

200500J25A

厚生労働省科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

生体内酸化ストレスによる老年性疾患の発症機構の解明と予防

平成17年度 総括研究報告書

主任研究者 石井 直明

平成18(2006)年3月

目 次

I.	総括研究報告	1
	生体内酸化ストレスによる老年性疾患の発症機構の解明と予防	
	石井直明	
II.	研究成果の刊行に関する一覧表	24
III.	研究成果の刊行物・別冊	25

生体内酸化ストレスによる老年性疾患の発症機構の解明と予防

主任研究者 石井直明 東海大学医学部教授

ミトコンドリア電子伝達系複合体のサブユニットである SDHC の変異遺伝子が導入されたマウスは、活性酸素種スーパーオキシドアニオン (O_2^-) が過剰に産生しており、野生型動物と比較して、成熟期以降に体重の減少を示し、視覚異常、筋肉異常、及び情動行動異常を示すことが確認された。これらの結果は、ミトコンドリア由来の活性酸素が、老化や各種疾患に関与していることを示すものであり、このマウスが生体内酸化ストレスを原因とする老化や老人性疾患のモデル動物として有用であることが示唆された。

A. 研究目的

加齢とともに進行する細胞の老化は、器官や臓器の機能低下のみならず、癌や痴呆など多くの深刻な疾患を引き起こし、高齢化社会にともなうこれらの疾患の増加は重要且つ緊急に解決すべき医療行政の課題になっている。老化や疾患の原因として最も注目されるのが酸化ストレスであり、その主な発生源が細胞小器官ミトコンドリアの電子伝達系であることが知られている。しかし、電子伝達系から酸化ストレスを任意に発生させる手段が存在しないために、外部から過剰な酸化ストレスを負荷するような、正常な生体環境ではありえない条件下で実験がおこなわれている。我々は、線虫、*Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) の突然変異体、*mev-1* が電子伝達系複合体 II を担っているシトクローム *b* の遺伝子 (*C. elegans* では *cyt-1*: マウスやヒトでは SDHC 遺伝子として定義されている) に変異

を持ち、ミトコンドリアから活性酸素が過剰に発生することを明らかにした。*mev-1* 突然変異体は大気中でも野生株に比べて短命で、酸素濃度に依存してさらに寿命の短縮がみられた。この変異体はミトコンドリアの形態異常、アポトーシス、老化のマーカーとして知られるリポフスチン (老人斑) や酸化タンパク質の早期蓄積などの早老症の兆候を示すようになった。その後 *C. elegans* の *mev-1* と同等の変異を有するマウス培養細胞を構築した。この変異細胞は過剰なアポトーシスの誘導により死滅していくが (培養1ヶ月目の細胞はヌードマウス皮下で直ちに貧食される)、アポトーシスを逃れて生存した一部の細胞は高頻度に形質転換を生じ、ヌードマウス皮下で腫瘍化することが認められた。これは、老化と癌化の過程が、ミトコンドリアから生じる酸化ストレスを起因とした一連の現象として密接に関係していることを示した世界で初

めての例である (Cancer Research, 2005)。最近、この変異を導入した遺伝子組換えマウスを作製した。*mev-1* 線虫もマウス培養細胞も、ATP 産生量は野生株と変化はなく、エネルギー代謝は正常に働いていることから、酸化ストレスを生体内部から自然な生体環境に近い状態で負荷することができる有用なモデル動物になると考える。

本研究の目的は、この SDHC 変異遺伝子組換えマウスが生体内酸化ストレスを原因とする老化や老人性疾患のモデル動物として、老化の基礎研究のみならず臨床研究にも応用され、さらに線虫とマウス培養細胞を用いた分子遺伝学的研究から酸化ストレスが老化を引き起こす過程を明らかにすることで、老化および老人性疾患の発症機構の解明から治療や予防（それによる医療費削減）まで幅広い分野に貢献することである。

本年度は、(1) SDHC 変異遺伝子組換えマウスの生化学・生理学・病理学・行動学に基づいた解析をおこなった。その結果、この変異マウスは筋力の低下や視力の低下といった老人性の疾患が野生型に比べて早期に認められることを明らかにした。(2) この変異マウスは成熟するまでは野生株と変わらず成長するが、不妊であった。そこで、この変異マウスをさらに改変し、ミトコンドリアからの活性酸素の発存量や発生時期をテトラサイクリンにより生体外から任意に制御可能な条件付変異遺伝子組換えマウス (Tet-*mev-1* マウス) の作製を試みた。現在、14 系統を取得し、解析に向けて準備をしている。

B. 研究方法

1. 変異型遺伝子組換えマウス

C. elegans の *cyt-1* 遺伝子のマウスホモログである SDHC 遺伝子の DNA 配列を、DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology.html>) から取得した。*C. elegans* の *cyt-1* 遺伝子がコードするタンパク質の 71 番目のアミノ酸残基であるグリシンを、それに対応するマウス SDHC 遺伝子がコードするタンパク質中のアミノ酸残基がグルタミン酸に置換した変異 SDHC 遺伝子を作成した。SDHC 遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列を図 1 に、タンパク質の構造と変異導入箇所を図 2 に示す。具体的には、野生型の SDHC の PCR 産物を、ICR マウス株の肝臓の cDNA の鋳型から得て、次いで pBluescript II SK-ベクターに挿入した。変異対立遺伝子を、PCR で増幅し、この断片を、サイトメガロウイルスプロモーター (PminCMV) の基本転写領域を含有する発現ベクターに挿入した。このベクター DNA を B6J マウス受精卵の雄性前核にマイクロインジェクションし、得られた卵細胞を培養した後、偽妊娠雌性マウスの輸卵管に移植した。その後被移植動物を飼育し、生まれた仔マウスから前記 cDNA を有する仔マウスを選択することにより遺伝子組換えマウスを作製した (図 3)。

2. 条件付変異遺伝子組換えマウス

テトラサイクリンの転写活性/抑制による遺伝子発現の調節原理を利用した条件付変異遺伝子組換えマウスを作製した。従来の方法では、完全な発現抑制をおこなうことができなかつたことから、少量の遺伝子発現による影響を避けることができなかつた。そこで、本研究では、転写活性よりも

抑制効果を強くし、完全な抑制制御が可能な系を新たに開発した (図 4)。また従来、目的遺伝子、テトラサイクリンの転写活性と抑制のそれぞれの DNA を別々のマウスに組み込み、交配によりこの 3 つの DNA を持つマウスを作製していた。この方法では、それぞれの DNA の発現量が異なるために、遺伝子発現の制御が困難であった。そこで、これらの DNA を結合したベクターDNA を作製した (図 5)。この DNA をマウスに導入することにより、作製が容易で、厳密な発現調節が可能な遺伝子組換えマウスの構築ができるようになった。この新しいマウスの作製方法は、「哺乳動物由来の変異 SDHC 遺伝子を有する遺伝子組み換え動物」として 2005 年 5 月 12 日に東海大大学より特許出願している (特願 2005-139588)。具体的な方法を以下に記す。

