
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

厚生労働省科学研究費補助金 長寿科学総合研究事業

平成17-19年度 総合研究報告書

平成20(2008)年3月

主任研究者 石 井 直 明

目 次

I.	総合研究報告	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	
	丸山直記	
II.	研究成果の刊行に関する一覧表	20
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

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：生体内から生じる活性酸素が原因となる老年性疾患の発症機構を解明し、その予防方法を見出すことを目的とした。野生型マウスの酸化ストレスや抗酸化に対する加齢変化は臓器や組織により大きく異なるが、酸化ストレスが生理的老化に関与していることが明らかとなった。酸化ストレスの研究には酸化ストレスの発生と抑制の両面からの研究が必要となってくる。このことから酸化ストレスに関係し、早老症の症状を示す *mev-1* マウス（ミトコンドリアからの活性酸素過剰発生マウス）や SMP-30 マウス（ビタミンC合成欠損マウス）が老化や老化に関わる疾患の機構の解明やその予防の研究に適したモデル動物になることが示唆された。また *C. elegans* を指標としたシステムが抗酸化物質の探索に最適であることを示唆した。

A. 研究目的

酸素は生命活動に必要な ATP の生合成に不可欠だが、体内に取り込まれた酸素の数%はミトコンドリア電子伝達系（主に複合体 I と III）から漏出した電子により 1 電子還元を起こしスーパーオキシドアニオン (O_2^-) となる。そして O_2^- は代謝され過酸化水素 (H_2O_2) やヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) となる。これらは活性酸素種 (ROS) と呼ばれ、他の物質のとの反応性が非常に高く、細胞内構成成分を酸化することで機能異常を引き起こし、老化の促進や様々な疾患の原因となるとされる。本来、ミトコンドリアで発生した O_2^- は抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) により H_2O_2 となり、さらにカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px) により無害な H_2O へと代謝されることで、生体は ROS による障害を防ぎつつ ATP を合成している。

活性酸素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た。石井らは、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（老人班）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。一方、丸山らは、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 が欠損したマウスが早老症の表現形を示すことを見出し、SMP-30 マウスが酸化と老化の関係を明らかにする有用なモデル動物になることを示した。

寿命や老化の速度は酸化ストレスの発生量と抗酸化能力のバランスによって決定されていることから、この両面からの研究を融合する必要がある。本研究ではミトコンドリアから活性酸素が過剰に発生する *mev-1* 変異マウスとビタミンCの合成能力を欠損した SMP-30 マウスの解析から、活性酸素による老化に関わる疾患の研究を行った。

本研究では、(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生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変異遺伝子組換えマウス (Tet-*mev-1* マウス) の作製し、解析を行った。

さらに、生理的老化とは、加齢とともに徐々に進行していく臓器の機能の低下と、生体の内部を一定にしようとする働き (ホメオスタシス) の機能減退から生じる現象である。近年のトランスジェニックあるいはノックアウト動物における研究

より、ミトコンドリアにおける O_2^- 発生と抗酸化酵素のバランスが老化や老年性疾患に重要であると推測される事例が多数報告されている。しかし、哺乳動物における生理的な老化がこのような機構により生じることを明確に説明するにはまだ不十分である。 O_2^- と生理的老化の因果関係は、加齢における様々な器官での上記機構の総合的な変化について研究することなしには評価できない。ここで我々は、近交系マウス (C57BL/6J) の脳、心臓、筋肉、眼、腎臓におけるミトコンドリアからの O_2^- 発生量、ミトコンドリアの抗酸化酵素活性、ミトコンドリア電子伝達系複合体活性、アポトーシスの誘導やエネルギー代謝の一指標となりえる体温の加齢変化を総合的に明らかにしたことを述べる。そして、ミトコンドリアから発生する O_2^- が生理的老化を引き起こす最初のステップである仮説を支持する。さらに我々は加齢においてミトコンドリアから発生する O_2^- 、酸化障害そしてアポトーシスの誘導が密接に関与し生理的老化を引き起こしていることを示唆する結果を得たので報告する。

自然界の中には、まだ未解明ではあるが、ヒトの健康維持・増進や疾患の治療に有用なものが多数含まれていると考えられる。その中でも個々の漢方薬についての研究は精力的に行われているが、多くの試料を網羅的におこなうような研究は少ない。表皮、神経、筋肉、消化器系、生殖系など、動物としての必要最低限の体制を整えている線虫の一種である *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) は、最長寿命が約 30 日であることから老化の研究に盛んに用いられている。本研究では、*C. elegans* の寿命を簡易に測定するシステムを開発し、それを用いた生薬や漢方に含まれる抗老化活性物質の探索を試み、抗老化・抗酸化物質の探索におけるこのシステムの有用性を検証した。

B. 研究方法

1. 変異型遺伝子組換え *mev-1* 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個所を図2に示す。このマウス(図3)に対して、(1) 個体観察、(2) 行動観察、(3) 活性酸素種スーパーオキシドアニオン (O_2^-) の測定、(4) 電子伝達系活性の測定、(5) 組織観察などを行った。

2. 条件付変異遺伝子組換え *mev-1* 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(図6)。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日に東海大学より特許出願している(特願2005-139588)。

