

図10 Tet-*mev-1* Tg/ - マウスにおける
臓器・器官別の酸化タンパク質の蓄積
(生後2~3ヶ月)

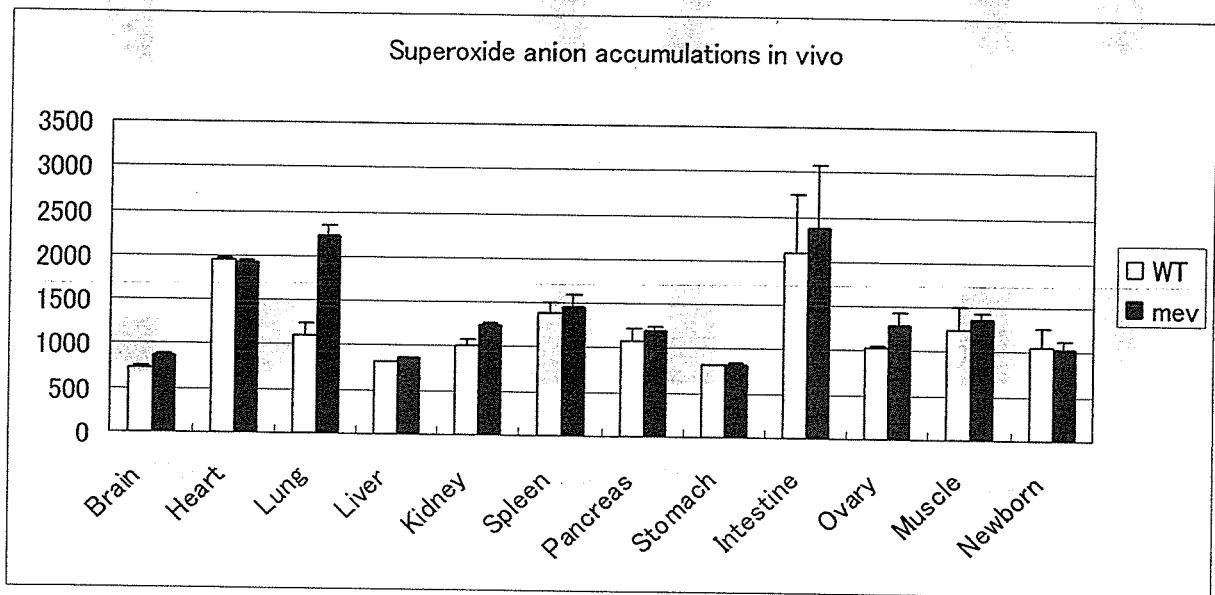


図11 Tet-*mev-1* Tg^{-/-}マウスにおける
 活性酸素(O₂⁻)発生量
 (生後2~3ヶ月)

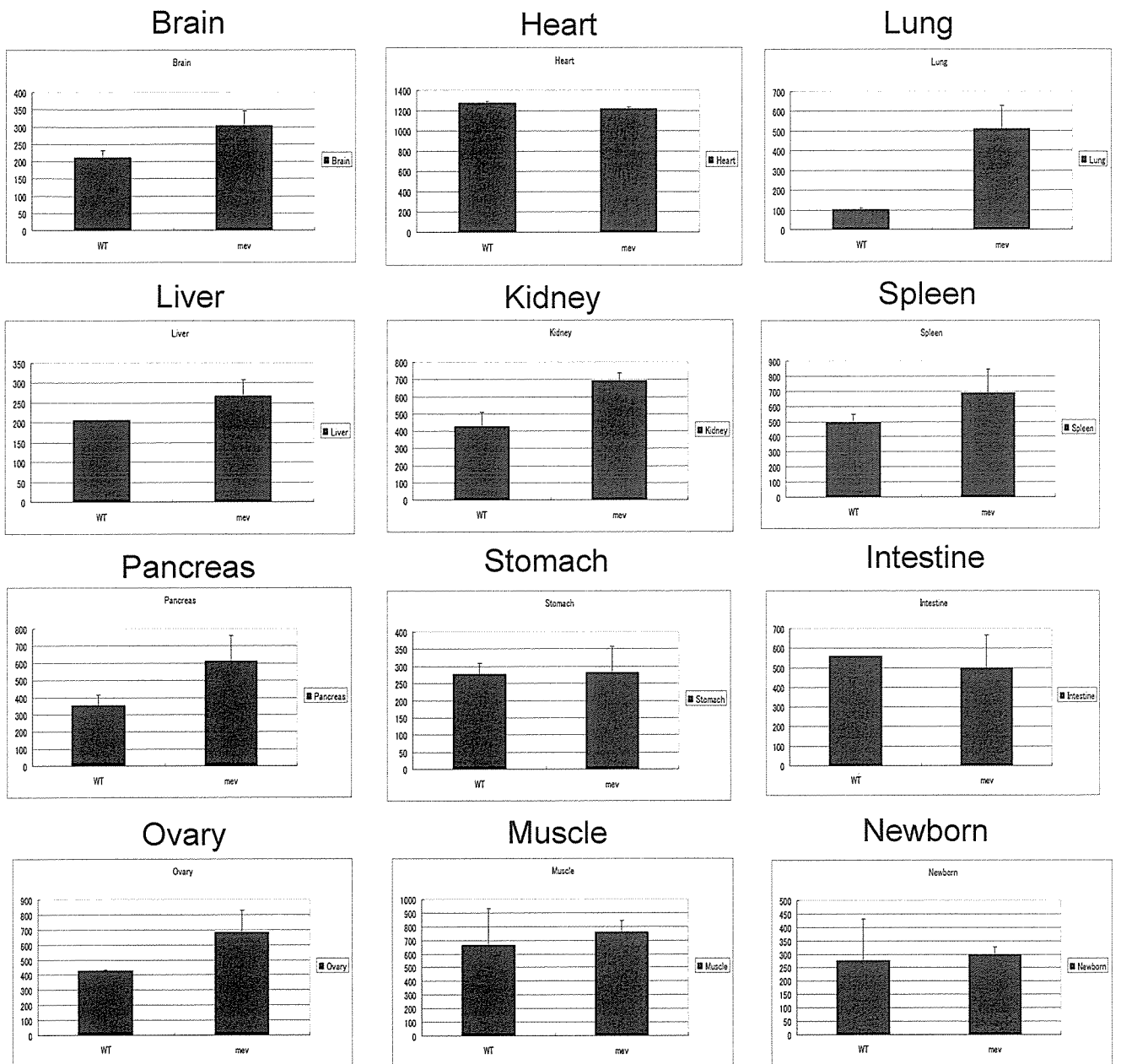
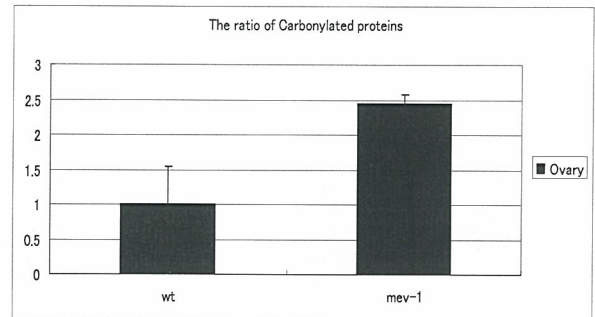
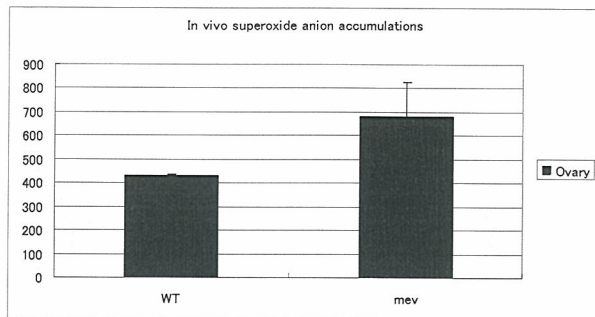