(1) *mev-1* 条件付変異遺伝子組換えマウスの Transgene 作製

a. PCR 法を用いたサイトメガロウィルスプロモーター (PhCMV promoter) の DNA 断片の増幅・単離

PCR 法を用い、PhCMV promoter の両端に新規制限酵素認識サイトを挿入する (これを Gene. 1 とする)。PhCMV promoter を含有する pcDNA3 プラスミドベクターを PCR の鋳型として使用した。pcDNA3 プラスミドベクター (Vector. 1) に Gene. 1 を挿入して、Vector. 2 を作製した。

b. ポリアデニル酸シグナル (polyA) の付加

SV40 polyA を、同様に処理したプラスミドベクター: Vector. 2 へ挿入して、Vector. 3 を作製した。

c. テトラサイクリン依存性転写活性化因子 (rTetR-VP16) の付加

pUHD17 プラスミドベクターを制限酵素処理した rTetR-VP16 を取得し、プラスミドベクター (Vector. 3) へ挿入して、Vector. 4 を作製した。

d. PCR 法を用いた SV40 polyA の DNA 断片の増幅・単離

PCR 法を用い、SV40 polyA の両端に新規制限酵素認識サイトを挿入した (Gene. 2)。PCR で使用した鋳型は、SV40 polyA を含有する pcDNA3 又は pTRE プラスミドベクターである。pcDNA3 プラスミドベクターに Gene. 2 を挿入して、Vector. 5 を作製した。

e. テトラサイクリン依存性転写抑制因子発現ベクターの作製

Homo sapiens zinc finger protein 10; Kox1 gene (X52332) の転写抑制ドメイン (KRAB) を PCR 法により増幅・単離した (Gene. 3)。PCR で使用した鋳型は、HeLa 細胞より抽出合成した Gene. 3 を、テトラサイクリン依存性レセプター (TetR) を含有した pBluescriptII へ挿入し、TetR-KRAB を作製した (Vector. 6)。プラスミドベクター: Vector. 6 を PhCMV pro. を含有した pBluescriptII へ挿入し、PhCMV pro. - TetR-KRAB を作製した (Vector. 7)。プラスミドベクター: Vector. 7 をプラスミドベクター (Vector. 5) へ挿入して、Vector. 8 を作製した。

f. テトラサイクリン依存性転写因子 (PhCMV pro. - rTetR - VP16, PhCMV pro. - TetR - KRAB (Kox1)) の連結

プラスミドベクター: Vector. 4 及び 8 をそれぞれテトラサイクリン依存性転写活性化因子発現プラスミドベクター (Vector.

4) へ、テトラサイクリン依存性転写抑制因子発現遺伝子を連結して、Vector. 9 を作製した。

g. 電子伝達阻害型＝活性酸素過剰発生型遺伝子変異を挿入した (mev-1型) cyt-1 遺伝子の作製 (Gene. 4)

ICR 系統のマウス肝臓由来の cDNA を鋳型に、PCR 法によりチトクローム b 大サブユニット (*cyt-1*) のクローニングした。上記により得られた遺伝子の増幅 DNA 断片を pBluescript II SK- plasmid vector の MCS (multi cloning site : 複合制限酵素領域) へ導入した。大腸菌 DH5 α のコンピテントセルを作製し、そこへ上記プラスミドベクターの形質導入を行い目的遺伝子の PCR 増幅断片の単離 (サブクローニング) を行った。

電子伝達阻害型＝活性酸素過剰発生型遺伝子変異を挿入した (*mev-1*型) *cyt-1* 遺伝子の作製は、上記と同様にして、PCR および形質導入を行い、*mev-1* 型 *cyt-1* 遺伝子の 3' 領域のサブクローニングを行った。

上記で作製した野生型 *cyt-1* 遺伝子全長サブクローニング用プラスミドベクターへ、*mev-1*型 *cyt-1* 遺伝子の 3' 領域を挿入して、*mev-1*型 *cyt-1* 遺伝子全長を作製した。

h. テトラサイクリン系遺伝子発現制御システム (TRE) を用いた目的遺伝子 (mev-1 型 cyt-1 遺伝子) 発現用プラスミドベクターの作製

pTRE プラスミドベクターへ *mev-1* 型 *cyt-1* 遺伝子: Gene. 4 を挿入して、Vector. 10 を作製した。

pcDNA3 プラスミドベクターを、サイトメガロウィルス・プロモータ (CMV promoter) を排除した pcDNA3 Δ CMV pro. プラスミド

ベクターを作製した (Vector. 11)。

Vector. 10 から、Tetracycline receptor Responsive element (TRE)- *mev-1*型 *cyt-1* 遺伝子を取得し、Vector. 11 へ挿入して、Vector. 12 を作製した。

i. プロモーター、転写調節領域内に存在するシスエレメントの効果を外部より絶縁するための働きをする遺伝子 (beta-globin insulator sequence : insulator) の挿入 (パート1)。

PCR 法による insulator DNA 断片の増幅・単離した (Gene. 5)。ニワトリ cDNA ライブラリーを PCR の鋳型として使用した。

上記で増幅した DNA 断片: Gene. 5 を pBluescriptII SK-プラスミドベクターへ挿入して、Vector. 13 を作製した。上記プラスミドベクター (Vector. 13) から取得した insulator を、プラスミドベクター: Vector. 12 へ挿入して、Vector. 14 を作製した。

j. Tetracycline receptor Responsive element (TRE) を利用したテトラサイクリン遺伝子発現制御システム全長の作製

テトラサイクリン依存性転写因子 (活性化因子、抑制因子) 発現プラスミドベクター: Vector. 9、およびテトラサイクリン系遺伝子発現制御システム (TRE) を用いた目的遺伝子 (*mev-1* 型 *cyt-1* 遺伝子) 発現用プラスミドベクターを連結して、Vector. 15 を作製した。

k. プロモーター、転写調節領域内に存在するシスエレメントの効果を外部より絶縁するための働きをする遺伝子 (insulator) の挿入 (パート2)

insulator 含有 pBluescriptII SK-プラスミドベクター (Vector. 13) から取得した

insulator を、プラスミドベクター:Vector. 15 へ挿入して、Vector. 16 を作製した。

l. プロモーター、転写調節領域内に存在するシスエレメントの効果を外部より絶縁するための働きをする遺伝子 (insulator) の挿入 (パート 3)

insulator 含有 pBluescriptII SK-プラスミドベクター:Vector. 13 から取得した insulator をプラスミドベクター:Vector. 16 へ挿入して、Vector. 17 を作製した。

m. プロモーター、転写調節領域内に存在するシスエレメントの効果を外部より絶縁するための働きをする遺伝子 (insulator) の挿入 (パート 4)