3. 酸化ストレスにより誘導される物質の解析とSMP30マウス

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アミナーゼ(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以下に関して解析した。(1) HPLC・電気化学的検出法による還元型および酸化型ビタミンC濃度の測定 (2) 培養脳スライスを用いたスーパーオキシドのリアルタイムイメージング (3) 抗酸化系の解析~総SOD活性、Mn-SOD, CuZn-SOD, カタラーゼタンパク質、還元型および酸化型グルタチオン (4) 酸化ストレス指標の測定~チオバルビツール酸反応物質(TBARS)、カルボニル化タンパク質

4. 野生型マウス

マウスは2、6、12、24ヶ月齢のC57BL/6Jを使用し、以下の解析を行った。(1) ミトコンドリアから発生する O_2^- と Mn-SOD 活性の加齢変化、シトクローム c オキシダーゼ(COX) 活性の加齢変化、(3) ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)の加齢変化、(4) カルボニル化蛋白質の加齢変化、(5) アポトーシス誘導の加齢変化、(6) 体温の加齢変化。

4. 線虫、*C. elegans*

C. elegans は雌雄同体であるために自家受精により次世代が産まれてしまう。これまでは、それを防ぎ、寿命測定に必要な同調培養を行うために、生殖機能を阻害する薬剤であるFudRを用いてきた。この薬剤の線虫に対する目的以外の作用を排除するため、*fer-15* 突然変異体を用いた。*fer-15* は

低温飼育 (20℃) では野生株の性質を示すが、高温 (25.5℃) で飼育すると次世代の産生が抑制される突然変異体である。この利点を利用し、増殖時には20℃で飼育し、寿命測定を25.5℃でおこなった。飼育は大腸菌を餌として液体培地中でおこなった。それぞれのフラスコには約2,000匹の第1期幼虫を加え、4日後成虫に育った時点で、測定する物質とともに、餌の量を一定にするためにアンピシリンを加えて、大腸菌の増殖を抑制した。数日ごとに一部を取り虫の生死の割合を調べた。このシステムを利用して、(株) ツムラより提供された26種類の漢方薬と生薬の寿命を指標とした抗老化作用を調べた。

C. 研究結果

1. 変異型遺伝子組換え *mev-1* マウス

(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7)。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8)。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9)。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9)。

(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10)。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11)。マウス行動解析(高架パイプ歩行テスト)は、1mの高さに、3mm、6mmの金属パイプを架け、逃避台までの距離20cm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12)。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13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14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15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 16)。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. 条件付変異遺伝子組換え *mev-1* マウス

(1) 条件付変異遺伝子組換えマウスの作成

Tet on/off システムを使い (図 17)、14 系統の組換えマウスを作成し、変異遺伝子の発現量を調べたところ、野生株に比較して 1~2 倍の発現量を示した (図 18)。

(2) パラコート感受性

生後 6 ヶ月未満のマウスを調べたところ、No. 37 系統のマウスが感受性を示した (図 19)。この系統のマウスと、感受性を示さなかった No. 48 系統のマウスと野生株マウスで、生後 3 ヶ月目の感受性を調べたところ、やはり No. 37 が高感受性を示した [図 20]。本年度はこの No. 37 系統マウスを中心に解析をおこなった。

(3) SDHC タンパク質の発現量

間脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、胃、性巣、筋肉における発現量を調べたところ、No. 37 系統のマウス (Tg/-) ではドキシサイクリンを摂取させたグループで、すべての臓器・器官で発現量の増加が確認された。しかし、No. 48 系統マウス (Tg/-) では変化は確認されなかった。[図 21]

(4) 酸化タンパク質の蓄積量

生後 2~3 ヶ月齢のマウスの間脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、胃、小腸、卵巣、筋肉、新生児個体で測定した。蓄積量は臓器・器官で異なり、ドキシサイクリンを摂取させなかった対象でも、肺、脾臓、卵巣で蓄積量が増加していた [図 9]。

No. 37 系統マウス (Tg/Tg) では肺と卵巣、筋肉のみで蓄積が観察されたが [図 22、図 23]、No. 48 ではすべての臓器・器官で差は確認されなかった。

[図 9]。

(5) 活性酸素発生量

活性酸素量も臓器・器官で異なり、脳、肝臓、胃で少なく、心臓と小腸で増加していた [図 24]。

No. 37 のマウス (Tg/Tg) では、ドキシサイクリンを摂取により、脳、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、卵巣で増加が確認された [図 25]。

(6) 受胎数

No. 37 系統マウス (Tg/Tg) の母親を交配前からドキシサイクリンを摂取させると、 3.83 ± 3.93 匹の子を作り、妊娠後の摂取では野生株マウスと同じ、 5.33 ± 1.15 匹であった。一方、No. 37 系統マウス (Tg/Tg) では交配前の摂取では子は生まれず、妊娠後の摂取であっても 2.13 ± 2.1 匹と減少した。

(7) 卵巣の詳細解析

変異 SDDHC 遺伝子を常時発現させたマウスは不妊であり、その原因が卵胞の成熟不全が疑われた。ドキシサイクリンを摂取させた No. 37 系統マウス (Tg/Tg) の卵巣ではミトコンドリアからの活性酸素の発生量、酸化タンパク質の蓄積ともに上昇していた (図 26)。卵胞の成熟不全も観察され、卵胞外細胞ではアポトーシスも観察された (図 27)。また、子宮卵管脛部に多数のアポトーシス、caspase 3 の活性が観察された [図 28]。