図12 Tet-*mev-1* Tg/ - マウスにおける
臓器・器官別の活性酸素(O₂⁻)発生量
(生後2~3ヶ月)



活性酸素(O_2^-)の産生量

酸化タンパク質の蓄積量

図13 Tet-*mev-1* Tg/ Tg マウスにおける
卵巣の活性酸素(O_2^-)発生量と酸化タンパク質蓄積量

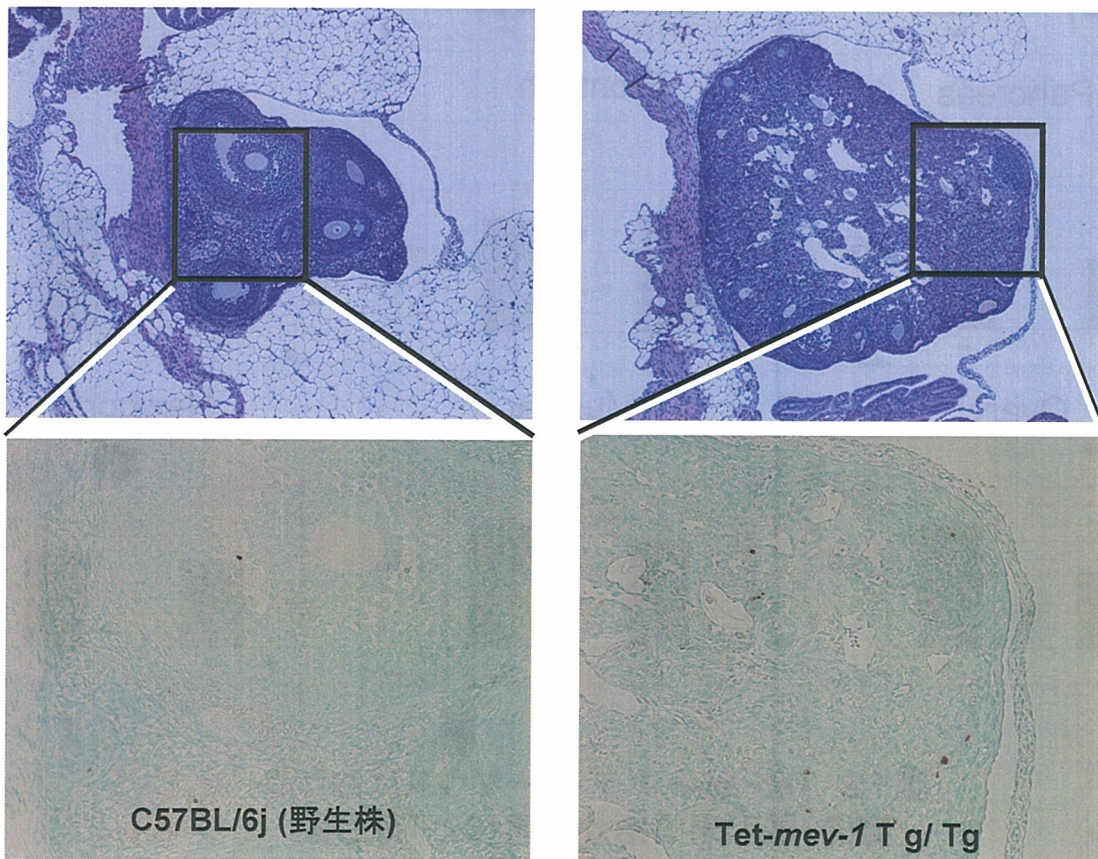


図14 Tet-*mev-1* Tg/ Tg マウスにおける
卵巣の形態形成不全と卵巣外細胞のアポトーシス

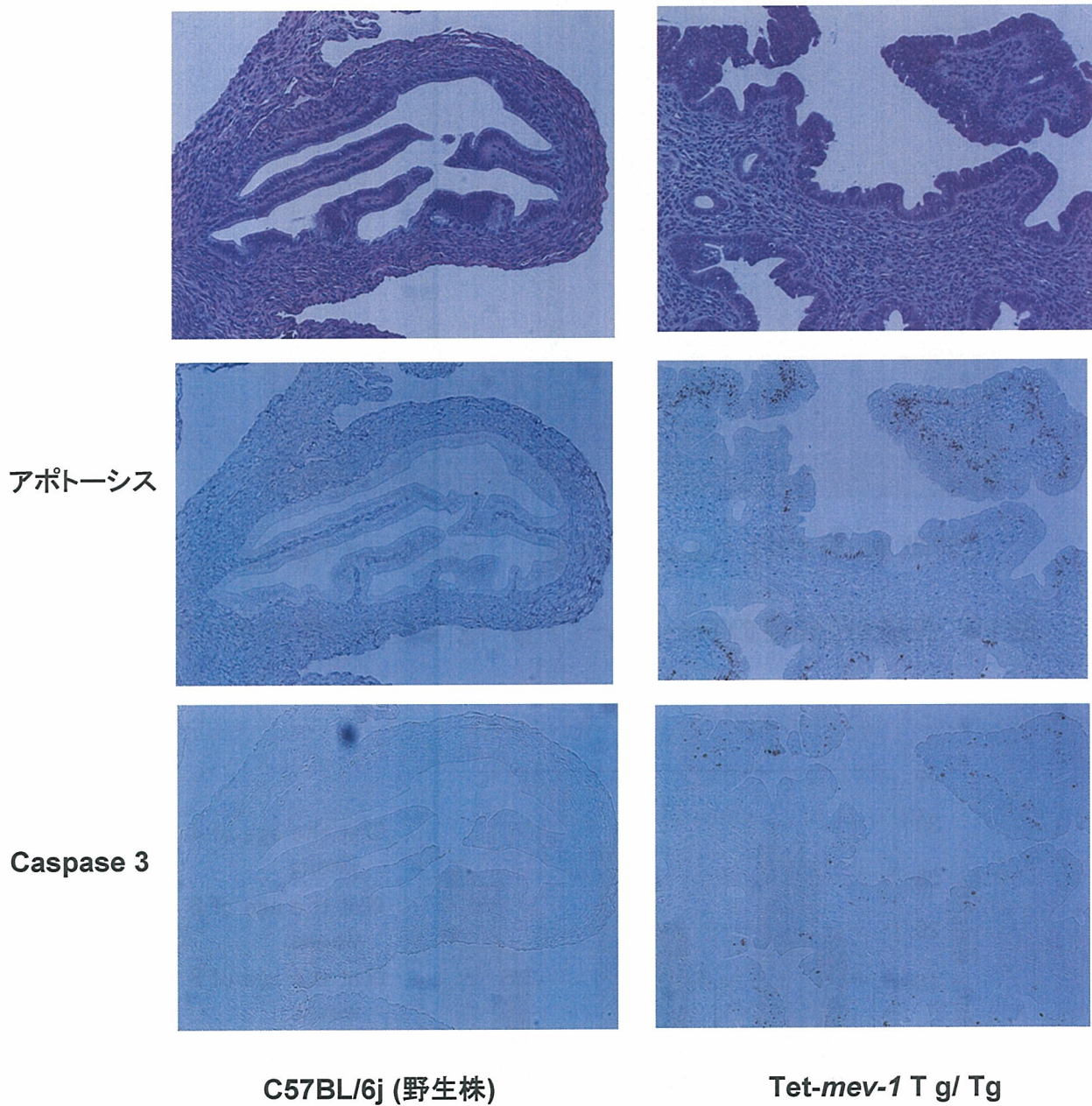


図15 Tet-*mev-1* Tg/Tg マウスにおける子宮卵管脛部のアポトーシスとcaspase 3活性



C57BL/6j (野生株) Tet-*mev-1* T g/ - Tet-*mev-1* T g/ Tg

