

# 遺伝子で応える細胞のストレス応答

同志社大学工学部環境システム学科

野口 範子

## 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)。

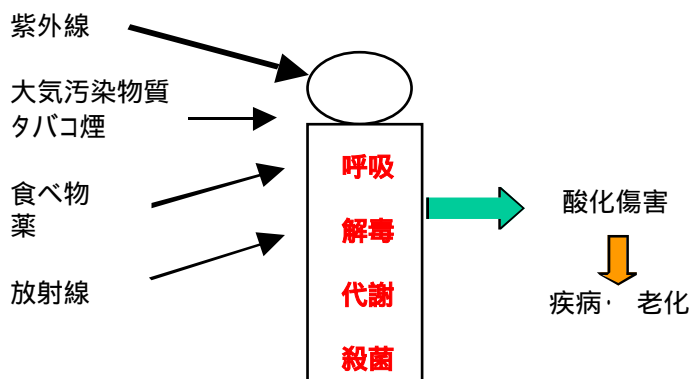


図1. 生体の内外で生じる活性酸素・フリーラジカルによる酸化ストレスと傷害

## 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、いいかえれば適応してきたといえることができる。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 に属する物質は蛋白質であるため、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。

表 1 酸化ストレスに対する生体の防御システム

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
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
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

### 3. 酸化ストレスへの適応

生体がつ抗酸化防御システムの4つめに、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 法にかわり、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。

#### 4 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。

##### 4 - 1 - a 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。

##### 4 - 1 - b オリゴ DNA チップ

GeneChip™ は、mRNA に対する相補的な 25mer（塩基長）のオリゴヌクレオチドプローブを一つの遺伝子あたり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 x 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。ヒト用チップで解析できる遺伝子の数は、特徴が明らかにされている遺伝子38,500個、これに転写産物やバリエーションを含めると47,000個を超える。

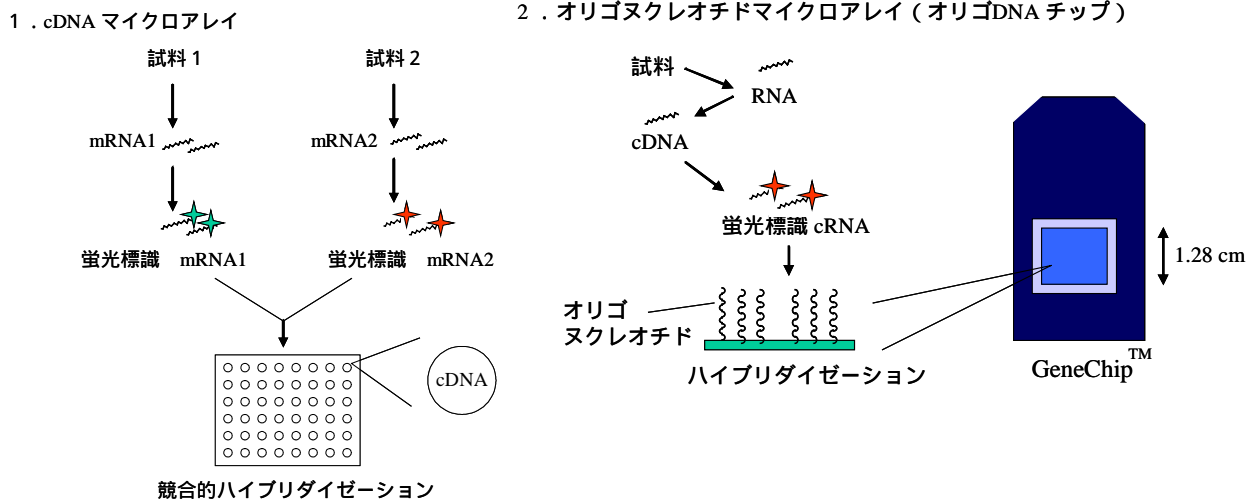


図2 DNA マイクロアレイの種類と原理

#### 4 - 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 $\mu$ g あればハイブリダイゼーションをおこなうのに十分である。プローブに結合したビオチン化 cRNA にアビジシン-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 lipoprotein, 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)。