(8) 成長率

ドキシサイクリンを摂取させた No. 37 系統マウスは、ヘテロマウス (Tg/-) では野生株と同じように成長する。しかし、ホモマウス (Tg/Tg) は成長が遅れ、離乳期で一番顕著であった (図 29)。この遅れは生後 12 週間で野生株と同じ大きさまで回復した (図 30)。

(9) 新生児における詳細解析

妊娠確認後に母親にドキシサイクリンを摂取させた No. 37 系統マウスの Tg/Tg 新生児は、体が小さく体重の減少が見られた (図 31)。興味あることに、尾の先端で多数のアポトーシスが観察された (図 31)。

変異 SDHC の発現が上昇し、酸化タンパク質の増加も確認された (図 32)。終脳 (図 33)、脳 (図 35)、肺 (図 35)、皮膚 [図 36]、筋肉・脂肪

細胞 (図 3 6)、肝臓 (図 3 7)、腎臓 (図 3 7)、直腸 (図 3 7)、副鼻腔粘膜 (図 3 8) で多数のアポトーシスが観察された。Caspase 3 の活性を肺で調べたところ、上昇していることが確認された (図 3 3)。

(10) 6ヶ月齢マウスの組織病理学的解析

分担研究者の丸山直記とともに、6ヶ月齢マウス (Tg/-) の組織病理学的解析をおこなったが、特に異常を見出すことができなかった。本研究の結果から、加齢とともに野生型マウスでは目と腎臓に大きな酸化ストレスがかかることが明らかになった。そこで1年6ヶ月の *mev-1* マウスの目を調べた。網膜に異常は見られないものの、角膜の表面の細胞が野生株に比べて強く脆弱化している組織像が観察された。

3. 酸化ストレスにより誘導される物質の解析と SMP 30 マウス

(1) 酸化ストレスによるシトルリン化分子の増加を SH-SY5Y 細胞を用いた同定

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 3 9)。

(2) 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る解析

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 4 0)。他のサブタイプである PAD1, PAD3, PAD4/5 は検出できなかった。

(3) 酸化ストレス抑制機能を有する SMP 30 の解析

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 4 1)。

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を定量した (図 4 2)。MP 30 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 SMP 30 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。

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 4 3 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。

(4) ビタミン C 欠乏による生体変化

体重変化と総ビタミン C 濃度では、生後約 60 日齢では各群に大きな差はないが約 80 日齢では KO-VC (-) 群 (ビタミン C が持続的に欠乏) では体重減少が著明となり壊血病の症状が出現した。脳内総ビタミン C 濃度は KO-VC-群では他の群に比較して著明に減少していた。特に還元型ビタミン C 濃度が低下していた。

次に脳リアルタイムイメージングとビタミン C

欠乏を測定した。各実験群から脳を摘出しスライスを作製し酸化ストレスを誘導した。方法は培養液に100分間酸素を供給し、その後、窒素で30分置換し、130分後に再び酸素に置換した。2ヶ月齢の各群のスーパーオキシドをリアルタイムイメージングにより測定した。その結果 KO-VC-群では著しくスーパーオキシドが誘導された(図44)。この結果はアスコルビン酸(ビタミンC)濃度の低下が脳内スーパーオキシド量増加させることを示す。

抗酸化系の変化を調べたところ、アスコルビン酸(ビタミンC)欠乏により他の抗酸化系が変化(低下)してスーパーオキシドが効果的に消去出来なかった可能性を検討した。総SOD活性の変化は認められなかった。またCuZn-SOD、Mn-SODおよびカタラーゼ蛋白質をWestern blottingにより定量化した。いずれの群間には有意の差が認められなかった。また還元型および酸化型グルタチオン濃度も有意の差を認めなかった。

酸化ストレス指標の評価を行ったところ、チオバルビツール酸反応物質(TBARS)はKO-VC(-)マウスで有意差は無いものの、むしろ減少していた。カルボニル化タンパク質の出現も有意の差を認めなかった。

4. 野生型マウス

(1) ミトコンドリアから発生する O_2^- と Mn-SOD 活性の加齢変化

まず始めに、我々は2、6、12、24ヶ月齢のマウスの脳、心臓、筋肉、眼、腎臓を用いてミトコンドリアから発生する O_2^- 量の加齢による変化を O_2^- 特異的発光物質(MPEC)を用いて測定した(図45A)。その結果、脳では2ヶ月齢に比べ6、12、24ヶ月齢それぞれにおいて O_2^- の有意な増加を確認した。さらに眼、腎臓では2ヶ月齢に比べ12、24ヶ月齢それぞれで O_2^- の有意な増加を確認し、これらの臓器では加齢に伴い O_2^- 発生量が有意に増加したことを明らかにした。一方で、心臓では加齢によりその発生量は変化せず、筋肉では24ヶ月齢において他の月齢と比べその発生量は有意に低

下した。

次に抗酸化酵素の一つであるミトコンドリアのSOD活性(主にMn-SOD活性)の加齢変化を測定した(図45B)。その結果、脳では12、24ヶ月齢において2ヶ月齢に比べほんの数%であるが有意な低下を示した。心臓では24ヶ月齢で、筋肉では6、12ヶ月齢で2ヶ月齢に比べその活性は有意な上昇を示したが、これら臓器においてMn-SOD活性は加齢に準じた増減を示さなかった。また、眼、腎臓では加齢による変化は認められなかった。

