteine targets of protein modification for activation of RET kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292:826-831, 2002.
- 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. *Antioxid. Redox Signal.* 4:517-531, 2002.
- Nakashima, I., Suzuki, H., Akhand, A.A. and Kato, M.: Redox control of T cell death. *Antioxid. Redox Signal.* 4:353-356, 2002.
- 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. *Antioxid. Redox Signal.* 4:445-454, 2002.
- Ma, X., Du, J., Nakashima, I. and Nagase, F.: Menadione biphasically controls JNK-linked cell death in leukemia Jurkat T cells. *Antioxid. Redox Signal.* 4:371-378, 2002.
- Kamei, K., Nimura, Y., Nagino, M, Aono, K. and Nakashima, I.: Surgical stress reduces mortality from endotoxin shock, *Langenbeck's Arch. Surgery.* 386:512-517, 2002.
- Wu, J., Suzuki, H., Akhand, A.A., Zhou, Y-W., Hossain, K. and Nakashima, I.: Modes of activation of mitogen-activated protein kinases and their roles in cepharanthine-induced apoptosis in human leukemia cells. *Cell Signal.* 14:509-515, 2002.
- Kato, M., Takeda, K., Kawamoto, Y., Iwashita, Y., Iwashita, T., Akhand, A.A., Senga, T., Yamamoto, M., Sobue, G., Hamaguchi, M., Takahashi, M. and Nakashima, I.: Repair by Src kinase of function-impaired RET with multiple endocrine neoplasia type 2A mutation with substitutions of tyrosines in the carboxyterminal kinase domain for phenylalanine, *Cancer Res.* 62:2414-2422, 2002.
- Hayakawa, A., Wu, J., Kawamoto, Y., Zhou, Y.W., Tanuma, S., Nakashima, I. and Suzuki, H.: Activation of caspase-8 is critical for sensitivity to cytotoxic anti-Fas antibody-induced apoptosis in human ovarian cancer cells. *Apoptosis* 7:107-113, 2002.
- Koike C, Fung JJ, Geller DA, Kannagi R, Libert T, Luppi P, Nakashima I. Profozich J, Rudert W, Sharma SB, Starzl TE, Trucco M. Molecular basis of evolutionary loss of the alpha 1,3-galactosyltransferase gene in Higher primates. *J. Biol. Chem.* 277:10114-20, 2002
- Masahisa Katsuno, Hiroaki Adachi, Akito Kume, Mei Li, Yuji Nakagomi, Hisayoshi Niwa, Chen Sang, Yasushi Kobayashi, Manabu Doyu and Gen Sobue. Testosterone reduction prevents phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron* 35: 843-854, 2002.
- Hiroaki Adachi, Masahisa Katsuno, Makoto Minamiyama, Chen Sang, Gerasimos Pagoulatos, Moriaki Kusakabe, Atsushi Yoshiki, Yasushi

Kobayashi, Manabu Doyu and Gen Sobue. HSP70 chaperone over-expression ameliorates phenotypes of the SBMA transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant AR protein. *J Neurosci* 2003. (in press)

Sawada M, Imai F and Suzuki H. Brain-Specific Migration and Protective Roles in Brain Damage of Microglia. *Advance in Behavioral Biology*. 53:217-20. (2002)

Ohara, Y., Himeda, T., Asakura, K., Sawada, M.: Distinct cell death mechanisms by Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) infection in microglia and macrophage. *Neurosci. Lett.* 327, 41-44, 2002.

Salimi, K., Moser, K., Zassler, B., Reindl, M., Embacher, N., Schermer, C., Weis, C., Marksteiner, J., Sawada M., Humpel, C.: Glial cell line-derived neurotrophic factor enhances survival of GM-CSF dependent rat GMIR1-microglial cells. *Neurosci. Res.* 43, 221-229, 2002.

Frederik Vilhardt, Olivier Plastre, Makoto Sawada, Kazuo Suzuki, Maciej Wiznerowicz, Etsuko Kiyokawa, Didier Trono, and Karl-Heinz Krause: The HIV-1 Nef protein and phagocyte NADPH oxidase activation. *J. Biol. Chem.* 277:42139-42143, 2002.