図16 生後6週間目のTet-*mev-1* T g/ Tg マウスに体のサイズ

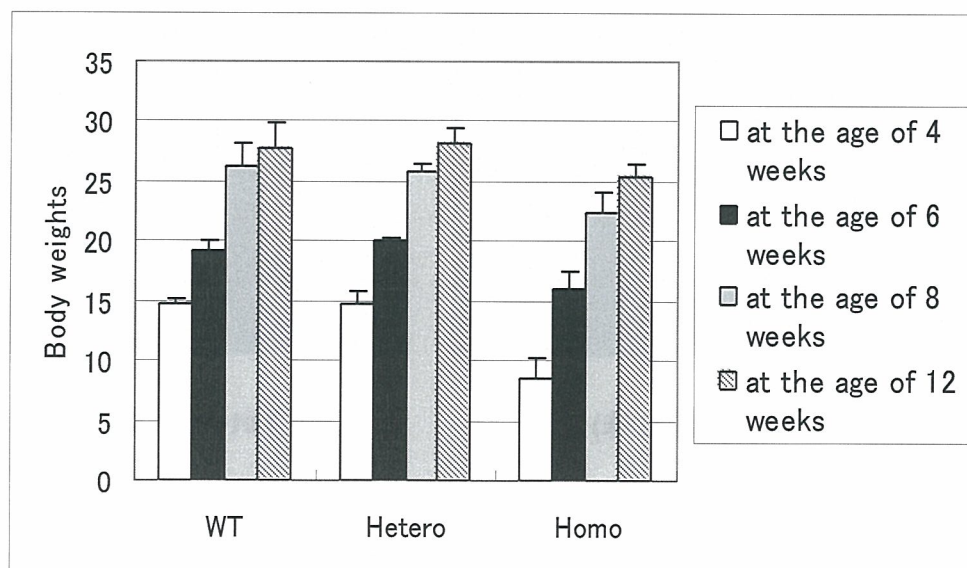


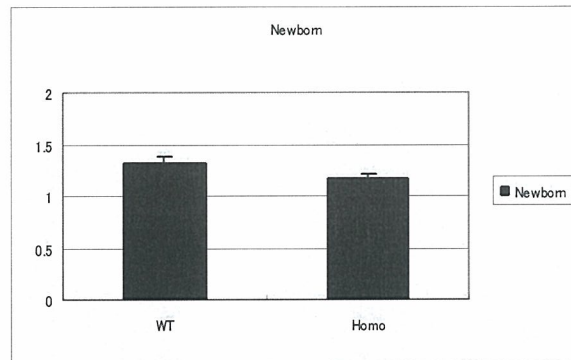
図17 Tet-*mev-1* マウスにおける加齢による体重変化



C57BL/6j (野生株)

Tet-*mev-1* Tg/Tg

体重



アポトーシス
(尾の先端)

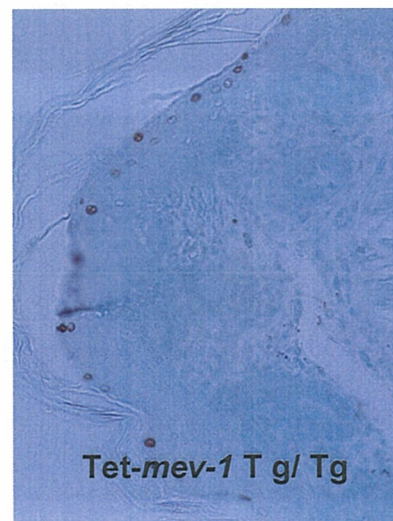
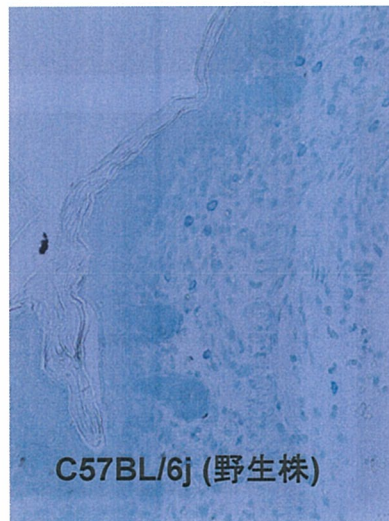
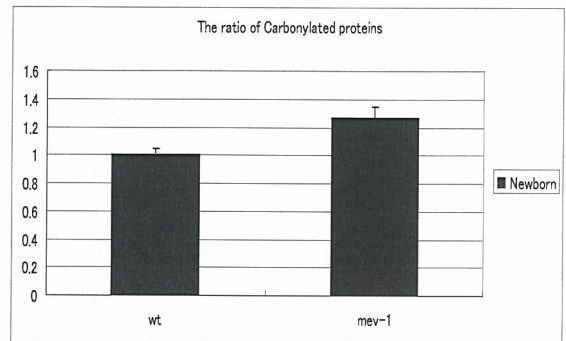
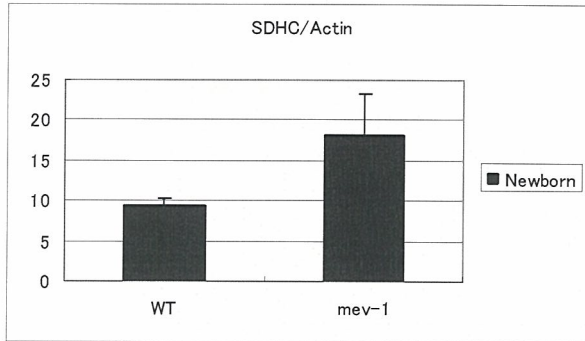