(2) シトクロームcオキシダーゼ(COX)活性の加齢変化

ミトコンドリアの内膜には、電子伝達系を構成する4つの複合体がある。電子は最終的に電子伝達系複合体IVであるシトクロームcオキシダーゼ(COX)へと送られATPを合成する。ゆえに、ミトコンドリアの機能を評価する上でCOX活性は重要な指標となるため、この酵素活性の加齢による変化を測定した。

その結果、脳、心臓、筋肉においてその酵素活性の加齢による変化は認められなかった(図46A, B, C)。一方で、眼および腎臓においては加齢によりその活性は有意に低下し続け、24ヶ月齢では2ヶ月齢にくらべ約20%その活性は低下していた(図46D, E)。

(3) ヒドロキシデーオキシグアノシン(8-OHdG)の加齢変化

ミトコンドリアから発生する O_2^- を起因としたDNAの酸化損傷の指標として各臓器における8-OHdG蓄積量の加齢変化を免疫組織染色により測定した。その結果、脳では大脳皮質、海馬共にその蓄積量は加齢により増加していた。さらに小脳においても同様の変化を示した(data not shown)。心臓、筋肉(大腿二頭筋)では変化は小さいながら8-OHdGの加齢による増加が確認された。眼では網膜色素上皮層、感覚網膜、および角膜上皮層において加齢による8-OHdGの蓄積増加が顕著であった。さらに腎臓においても加齢に伴った増加が確認された(図47)。

(4) カルボニル化蛋白質の加齢変化

カルボニル化蛋白質は酸化蛋白質の指標として用いられている。O₂⁻の大部分がミトコンドリアより産生されることからミトコンドリア自身は障害を受けやすく、細胞質よりミトコンドリアのカルボニル化蛋白質は蓄積しやすいという概念のもと、粗ミトコンドリア画分におけるカルボニル化蛋白質蓄積量を測定した。その結果、2ヶ月齢の弱齢マウスにおける各臓器のカルボニル化蛋白質蓄積量は脳、心臓、筋肉に比べ、眼、腎臓で約2倍であった(data not shown)。この蓄積量は、加齢により脳と心臓で増加傾向を示したが有意な差は認められなかった(図48 A, B)。一方、筋肉、眼、腎臓では加齢による有意な蓄積増加が確認された。2ヶ月齢と24ヶ月齢を比較すると、筋肉では約1.2倍、眼では約2.3倍、腎臓では約1.5倍の有意な蓄積増加が確認された(図48 C, D, E)。

(5) アポトーシス誘導の加齢変化

正常な生細胞においてシトクローム c はミトコンドリアに分布している。ところが、酸化障害や薬剤等によりアポトーシスのシグナルが誘導されると、シトクローム c はミトコンドリアから細胞質へ移動する。そしてタンパク分解カスパーゼカスケードを活性化し、最終的にアポトーシスを導く。

そこでアポトーシス誘導の指標となるミトコンドリアからのシトクローム c の細胞質へのリリース量の加齢変化を測定した。その結果、脳、眼、腎臓において細胞質におけるシトクローム c 存在量は加齢に伴い有意に増加した。2ヶ月齢と24ヶ月齢を比較すると、脳では2.2倍、眼では13.3倍、腎臓では3.5倍の増加が確認された(図49 A, D, E)。一方で心臓、筋肉ではそのリリース量の加齢での変化は認められなかった(図49 B, C)。

(6) 体温の加齢変化

エネルギー代謝を熱産生量とすると、体温はエネルギー代謝の指標の一つとなり得る。そこで、マウス直腸における温度の加齢変化を測定した。その結果、体温は加齢に伴い有意な低下を示した。12ヶ月齢では6ヶ月齢と比べて約0.53℃、24ヶ月齢では12ヶ月齢と比べて約0.55℃の低下が認めら

れた(表1)。

2. *C. elegans*

26種類の漢方。生薬の多くは *C. elegans* の寿命に変化をもたらさなかったが、生薬である大黄(ダイオウ)が寿命を延長させる効果を示した(図50)。初期実験であるが、大黄にはミトコンドリアから発生する活性酸素(superoxide)の量を抑制する強い抗酸化能がある可能性が示唆された(図51)。

一方、数種類が寿命を短縮させる作用を持っていた。この作用を示すものには生薬が多く、抗菌作用を示す芍薬(シャクヤク)や牡丹皮(ポタンピ)、抗ウイルス作用を示す麻黄(マオウ)が含まれており、さらに解熱や解毒作用をもつ甘草(カンゾウ)、生姜(ショウキョウ)、柴胡(サイコ)、黄芩(オウゴン)、麻黄(マオウ)が含まれるという興味ある結果が得られた。