Kenji F. Tanaka, Haruo Kashima, Hiromi Suzuki, Kenji Ono, Makoto Sawada: Existence of functional α_1 - and α_2 -adrenergic receptors on microglia. *J Neurosci. Res.* 70:232-237, 2002.

(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

高宮里奈、高橋素子、宮本泰豪、藤原範子、谷

口直之 家族性筋萎縮性側索硬化症における変異 Cu,Zn-SOD 高発現神経細胞における細胞骨格変化 第75回日本生化学会大会 2002, 10月、京都

大河原知水、江口裕伸、西村雅史、大野秀樹、谷口直之 細胞外型スーパーオキシドジスムターゼ(EC-SOD)の核移行と活性酸素ストレス 第75回日本生化学会大会 2002, 10月、京都

藤原範子、シェンミン、数馬聡、宮本泰豪、ワンペンジョージ、本家孝一、谷口直之 一酸化窒素合成酵素の新規基質の探索 第2回日本NO学会学術集会 2002, 5月、東京

宮本泰豪、朴用軾、藤原範子、鈴木敬一郎、本家孝一、谷口直之 ヒト臍帯血管内皮細胞における Peroxynitrite によるチオレドキシニン還元酵素遺伝子の発現 第2回日本NO学会学術集会 2002, 5月、東京

Fujiwara N, Miyamoto T, Taniguchi N. H46R mutant Cu, Zn superoxide dismutase linked with familial amyotrophic lateral sclerosis of which cases progress slowly is more stable than other mutants. The 15th Naito conference on molecular biological approaches for intractable diseases [III] October 2-5, 2002

Park Y.S., Koh Y.H., Fujiwara N., Suzuki K., Higashiyama S., Miyamoto Y., Taniguchi N. Upregulation of antiapoptotic and antioxidative gene expression under nitrooxidative stress in vascular cells. Second international conference, biology,

chemistry and therapeutic applications of nitric oxide. Prague. 2002. June 16-20.

Taniguchi N. Dysfunction of antioxidative enzymes and redox regulation under nitrosative stress and glycooxidative stress. 11th biennial meeting of the international society of free radical research. Paris. 2002. July 16-20

Nakashima I, Liu W and Akhand AA: 4-hydroxynonenal triggers a novel signal transduction cascade for a positive feedback regulation of caspase activation. First International Meeting of the HNE-Club, Oral communications of selected posters. Faculty of Natural Science, University of Salzburg,

Nakashima I, Takeda K, Kawamoto Y, Kato M, Akhand AA and Suzuki H: A conserved cysteine residue in the catalytic domain plays a key role in activation of protein tyrosine kinase RET. XIth Meeting of the Society for Free Radical Research International, Redox regulation in cellular signaling: glutathionylation/protein thiols (selected oral presentation). Rene Descartes University, Paris, France, July 16-20, 2002.

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：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した。最終年度 DNA 傷害性アルキル化剤に対する生体応答の基礎研究を行い、新しいストレス応答蛋白 **zfp148** の機能を明らかにした。**Zfp148** が DNA 傷害性ストレス刺激、血清除去で誘導されることを見出した。**zfp148** のヘテロ欠損マウスでは、神経管閉鎖不全と始原生殖細胞の細胞死の表現系を示した。**Zfp148** は PGC が分裂を停止する時期に発現してくること、同時に **p53** がリン酸化を受けること、**zfp148** のヘテロ欠損マウスでは **p53** のリン酸化が低下することを見出した (Nature Genetics 2003)。胎児線維芽細胞を ER ストレス (タプシガルギン) で刺激すると wild type マウスでは **GADD34** の発現に従い、ER ストレスによる **eIF2a** のリン酸化からの回復が見られたが、**GADD34** ノックアウトマウスでは **eIF2a** のリン酸化が遷延し、蛋白合成のシャットオフからの回復が遅れた。

