

課題番号 5

Nrf2 により発現制御される抗酸化・レドックス遺伝子の アスコルビン酸欠乏下における役割の解明

[1] 組織

代表者：藤井 順逸
 (山形大学大学院医学系研究科)
 対応者：本橋 ほづみ
 (東北大学加齢医学研究所)
 分担者：本間 拓二郎
 (山形大学大学院医学系研究科)
 研究費：物件費 15 万円

[2] 研究経過

老化および炎症などの病態で活性酸素種がどのように生成し制御されているかを明らかにするために、抗酸化酵素の SOD1 や、抗酸化作用のあるビタミンC (アスコルビン酸) の合成に関わる Akr1a 遺伝子欠損マウスを用いて研究を行ってきた。合成を担う酵素を欠くため、ヒトではアスコルビン酸はビタミンCに分類されているが、マウスはグルコースから多段階を経て合成できる。我々はアスコルビン酸合成に関わる Akr1a 遺伝子を欠損するマウスとスーパーオキシドの消去を担う SOD1 欠損マウスの二重欠損マウスを樹立し解析することで、それぞれの遺伝子の単独欠損では軽微な症状しか示さないにもかかわらず、二重欠損により2週間以内に死亡するといった致死的な病態を示すことを見出した。

アスコルビン酸は酵素の補因子としての作用を有するが、壊血病に見られるように、その欠乏の影響が現れるまでに長い期間を要する。またアスコルビン酸には抗酸化作用があるが、特異性が低く、その作用対象については不明な点が多い。この二重欠損マウスの結果は、アスコルビン酸がスーパーオキシドの消去に働き、その欠乏はスーパーオキシドの有害性を著しく高めることを示している。

体内で生じた活性酸素の消去には、アスコルビン酸以外にも各種抗酸化酵素が携わる。グルタチオンペルオキシダーゼ(GPX)は過酸化物の還元に関与する一群の酵素であり、グルタチオンから電子の供給を受ける。その電子供与体として働くグルタチオンの合成酵素や、同じく過酸化水素の消去に関与するグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)は、転写調節因子である Nrf2 によって発現誘導される(図)。しかしアスコルビン酸と Nrf2 の抗酸化能の相互の関連はほとんど知られていない。

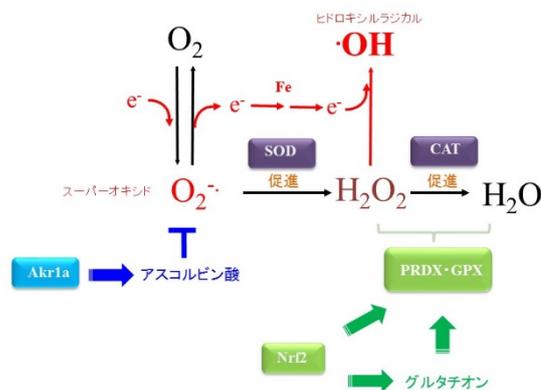


図 アスコルビン酸とNrf2による活性酸素の消去経路

本研究は、炎症やストレス負荷をかけたマウスにおけるアスコルビン酸欠乏による影響を調べ、Nrf2 制御下にある抗酸化・レドックス遺伝子との関連を明らかにすることを目的とする。本課題申請に当たっては、本橋教授の下で研究打合わせを行い、遂行の過程で、Nrf2 欠損マウスの入手ならびにその解析についてのご助言を e-mail でいただいている。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

Akr1a 遺伝子単独欠損マウスについては、以下のような知見が得られた。

1. Akr1a 遺伝子欠損マウスは持久力が増強している。

4ヶ月齢前後の雄の Akr1a 遺伝子欠損マウスを、トレッドミス装置により強制運動させて、野生型マウスの結果と比較した。当初の予想では、アスコルビン酸を欠乏しているため、増加した活性酸素により持久力が低下すると考えていたが、実際には長時間の運動に耐え、持久力の増強が認められた。しかしアスコルビン酸の投与の有無による影響を受けなかったことから、この結果は Akr1a の有するアスコルビン酸合成以外の機能に関わる可能性を示唆している。