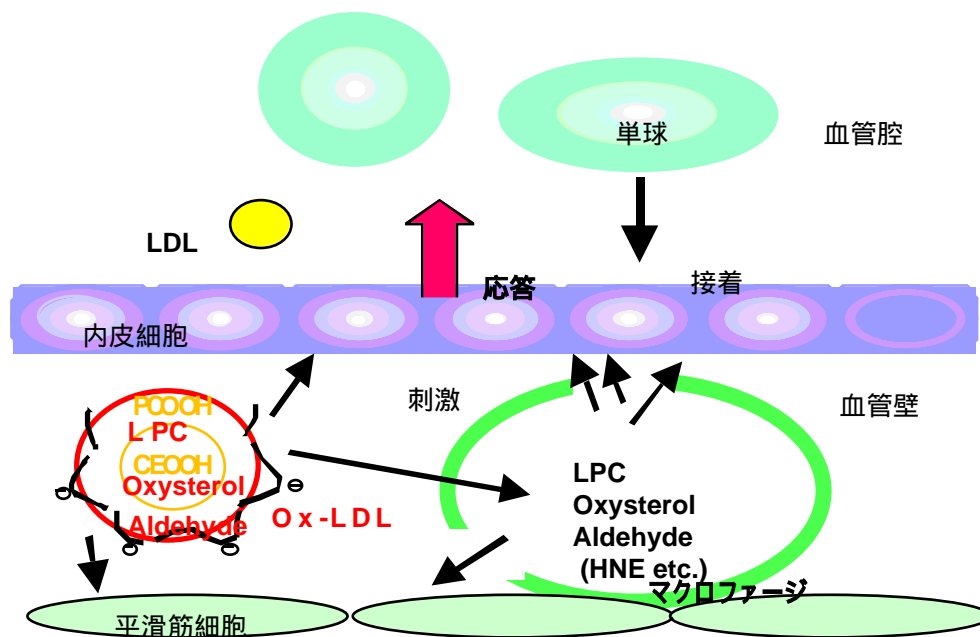


図3 動脈硬化の酸化LDL仮説と酸化生成物

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。

著者の研究室では、未酸化 LDL(nLDL, 200 $\mu$ g/ml)と酸化 LDL(oxLDL, 200 $\mu$ 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 $\mu$ M)、HNE(5 $\mu$ M)、3種類のオキシステロール(22-OH-ch, 25-OH-ch, 7-keto-ch 各 10 $\mu$ 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

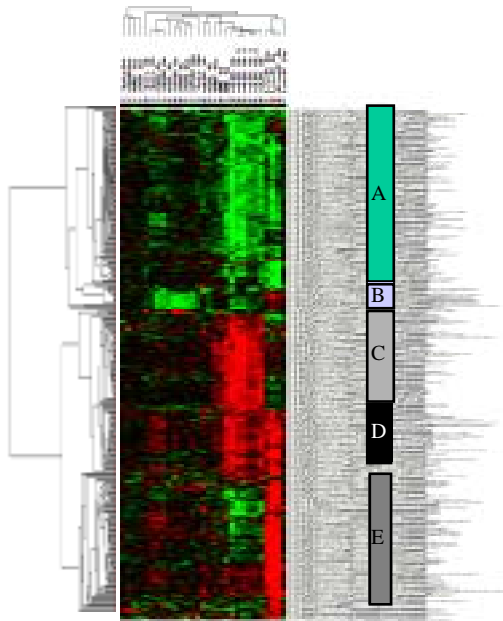


図4 酸化LDLと脂質酸化生成物にたいする内皮細胞の遺伝子発現応答  
 HUVEC に酸化LDLおよびLPC, HNE, oxysterolを添加し、1、4時間後の遺伝子発現をDNA  
 マイクロアレイを用いて分析した結果をクラスター解析した。

## 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(二木要旨)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)。

- 1 ) Kohane S. et al., 星田有人訳 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、2003、シュプリンガーフェアラーク東京
- 2 ) Steinberg, D. et al., *N. Engl. J. Med.* 320 , 915-924, 1989
- 3 ) 野口範子, *J. Vasc. Med.* 2, 33-39, 2006
- 4 ) Chen et al., *J. Biol. Chem.*, , 280, 41921, 2005