図18 Tet-*mev-1* Tg/Tg 新生児マウスにおける特徴



SDHCタンパク質量

酸化タンパク質量

図19 Tet-*mev-1* T g/ Tg 新生児マウスにおける特徴

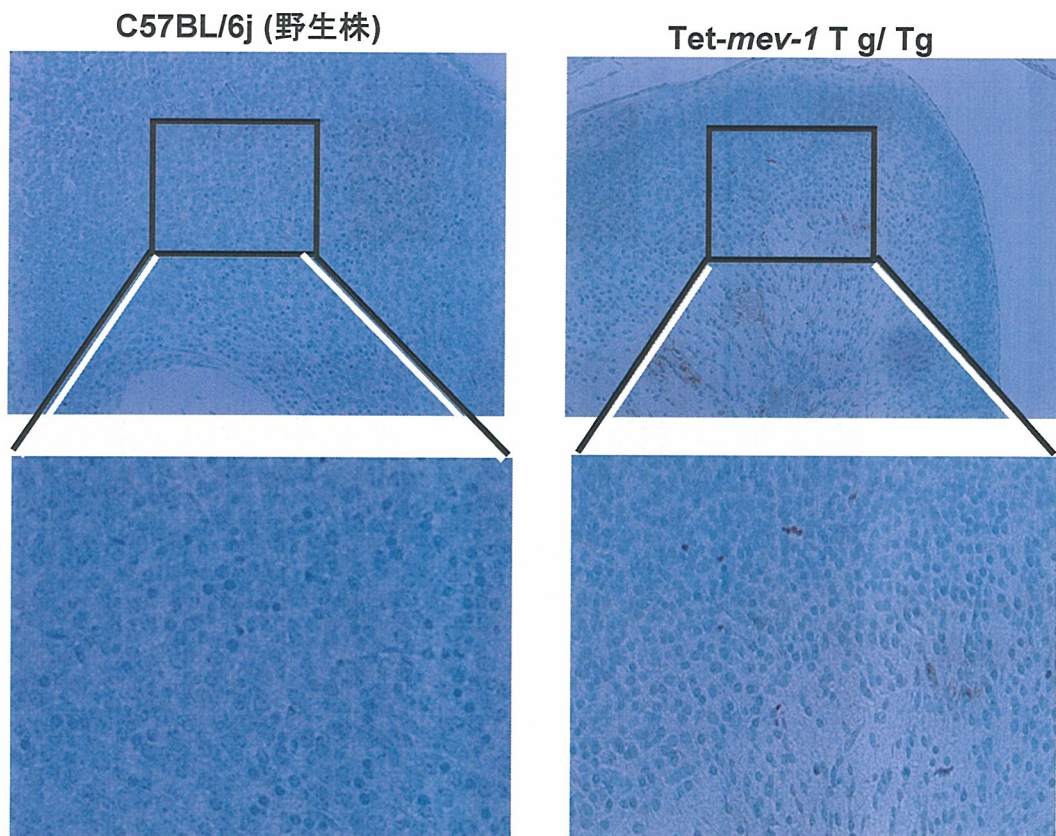


図20 Tet-*mev-1* T g/ Tg 新生児マウス終脳のアポトーシス

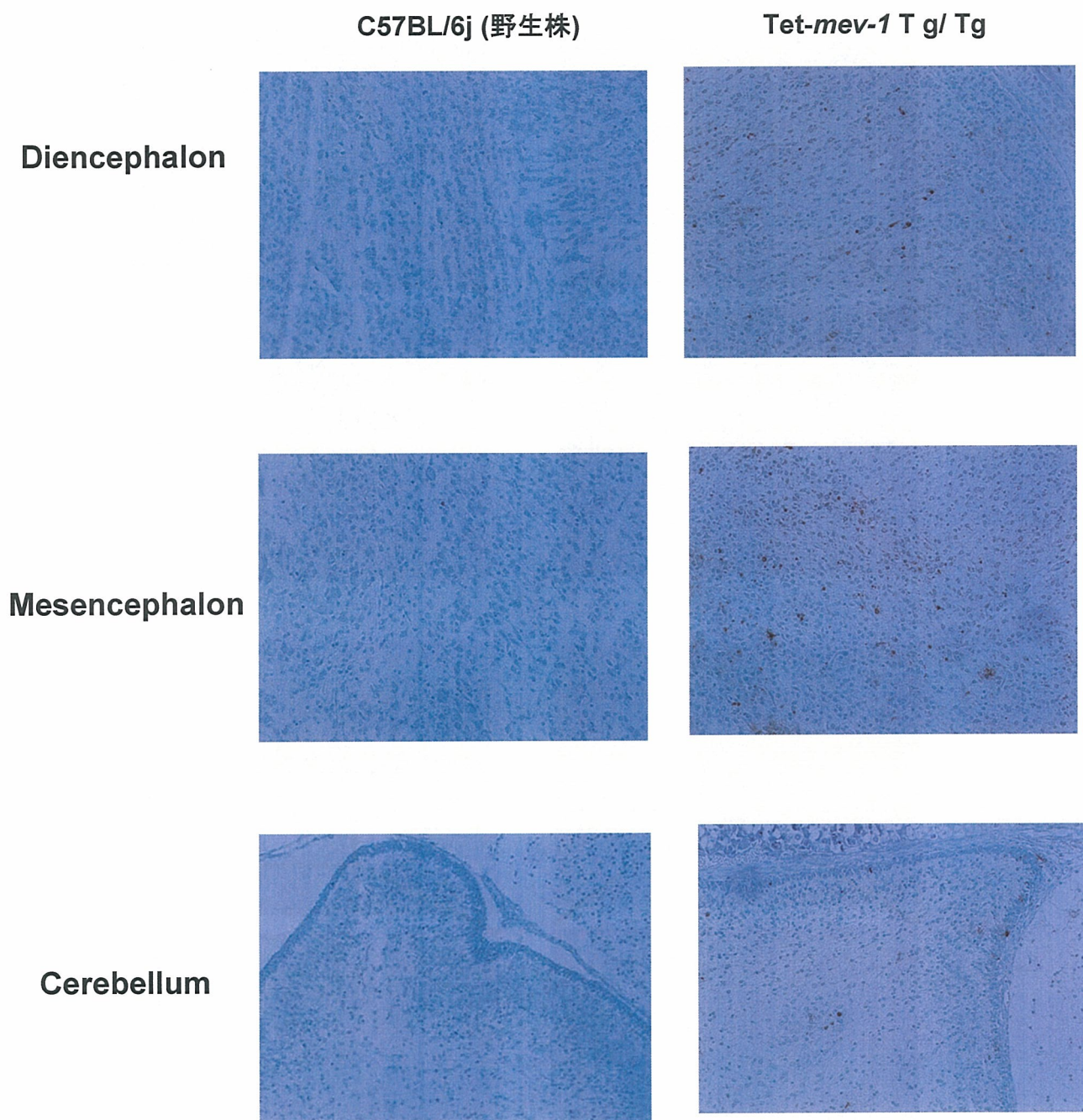


図21 Tet-*mev-1* T g/ Tg 新生児マウス脳のアポトーシス

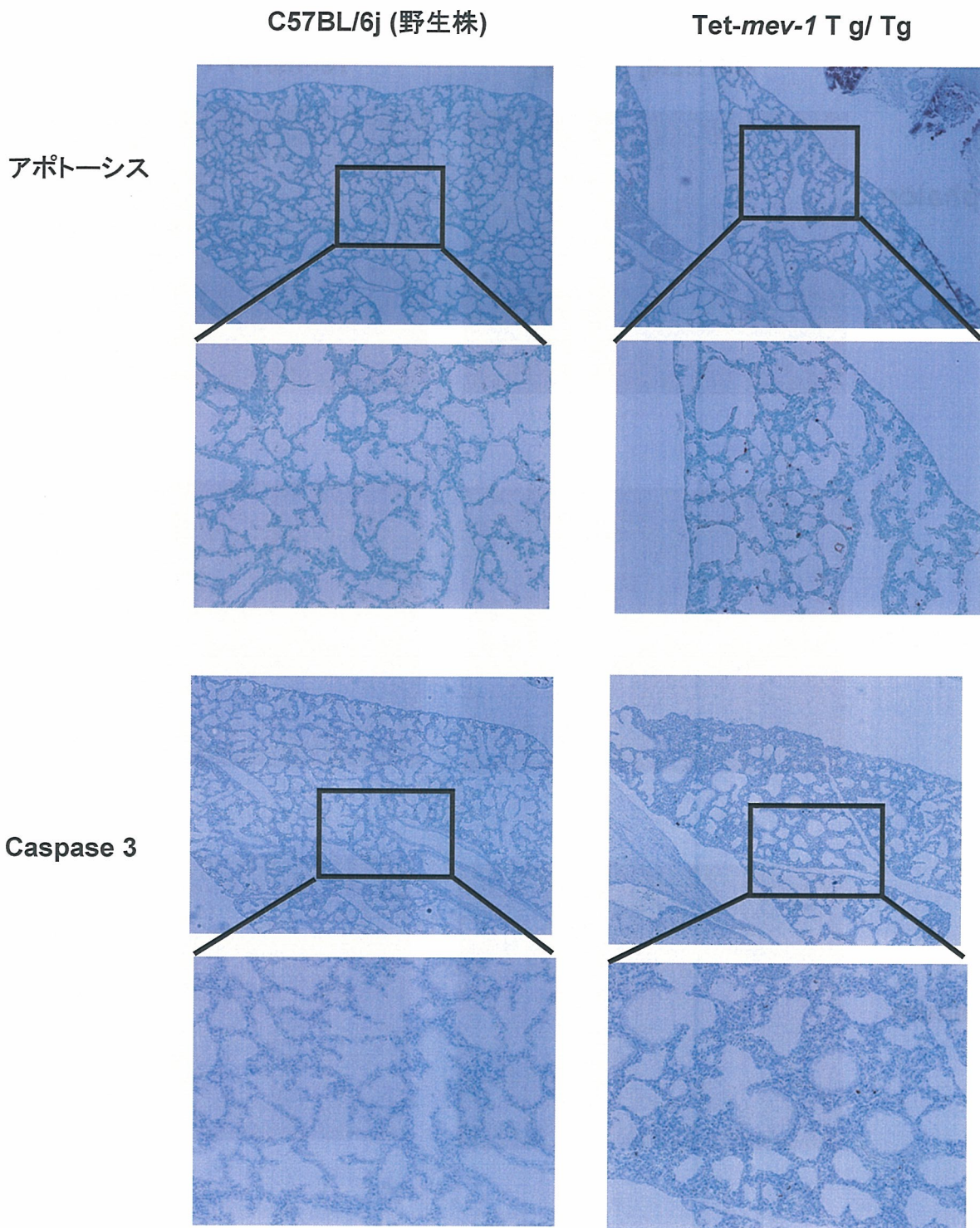
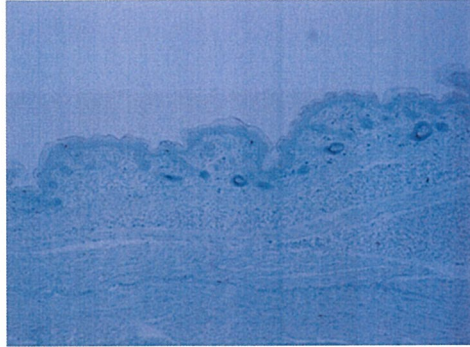


図21 Tet-*mev-1* T g/ Tg 新生児マウス肺のアポトーシス

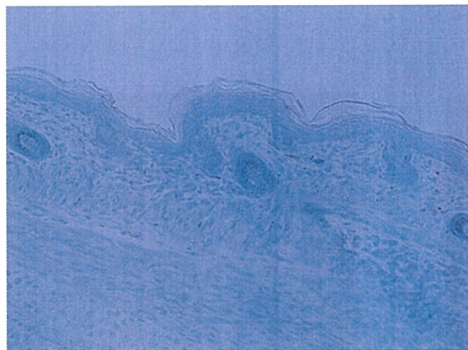
C57BL/6j (野生株)

Tet-*mev-1* T g/ Tg

Skin



Skin



Muscle
and
Adipose

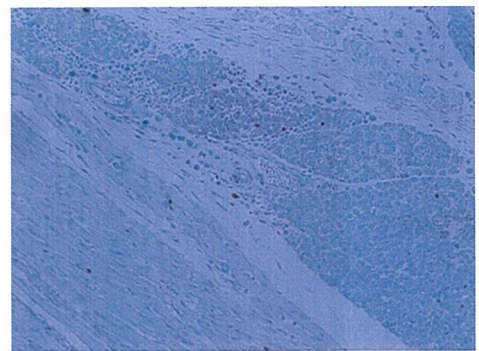