D. 考察

1. *mev-1* マウスの解析から

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(O₂⁻)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。このマウスは、生体内で活性酸素を産生するパラコートに感受性を示し、臓器・器官によって異なるものの、ミトコンドリアから活性酸素が過剰に産生され、酸化タンパク質の蓄積が認められた。このホモ(Tg/Tg)マウスは胎児期から離乳期にかけて成長の遅れが見られ、多くの組織・器官でアポトーシスが観察された。生後 1 2 週目には正常の大きさの身体に回復した。生まれる子供の数が減少する。興味あることに、妊娠確認後にドキシサイクリンを摂取させた No. 37 マウスでは、初産では生まれてこないことが多く、その後、個体数は少ないものの出産回数が増加する現象が認められた。卵胞の成熟不全も観察され、卵胞外細胞ではアポトーシスも観察された。また、子宮卵管腔部に多数のアポトーシス、caspase 3 の活性が観察された。この結果、受胎数の減少は卵胞成熟の不安定化か、卵管の異常による着床不全が疑われた。

6 ヶ月齢のヘテロ (Tg/-) マウスにおいては形態病理学的な異常は観察されなかったが、加齢とともに早老的な変化が出現すると予想された。現に、1 年 6 ヶ月の *mev-1* マウスの目を調べた。網膜に異常は見られないものの、角膜の表面の細胞が野生株に比べて強く脆弱化している組織像が観察された。

2. 酸化ストレスにより誘導される物質の解析と SMP 30 マウスの解析から

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。本研究において最も注目すべき所見として還元型アスコルビン酸 (ビタミン C) はスーパーオキシドの量は増加するが、欠乏があっても顕著な酸化ストレスの亢進が認められなかったことである。その原因として他の抗酸化系が低下している可能性が考えられたが、明らかな原因を特定できなかった。他の可能性としては、酸化ストレスはアスコルビン酸 (ビタミン C) 濃度の低下により酸化ストレスが亢進するもののミトコンドリアにおけるスーパーオキシドの亢進の可能性も残されている。いずれにしてもスーパーオキシドの由来を同定する必要がある。

3. 野生型マウスによる生理的老化

生理的老化とは、加齢とともに徐々に進行していく臓器の機能の低下と、恒常性維持機構の減退から生じる生体機能の低下である。早老や老年性疾患の発症促進は O_2^- を始めとする ROS と抗酸化酵

素のバランスが崩れることが一因となり生じることが遺伝子改変動物を用いた研究により明らかになりつつある。しかし、このような研究だけでは、生理的な老化が上記機構によるものであるかを明確に説明するには不十分となる。 O_2^- と生理的老化の因果関係は、加齢における様々な器官での O_2^- を中心とした上記機構の総合的な変化について研究することなしには評価できない。そこで我々は、近交系マウス (C57BL/6J) の脳、心臓、筋肉、眼、腎臓におけるミトコンドリアからの O_2^- 発生量、ミトコンドリアの抗酸化酵素活性、ミトコンドリア電子伝達系複合体活性、アポトーシスの誘導やエネルギー代謝の一指標となりえる体温の加齢変化を総合的に明らかにし、 O_2^- と生理的老化の関係性を見出すことを目的とした。

まず始めに我々は、ミトコンドリアから発生する O_2^- 量の加齢変化を確認した。 O_2^- の加齢変化を測定した例は家蠅、線虫においては報告がある。我々のマウスを用いた解析結果では、脳、眼、腎臓において加齢によりミトコンドリアから発生する O_2^- 量は増え、心臓では変化せず、筋肉では有意に減少した。脳、腎臓は組織 g あたりの血流量が非常に多く、体内で消費される酸素の約 20% が脳、腎臓それぞれにおいて消費される。このような臓器はエネルギー代謝量が高くミトコンドリアでの O_2^- 生成が促進されていることが考えられる。また眼においては、生体外からの酸素ストレスおよび紫外線の影響が直接反映される臓器であることから、 O_2^- が加齢においてより増加したひとつの要因ではないかと推察される。現に、高濃度酸素下におかれたマウス早産児は、未熟児網膜症を起こし、紫外線が一因となる黄斑変性症の発症率は加齢に伴い増加する。このように、脳、腎臓、眼では過剰に発生した O_2^- が抗酸化酵素の消去能力を超越逸脱し酸化障害を引き起こす。そしてその障害が更なる O_2^- 発生量の増加を引き起こす悪循環に陥り、加齢により O_2^- 発生量が増加する要因になったものと考えられる。また、筋肉では 24 ヶ月齢の老齢マウスで O_2^- 発生量は低下した。24 ヶ月齢では筋肉 (大腿二頭筋+ヒラメ筋) の湿重量が他の

月齢のマウスに比べ約 33% 低下しており (P < 0.001) (data not shown)、 O_2^- 発生量の低下は筋線維量の低下によるエネルギー代謝の低下で生じたと考えられる。筋肉での加齢による筋肉湿重量の低下、エネルギー代謝量の低下は以前の報告と一致する上に、エネルギー代謝を熱産生量と考えると我々の研究において体温が加齢により低下したことからもこの考察は正しいと思われる。心臓においては、活性酸素発生量は加齢により変化しない。ことから、心臓の加齢による機能低下、あるいは疾患発症に O_2^- は直接関与していないように思える。

