

遺伝子で応える細胞のストレス応答

野口 範子

要約：われわれヒトを含め地球上の生物は、常に活性酸素やフリーラジカルによる酸化傷害の危険にさらされてきた。それにもかかわらず、発展することができたのは、酸化ストレスに対する防御機構を獲得したためと考えられる。防御機構の構築およびその維持は、細胞の遺伝子発現の調節によってなされてきた部分が多い。生物が酸素を使って生命を維持するうえで、活性酸素やフリーラジカルの生成は避けることができない。これらの活性種は、細胞を構成する脂質、タンパク質、核酸などを酸化し、様々な酸化生成物を与える。酸化生成物による遺伝子誘導を解析することによって、これまで細胞毒性の強い物質として報告されていたものが、様々な細胞防御遺伝子の発現誘導能をもつことがわかってきた。また、放射線は生体に傷害を与えることが知られているが、高線量で暴露する前に低線量で処理しておくこと、傷害が抑制されることが報告されている。これはホルミシス現象と呼ばれるものであるが、同じことが脂質酸化物による細胞傷害の防御能充進に適用できることが証明されてきた。つまり、低濃度の細胞毒性の強い脂質酸化生成物で細胞を前処理しておくこと、それに続いて高濃度でひきおこされる細胞傷害を軽減することができる。そのメカニズムは脂質酸化生成物の種類によって異なるが、一部は転写因子 Nrf2 で制御される細胞防御酵素の発現誘導によることが証明されている。また、詳細は明らかではないが、Nrf2 非依存的に細胞防御系が充進するメカニズムが存在することも示唆されている。

1. 酸化ストレスとの疾患

われわれヒトを含め地球上の生物は、酸素を利用して効率よくエネルギーを得ることに成功し発展してき

た。その一方で、生物は常に活性酸素やフリーラジカルによる酸化傷害の危険にさらされてきた。生物が酸化ストレスに倒れることなく、これまで発展することができたのは、酸化ストレスに対する防御機構を獲得したためと考えられる。近年、様々な異常気象に象徴されるようにわれわれの住む地球環境は大きく変わってきており、紫外線や有害な化学物質に曝される割合がまた増えてきている。外環境だけではなく生活習慣の変化にともない、癌や動脈硬化、糖尿病といった、いわゆる生活習慣病は増加の一途を辿っている。これらのいずれの疾患の発症にも酸化傷害は関係しているといってもよい(図1)。

2. 酸化ストレスに対する防御機構

われわれのように常に酸化ストレスに曝される危険性をもつ生物は、優れた防御システムを構築して酸化ストレスに対抗、言い換えれば適応してきたといえる。酸化ストレスに対する防御システムは機能別に4つに分けることができる。1) 活性酸素、フリーラジカルの生成を抑えること、2) 生成した活性

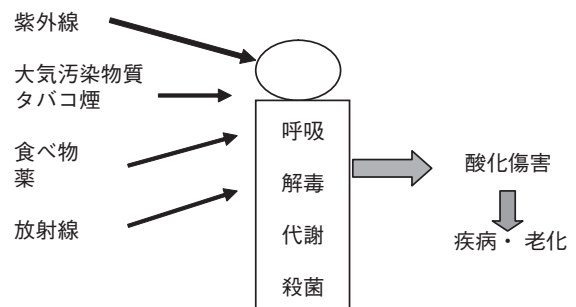


図1 生体の内外で生じる活性酸素・フリーラジカルによる酸化ストレスと傷害

キーワード：酸化ストレス、適応応答、防御機構、遺伝子発現、DNA マイクロアレイ
 同志社大学工学部環境システム学科 (〒610-0321 京田辺市多々羅都谷 1-3)
 東京大学先端科学技術研究センター (〒153-8904 東京都目黒区駒場 4-6-1)
 e-mail: nnoguchi@mail.doshisha.ac.jp