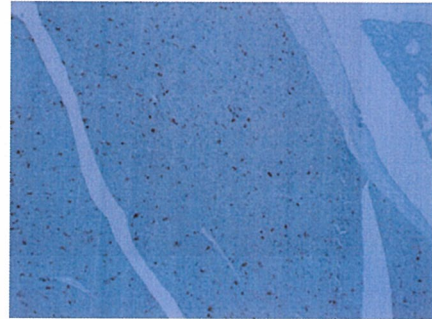


図23 Tet-*mev-1* T g/ Tg 新生児マウス皮膚、筋肉、脂肪細胞のアポトーシス

C57BL/6j (野生株)

Tet-*mev-1* Tg/Tg

Liver



Kidney



Rectum

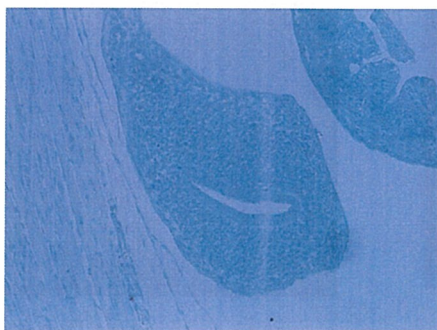


図24 Tet-*mev-1* Tg/Tg 新生児マウス肝臓、腎臓、直腸のアポトーシス

C57BL/6j (野生株)

Tet-*mev-1* Tg/Tg

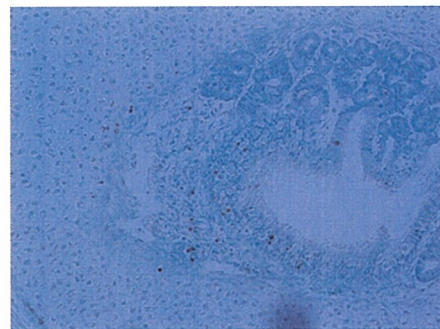
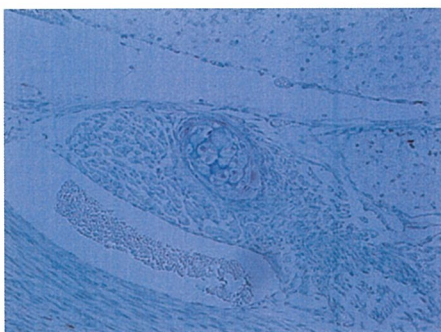
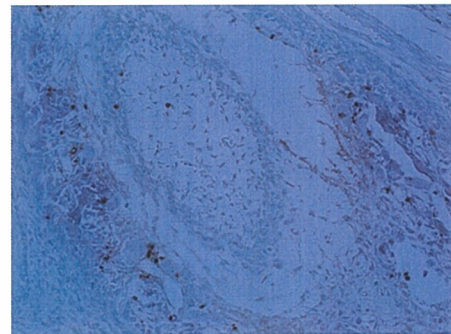
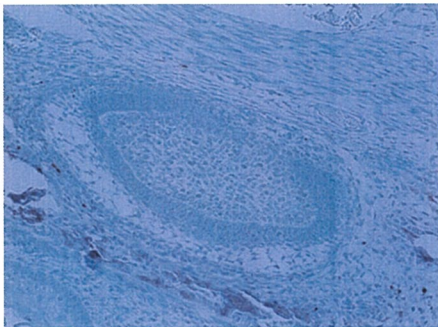
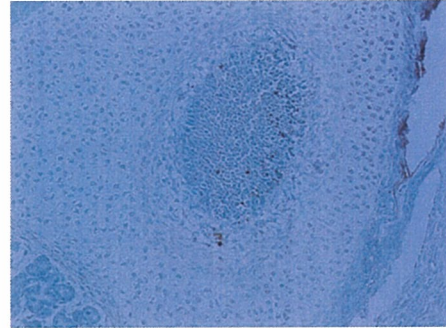
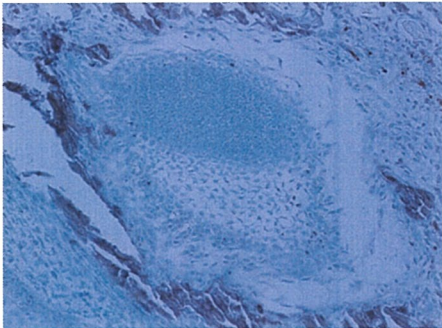