O_2^- の大部分はミトコンドリアから発生する。すなわち、この O_2^- を即座に消去するのがミトコンドリアに局在している抗酸化酵素 Mn-SOD であり、その重要性は大きい。そこで加齢における Mn-SOD の活性変化を測定した。その結果、脳において、加齢によりほんの数%の活性低下がみられたが、心臓、筋肉、眼、腎臓においては加齢に準じた活性の増加あるいは減少は示さなかった。これまでの報告より、ヒト白血球における Mn-SOD は加齢により殆ど変化せず、さらにラットにおける幾つかの臓器でも Mn-SOD 活性は、加齢により殆ど変化していない。このように Mn-SOD はつねに臓器固有のある一定量の活性を常に維持し、ミトコンドリアから発生する O_2^- を一定量消去するものであり、加齢によりその活性は大きく変化はしないと考えられる。我々の解析結果から、各臓器における O_2^- 発生量の加齢変化と Mn-SOD 活性の加齢変化が一致していないことから Mn-SOD がミトコンドリアからの O_2^- 発生量を規定するものでは無いことが示された。

脳、眼、腎臓では Mn-SOD 活性は加齢により著しい変化を示していないため、これら臓器の加齢による O_2^- 発生量の増加は、ミトコンドリア電子伝達系の損傷による機能低下が一因で生じることが考えられた。シトクローム c オキシダーゼ (COX) は電子伝達系複合体 IV であり、この活性はしばしばミトコンドリア機能の一指標として使われる。そこで、COX 活性の加齢による変化を測定したところ、 O_2^- が加齢により著しく増加した眼、腎臓において

COX 活性の加齢に伴う有意な低下が確認された。このことから眼、腎臓の O_2^- 増加はミトコンドリア電子伝達系から発生し、消去し切れなかった O_2^- が電子伝達系複合体構成蛋白質自身を障害し O_2^- 発生量をさらに増加させるという悪循環の結果であろうと推測された。このように、眼、腎臓における加齢にともなうミトコンドリア機能の低下は臓器機能の低下を意味し、生理的老化を引き起こす重要な要因のひとつになりえる。

O_2^- は近傍の DNA、蛋白質、脂質を酸化させ老化を進行させる。そこで、様々な動物種の組織において、加齢と共に増加するとされている、老化マーカー (8-OHdG、カルボニル化蛋白質) の加齢変化を調べた。その結果、我々の実験においてもすべての臓器で酸化 DNA の指標である 8-OHdG の加齢に伴う増加が定性的に確認された。興味深いことに、 O_2^- 発生量が加齢により増加した脳、眼、腎臓で加齢によるその蓄積の増加は顕著であった。眼に関しては、特に網膜色素上皮、感覚網膜および角膜の上皮層に変化は顕著であり、この結果はドライアイモデルマウス、および Cu/Zn-SOD ノックアウトマウスの結果と一致する。次に、酸化蛋白質の指標であるカルボニル化蛋白質の定量的な測定を行った。その結果、加齢による O_2^- の増加および COX 活性の低下が著しかった眼、腎臓で顕著な増加が確認された。また筋肉においても若干の有意な増加が認められた。脳、心臓においては加齢による増加傾向はあったが有意ではなかった。酸化障害についてのこれらの結果は、常に発生している O_2^- による障害の蓄積と、加齢によりその発生量が増加したことによる障害蓄積増加の 2 つの現象を総合的に表しているものと考えられる。さらに眼、腎臓におけるカルボニル化蛋白質は、2 ヶ月齢の弱齢マウスにおいて脳、心臓、筋肉に比べ約 2 倍と高い蓄積量を示していた (data not shown)。このことは、潜在的に眼、腎臓が O_2^- による酸化障害を蓄積しやすい臓器であることを意味している。

細胞内構成成分に O_2^- による酸化障害が蓄積すると、細胞は機能異常、機能低下を引き起こす。そのような細胞はプログラム細胞死であるアポト

ーシスを誘導し、正常な状態を保とうとする防御機構が働く。そこで我々は各臓器でのアポトーシスの誘導の加齢変化を確認したところ、脳、眼、腎臓において有意にアポトーシス誘導が増加していた。非常に興味深いことにこの結果は、加齢による O_2^- 発生量の増加、および、酸化障害の蓄積増加と高い相関性があった。

これまでの哺乳動物における老化研究は単一臓器あるいは単一因子を対象として行うことが多く、研究対象の臓器特性により結果の相違が生じることがしばしば有り不明瞭の部分が多かった。しかし、我々が行った多臓器多因子の比較解析により、 O_2^- と生理的老化との関係を明確に示すことができた。

我々の研究より、生理的老化はミトコンドリアの O_2^- 発生量の増加に起因した酸化障害の蓄積、その蓄積によるアポトーシスの過剰誘導による臓器萎縮、機能低下により生じると結論づけられた。そしてこの機構は、臓器によりその度合いは区々であり、脳、眼、腎臓といった臓器では上記機構が強く影響し、生理的老化を引き起こしていると考えられた。ミトコンドリアより O_2^- を過剰発生させた線虫、細胞株ではこれら一連の機構が著しく促進し、早老あるいは細胞老化が促進することが明らかであることから、 O_2^- が生理的な老化を引き起こす起因となる因子であることが示唆された。また、線虫においては加齢による著しいエネルギー代謝の低下により O_2^- 発生量は増加しない。我々の研究においても加齢により体温の低下を示したことから、筋肉のみならず他の臓器のエネルギー代謝も同様に低下している可能性が考えられ、 O_2^- 発生量を抑制する方向に働く現象も加齢により同時に生じているのかもしれない。

3. *C. elegans* を使った抗老化・抗酸化物質の探索

我々が開発した、「線虫の寿命を指標とした、新規生理活性物質スクリーニング法」により、coenzyme Q_{10} や漢方的一种である大黄ミトコンドリアから発生する活性酸素 (O_2^-) の発生量を抑制する