insulator 含有 pBluescriptII SK-プラスミドベクター (Vector. 13) から取得した insulator をプラスミドベクター (Vector. 17) へ挿入して、テトラサイクリンシステム完全長 (一本化) プラスミドベクター:Vector. 18 を作製した。この Vector. 18 を、電子伝達阻害型=活性酸素過剰発生型; *mev-1* 動物作製のための導入遺伝子とした。

n. レポーター蛋白質 (核移行緑色蛍光蛋白質:nlsGFP) 遺伝子の挿入

PCR 法により nlsGFP DNA 断片を増幅・単離した (これを Gene. 6 とする)。GFP を含有する pEGFP-C1 プラスミドベクターを PCR の鋳型として使用した。上記で増幅・単離した nlsGFP 遺伝子:Gene. 6 をテトラサイクリンシステム完全長 (一本化) プラスミドベクター:Vector. 18 へ挿入して、Vector. 19 を作製した。

o. レポーター蛋白質 (Luciferase) 遺伝子の挿入

PCR 法により Luciferase DNA 断片を増

幅・単離した (Gene. 7)、Luciferase を含有した pCH110 あるいは pMC1871 プラスミドベクターを PCR の鋳型として使用した。上記で増幅・単離した Luciferase 遺伝子:Gene. 7 をテトラサイクリンシステム完全長 (一本化) プラスミドベクター:Vector. 19 へ挿入して Vector. 20 を作製した。

p. 一種類のプロモーターより二種類の mRNA を発現することを可能にする遺伝子配列 (IRES) の挿入

IRES 含有の pBluescriptII SK-プラスミドベクターから取得した IRES をテトラサイクリンシステム完全長 (一本化) プラスミドベクター:Vector. 20 へ挿入して、Vector. 21 を作製した。Vector. 21 は、テトラサイクリンシステムが insulator の効果により目的遺伝子の誘導発現が厳密に行えることを証明するための導入遺伝子 (Tetracycline system Transgene (Insulator (+)): Tet system-Rep. Tg (+)) である。また、Tetracycline system Transgene (Insulator (-)): Tet system-Rep. Tg (-)) となるプラスミドベクターは、i、k~m の工程を除いたものである。

q. テトラサイクリン依存性転写活性化因子 (rTetR-VP16) の発現が PhCMV プロモーターによって制御されるプラスミドベクターの作製

PCR 法を用いて、beta-globin 遺伝子イントロン 2、エキソン 3 領域 (beta-globin splice A/D) 遺伝子を増幅・単離した (これを Gene. 8 とする)。マウス cDNA ライブラリーを PCR の鋳型として使用した。上記で増幅・単離した beta-globin splice A/D 遺伝子:Gene. 8 をテトラサイクリン依存

性転写活性化因子発現プラスミドベクター: Vector. 4 へ挿入して、Vector. 22 を作製した。

r. テトラサイクリン依存性転写抑制因子 (TetR-KRAB) の発現が PhCMV エンハンサー-アクチンプロモーターによって制御されるプラスミドベクターの作製

PCR 法を用いた beta-actin プロモーター領域 (beta-actin pro.) 遺伝子を増幅、単離した (これを Gene. 9 とする)。マウス cDNA ライブラリーを PCR の鋳型として使用した。上記で増幅・単離した beta-actin pro. 遺伝子: Gene. 9 を pcDNA3 プラスミドベクターへ挿入して、Vector. 23 を作製した。

CMV enhancer に beta-actin pro. を連結した (CMV enhancer- beta-globin pro.)。即ち、pcDNA3 プラスミドベクター: Vector. 23、および beta-globin 遺伝子イントロン 2、エキソン 3 領域 (beta-globin splice A/D) 遺伝子断片 (Gene. 8) を Vector. 23 へ beta-globin splice A/D を挿入して、Vector. 24 を作製した。

テトラサイクリン依存性転写抑制因子プラスミドベクター (Vector. 8) を制限酵素処理し、Vector. 8 内に存在する pcDNA3 プラスミドベクターの CMV pro. を排除した (これを Vector. 25 とする)。CMV enhancer- beta-globin pro. に beta-globin splice A/D を連結した (CMV enhancer- beta-globin pro. - beta-globin splice A/D) pcDNA3 プラスミドベクター: Vector. 24 を Vector. 25 へ CMV enhancer- beta-globin pro. - beta-globin splice A/D を挿入した (これを Vector. 26 とする)。

s. テトラサイクリン系薬剤による遺伝子誘導発現制御を厳密に行うテトラサイクリン

ンシステム完全長 (一本化) プラスミドベクターの作製

テトラサイクリン依存性転写活性化因子 (rTetR-VP16) の発現が PhCMV プロモーターによって制御されるプラスミドベクター: Vector. 22、およびテトラサイクリン依存性転写抑制因子 (TetR-KRAB) の発現が PhCMV enhancer - actin プロモーターによって制御されるプラスミドベクター: Vector. 26 を Vector. 22 へ Vector. 26 を連結して、Vector. 27 を作製した。

上記プラスミドベクター: Vector. 27 に、insulator を挿入して、Vector. 28 を作製した。上記プラスミドベクター: Vector. 28 をテトラサイクリンシステム完全長 (一本化) プラスミドベクター: Vector. 21 へ挿入して、Vector. 29 を作製した。Vector. 29 は、2 段階での転写調節因子の競合 (CMV enhancer への転写因子の結合競合および TRE へのテトラサイクリン依存性転写調節因子の結合競合) によりテトラサイクリン系遺伝子誘導発現を厳密に制御することを可能とした本発明の導入遺伝子 (Tetracycline system Transgene: Tet system-Rep Tg AD (+)) である。

この Tetracycline system Transgene へ *mev-1* 型 *cyt-1* 遺伝子を導入して Tet system- *mev-1* Tg AD (+) を作製した。その構造を図 5 に示す。

(2) *mev-1* 条件付遺伝子組換えマウス (Tet-*mev-1* マウス) の作製

上記で作製した Tet system- *mev-1* Tg AD (+) を、マウスの前核期受精卵の雄性前核へ微量注入した。微量注入の方法は、マイクロインジェクション法の常法に従った。得

られた卵細胞を培養した後、偽妊娠雌性マウスの輸卵管に移植し、その後被移植動物を飼育した。

(3) *mev-1* 条件付遺伝子組換えマウス (Tet-*mev-1* マウス) のスクリーニング

上記の手法により得られた子マウスの尾部より、ゲノム DNA を抽出し PCR 法により Transgene に含まれる *mev-1* 型 *cyt-1* 遺伝子を増幅させた。*mev-1* 型 *cyt-1* 遺伝子の増幅の有無により、*mev-1* 条件付遺伝子組換えマウスのスクリーニングを行い、目的とする *mev-1* 条件付遺伝子組換えマウス (Tet-*mev-1* マウス) を取得した。