図25 Tet-*mev-1* Tg/Tg 新生児マウス鼻腔粘膜組織のアポトーシス

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

分担研究者 丸山 直記 東京都老人総合研究所 副所長

研究要旨：加齢に伴い亢進する生体内酸化ストレスの影響を病理学的に解析した。本分担研究は2つの研究から構成されている。1) 主任研究者が開発した生体内酸化ストレスの発生在任意に制御可能なコンディショナル・トランスジェニックマウス (Tet-mev-1 マウス) における病理組織像の解析を行った。現時点では解析対象の月齢および臓器には顕著な差は認められなかった。別の負荷を与える解析を行う予定である。2) 加齢に伴いペプチド中のアルギニンが酵素 PAD によりシトルリンに変換する。生体内酸化ストレスはこの変換に重要な要因であることを解明した。老化抑制分子 SMP30 はアスコルビン酸 (ビタミンC) 合成系に位置する分子であることを解明した。SMP30 の欠損個体はカルボニル化蛋白が増加することから SMP30 はアスコルビン酸 (ビタミンC) を介した生体内酸化ストレス抑制に貢献することを解明した。

A. 研究目的

老化の成立には加齢に伴い生体内酸化ストレスが亢進することが最も重要な要因として認知されている。その生体内酸化ストレスの亢進は老年病の成立に深く関わっている。従って生体内酸化ストレスによる老年病態の解析とその抑制は高齢者医療に大きく貢献するものである。本分担研究は2つの項目から構成される。1つは主任研究者である石井直明等が発見・解析したミトコンドリア中の電子伝達系複合体IIを担っているシトクローム b 遺伝子に変異を有するモデル動物系を用いた生体内酸化ストレスによる老年病態の解析である。もう1つは酸化ストレスによる生体内分子の変化や酸化ストレス除去による老年病の抑制に貢献する研究成果を得ることである。

B. 研究方法

ミトコンドリアにおける活性酸素発生や発生時期が任意に制御可能となるコンディショナル・トランスジェニックマウス (Tet-mev-1 マウス) の組織病理学的は6ヶ月齢の遺伝子改変マウスと野生型マウスをテトラサイクリ

ン投与により meV-1 遺伝子を活性化し生体内酸化ストレスの亢進を誘導した。その後、摘出した臓器を病理組織学的に解析した。

酸化ストレス亢進により誘導される2種類の生体内分子修飾について解析した。ペプチド中に含まれるアルギニン残基は高濃度のカルシウム存在下でペプチジルアルギニンデイミナーゼ (PAD) によりシトルリン残基に変換される。塩基性にアルギニンから中性のシトルリンへの変換は大きな立体構造の変化も伴うことが知られている。我々はこの立体構造の変化を検出する系を開発した。この検出系を用いて細胞レベルにおける酸化ストレス亢進によるシトルリン化分子の出現を解析した。もう1種類の生体内分子修飾は蛋白分子のカルボニル化である。解析対象は齧歯類では酸化ストレスに対して抑制的に作用するアスコルビン酸 (ビタミンC) の合成酵素として機能する SMP30 が欠損した動物におけるカルボニル化 (酸化) 蛋白質を検出した。生体内酸化ストレスの抑制に関わるアスコルビン酸の役割を解析した。

C. 研究結果

Tet-mev-1 マウスに生体内酸化ストレスを誘導した実験系における病理組織解析を行った。現在までの解析では病理組織学的には顕著な差異は認められなかった。生体内酸化ストレスが亢進したマウスの神経組織においては軽度の dark cell の増加を認めるのみであった。

酸化ストレスによるシトルリン化分子の増加を SH-SY5Y 細胞を用いて同定した。SH-SY5Y 細胞内に発現する PAD のシトルリン化機能を確認するために細胞抽出液にカルシウムを加えて 37°C で 1 時間インキュベーションを行った。その後、抗シトルリン化抗体で Western blotting を行い細胞抽出液内にシトルリン化分子が含まれることを確認した。この条件下で SH-SY5Y 細胞に 50 μ M の濃度で 6-ヒドロキシドーパミン (6-OHDA) を 2 時間負荷した。同様に Western blotting を行ったところ 6-OHDA 負荷 (酸化ストレス負荷) によりシトルリン化蛋白質が出現することが明らかとなった (図 1)。

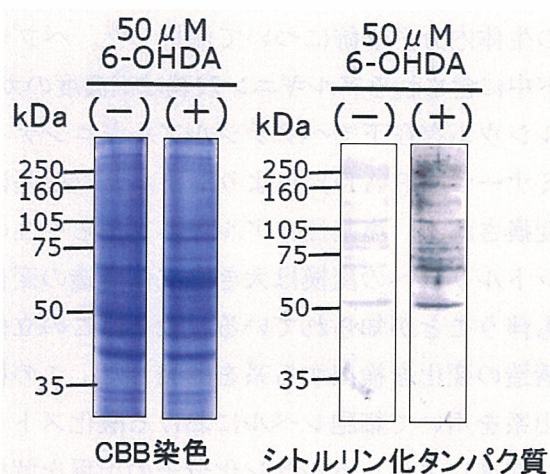


図 1. SH-SY5Y 細胞への酸化ストレスによるシトルリン化分子の出現

この実験の酸化ストレスにより出現したシトルリン化分子は質量分析計により解析された。細胞骨格蛋白に分類されるものであるとの結果を得たが、現在確認中である。シトルリン化分子の誘導には酵素 PAD が必須であるが酸化ストレスにより PAD の発現が亢進

するのかを検討した。今回の実験系では酸化ストレスによる明らかな PAD の発現亢進は認められなかった。一方、レチノイン酸を添加することにより PAD のサブタイプである PAD 2 のみ、発現亢進することが認められた (図 2)。他のサブタイプである PAD1, PAD3, PAD4/5 は検出できなかった。