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。最終年度はこれまでの研究成果のまとめとして、いまだ機能の未知なストレス応答蛋白 **Zfp148**(**ZBP148**, **ZBP89**)、**GADD34** の遺伝子欠損マウスの解析を中心に仕事を進め、一定の成果を得ることができた。

B. 研究方法

1、マウス個体を使用した実験と組織染色

GADD34 ノックアウトマウスはかけ合わせにより、**+/+**, **+/-**, **-/-**の系統を樹立し、その組織あるいは胎児より MEF (線維芽細胞) を培養し、実験に使用した。**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。

2、各種ストレス刺激とその応答解析

DNA 傷害性ストレスは methyl methanesulfonate (MMS)。ER ストレスとして、Thapsigargin (Tg)、Tunicamycin (Tm) and dithiothreitol (DTT) を使用した。細胞の反応は細胞抽出液を SDS ページに流し、リン酸化抗体等でウエスタンブロッティングで検索した。

C. 研究結果

3. Zfp148(ZBP-89)遺伝子の働き Zfp148 はコラーゲンの発現を抑制することから我々は Zfp148 と名づけた蛋白である。コラーゲンは皮膚の老化に関係することから、その発現が低下することは老化様形態を促進することになる。我々は Zfp148 が DNA 傷害性ストレス刺激、血清除去で誘導されることを見出した。Zfp148(ZBP-89)遺伝子欠損マウスは ES からキメラ作製の段階で精子形成不全をきたしその後の遺伝子欠損マウス作製が困難になった。そのため、ES 細胞からキメラマウスを作り、胎生期のフェノタイプ、あるいはテトラプロイドのフェノタイプを解析した。すると、zfp148 のヘテロ欠損マウスでは、神経管閉鎖不全と始原生殖細胞の細胞死の表現系を示した。Zfp148 は PGC が分裂を停止する時期に発現してくること、同時に p53 がリン酸化を受けること、zfp148 のヘテロ欠損マウスでは p53 のリン酸化が低下することを見出した (Nature Genetics 2003)。

2) GADD34 の機能解析

GADD34 はストレス刺激で上昇する蛋白ということが知られてきたが、個体での機能は今だあきらかではなかった。私達は GADD34 ノックアウトマウス解析で機能を検索した。GADD34 ノックアウトマウスは正常に出生し、12 ヶ月時点で対照マウスと大きな差は見られなかった。ところが、胎児線維芽細胞を ER ストレス (タブシガルギン) で刺激すると wild type マウスでは GADD34 の発現に従い、ER ストレスによる eIF2a のリン酸化からの回復が見られたが、GADD34 ノックアウトマウスでは eIF2a のリン酸化が遷延

し、蛋白合成のシャットオフからの回復が遅れた (分子生物学会ワークショップ発表、論文提出中)。。

D. 考察

2、 Zfp148 と老化との関係はあるか？

老化は組織の幹細胞が不可逆的な分化をする過程と分化できなくなった細胞が活性酸素、ER ストレス等ストレス刺激を受け死滅するまでの過程にわけることができる。Zfp148 は p53 と結合すること、ストレス刺激で発現が上昇することから考えると前者の細胞老化に関係する可能性がある。活性化 p53 の過剰発現マウスが老化様症状を呈することから考えあわせると、Zfp148 蛋白は老化を促進させる可能性がある。その場合、p53 リン酸化、p21/WAF1 上昇、細胞分裂停止の経路に Zfp148 が関係し、そのことが、神経発生と PGC 発生の重要な時期に関与することと一致する。

3、 GADD34 と老化との関係はあるか？

老化の後の過程すなわち不可逆的分化後に ER ストレスが関与する可能性が出てきている。すなわち活性酸素等で変化した蛋白は ER ストレスを誘起する。

E. 結論

1、DNA 傷害性ストレスは zfp148 の発現を上げ、p53 を介して細胞の増殖停止に関与する。

2、ER ストレスは GADD34 を上昇させ、蛋白合成のシャットオフからの回復を担う。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

磯部健一、城川哲也；ストレスと老化；基礎老化研究 in press

武内章英、三品裕司、磯部健一「Zfp148 の

ハプロ不全は、マウス胎仔発生において生殖細胞の完全消失を起こす」実験医学(羊土社)、2003年、5月号(in press)

Takeuchi A., Mishina Y., Miyaishi O., Kojima E., Hasegawa T. and Isobe K. Heterozygosity for Zfp148 causes complete loss of fetal germ cells during mouse embryogenesis. *Nature Genetics* 33:172-176, 2003.