この時、Akr1a 遺伝子欠損マウスの方が、血液中のグルコース濃度が高く維持され、遊離脂肪酸含有量が増加していた。また Nrf2 や PPAR δ による遺伝子発現制御の過程で補助分子として働き、エネルギー代謝の調節の上で重要な役割を果たす PGC-1α の発現亢進が認められたことから、グルコース節約の結果が持久力の向上に繋がった可能性が示唆された。

2. ビタミンCの欠乏は敗血症の症状を悪化させる。

外傷や手術時の細菌感染によって起こる敗血症では、細菌内毒素が原因となって炎症細胞が活性化され、活性酸素種が大量に生成する。3ヶ月齢の雌の *Akr1a* 遺伝子欠損マウスを用いて敗血症病態モデルを作製したところ、野生型マウスに比べて病態が悪化し、死亡率が増した。一方、1.5 g/Lのアスコルビン酸を飲水投与することで、死亡率が著しく改善した。これまでの報告ならびに *in vitro* の結果から、アスコルビン酸による活性酸素の消去がこの改善をもたらしたと考えられる。

3. ビタミンCの欠乏は幼若マウスの空間記憶を低下させる。

ビタミンCは主に肝臓で合成され、各臓器に運搬されるが、その貯蔵濃度は脳が最も高い。そこで雄の *Akr1a* 遺伝子欠損マウスを用いて水迷路試験を行ない、ビタミンCの空間記憶への影響を調べた。その結果、離乳直後（5週齢）には、空間記憶形成に異常が認められ、ビタミンCの投与で改善した。一方、生後3ヶ月齢の成獣ではビタミンCの有無による影響は認めなかった。以上の結果は、神経系が成熟する若齢ではビタミンCは空間記憶形成に重要な役割を担うが、成獣ではビタミンCの依存性は低下することを示している。

マウスの入手に時間を要し *Nrf2* 欠損マウスに関する結果は得られていないため、今後は、*Nrf2* 欠損マウスならびに二重欠損マウスを樹立し、同様の解析を行なうことで本研究の目的を達成する予定である。

（3-2）波及効果と発展性など

1. 今後の展望

Nrf2 の制御を受けるグルタチオン-GPX系を中心とする抗酸化系の連携をマウス個体で検証することで、酸化ストレスが関係する炎症をはじめとする各種疾患の予防に繋がると考える。食品やサプリメントとして安全かつ安価に摂取可能であるビタミンCと、*Nrf2* 活性化能を有する成分を含む食品の同時摂取の有効性について科学的な根拠を提示することで、こうした成分を多く含む食品やサプリメントの摂取が健康維持に繋がる可能性がある。

2. 若手研究者の育成と研究者ネットワークの広がり

分担研究者である本間助教は、大学院生とともに本研究の中心を担っており、将来が有望な若手研究者である。また本研究に関連する課題については、二国間共同研究（日本学術振興会プログラム）として進行中であり、さらに本研究組織のメンバーが参加する申請が、山形大学の学内資金である平成31年度YC-COE(C)にも採択され、今後の研究グループとしての広がりや研究の発展が期待される。

3. 新領域の開拓

酸化ストレスが原因と考えられる炎症性疾患や癌の研究領域では、最近報告された、アポトーシスとは異なる鉄依存性の細胞死であるフェロトーシスが注目されている。グルタチオンならびに *GPX4* がフェロトーシス抑制因子として中心的な役割を担うことから、関連遺伝子の制御を担う *Nrf2* の役割は極めて重要である。*Nrf2* はこうした遺伝子の発現を介してフェロトーシスを抑制すると考えられることから、本研究課題はフェロトーシス解明につながる新たな研究領域として発展することが期待される。

〔4〕 成果資料

報告すべき成果は未だございません。