3. 活性酸素種スーパーオキシドアニオン (O_2^-) の測定

O_2^- 生成は、従来の MCLA 法よりも感度が高い、化学発光プローブ MPEC (2-メチル-6-p-メトキシフェニルエチニル-イミダゾピラジノン) を用いて測定した。具体的には、筋肉、肝臓組織を溶媒 (210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 0.1 mM EDTA and 5 mM Tris-HCl, pH 7.4) に 10% (w/v) 濃度になるよう加え、テフロンホモジナイザーをもちいて粉碎した。これを遠心分離し、細胞質画分とミトコンドリア画分に分離抽出した。このそれぞれの画分を、反応液 (50 mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 2 mM EDTA) 中に 40 μ g 分加え、0.7 μ M の MPEC 発光試薬と反応させ、AB-2200 type Luminescencer-PSN (ATTO, Tokyo) をもちいて発光量を測定することで活性酸素量を測定した。測定温度は 37°C に調節した。 O_2^- の速度は秒当たりの計数として表し、量は 10 μ g/ml のウシ Cu, Zn-スーパーオキシドジスムターゼ

(SOD) 存在下のサンプル光学密度を酵素不在下の光学密度から減算することによって算出した。

4. ミトコンドリアの酵素活性測定

上記組織においてミトコンドリアの酵素活性測定をおこなった。詳しくはエネルギー代謝の中核を担っている複合体 I-III および II-III の酵素活性測定をおこなった。具体的には、上記と同様にミトコンドリア画分を抽出し、文献 (Trounce IA, KimYL, Jun AS, Wallace DC. Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and transmitochondrial cell lines. Methods Enzymol 1996;264:484-509.) の測定方法に従い測定した。

(4) 胎児の発生時期より導入遺伝子の発現を誘導している変異型遺伝子組換えマウスの解析

マウス個体の成長、形態観察、マウス行動解析 (オープンフィールドテスト)、及び、解剖し、肝臓と筋肉のミトコンドリアの機能と活性酸素産生量、筋肉の電子顕微鏡観察、生殖巣の観察をおこなった。オープンフィールドテストは、50 cm 四方、高さ 50~60 cm の台の上で動くマウスの行動範囲を測定した。マウスの足に墨汁を浸し、マウスの足跡の軌跡を 3 分間観察した。

(倫理面への配慮)

マウスの扱いについては、東海大学の動物倫理委員会の規定に従い、肉体的精神的苦痛を与えないよう配慮した。変異マウスの作製・飼育はすべて東海大学・遺伝子工

学実験動物研究センターでおこなった。

C. 研究結果

1. 変異型遺伝子組換えマウス (*mev-1*マウス)

このマウスは胎児の発生時期より導入遺伝子の発現を誘導しており、以下のような結果が得られた。

(1) 個体の大きさなどの観察結果

外見は、毛並み等の変化は見られなかったものの、早老症の表現型であると示される脊椎の湾曲が観察された(図6)。飼育時の経過観察から、個体の大きさに変化が観察された。胎児期から成熟期における個体の成長が、野生型のマウスと比較して著しく遅く、線虫の *mev-1* 変異体と同様の結果が得られた。さらに、成熟期以降、個体は徐々に小さくなる傾向にあった。個体の重量について、結果を示す(図7)。この結果は、早老症を示唆する結果となった。

(2) 視覚異常

飼育観察から、眼球に白濁が確認された(図8)。さらに、角膜、網膜の組織切片解析から、異常が観察された。角膜では細胞体の減少、血管新生が確認された(図8)。また、網膜では細胞層や顆粒層の配列に乱れが確認された(図8)。

(3) 直線歩行幅、オープンフィールドテストによる行動解析

mev-1 マウスが直進しているときの歩幅に有意な減少が確認された(図9)。これは、脊椎の湾曲の影響によるものと考えられた。また、オープンフィールドテストの結果、

視覚異常によるものと考えられる歩行異常(回転歩行)が確認された(図9)。

(4) 筋肉異常、情動行動異常

筋肉の張力解析は、前足の筋力テストによる。具体的には、尻尾を引っ張られた状態で前足が重量測定器を掴んでいられたときの重量を測定することにより行った。上記した筋肉の張力解析の結果、*mev-1* マウスでは、野生型のマウスと比較し顕著に筋力の低下が確認された(図10)。マウス行動解析(高架パイプ歩行テスト)は、1 mの高さに、3 mm、6 mmの金属パイプを架け、逃避台までの距離20 cmを移動する時間を測定した。さらに、テスト間にスタート位置に静止してしまう回数、途中で落下する回数も測定した。

高架パイプ歩行テストの結果、パイプを渡り終える歩行時間に優位な増加が認められた(図11)。上記の結果は、パイプからの落下頻度の上昇やパイプの上で停止状態にいる時間が増加していたことが原因となった。これらの現象はパイプを握る握力低下、あるいは、恐怖心の増加によるものと考えられた。

(5) 活性酸素発生量、ミトコンドリア複合体活性の測定

活性酸素種スーパーオキシドアニオン(O_2^-)発生量の結果を図12に示す。この結果から分かるように、組織が大きな肝臓・筋肉において解析をおこなった結果、その蓄積量は野生型のマウスに比べ顕著に増加していることが確認された。ミトコンドリア複合体IとIIの活性の測定結果を図13に示す。予想外なことに線虫の *mev-1* 変異

体、*mev-1*細胞株とは異なり、*mev-1*マウスでは、野生型と比較して優位な変化は確認されなかった。

(6) 電子顕微鏡によるミトコンドリアの形態解析

その結果を図14に示す。この結果から、*mev-1*マウスでは、野生型のマウスに比べミトコンドリアの数の増大、巨大化が確認され横紋筋構造の筋繊維を破壊していることが確認された。

(7) 生殖巣（卵巣）異常

*mev-1*雌マウスは不妊であることが確認された。また、組織切片の解析結果から、野生型マウスでの卵胞内の卵母細胞は卵巣の外側に向かうにつれて規則正しく発生が進んでいるのに比べ、*mev-1*マウスでの卵母細胞の発生過程は卵巣内の位置に関係なく不規則に進んでいた（図15）。これらの結果から、不妊の原因は、酸化ストレスにより、排卵にいたるまでの発生が正常におこなわれずに、卵子までの発生を正常に終了する卵母細胞が減少していることにあると予測された。

2. 条件付変異型遺伝子組換えマウス

ミトコンドリアからの活性酸素の発存量や発生時期をテトラサイクリンにより生体外部から任意に制御可能な条件付遺伝子組換えマウス（Tet-loxJTZ17マウス）、およびこのシステムに *mev-1* 変異遺伝子を挿入した条件付変異型遺伝子組換えマウス（Tet-*mev-1*マウス）の作製をおこなった。現在、Tet-loxJTZ17マウス16系統、20匹と Tet-*mev-1*マウス14系統、200匹を取得

