

## 平成20年度 研究戦略プロジェクト事業 研究成果報告書

平成21年6月30日

公立大学法人横浜市立大学  
理事長 様

平成20年度 研究戦略プロジェクト事業 (W20015) で行った研究成果等は下記のとおりです。

記

1 研究者情報	研究代表者氏名 (所属・職位)	藤井 道彦 (国際総合科学研究科・准教授)			
2 事業情報	新規・継続の分け				
	研究費の区分	若手人材育成推進費 (自然科学)			
	研究課題名	活性酸素の生成・消去機構の遺伝学的解析とその応用			
	研究実施期間	平成20年7月1日 ~ 平成21年3月31日			
	研究ユニットの構成 ※研究代表者も含む ※研究計画書と相違のないようご注意ください。	所属名・企業名等	役職名	氏名	役割
	国際総合科学研究科	准教授	藤井道彦	研究代表者	
3 研究概要	酸素は我々の生存に必須であるが、酸素の一部は、代謝の過程で活性酸素へと変わる。活性酸素は生体分子を攻撃し、老化や疾病を含めた種々の生命機能の劣化を引き起こす。しかし、多くの場合、活性酸素がどこから生じるか明らかでない。そこで、本研究では、モデル生物を利用した遺伝学的解析より、活性酸素の生成・消去に関わる遺伝子を同定する。そして、それらモデル生物変異体を用いて、種々の薬草より、活性酸素防御効果や寿命延長効果のある物質の探索を行う。これらの研究より得られる成果が、人々の健康増進、疾病予防、寿命延長に貢献することを目標としている				
4 研究成果	※研究成果については、2,000字程度で記入して下さい。(絵、図入りも可) ※地域貢献促進費の方は課題提案者に提出する報告書(必須)をご提出頂きますので、この欄は記載しないで結構です。その他の方は別紙を用意せず、この枠の中に記入するようにして下さい。(枚数は問いません)				

多くの生物にとって、酸素は生命活動に必須であるが、その一部は反応性の高い活性酸素となり、生命活動を脅かす。活性酸素種は、DNA、タンパク質、脂質等様々な生体分子に損傷を与え生命機能の低下をもたらすことから、種々の疾病や老化促進を引き起こすと考えられている。活性酸素の生成・消去に関与する遺伝子としてNADPH-オキシダーゼ、SOD、カタラーゼ等、幾つかの遺伝子が知られているが、そのメカニズムは複雑で他にも数多くの遺伝子が関与すると考えられる。

そこで、申請者は、モデル生物として頻用される線虫 *Caenorhabditis elegans* を採用し、遺伝学的手法による活性酸素の生成・消去に関わる遺伝子の同定を試みている。*C. elegans* で得られた基礎知識の多くはヒトを含む高等動物にもあてはまる事が分かっており、活性酸素の生成・消去の様な基礎的生命活動に関わる因子の多くは、線虫からヒトまで種を越えて保存されていると期待できる。本研究も最終的にヒトへの応用を目指しているため、モデル生物より得られた結果を、ヒト培養細胞を用いた実験系で検証する。また、インド地方の伝承医学「アーユルヴェーダ」に用いられる薬草類（ハーブ）を材料とし、変異体の遺伝子欠損を補える有用物質の探索も行う。遺伝子解析を即座に応用に結びつけるのは難しいので、このような薬効成分を介する応用を計画している。

## 1. *C. elegans* の *oxy-4*、*oxy-5*、*rad-8* 遺伝子の解析

*C. elegans* の 3 種類の活性酸素高感受性変異体 *oxy-4*、*oxy-5*、*rad-8* の原因遺伝子を同定し、これらの遺伝子の機能解析を開始した。

### 1-1. *C. elegans* の OXY-4、OXY-5、RAD-8 タンパク質の局在の解析

OXY-4 タンパク質の C 末端に FLAG タグを融合させ、*C. elegans* 内に安定的に発現させるベクターを構築した。この発現ベクターを用いて、線虫組織での発現パターンや細胞内局在を調べている。OXY-5、RAD-8 は C 末端に GFP 蛍光タンパク質を融合させる発現ベクターを構築した。この発現ベクターを用いて、蛍光シグナルを指標に発現パターンを解析した。OXY-5 と GFP の融合タンパク質では、観察に十分な強さのシグナルが観察されたが、RAD-8 の場合のシグナルは弱く、観察は困難であった。抗体を用いてシグナルを増強する必要があると思われる。

### 1-2. *C. elegans* の OXY-4、OXY-5、RAD-8 の酵母ホモログの解析

タンパク質の局在の解析と平行して、酵母ホモログを解析した。酵母 *oxy-4* ホモログは生育に必須なので、ガラクトース依存的な GAL1 プロモーターを利用し、条件致死変異株を作製した。生育に必要な炭素源としてラフィノースを加えた培地に、種々の濃度のガラクトースを加え、GAL1 プロモーターの強さを調節できるようにした。GAL1 プロモーターを弱く誘導し、活性酸素に対する感受性を調べた。また、*C. elegans* の *oxy-4* 遺伝子と酵母ホモログの機能は進化的に保存されていることが期待されたため、*C. elegans* の *oxy-4* 遺伝子の発現が致死性を抑圧できるかどうかを調べたが、抑圧できなかった。

*rad-8* ホモログは生育に必須ではないので、通常の遺伝子破壊体を作製し、活性酸素に対する感受性を調べたが、酸素に対し高感受性を示さなかった。酵母ゲノムには、*C. elegans* の *rad-8* に相同性を示す遺伝子が複数存在するので、機能が重複し、1 遺伝子の欠失では表現型が現れない可能性も考えられる。

### 1-3. ヒト培養細胞を用いた遺伝子解析

ヒトの *oxy-4* 遺伝子の RNAi によるノックダウン実験を行うために、ヘアピン RNA を発現させるベクターの構築に着手した。ベクターに用いる配列候補を文献より検索した。

## 2. 抗酸化ストレス活性・寿命延長活性を持つ薬草抽出液の同定

植物体を粉碎した後、80%メタノールで2週間抽出し、薬草抽出液を調製した。*C. elegans*の活性酸素高感受性変異体を抽出液を含む培地で、酸化ストレス（高濃度酸素）を与えて培養した。抽出液添加が増殖能を回復させるか調べた。現在のところ、強い回復効果を示すハーブは得られていないが、まだ、十分な数のハーブを検索できていないので、結論を出すにはもう少し実験の継続が必要となる。

## 5 研究成果の活用（予定）

例) 平成 22 年度 科学研究費補助金（基盤 S）に申請予定

例) 第〇会 〇〇学会に論文発表予定

例) 研究成果が横浜市〇〇事業に活用され、当該事業の PR イベントが開催された際に広報チラシ等に「横浜市立大学 研究戦略プロジェクト事業」との関連を記載した。

平成 21 年度科学研究費補助金（基盤 C）獲得

2010 年度農芸化学会大会で発表予定

※ページ数は増えても構いません。

以上