Yamamoto K, Shimokawa T, Yi H, Isobe K., Kojima T, Loskutoff DJ, Saito H. Aging accelerates endotoxin-induced thrombosis : increased responses of plasminogen activator inhibitor-1 and lipopolysaccharide signaling with aging. *Am J Pathol.* 2002 ;161(5):1805-14.

Yamamoto K, Shimokawa T, Yi H, Isobe K., Kojima T, Loskutoff DJ, Saito H. Aging and obesity augment the stress-induced expression of tissue factor gene in the mouse. *Blood.* 2002 1;100(12):40

Maehara K, Uekawa N, Isobe K. Effects of histone acetylation on transcriptional regulation of manganese superoxide dismutase gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 5;295(1):187-92, 2002.

(2) 学会発表

磯部健一、野沢桂；マウステロメラー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 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 1
2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

分担研究報告書

老化における抗酸化酵素の破綻およびその防御機構

分担研究者 谷口直之

(大阪大学大学院医学系研究科 生化学、教授)

研究要旨：生体内の物質による酸化ストレスの誘導メカニズムと、それに対する防御機構について検討した。一酸化窒素(NO)や、メチルグリオキサール(MG)等のジカルボニル化合物は細胞に酸化ストレスを誘導する。我々は抗酸化酵素のグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)は NO により不活化され細胞内の過酸化水素が上昇することを報告してきた。そこで MG の GPx に対する作用を検討した結果、MG は GPx のグルタチオンの結合部位に不可逆的に結合し、GPx 活性を低下させた。血管内皮細胞にパーオキシナイトライドを添加するとチオレドキシソレダクターゼ(TR)活性が低下する。しかし TR 活性の低下に伴う酸化ストレスにより代償性に TR それ自身の発現が誘導された。以上のことから GPx や TR などの抗酸化酵素は生体内の様々な物質により不活化されるが、血管平滑筋細胞や血管内皮細胞には、細胞内のレドックス状態を変化させ、細胞の生存、維持に重要な遺伝子や抗酸化酵素の発現を調節していることが示唆された。さらにこれらの酸化ストレスに対する防御機構の破綻は、老化を促進する可能性が考えられる。

研究目的

体内で発生する活性酸素に対しては、それらを消去する SOD、GPx や TR などの抗酸化酵素や低分子抗酸化物質が存在しホメオスタシスを保っている。我々の研究室では SOD がグルコースと反応し（糖化反応）活性が低下すること、また GPx が NO により不活化されること、またそれらにより細胞に酸化ストレスが誘導されることを報告してきた。今回は GPx と MG、TR とパーオキシナイトライドとの反応性およびその作用機序を検索した。また血管平滑筋や血管内皮細胞は酸化ストレスに抵抗性を有することが知られており、何らかの防御機構が存在することが示唆されている。昨年は血管平滑筋の NO による酸化

ストレスに対する防御メカニズムとして、抗アポトーシス作用のあるヘパリン結合性 EGF 様増殖因子(HB-EGF)の発現誘導を報告した。今回はパーオキシナイトライド添加によるストレスに対して血管内皮細胞が如何なる防御システムを有しているかを、遺伝子発現誘導の観点から検討した。

(1) 研究方法

1. 精製した GPx と 0.1-5mM の MG を反応させ、3、6、9 時間後に GPx 活性を測定した。MG と反応させると GPx と、コントロールの GPx をそれぞれアルキル化剤 BIAM と反応させ、エンドペプチダーゼ Lys-C で切断し、ペプチド断片のセレノシステイン、システイン残