している。Tet-*mev-1*マウス14系統のうち、ヘテロマウス1系統に投与量10mg/mlのドキシサイクリン（テトラサイクリンと同じ効果）水を自由給水させて調べた。このマウスでは、外来遺伝子の発現が筋肉では見られず、脳幹など臓器・器官で弱い発現を示した。現在、このマウスの長期飼育による表現形の変化を調べている。現在、ドキシサイクリンの量を増加させたマウスでも再検討している。さらに、ヘテロマウスに比べて2倍の遺伝子発現量が期待されるホモマウスの作製とテトラサイクリンの転写抑制を弱めたマウスを作製している。

D. 考察

細胞内で重要な働きをするミトコンドリア電子伝達系複合体の欠損は細胞や個体に致死的效果をもたらすことが多い。現に、複合体IIを担っているシトクローム*b*（SDHC）に変異を持つマウス培養細胞でも、外部から導入した変異遺伝子の発現量が多い細胞は生存できず、本来細胞が持つ正常遺伝子からの発現量よりも変異遺伝子の発現量が同じか少ない細胞のみが生存可能であった。マウス個体の場合も例外ではなく、変異遺伝子を受精卵に導入し、得られた卵細胞を培養した後、偽妊娠雌性マウスの輸卵管に移植し、その後被移植動物を飼育したが、この変異遺伝子が挿入されていたマウスは1匹に過ぎなかった。

しかし、この変異SDHC遺伝子が導入されたマウスは、活性酸素種スーパーオキシドアニオン（ O_2^- ）が過剰に産生しており、野生型動物と比較して、成熟期以降に体重の減少を示し、かつ視覚異常、筋肉異常、及び情動行動異常を示すことが確認さ

れた。これらの結果は、ミトコンドリア由来の活性酸素が、老化や各種疾患に関与していることを示すものであり、このマウスが生体内酸化ストレスを原因とする老化や老人性疾患のモデル動物として有用であることを示唆した。

この SDHC 変異遺伝子組換えマウス (*mev-1* マウス) は成熟するまでは野生株と変わらず成長するが、不妊であった。この原因は、酸化ストレスにより、排卵にいたるまでの発生が正常におこなわれずに、卵子までの発生を正常に終了する卵母細胞が減少していることにあると予測され、不妊における酸化ストレスの役割の解明に *mev-1* マウスが有用なモデルマウスになることを示している。しかし、本研究には数多くのマウス個体が必要なことから、不妊の問題を解決する必要に迫られた。その解決策として、ミトコンドリアからの活性酸素の発生量や発生時期をテトラサイクリンの転写活性/抑制による遺伝子発現の調節原理を利用した、生体外から任意に制御可能な条件付遺伝子組換えマウス (Tet-loxJTZ17 マウス)、およびこのシステムに *mev-1* 変異遺伝子を挿入した条件付変異遺伝子組換えマウス (Tet-*mev-1* マウス) の作製をおこなった。現在、Tet-*mev-1* マウス 14 系統、200 匹を取得している。Tet-*mev-1* マウス 14 系統のうち、ヘテロマウス 1 系統に投与量 10 mg/ml のドキシサイクリン (テトラサイクリンと同じ効果) 水を自由給水させて調べた。このマウスでは、外来遺伝子の発現が筋肉では見られず、脳幹など臓器・器官で弱い発現を示した。現在、このマウスの長期飼育による表現形の変化を調べている。この弱い遺伝子発現は、

テトラサイクリンがない状態でも転写活性を抑制できない従来の方法を改良して抑制を強めたことが原因と考える。そこで、ドキシサイクリンの量を増加させたマウスで再検討している。さらに、ヘテロマウスに比べて 2 倍の遺伝子発現量が期待されるホモマウスの作成をおこなうと同時に、テトラサイクリンの転写抑制を弱めた系を再構築している。

E. 結論

現在では、医学・薬学の発展により、多くの疾患が治療又は予防され、現代社会は長寿社会となっている。こうした状況下において、加齢とともに発症率が増加する癌や心臓血管障害、脳血管障害の三大疾患が日本人の死亡原因の約 6 割を占める。これら疾患の原因となる肥満、糖尿病、高血圧、高脂血症などの生活習慣病や、アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患には生体内酸化ストレスが深く関与していることが知られている。この生体内酸化ストレスの大部分は、エネルギー代謝の副産物としてミトコンドリアから発生する活性酸素が原因である。活性酸素は、ミトコンドリアに存在し、細胞内のエネルギー生産を担っている電子伝達系から電子が漏出し、近傍の酸素と反応することにより発生している。

これら疾患の解明を目的とした研究には、自然な生体環境に近い状態での生体内酸化ストレスを負荷することが可能なモデル動物が必要不可欠である。しかしながら、現在の所、このようなモデル動物は存在せず、人為的に外部から酸化剤や細胞毒性を有する電子伝達系の阻害剤を投与するか、ある

いは抗酸化系酵素を失活させるといった手法が主に使用されている。このようにミトコンドリアから発生する活性酸素の生体への直接の影響を証明する手段は存在せず、これら疾患発症の詳しいメカニズム解明は行われていなかった。

我々は、線虫やマウス培養細胞を用いた研究において、細胞内部から自然な生体環境に近い状態で生体内酸化ストレスを負荷する研究に成功している。これにより、ミトコンドリアから発生した活性酸素が老化や神経変性疾患の原因となる過剰なアポトーシスを誘導すること (Ishii N, Fujii M, Hartman PS, et al. A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome *b* causes oxidative stress and aging in nematodes. *Nature* 1998;394:694-7. / Senoo-Matsuda N, Yasuda K, Tsuda M, et al. A defect in the cytochrome *b* large subunit in complex II causes both superoxide anion overproduction and abnormal energy metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 2001;276:41553-8. / Senoo-Matsuda N, Hartman PS, Akatsuka A, Yoshimura S, Ishii N. A complex II defect affects mitochondrial structure, leading to *ced-3* and *ced-4*-dependent apoptosis and aging. *J Biol Chem* 2003;278:22031-6.)、さらに、癌発症の要因となる形質転換を高頻度に引き起こすことを明らかにしている (Ishii T, Yasuda K, Akatsuka K, et al. A mutation in the SDHC gene of complex II increases oxidative stress, resulting in apoptosis and tumorigenesis. *Cancer Res.* 2005; 65: 203-209)。

哺乳動物由来の変異SDHC遺伝子が導入されたマウスは、活性酸素種スーパーオキシドアニオン (O_2^-) が過剰に産生しており、野生型動物と比較して、成熟期以降に体重の減少を示し、かつ視覚異常、筋肉異常、及び情動行動異常を示すことが確認された。これらの結果は、ミトコンドリア由来の活性酸素が、老化や各種疾患に関与していることを示すものである。これにより、このマウスが生体内酸化ストレスを原因とする老化や老人性疾患のモデル動物として、老化の基礎研究のみならず臨床研究にも応用され、老化および老人性疾患の発症機構の解明から治療や予防（それによる医療費削減）まで幅広い分野で貢献することが期待される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Suda H, Shouyama T, Yasuda K, Ishii N, Direct measurement of oxygen consumption rate on the nematode *Caenorhabditis elegans* by using an optical technique, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 330: 839-843, 2005