Title: Stress responses of cells via gene expression. Author: Noriko Noguchi

表 1 酸化ストレスに対する生体の防御システム

1) 予防型抗酸化物	ラジカルの生成を抑制	カタラーゼ、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、グルタチオンペルオキシダーゼ、グルタチオンSトランスフェラーゼ、トランスフェリン など
2) ラジカル捕捉型抗酸化物	連鎖開始反応を抑制 連鎖成長反応を抑制	ビタミンC、ビタミンE、尿酸、ビリルビン、アルブミン、カロテノイド、ユビキノール、フラボノイド など
3) 修復、再生型抗酸化物	酸化変性物質の修復と再生	リパーゼ、プロテアーゼ、DNA修復酵素、アシルトランスフェラーゼ など

酸素、フリーラジカルを速やかに消去、捕捉、安定化すること、そして、3) 生じた損傷を修復し、失ったものを再生すること。4) 必要に応じてこの防御機能を誘導すること。このような作用をもつものを広く抗酸化物 (antioxidant) といい、それぞれ機能ごとに、1) 予防型抗酸化物 (preventive antioxidant)、2) ラジカル捕捉型抗酸化物 (radical-scavenging antioxidant)、3) 修復、再生型抗酸化物 (repair, *de novo* antioxidant)、4) 適応機能 (adaptation) と呼ぶ。表 1 に 1) から 3) の機能別抗酸化物に属する物質を示している。1) と 3) は主に酵素 (タンパク質) がその役割を担うが、2) のラジカル捕捉型抗酸化物の多くは、一般の人にも馴染み深いビタミン (ビタミンC、ビタミンE) やポリフェノール、コエンザイムQなどの低分子化合物である。これらの抗酸化物は活性酸素やフリーラジカルを捕捉するか安定化させて、細胞を攻撃するのを防いだり、酸化傷害が広がることを防ぐ役割を担っている。これらの化合物の多くは食物から摂取され、生体内の

酵素によって代謝を受ける。1) と 3) に属する物質はタンパク質であるため、これらの機能は遺伝子の発現レベルによっても影響を受ける。

3. 酸化ストレスへの適応

生体がもつ抗酸化防御システムの4つ目に、必要に応じて1) から3) の防御機能を誘導して「適応機能」をはたす系が分類されている。抗酸化システムの機能別分類はかなり以前からなされていたが、適応機能のメカニズムの詳細については最近急速に明らかにされてきている。本研究のねらいの中心は、酸化ストレスに対する生体の適応のメカニズムを、細胞の遺伝子発現制御に注目して明らかにすることである。

4. 遺伝子発現解析の方法

従来の Differential Display 法や cDNA subtraction 法に代わり、より包括的な遺伝子発現解析法として DNA マイクロアレイ法が開発された。DNA マイクロ