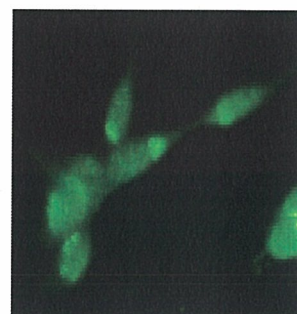


図 2 a SH-SY5Y 細胞における PAD2 発現

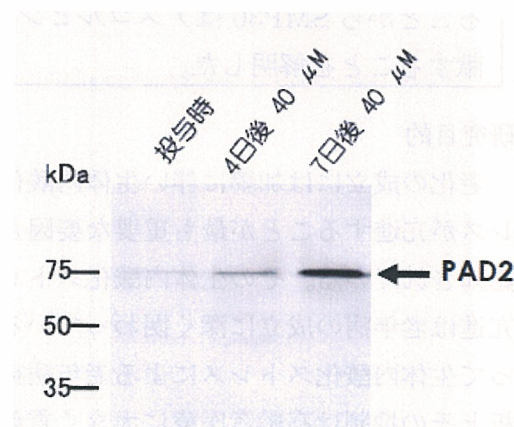


図 2 b レチノイン酸による PAD2 発現亢進

Tet-mev-1 マウスにおける生体内酸化ストレス亢進による病態解析に資するために酸化ストレス抑制機能を有する SMP 30 の解析も併せて行った。SMP 30 は加齢に伴い減少する分子として発見された。最近、その機能の一部が解明された。分担研究者等は SMP 30 が以前から酵素活性自体が検出されていたグルコノラクトネースであることを明らかにした。齧歯類ではグルコノラクトネースはアスコルビン酸 (ビタミン C) の合成に関与する酵素である。アスコルビン酸 (ビタミン C) は抗酸化ストレス機能を有することから SMP 30 欠損マウス臓器におけるアスコルビン酸 (ビタミン C) 含量およ

び酸化ストレスの程度を解析した。SMP 30欠損マウス臓器（血漿、肝臓、腎臓）ではアスコルビン酸（ビタミンC）が極めて低値であることが明らかとなった。

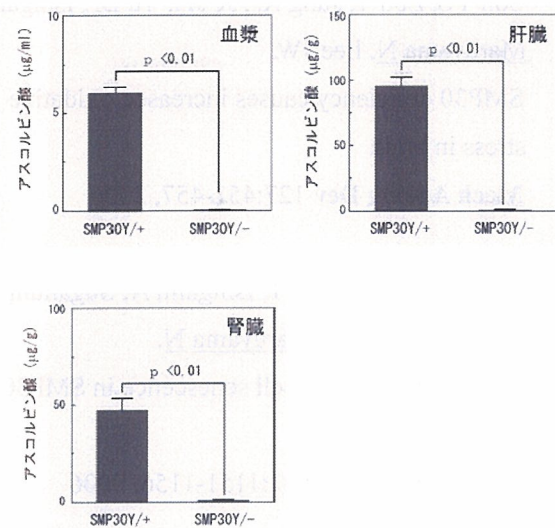


図3 SMP30欠損マウス(SMP30Y/-)では野生型(SMP30Y/+)と比較して著しくアスコルビン酸(ビタミンC)の濃度が低値である。

次に臓器における酸化ストレスの指標となるカルボニル化蛋白質の定量を行った(図4)。SMP30の欠損により酸化ストレスが亢進することがカルボニル化蛋白質の増加により証明された。この結果はSMP30がアスコルビン酸(ビタミンC)合成に関与するため、抗酸化ストレス能が低下するためである。

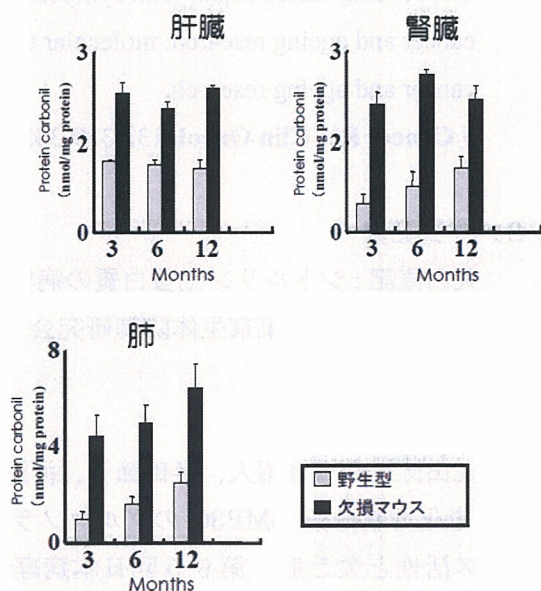


図4 SMP30欠損に伴う臓器のカルボニル化蛋白質の増加

このような酸化ストレスに対する抵抗性の低下は喫煙による肺胞破壊指数の増加として表現されることも明らかとなった。図5の実験例では喫煙により酸化ストレスが著しく増加した。しかしアスコルビン酸(ビタミンC)投与によりカルボニル化蛋白質の減少を観察している。

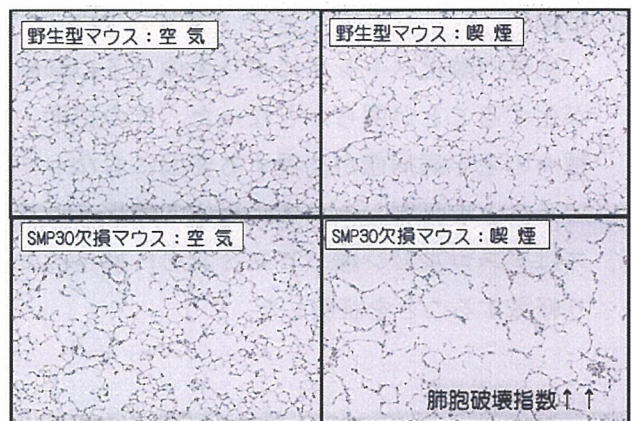


図5 SMP30欠損マウスと野生型マウスに喫煙をさせて肺組織を観察した。SMP30欠損と喫煙により肺胞が破壊されCOPDの素因となる。

D. 考察

Tet·mev-1マウスにおいて生体内酸化ストレスが亢進しているにもかかわらず、顕著な病理組織学的差異が認められなかったが、観察した月齢が6ヶ月であり、他の遺伝子変換マウスと比較するとやや早期であった可能性が考えられた。分担研究者の研究経験からは更に喫煙に類した負荷を与えることにより顕著な差異が出現する可能性は存在する。

生体内酸化ストレスの亢進によりシトルリン化分子およびカルボニル化蛋白質が増加することが明らかとなった。分担研究者が以前に報告したアルツハイマー病脳に出現する細胞骨格を構成する分子のシトルリン化は酸化ストレスが関与していることが明らかとなった。酸化ストレスは加齢に伴い増加すること

から、アルツハイマー病の脳病変の成立には加齢に伴う酸化ストレスを無視できないと考えられる。また老年病として重要な慢性閉塞性呼吸器疾患 (COPD) の成立には喫煙による酸化ストレスの亢進が重要であると考えられる。このような酸化ストレスの亢進もアスコルビン酸 (ビタミンC) の投与により軽減が可能となる。これらの研究成果は特に高齢者における疾病予防に貢献すると考えている。

E. 結論

生体内酸化ストレスにより生体分子の修飾が生ずることが明らかとなった。その結果、種々の老年病病態が出現する要因にもなっていることを証明した。また生体内酸化ストレスはアスコルビン酸 (ビタミンC) 投与により軽減することを証明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Shigemoto K, Kubo S, Maruyama N Hato N, Yamada H, Chen J, Kobayashi N, Mominoki K, Abe Y, Ueda N, Matsuda S.

Induction of myasthenia by immunization against muscle-specific kinase.

J Clin Inv 116:1016-1024, 2006

Kondo Y, Inai Y, Sato Y, Handa S, Kubo S, Shimokado K, Goto S, Nishikimi M, Maruyama N, Ishigami A.

Senescence marker protein 30 functions as gluconolactonase in L-Ascorbic acid biosynthesis and its knockout mice are prone to scurvy.

Proc Natl Acad Sci, USA 103:5723-5728, 2006

Jung KJ, Chung HY, Maruyama N, Ishigami A, Yu BP.

The redox-sensitive DNA binding sites responsible for the age-related down-regulation of SMP30 by the ERK pathway and its reversal by calorie

restriction.