Kondo M, Senoo-Matsuda N, Yanase S, Ishii N, Hartman PS, Ishii N, Effect of oxidative stress on translocation of DAF-16 in oxygen-sensitive mutants, *mev-1* and *gas-1* of *Caenorhabditis elegans*, *Mech. Ageing Develop.*, 126: 637-641, 2005

Kondo M, Yanase S, Ishii T, Hartman PS, Matsumoto K, Ishii N, The *p38* signal transduction pathway participates in the oxidative stress-mediated translocation of DAF-16 to *Caenorhabditis elegans* nuclei, *Mech. Ageing Develop.*, 126: 642-647, 2005

2. 学会発表

安田佳代、石井恭正、須田斎、後藤佐多良、赤塚明、石井直明、線虫 *C. elegans* におけるミトコンドリアの加齢変化、日本基礎老化学会

宮沢正樹、石井恭正、切無沢美香、安田佳代、石井直明、ミトコンドリアからの生体内酸化ストレスにより誘導されるアポトーシスが形質転換前後の細胞に及ぼす影響

山口卓朗、津田道雄、新井信、西尾康徳、石井直明、線虫 *C. elegans* の寿命を指標とした抗老化物質の探索システムを利用した、生薬、漢方の抗老化効果の探索、日本動物実験代替法学

網野比佐江、Wang Ting、石井直明、北潔、線虫 *Caenorhabditis elegans* ミトコンドリア電子伝達系複合体IIにおけるフラビンタンパク質サブユニットアイソフォームの機能解析、日本分子生物学会

築瀬澄乃、小野寺章、石井直明、線虫 Cu/Zn 型 SOD 遺伝子欠失変異株の寿命に関する表現型解析、日本分子生物学会

宮沢正樹、石井恭正、切無沢美香、安田佳代、石井直明、老化細胞および腫瘍細胞に

おけるミトコンドリアからの酸化ストレスによるアポトーシス誘導性シグナル伝達経路の影響、日本分子生物学会

正山哲嗣、須田斎、安田佳代、横田繁史、石井直明、堀越哲郎、線虫 *C. elegans* における代謝エネルギーの加齢変化、日本分子生物学会

小野寺章、山口卓朗、石井恭正、安田佳代、石井直明、線虫 *C. elegans* の抗老化期 (non-aging stage) における放射線障害、日本分子生物学会

横田繁史、石井恭正、安田佳代、須田斎、石井直明、酸化ストレスに関する新規遺伝子 *C03C10.6(aos-1)* の特徴、日本分子生物学会

Naoaki Ishii, The role of oxidative stress from mitochondria on aging and cancer, The International Conference on Mitochondria and Life 2005

Takamasa Ishii, Masaki Miyazawa, Mika Kirinashizawa, Kayo Yasuda, Philip S. Hartman, Naoaki Ishii, Establishment of a model animal with a mutation in respiratory chain complex II SDHC subunit overproducing superoxide anion from mitochondria, The International Conference on Mitochondria and Life 2005

Masaki Miyazawa, Takamasa Ishii, Mika Kirinashizawa, Kayo Yasuda, Naoaki Ishii, Influence of superoxide anion

overproduced from mitochondria on cellular senescence and tumorigenesis、
The International Conference on Mitochondria and Life 2005

Kayo Yasuda, Philip S. Hartman, Akira Akatsuka, Takamasa Ishii, Naoaki Ishii, The role of mitochondrial fusion on aging and oxidative stress in *C. elegans*、
The International Conference on Mitochondria and Life 2005

Naoaki Ishii, The role of oxidative stress from mitochondria on apoptosis and cancer、
The 7th Korea-Japan Joint Symposium on Cancer and Ageing Research

Koayo Yasuda, Takamasa Ishii, Hitoshi Suda, Philip S. Hartman, Sataro Goto, Naoaki Ishii, Age-related changes of mitochondrial structure and function in *C. elegans*、
The 7th Korea-Japan Joint Symposium on Cancer and Ageing Research

Takamasa Ishii, Masaki Miyazawa, Kayo Yasuda, Okio Hino, Philip S. Hartman, Naoaki Ishii, Influence of superoxide anion produced from mitochondria on cellular senescence and transformation、
The 7th Korea-Japan Joint Symposium on Cancer and Ageing Research

シンポジウム「老化の分子生物学：モデル生物からみる共通基盤」

石井恭正、石井直明、ミトコンドリアから活性酸素を過剰発生する短寿命モデル動物、

線虫からマウスへ、日本分子生物学会

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

工業所有権の名称 「哺乳動物由来の変異SDHC 遺伝子を有する遺伝子組み換え動物」

発明者 石井直明、石井恭正

工業所有権の種類、番号

特許（通常）特願 2005-139588

出願年月日 2005年5月12日

atg gct gcg ttc ttg ctg aga cat gtc agc cgt cac tgc ctc cga gcc	48
Met Ala Ala Phe Leu Leu Arg His Val Ser Arg His Cys Leu Arg Ala	
1 5 10 15	
cac ctg aat gct cag ctt tgt atc aga aat gct gct cct ttg gga acc	96
His Leu Asn Ala Gln Leu Cys Ile Arg Asn Ala Ala Pro Leu Gly Thr	
20 25 30	
aca gct aag gag gag atg gag cgg ttc tgg aag aag aac acg agt tca	144
Thr Ala Lys Glu Glu Met Glu Arg Phe Trp Lys Lys Asn Thr Ser Ser	
35 40 45	
aac cgt cct ctg tct ccc cat ttg act atc tac aaa tgg tct ctt ccc	192
Asn Arg Pro Leu Ser Pro His Leu Thr Ile Tyr Lys Trp Ser Leu Pro	
50 55 60	
atg gca ctg tcc gaa tgc cac cga ggc tct gga ata gcc ttg agt gga	240
Met Ala Leu Ser Glu Cys His Arg Gly Ser Gly Ile Ala Leu Ser Gly	
65 70 75 80	
ggg gtc tct ctt ttt ggc ctg tcg gca ctg gtg ctt cct ggg aac ttt	288
Gly Val Ser Leu Phe Gly Leu Ser Ala Leu Val Leu Pro Gly Asn Phe	
85 90 95	
gag tcg tat ttg atg ttt gtg aag tcc ctg tgt ttg ggg cca aca ctg	336
Glu Ser Tyr Leu Met Phe Val Lys Ser Leu Cys Leu Gly Pro Thr Leu	
100 105 110	
atc tac tcg gct aag ttt gtg ctt gtc ttc ccg ctc atg tac cac tca	384
Ile Tyr Ser Ala Lys Phe Val Leu Val Phe Pro Leu Met Tyr His Ser	
115 120 125	
ctg aat ggg atc cga cac ttg cta tgg gac cta gga aaa ggc ctg gca	432
Leu Asn Gly Ile Arg His Leu Leu Trp Asp Leu Gly Lys Gly Leu Ala	
130 135 140	
ata ccc cag gtc tgg ctg tct gga gtg gcg gtc gtg gtt ctt gct gtg	480
Ile Pro Gln Val Trp Leu Ser Gly Val Ala Val Val Val Leu Ala Val	
145 150 155 160	
ttg tcc tct ggc ggg ctg gcc gcc ctg tga	510
Leu Ser Ser Gly Gly Leu Ala Ala Leu	
165	