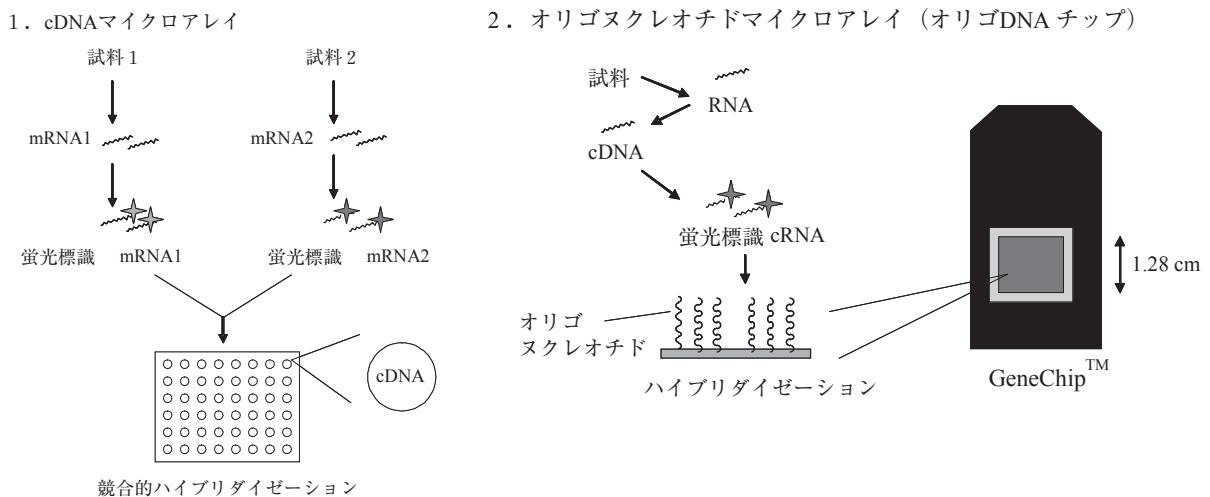


図 2 DNA マイクロアレイの種類と原理

アレイとは、数千種以上の DNA またはオリゴヌクレオチド（これらをプローブと呼ぶ）を数センチ四方の基盤上に固定したもので、蛍光標識した試料 RNA（サンプルプローブまたはターゲット）とハイブリダイゼーションさせて遺伝子の発現量を検出するものである。現在では多種の DNA マイクロアレイが製品化されており、その精度、感度ともに向上する一方、価格が低下してきたこともあり、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子解析の報告が増えてきている。

1) DNA マイクロアレイの種類

DNA マイクロアレイはプローブの種類と作成方法の違いにより大きく2つに分類される（図2）。cDNA の断片をガラスなどの基盤上に固定する方式と、オリゴヌクレオチドを基盤上で合成（オリゴ DNA チップまたはオリゴヌクレオチドマイクロアレイ；Affymetrix 社の GeneChip™），もしくは合成したオリゴヌクレオチドを基盤上に固定する方式である。

① cDNA マイクロアレイ

PCR で増幅した cDNA 断片を基盤上に固定した cDNA マイクロアレイは、異なる蛍光物質を用いて標識した2つの検体を競合的ハイブリダイゼーションさせ、両者の蛍光強度の量比を算出することにより発現量を求める。研究目的にあわせて必要なプローブを並べるカスタムアレイを作成することが容易である一方で、データを共有する場合に標準化が困難であるという問題がある。

②オリゴ DNA チップ

GeneChip™ は、mRNA に対する相補的な 25 mer（塩基長）のオリゴヌクレオチドプローブを1つの遺伝子あたり 11～20 デザインし、基盤上で光照射化学合成技術を用いて作成する。フォトリソグラフィックマスクにより特定のセルのみ光照射して活性化し、ヌクレオチドの化学的カップリング反応を行わせる。あらかじめデザインしたマスクを順次用いることにより、アレイ上の決められた位置に各種のオリゴヌクレオチドプローブを合成して高密度アレイを構築する。現在、市販されているアレイは 11 ミクロン四方のプローブセルが約 1000 × 1000 並び 100 万個以上のオリゴヌクレオチドが 1.28 センチ四方の基盤上に合成されている。発現解析用チップの種類はヒト、マウス、ラット、酵母を中心に作成されていたが、近年種類が急速に増え、牛、犬、カエル、ゼブラフィッシュ、線虫、その他多岐に渡っている。ヒト用チップは、現在明らかにされているヒト遺伝子のほぼすべてを網羅しているといつてよい。

2) オリゴ DNA チップの実際

試料（培養細胞、組織）から RNA を抽出し、T7 プロモーターを有するプライマーを用いて cDNA を合成し、さらに T7RNA ポリメラーゼにより cRNA を合成するが、その際に Biotin-11-CTP と Biotin-16-UTP によって標識を行う。RNA は全 RNA, Poly (A)-RNA いずれも使用可能である。全 RNA の場合 10 μg あればハイブリダイゼーションを行うのに十分である。プローブに結合したビオチン化 cRNA にアビジン-フィコエリスリンを結合させ、共焦点アルゴンレーザー スキャナーを用いて蛍光分子を励起させ、その蛍光量を測定する。