基の BIAM 化を ELISA にて測定した。MG と反応させた GPx と、コントロールの GPx をそれぞれエンドペプチダーゼ Lys-C で切断し、それぞれのペプチド断片を MALDI-TOF-MS にて質量分析した。両者で質量の異なるペプチド断片を HPLC にて精製し、プロテインシーケンスを行い MG の結合部位を決定した。

2. パーオキシナイトライトドナーとして SIN-1 あるいは合成パーオキシナイトライトを用いた。ヒト胎盤より精製した TR と 1-100 μ M の SIN-1 あるいは 200 μ M の合成パーオキシナイトライトとを反応させた後 TR 活性を測定した。血管内皮細胞としてはヒト臍帯血管内皮細胞(HUVEC)の初代培養を用いた。HUVEC に 1mM の SIN-1 を添加し、1、3、6、24 時間後に細胞内のタンパク質を抽出し TR 活性を測定した。HUVEC に 0.5mM の SIN-1 あるいは 0.2mM の合成パーオキシナイトライトを添加し、0.5、1、6、24 時間後に RNA を抽出しノザンプロットングを行った。プローブとしてはヒト TR cDNA を用いた。同様の実験を COS-1 細胞と A549 細胞を用いて行った。

(2) 研究結果

1, MG による GPx の不活化

MG は GPx 活性を濃度、時間依存的に低下させた。MG と反応させた GPx とコントロールの GPx とではアルキル化剤 BIAM との反応性に差を認めなかった。このことは MG が GPx の活性中心あるセレノシステインに結合していないことが示唆される。MG と反応させ

た GPx とコントロールの GPx とを Lys-C で切断しそれぞれのペプチド断片の質量を比較した結果、GPx の N 末端の 36 アミノ酸の分子量が、MG と反応させた方では 54 増加しており、MG の分子量が 54 であることを考えあわせると、この部分に MG が結合することが明らかとなった。この N 末端のペプチド断片をペプチドシーケンスした結果、グルタチオンの結合部位である Arg184、Arg185 に MG が結合することが判明した。

2, パーオキシナイトライトによる TR の不活化と TR 発現誘導

SIN-1、合成パーオキシナイトライトともに濃度、時間依存性に TR 活性を低下させた。しかし NO によっては TR 活性は低下しなかった。SIN-1 を HUVEC に添加後 1 時間で TR 活性は約 55%まで低下した。しかしその後 3、6 時間と TR 活性は徐々に回復し、24 時間後では SIN-1 添加前と同程度にまで回復した。パーオキシナイトライトによる TR の活性低下が不可逆であることがわかってきたため、TR が発現誘導された可能性が示唆された。ノザンプロットング、ウエスタンプロットングで確認したところ、パーオキシナイトライト添加後 6 時間で TR mRNA およびタンパク質の発現が誘導されていた。抗酸化剤である N-acetylcysteine の添加により、TR の誘導が抑制されることから、TR の活性低下に伴い細胞内に増加した過酸化物がシグナルとなり、TR が誘導されることが示唆された。同様の実験を COS-1、A549 細胞で行ったが、これらの細胞ではパーオキシナイトライト添加により TR 活性が低下するものの、TR 遺

伝子の発現誘導は認められなかった。

D. 考察

1, NO は GPx の活性中心にあるセレノシステインをニトロ化しさらに酸化で Se-S 結合を形成することにより GPx を不活化する。今回の研究から、MG は NO とは異なり、GPx のグルタチオン結合部位に結合することにより GPx を不活化させた。このことは抗酸化酵素のなかで GPx は、生体内の窒素酸化物やカルボニール化合物などの反応性の高い物質により容易に修飾され、不活化されやすい酵素であると考えられる。