図1 SDHC遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列

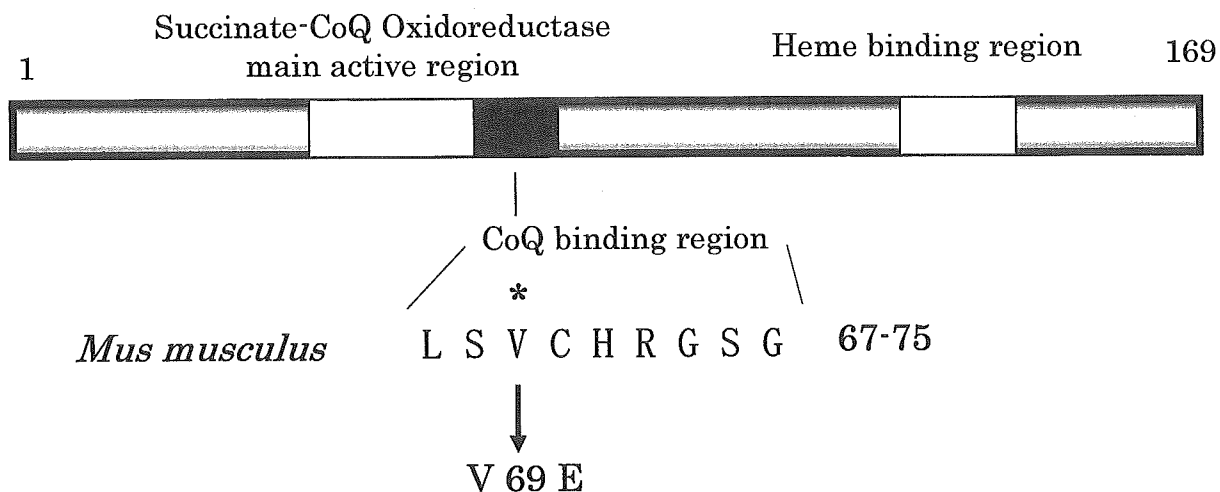
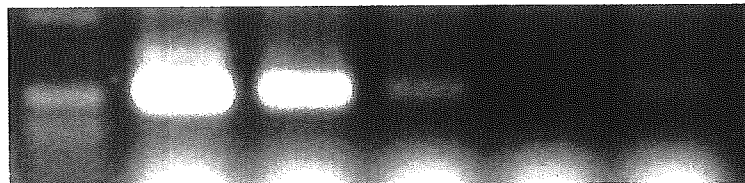