発現強度の数値化（スコアリング）は、オリゴヌクレオチドプローブをデザインする際に、配列が完全に一致する「perfect match」の他に、配列の中央付近に 1 塩基異なる「miss match」を対にして用意する。この対のシグナル強度の差の平均値（average difference）を遺伝子の発現強度とする。これにより、類似の配列をもつターゲットからのクロスハイブリダイゼーションを補正することができ、絶対量としての精度、再現性も良好になる。バックグラウンドの補正も必要であるが、スコアリングと合わせてソフトの改良により解析結果の信頼性は向上させるように工夫されている。これらの詳細については他の成書を参照されたい（1）。

5. 酸化ストレスに対する遺伝子発現応答

酸化ストレスが主な原因となると考えられる疾病は数多くあるが、動脈硬化はその代表ともいえる病態である。このことは、動脈硬化の発症や進展に、酸化変性を受けた低比重リポタンパク（low density lipopro-

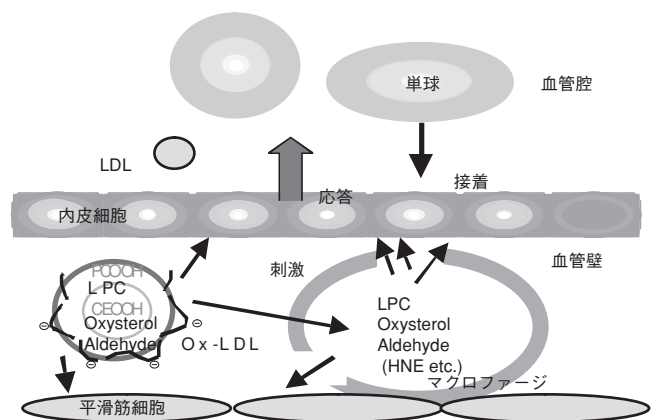


図3 動脈硬化の酸化 LDL 仮説と酸化生成物

LDL は酸化されるとさまざまな脂質酸化生成物をもつ酸化 LDL になり、血管の細胞を刺激する。また、マクロファージは酸化 LDL 取り込み、泡沫化細胞となって集積するが、破裂した細胞内から放出された脂質酸化生成物もまた血管の細胞を刺激し、様々な応答を導く。

tein, LDL) が重要な役割を担うという, 「酸化 LDL 仮説」が提唱されていることから伺える(2). 実際に動脈硬化巣から酸化 LDL や種々の脂質酸化生成物が検出されており, これらが血管細胞を刺激して様々な応答を誘導する. 図3に示すように, 酸化 LDL は受容体を介して細胞内に取り込まれ, 酸化 LDL に含まれる脂質酸化生成物は細胞内で分散して細胞に作用する. また, 一旦酸化 LDL を取り込んだマクロファージが崩壊し, 血管内膜中に飛散した酸化物が細胞の外から作用する場合も考えられる. 脂質酸化生成物は各々に特徴のある生物活性をもち, 動脈硬化の進展に寄与していることが報告されている(3).