2, パーオキシナイトライトは *in vitro* および培養細胞で TR 活性を不可逆的に阻害した。不活化のメカニズムは明らかになっていないが、NO では不活化なかったことを考えると、TR の活性中心にあるチロシン残基がニトロ化された可能性がある。HUVEC では TR の不活化により誘導させる酸化ストレスにより代償性に TR 遺伝子そのものの発現が上昇し、レドックスを制御した。このような現象は COS-1、A549 細胞などの他の細胞では認められなかったことから、血管内皮細胞は TR の発現誘導を介した、酸化ストレスに対するユニークな防御機構を備えていることが示唆される。

E. 結論

生体内の窒素酸化物やカルボニール化合物などにより GPx や TR などの抗酸化酵素は不活化させることが明らかとなった。不活化のメカニズムはそれぞれ異なっていたが、生体、特に血管平滑筋や血管内皮細胞は抗酸化酵素

の不活化により発生した活性酸素をセカンドメッセンジャーとして有効に利用し、HB-EGF などの抗アポトーシス作用を有する遺伝子や TR などの抗酸化酵素そのものの発現を上昇させ、酸化ストレス、細胞死から回避する防御機構を備えていることが明らかとなった。

4, 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

T. Fujii, T. Endo, J. Fujii and N. Taniguchi: Differential expression of glutathione reductase and cytosolic glutathione peroxidase, GPX1, in developing rat lungs and kidneys. *Free Rad. Res.*, 36, 1041-49, 2002.

Y. Miyamoto, Y. H. Koh, W. Che, Y. S. Park, N. Fujiwara, T. Ookawara, K. Suzuki and N. Taniguchi: Dysfunction of antioxidative enzymes and redox regulation under nitrosative stress and glycoxidative stress. *International Congress Series*, 1245, 23-30, 2002.

M. Xian, N. Fujiwara, Z. Wen, T. Cai, S. Kazuma, A. J. Janczuk, X. Tang, V. V. Telyatnikov, Y. Zhang, X. Chen, Y. Miyamoto, N. Taniguchi and P. G. Wang: Novel Substrates for Nitric Oxide Synthases. *Bioorg. Med. Chem.*, 10, 3049-55, 2002.

H. Eguchi, Y. Ikeda, S. Koyota, K. Honke, K. Suzuki, J. M. Gutteridge and N. Taniguchi: Oxidative Damage Due to Copper Ion and

Hydrogen Peroxide Induces GlcNAc-Specific Cleavage of an Asn-Linked Oligosaccharide. *J. Biochem.*, 131, 477-84, 2002.

Y. S. Park, N. Fujiwara, Y. H. Koh, Y. Miyamoto, K. Suzuki, K. Honke and N. Taniguchi: Induction of Thioredoxin Reductase Gene Expression by Peroxynitrite in Human Umbilical Vein Endothelial Cell. *Biol. Chem.*, 383, 683-91, 2002.

I. Laffont, M. Takahashi, Y. Shibukawa, K. Honke, V. V. Shuvaev, G. Siest, S. Visvikis and N. Taniguchi: Apolipoprotein E activates Akt pathway in neuro-2a in an isoform-specific manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 292, 83-87, 2002.

J. Niwa, S. Ishigaki, N. Hishikawa, M. Yamamoto, M. Doyu, S. Murata, K. Tanaka, N. Taniguchi and G. Sobue: Dorfin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1-mediated neurotoxicity. *J. Biol. Chem.*, 277, 36793-98, 2002.

T. Ookawara, T. Kizaki, E. Takayama, N. Imazeki, O. Matsubara, Y. Ikeda, K. Suzuki, J. L. Li, T. Tadakuma, N. Taniguchi and H. Ohno: Nuclear translocation of extracellular superoxide dismutase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 296, 54-61, 2002.

Y. Shibukawa, M. Takahashi, I. Laffont, K. Honke and N. Taniguchi: Downregulation of

hydrogen peroxide-induced PKC δ activation in N-acetylglucosaminyltransferase III transfected HeLaS3 cells. *J. Biol. Chem.*, 278(5):3197-203, 2003.