ことを見出した。また漢方や生薬の中には寿命を短縮する効果があるものも見出され、寿命に変化をもたらす生理的活性を持つ物質の探索に有用なシステムであることが示唆された。

E. 結論

野生型マウスの酸化ストレスや抗酸化に対する加齢変化は臓器や組織により大きく異なるが、酸化ストレスが生理的老化に関与していることが明らかとなった。このことから酸化ストレスに関する *mev-1* マウスや SMP-30 マウスが老化や老化に関わる疾患の機構の解明やその予防の研究に適したモデル動物になることが示唆された。

また、生体内の活性酸素量の発生量の8割がミトコンドリアから発生していることを考えると、ここから発生する活性酸素の量を抑制する物質を見出すことが重要と思われる。我々が *C. elegans* で開発したシステムを使い、すでに漢方の一種である大黄がミトコンドリアからの活性酸素量を抑制し、寿命を延長させる効果を持つことを見出したことから、このシステムがそのような物質の探索に最適であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

[平成17年度]

石井直明

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

[平成18年度]

石井直明

Yasuda K, Ishii T, Suda H, Akatsuka A, Hartman PS, Go S, Miyazawa M, [Ishii N](#)
Age-related changes of mitochondrial structure and function in *Caenorhabditis elegans*
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

丸山直記

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

[平成19年度]

石井直明

Miyazawa M, Ishii T, Kirinashizawa M, Yasuda K,
Hino O, Hartman PS, Ishii N
Cell growth of the mouse SDHC mutant cells was
suppressed by apoptosis throughout mitochondrial
pathway
BioScience Trends, 2: 22-30, 2008

Yamaguchi T, Onodera A, Yasuda K, Nishio Y,
Arai M, Tsuda M, Miyazawa M, Hartman PS, Ishii
N
A low cost and quick assay system using the
free-living nematode *Caenorhabditis elegans* to
determine the effects of Kampo medicine on life
span
AATEX 13: 1-10, 2008

Ishii N, Ishii T, Hartman PS
The role of the electron transport SDHC gene on
lifespan and cancer
Mitochondrion 7: 24-28, 2007

Tuda M, Sugiura T, Ishii T, Ishii N, Aigaki T

A *mev-1* life dominant-negative SdhC increases oxidative stress and reduces lifespan in *Drosophila*, **Biochem. Biophys. Res. Com.** 363: 342-346, 2007

Ishii N

Role of oxidative stress from mitochondria on aging and cancer
Cornea 26: S3-S9, 2007

Sakashita T, Hamada N, Suzuki M, Ikeda DD, Yanase S, Ishii N, Kobayashi Y
Effects of γ -ray irradiation on olfactory adaptation to benzaldehyde in *Caenorhabditis elegans*,
Biological Sciences in Space 21: 117-120, 2007

Sakashita T, Hamada N, Ikeda DD, Yanase S, Suzuki M, Ishii N, Kobayashi Y
Modulatory effect of ionizing radiation on food-NaCl associated learning: the role of γ subunit of G protein in *Caenorhabditis elegans*,
FASEB J. 22: 713-720, 2007

石井直明

寿命および寿命関連遺伝子 医学のあゆみ、
222 : 299-303、2007

石井直明、桑平一郎（監修） 専門医がやさしく教える老化予防&アンチエイジング P
HP 出版、2007

丸山直記

Ohta K, Shigemoto K, Fujinami A, Maruyama N, Konishi T, Ohta M.
Clinical and experimental features of MuSK antibody positive MG in Japan.
Eur J Neurol 14:1029-1034, 2007

Ishigami A, Maruyama N.
Significance of SMP30 in gerontology.

Geriatr Gerontol Int 7:316-325, 2007

丸山直記、重本和宏

神経筋接合部位における抗 MuSK 抗体と病態機序
臨床神経 47:842-844, 2007

佐藤 匡、瀬山邦明、石神昭人、丸山直記
肺の老化のメカニズム
The Lung Perspectives 15:155-160, 2007

Kimura Y, Kubo S, Koda H, Noguchi Y, Sawabe M, Maruyama N, Kitamura K
Quantitative analysis of mRNA in human temporal bones.
Acta Otolaryngol. 127:1024-1030, 2007

Shigemoto K, Kubo S, Jie C, Hato N, Abe Y, Ueda N, Kobayashi N, Kameda K, Mominoki K, Miyazawa A, Matsuda S, Maruyama N
Experimentally induced myasthenia gravis with muscle-specific kinase.
Ann N Y Acad Sci. 印刷中

2. 学会発表

[平成17年度]

石井直明

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 *Caenorahbditis 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、酸化ストレスに関与する新規遺伝子
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

石井恭正、石井直明、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」、
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

[平成18年度]

石井直明

安田佳代、Hartman PS, 須田斎、正山哲嗣、赤塚明、石井恭正、石井直明、酸化ストレスと老化におけるミトコンドリア融合の役割
日本基礎老化学会, 2006

石井恭正、宮沢正樹、小野寺章、安田佳代、石井直明、ミトコンドリアから過剰な活性酸素を発生するモデル動物(mev-1 マウス)の作製と解析、日本基礎老化学会、2006