Antioxidants and Redox Signaling 8:671-680
2006

Son TG, Zou Y, Jung KJ, Je JH, Yu BP, Ishigami A, Maruyama N, Lee JW.

SMP30 deficiency causes increased oxidative stress in brain

Mech Ageing Dev 127:451-457, 2006

Yumura W, Imasawa T, Ishigami A, Suganuma S, Handa S, Kubo S, Maruyama N.

Accelerated tubular cell senescence in SMP30 knockout mice.

Histol Histopathol 21:1151-1156, 2006

Sato T, Seyama K, Sato S, Mori H, Souma S, Akiyoshi T, Kodama Y, Mori T, Goto S,

Takahashi K, Fukuchi Y, Maruyama N, Ishigami A.

Senescence Marker Protein-30 protects mice lungs from oxidative stress, aging and smoking.

Am J Respir Crit Care Med 174:530-537, 2006

Park SC, Lim IK, Koh GY, Surh YJ, Lee YS, Fujiki H, Yamamoto T, Yuasa Y, Maruyama N, Goto S.

The seventh Korea-Japan joint symposium on cancer and ageing research: molecular targets in cancer and ageing research.

J Cancer Res Clin Oncol. 132:339-342, 2006

2. 学会発表

丸山直記: シトルリン化蛋白質の病態生理学的意義. 第2回 東京生体防御研究会
2006.1.16 東京

丸山直記、石神昭人、半田節子、河野葉子: 老化抑制分子 SMP30 のグルコノラクトネース活性と欠乏症. 第95回日本病理学会総会

2006.4.30-5.2 東京都

重本和宏、久保幸穂、阿部康人、植田規史、丸山直記：抗 MuSK 抗体を起因とする重症筋無力症発症機序。第 95 回日本病理学会総会 2006.4.30-5.2 東京都

佐藤 匡、瀬山邦明、石神昭人、丸山直記
加齢に伴う呼吸器疾患モデルとしての
SMP30 欠損マウスの有用性の検討。第 95 回
日本病理学会総会 2006.4.30-5.2 東京都

丸山直記、石神昭人、下門顕太郎：
ApoE/SMP30 ダブルノックアウトマウスにお
ける動脈硬化巣の形成抑制。日本老年医学会
2006.6.7-9 金沢市

今澤俊之、横山司甫、西村元伸、服部俊治、
山本正敏、北村博司、丸山直記、城 謙輔：
タイプ IV コラーゲン NC1 領域精製抗原を用
い尿検査にて糸球体及び尿細管基底膜障害を
検出する検査法。第 49 回 日本腎臓学会
2006.6.14-16 東京都

佐藤安訓、井内陽子、錦見盛光、後藤佐多良、
丸山直記、石神昭人：SMP30 はアスコルビン
酸合成経路の重要な酵素である。第 29 回
日本基礎老化学会 2006.6.15-16 長崎市

近藤嘉高、岩佐嘉洋、島田信子、福田 貢、
下門顕太郎、丸山直記、石神昭人：グルコノ
ラクトナーゼ活性は加齢で低下する。第 29
回日本基礎老化学会 2006.6.15-16 長崎市

山本尚吾、浦野四郎、久保幸穂、丸山直記、
石神昭人：SH-SY5Y 細胞においてシトルリン
化蛋白質が酸化ストレスにより誘導される。
第 29 回日本基礎老化学会 2006.6.15-16
長崎市

遊長由希、半田節子、島田信子、福田 貢、
町田武生、丸山直記、石神昭人：アストロサ
イトにおける PAD 活性機構の解明。第 29 回
日本基礎老化学会 2006.6.15-16 長崎市

Son TG, Kim SJ, Kim KH, Ishigami A, Maruyama
N, Lee J: Increase of senescence marker protein 30
in kainite-induced hippocampal damage is
involved in the ERK-mediated astrocytosis. The
6th Korea-Japan Gerontologist Joint Meeting,
Chuncheon, Korea, 2006.6.22

Maruyama N : Aging study; Chaos as a resource.
The 8th International Symposium on Vascular Aging
and Age-related Angiogenesis, Pusan, Korea
2006.8.24

丸山直記：加齢指標蛋白質 SMP30 の機能解析
と応用。日本分子生物学会 2006 フォーラム。
(SMP30) and its neurological aspects in aging.
International Symposium for Aging Science, Seoul,
Korea 2006.12.14

Maruyama, N : Biological functions of Senescence
Marker Protein 30 (SMP30) and its nutritional
aspects in ageing. Bhubaneswar, India
2006.12.22-24

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yasuda K Ishii T Suda H Akatsuka A Hartman PS Goto S Miyazawa M Ishii N	Age-related changes of mitochondrial structure and function in <i>Caenorhabditis elegans</i>	Mech. Ageing Develop.	127	763-770	2006
Ishii N Ishii T Hartman PS	The role of the electron transport gene SDHC on lifespan and cancer	Exp. Geront.	41	952-956	2006
石井恭正、 石井直明	ミトコンドリアから生じる活性酸素が起因となる老化と老年性疾患	生化学	78	201-207	2006
石井直明	総説：人はなぜ老いるのか—個体老化・寿命のメカニズム—	日本消化器病学会誌	103	143-148	2006
石井直明	ミトコンドリアと寿命	医学のあゆみ	217	748-751	2006
石井直明	長寿の遺伝子	肝胆脾	53	31-38	2006
石井直明	フリーラジカルとアンチエイジング	あたらしい眼科	23(10)	1245-1250	2006
Shigemoto K Kubo S Maruyama N Hato N Yamada H Chen J Kobayashi N Mominoki K Abe Y Ueda N Matsuda S.	Induction of myasthenia by immunization against muscle-specific kinase.	J Clin Inv	116	1016	2006
Kondo Y, Inai Y, Sato Y, Handa S Kubo S Shimokado K Goto S Nishikimi M Maruyama N Ishigami A	Scenescence marker protein 30 functions as gluconolactonase in L-Ascorbic acid biosynthesis and its knockout mice are prone to scurvy.	Proc Natl Acad Sci, USA	103	5723-5728	2006

Jung KJ Chung HY <u>Maruyama N</u> Ishigami A Yu BP	The redox-sensitive DNA binding sites responsible for the age-related down-regulation of SMP30 by the ERK pathway and its reversal by calorie restriction.	Antioxidants and Redox Signaling	8	671-680	2006
Son TG, Zou Y Jung KJ Je JH Yu BP Ishigami A <u>Maruyama N</u> Lee JW.	SMP30 deficiency causes increased oxidative stress in brain	Mech Ageing Dev	127	451-457	2006
Yumura W Imasawa T Ishigami A Suganuma S Handa S Kubo S <u>Maruyama N</u>	Accelerated tubular cell senescence in SMP30 knockout mice.	Histol Histopathol	21	1151-1156	2006
Sato T Seyama K Sato S Mori H Souma S Akiyoshi T Kodama Y Mori T Goto S Takahashi K Fukuchi Y <u>Maruyama N</u> Ishigami A.	Senescence Marker Protein-30 protects mice lungs from oxidative stress, aging and smoking.	Am J Respir Crit Care Med	174	530-537	2006
Park SC Lim IK Koh GY Surh YJ Lee YS Fujiki H, Yamamoto T Yuasa Y <u>Maruyama N</u> Goto S.	The seventh Korea-Japan joint symposium on cancer and ageing research: molecular targets in cancer and ageing research.	J Cancer Res Clin Oncol.	132	339-342	2006