R. Takamiya, M. Takahashi, M. Theingi, Y. S. Park, N. Miyazawa, T. Endo, N. Fujiwara, H. Sakiyama, Y. Misonou, Y. Miyamoto, J. Fujii and N. Taniguchi: Glycation Proceeds Faster in Mutated Cu, Zn-Superoxide Dismutases Related to Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *FASEB J.*, in press, 2003.

学会発表

高宮里奈、高橋素子、宮本泰豪、藤原範子、谷口直之 家族性筋萎縮性側索硬化症における変異 Cu,Zn-SOD 高発現神経細胞における細胞骨格変化 第75回日本生化学会大会 2002, 10月、京都

大河原知水、江口裕伸、西村雅史、大野秀樹、谷口直之 細胞外型スーパーオキシドジスムターゼ(EC-SOD)の核移行と活性酸素ストレス 第75回日本生化学会大会 2002, 10月、京都

藤原範子、シェンミン、数馬聡、宮本泰豪、ワンベンジョージ、本家孝一、谷口直之 一酸化窒素合成酵素の新規基質の探索 第2回日本 NO 学会学術集会 2002, 5月、東京

宮本泰豪、朴用軾、藤原範子、鈴木敬一郎、

本家孝一、谷口直之 ヒト臍帯血管内皮細胞
における Peroxynitrite によるチオレドキシ
ン還元酵素遺伝子の発現 第2回日本 NO 学
会学術集会 2002, 5月、東京

Fujiwara N, Miyamoto T, Taniguchi N.
H46R mutant Cu, Zn superoxide
dismutase linked with familial amyotrophic
lateral sclerosis of which cases progress slowly is
more stable than other mutants. The 15th Naito
conference on molecular biological approaches
for intractable diseases [III] October 2-5, 2002

Park Y.S., Koh Y.H., Fujiwara N., Suzuki K.,
Higashiyama S., Miyamoto Y., Taniguchi N.
Upregulation of antiapoptotic and antioxidative
gene expression under nitrooxidative stress in
vascular cells. Second international conference,
biology, chemistry and therapeutic applications of
nitric oxide. Prague. 2002. June 16-20.

Taniguchi N. Dysfunction of antioxidative
enzymes and redox regulation under
nitrosative stress and glycooxidative
stress. 11th biennial meeting of the
international society of free radical
research. Paris. 2002. July 16-2

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：酸化ストレス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、システイン基を介する蛋白質架橋剤である 1,4-butanediyl-bismethanetiosulfonate (BMTS) を用いて解析した。その結果、受容体型チロシンキナーゼである RET の遺伝子を移植した NIH3T3 細胞に BMTS を作用させると、細胞内蛋白質のチロシンリン酸化が誘導されること、そして、BMTS は RET 分子を重合させて、そのキナーゼ活性を増強させることを明らかにした。細胞外ドメインを欠失するミュータント分子の遺伝子である RET-PTC-1 を移植した細胞では、BMTS によるキナーゼ活性の増強は認められず、BMTS が反応する標的システインは RET の細胞外ドメインにあると考えられた。一方、このミュータント分子に試験管の中で直接 BMTS を作用させると、キナーゼ活性が増強された。この成績は、酸化ストレスの作用点は細胞表面と細胞内の両方にあるという筆者らが先に提示した考えを強く支持する。

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直接的に傷害するが、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かと推定されている。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に作用して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て、細胞のシグナル伝達が促進または抑制されて老化の進展にかかわることを先に示した。また、蛋白のこうした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。ラジカ

ルとその関連因子およびカルボニル化合物が、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が、明らかにされる必要がある。今年度は、システイン残基を介する蛋白質の架橋剤である BMTS を用いて、酸化ストレスの作用点の 2 極性仮説の証明を試みた。

B. 研究方法

ラジカル関連のモデル分子として、蛋白質システイン基高反応性の BMTS を用いた。受容体型チロシンキナーゼ RET またはそのミュータントの遺伝子を導入した NIH3T3 細胞、あるいはこれらの細胞から免疫沈降によって分離した