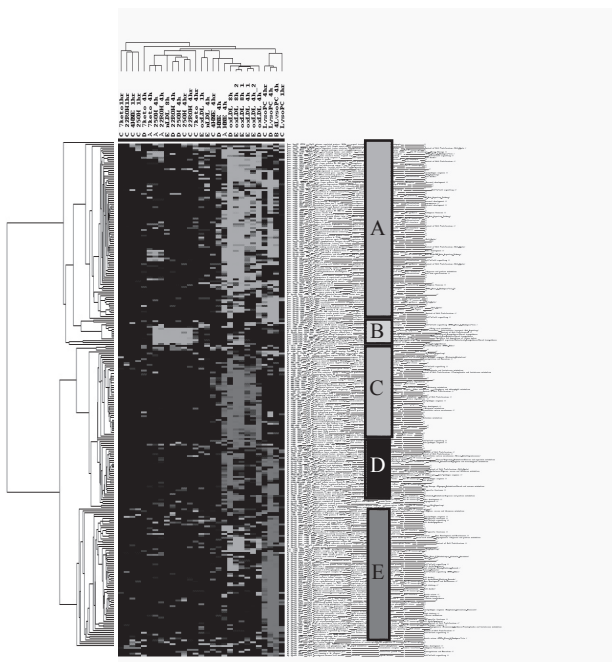


図4 酸化 LDL と脂質酸化生成物に対する内皮細胞の遺伝子発現応答

HUVEC に酸化 LDL および LPC, HNE, oxysterol を添加し, 1, 4 時間後の遺伝子発現を DNA マイクロアレイを用いて分析した結果をクラスター解析した.

著者の研究室では, 未酸化 LDL (nLDL, 200 μ g/ml) と酸化 LDL (oxLDL, 200 μ g/ml) および酸化 LDL に含まれる主要な脂質酸化生成物である LPC (30 μ M), HNE (5 μ M), 3 種類のオキシステロール (22-OH-ch, 25-OH-ch, 7-keto-ch 各 10 μ M) に対する, ヒトの臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の遺伝子発現応答を, オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて解析している.

クラスター解析結果を図4に示したが, 発現パターンは大きく分けて A ~ E の5つのクラスターに分類された.

- A : OxLDL, LPC によって発現が低下する遺伝子
- B : OxLDL, オキシステロールで低下し, LPC によって上昇する遺伝子
- C : OxLDL, HNE によって発現が上昇する遺伝子
- D : OxLDL によって発現が上昇する遺伝子
- E : LPC によって上昇する遺伝子

6. 酸化ストレスへの遺伝子発現による適応反応

酸化生成物による遺伝子誘導を解析することによって, これまで細胞毒性の強い物質として報告されていたものが, 様々な細胞防御遺伝子の発現誘導能をもつことに気づく. ホルミシス現象として捕らえられる酸化生成物の細胞防御作用は (二木原稿参照) これらの遺伝子を誘導することにより行なわれていることが理解され, 実験的にも確認されている(4-6).

文 献

- 1) Kohane S, et al. 統合ゲノミクスのためのマイクロアレイデータアナリシス. シュプリンガーフェアラーク東京; 2003.
- 2) Steinberg D, et al. N Engl J Med. 1989;320:915-924.
- 3) 野口範子. J Vasc Med. 2006;2:33-39.
- 4) Chen Z-H, et al. J Biol Chem. 2005;280:41921-41927.
- 5) Chen Z-H, et al. FEBS Lett. 2006;580:479-483.
- 6) Chen Z-H, et al. J Biol Chem. 2006;281:14440-14445.

著者プロフィール

野口 範子 (のぐち のりこ)

同志社大学工学部環境システム学科, 教授.

東京大学先端科学技術研究センター, 特任教授. 医学博士.

◇ 1977年3月 京都市立堀川高等学校卒業, '81年3月 筑波大学第二学群生物学類卒業, '87年3月 筑波大学大学院医学研究科博士課程修了, 同年4月 帝京大学医学部 助手, '90年2月 National Institute of Standards and Technology (U.S.A.) 客員研究員, '91年2月 東京大学工学部 助手, '93年11月 東京大学先端科学技術研究センター 助手, '05年4月 東京大学先端科学技術研究センター 特任教授, 同志社大学工学部 教授. ◇研究テーマ: 活性酸素フリーラジカルによる LDL の酸化と抗酸化物によるその抑制メカニズム, 酸化ストレスと細胞内情報伝達機構, 酸化と抗酸化による遺伝子発現. ◇趣味: 犬のシャンプー&ブロー. ◇著書: 酸化ストレスマーカー, 二木鋭雄, 野口範子, 内田浩二 編. 学会出版センター.