Yasuda K, Ishii N、Are-related changes of mitochondrial structure and function in *C. elegans*
The 2nd East Asia *C. elegans* Meeting, 2006

Suda H, Shoyama T, Ozaki T, Ishii N, Yokota S, Fundamental principle of the lifespan in *C. elegans*, The 2nd East Asia *C. elegans* Meeting, 2006

Yasuda K, Onodera A, Ishii N, SOD-1 contributes to anti-aging by maintaining the balance of localization of intracellular ROS in *Caenorhabditis elegans.*, The 2nd East Asia *C. elegans* Meeting, 2006

石井直明、シンポジウム「生体応答システムと老化・寿命の分子メカニズム -基礎老化から抗老化研究へ」、ミトコンドリアからの酸化ストレスにより生じる老化と老年性疾患
日本分子生物学会 2006 フォーラム、2006

Ishii T, Ishii N, Analysis of a model animal (*mev-1*) with superoxide anion overproduction from mitochondria, The 6th Korea-Japan Gerontologist Joint Meeting, 2006

石井直明、ミトコンドリアから発生する活性酸素を起因とする老化、The 10th Molecular Cardiovascular Conference, 2006

石井直明、シンポジウム「ダイナミックな疾患モデル」、ミトコンドリアから発生する活性酸素を起因とする老年性疾患・生活習慣病モデル動物、第52回日本病理学会特別総会、2006

丸山直記

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
酸生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

[平成19年度]

石井直明

石井直明：老化のメカニズム、第27回 日
本医学会総会、大阪、2007、4、8

石井直明：ミトコンドリアから活性酸素
を過剰発生させたモデル動物の解析。エ
イジング・バイオストレス・メタボリズム研
究会、京都市 2007.4.

宮沢正樹、石井恭正、安田佳代、切無沢美香、
石井直明：加齢に伴うレドックス制御と酸化
障害の変化、日本基礎老化学会 第30回大
会、札幌、2007、6

須田斎、正山哲嗣、尾崎貴美、石井直明：線
虫 *C. elegans* における老化・寿命の定量的
解析、日本基礎老化学会 第30回大会、札
幌、2007、6

Onodera A, Yanase S, Ishii T, Yasuda K,
Miyazawa M, Hartman PS, Ishii N: X
rays-irradiation-mediated hormesis of
post-dauer life span, 16th International *C.*
elegans meeting, LA, USA, 2007, 6

Shouyama T, Oxaki T, Ishii N, Shuda H:
Quantitative analysis between longevity and
aging in *C. elegans*, 16th International *C.*
elegans meeting, LA, USA, 2007, 6

Yanase S, Ishii N: Hormesis-induced lifespan
extension decreased mitochondrial superoxide

radical levels via Ins/IGF-1 signaling pathway in *C. elegans*, 16th International *C. elegans* meeting, LA, USA, 2007, 6

Yasuda K, Hartman PS, Suda H, Akatsuka A, Ishii T, Ishii N: The role of mitochondrial fusion in aging and oxidative stress in *C. elegans*, 16th International *C. elegans* meeting, LA, USA, 2007, 6

Ishii N: Mitochondrial dysfunction and aging, Neuro 2007, Yokohama, 2007, 9

Ishii N: The role of oxidative stress from mitochondria on aging, The 8th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology and Geriatrics, Beijing, China 2007, 10

石井直明、石井恭正、宮沢正樹：細胞傷害におけるミトコンドリアからの酸化ストレスの影響、第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会合同大会、横浜、2007,12

網野比佐子、栗野睦美、石井直明、飯野雄一、北潔、線虫ミトコンドリア複合体IIの生化学的解析、第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会合同大会、横浜、2007,12

Shoyama T, Ishii N: Quantitative analysis between longevity and aging in *C. elegans*, 第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会合同大会、横浜、2007,12

平田哲也、瀬崎眞理子、石井直明、山口（藤田）陽子：線虫の寿命に対するエタノール効果について、第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会合同大会、横浜、2007,12

宮沢正樹、石井恭正、石井直明： 生理的老

化へのレドックス制御と酸化障害の影響、第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会合同大会、横浜、2007,12

栗野睦美、網野比佐子、石井直明、北潔：線虫短寿命変異株 *mev-1* 複合体II (コハク酸—ユビキノン還元酵素) の生化学的解析、第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会合同大会、横浜、2007,12

安田佳代、須田斎、赤塚明、石井恭正、石井直明： *C. elegans* におけるミトコンドリア融合阻害による酸化ストレス・老化への影響、30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会合同大会、横浜、2007,12

築瀬澄乃、小野寺章、テデスコ パット、ジョンソン トーマス、石井直明：線虫 *C. elegans* におけるSOD-1欠失の細胞内ROS局在への分子的寄与、第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会合同大会、横浜、2007,12

切無沢美香、宮沢正樹、石井恭正、安田佳代、石井直明：A-Rafによるミトコンドリアからの活性酸素発生および神経分化、第7回日本ミトコンドリア学会年会、鹿児島、2007、12

石井直明：ミトコンドリアを起因とする活性酸素と疾患、第24回臨床フリーラジカル会議、京都、2008、3

丸山直記

丸山直記

酸化ストレスによるシトルリン化蛋白質の誘導
第96回日本病理学会総会
大阪市 2007.3.13-15

丸山直記