図2 SDHC変異遺伝子の構造と変異部位

1 Kbp ladder
marker 100 10 1 copy *WT mev-1* 29



WT

mev-1



図3 SDHC変異遺伝子組換えマウス (*mev-1* マウス)
上図 遺伝子発現量; 下図 マウス個体

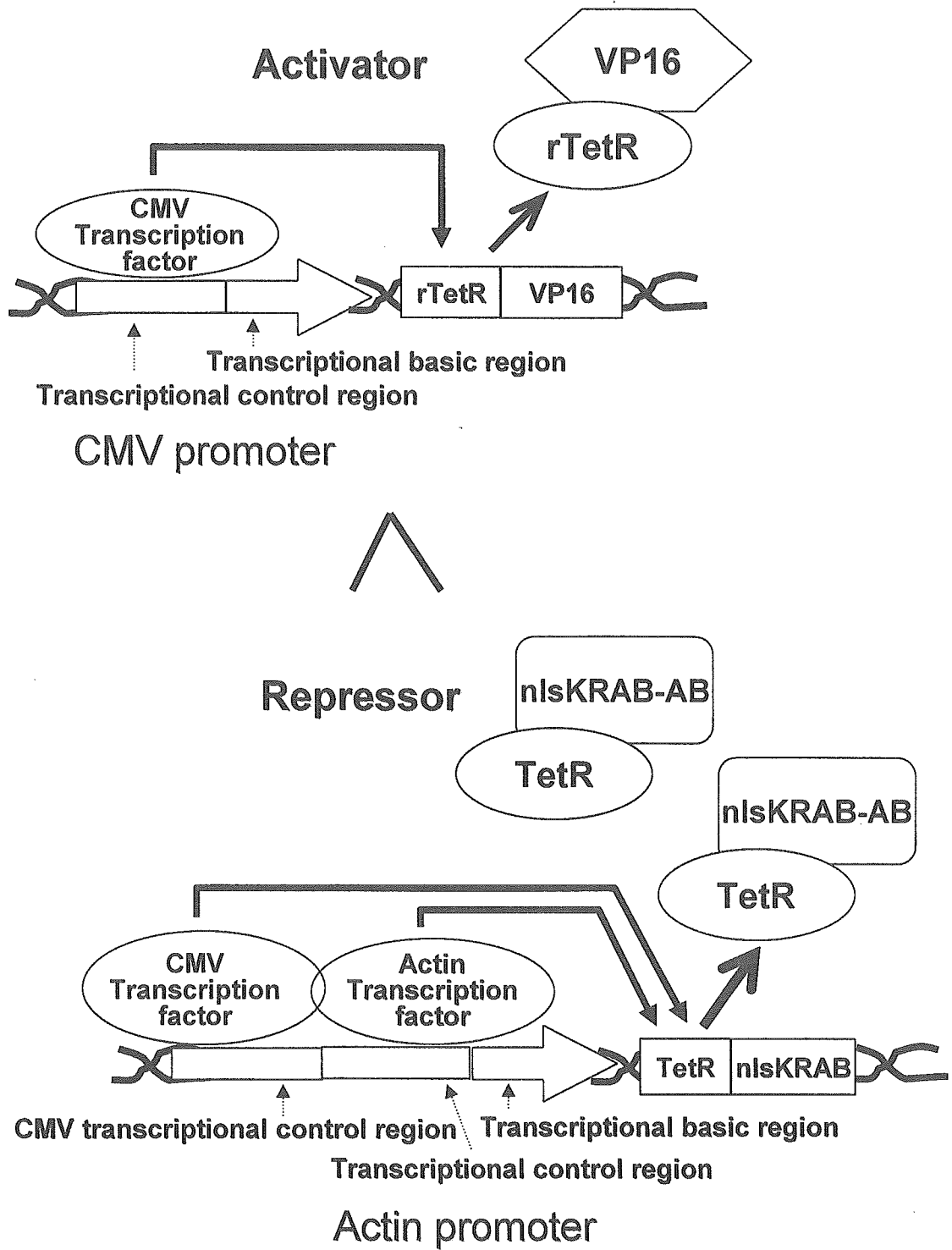


図4 Tet on/off システムの原理

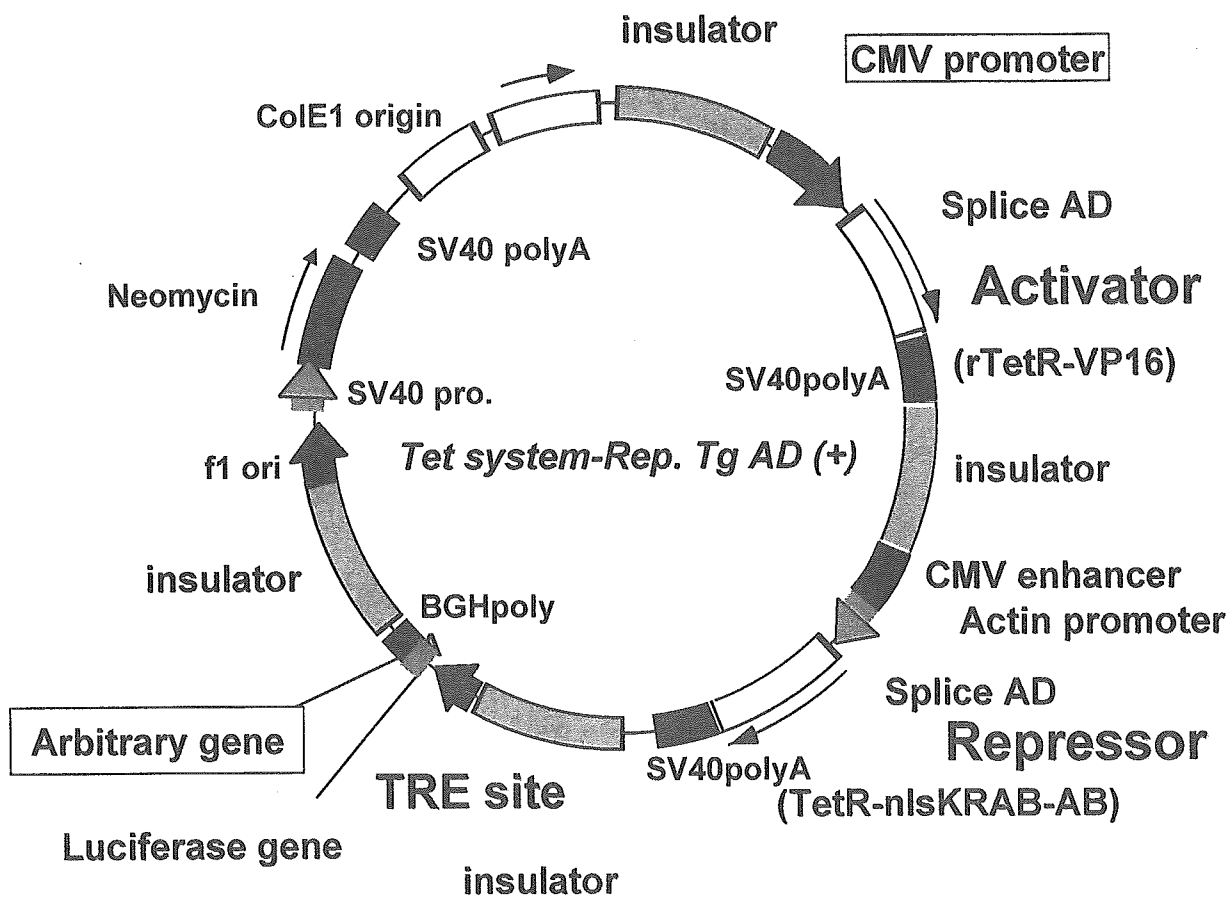


図5 条件付変異遺伝子組換えマウス作製用ベクター

WT

mev-1

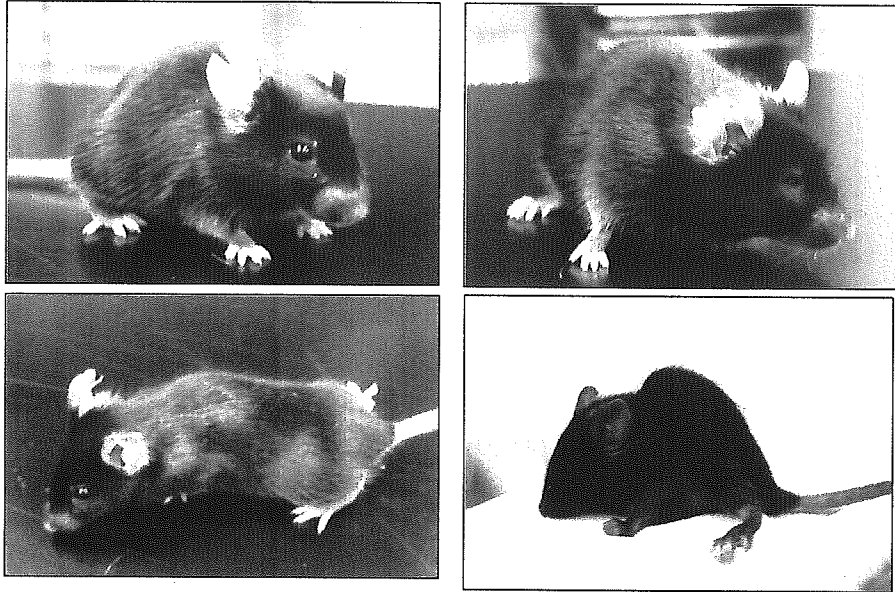


図6 SDHC変異遺伝子組換えマウス (*mev-1* マウス)

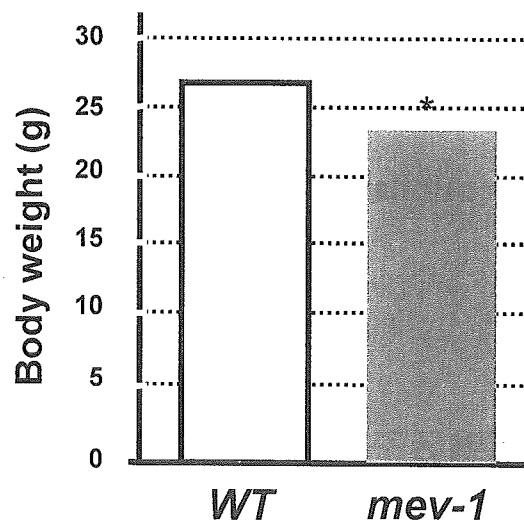


図7 体重