

## 総 説

### ストレス制御医学の確立をめざして : DNA チップを用いたストレス評価

六 反 一 仁

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

プロテオミクス医科学部門生体制御医学講座

ストレス制御医学分野

(平成16年4月15日受付)

(平成16年4月30日受理)

ヒューマンゲノムプロジェクトも終了し、ストレス応答を調節する多くのストレス関連遺伝子が同定された。ストレス関連遺伝子とその発現シグナルの研究から、ストレス応答は、生物がもつ環境適応反応として理解され、その生物学的意義も明らかにされつつある。今後は、スプライシングバリエーションや cap 非依存性のバリエーションタンパク質を介するストレス反応の解明がポストゲノム時代の重要な研究テーマである。ヒトのストレス評価に関して、我々が開発したストレス評価用 DNA チップは、末梢白血球に映し出される“こころのゆがみ”を捉える新しいバイオ・メンタル技術として、文部科学省省科学技術振興調整費と21世紀 COE プログラム「ストレス制御をめざす栄養科学」事業の基盤技術の一つとしてその成果が期待されている。本稿では、21世紀の重要テーマである“こころと遺伝子”を推進する新たな分野への挑戦についても紹介する。

#### はじめに

1930年代にハンス・セリエは、外部からのさまざまな侵襲や環境変化に対して生体の恒常性(ホメオスタシス)を保つ非特異的な生体反応をストレスと定義し、時間的・空間的な生体応答として確立した。このセリエの卓越した概念をもとに、ストレス反応を引き起こす生体内因子が次々と明らかにされ、これらの成果は20世紀における生理学の発展の礎となったといっても過言ではない。ストレス応答は、生体における三大調節機構である内分泌、神経、免疫系のすべてが関与する複雑系の反応である。さらに、相反作用を有する複数の因子が同時に関与するため、はたして体によい反応なのか悪い反応な

のかを明確に区別することは難しい。ストレス研究は多くのジレンマを抱えているが、ストレスは現代社会の最重要テーマの一つとなっており、社会のニーズに応えるため、基礎研究の発展とその成果が期待されている。本稿では、ストレス反応の仕組みとストレス制御をめざすわれわれの取り組みについて紹介する。

#### 1. ストレス応答と遺伝子

ストレス反応を生物の環境適応反応として捉えたと、表1のように、時間的な観点からその仕組みを、遺伝子の変異、遺伝子の再構成、遺伝子発現として分類することができる。生物にとって最も本質的な環境適応反応は遺伝子変異を介するものであり、何億年にもわたる進化という形で現れ、新たな環境に適した表現系を獲得した生物が地球上で生き延びてきた。遺伝子の再構成はもう少し短い日~年の時間単位で生じる反応であり、代表的な例として、初めて体内に侵入してきた微生物に対して特異的な抗体を作り出すため、抗体的可変領域をコードする遺伝子の再構成を行うことで多様な抗原に特異的な抗体を作り出す免疫反応が挙げられる。時間的に最も早いストレス応答は、ストレス関連遺伝子の発現を介した反応であり、熱ショックタンパク質のように15分程度の

表1 環境変化に対する生物の適応反応<sup>1)</sup>

応答形式	対象	時間	調節機構
進化	種・属	年~億年	遺伝子の突然変異
免疫応答	個体	日~年	遺伝子の再構成
ストレス応答	細胞・個体	分~時間	遺伝子発現

早い時間で遺伝子発現が生じることもあるが、通常は時間単位の反応である。現在、ストレス応答に關与する遺伝子が数多く同定され、それらの機能解析が進んでいる。

## 2. ストレス反応の新たな経路

最近、遺伝子の再構成が急性ストレス反応においても重要な役割を果たすことが示唆されている。スプライシング因子として知られている transformer beta 2 (Tra 2β) は、低酸素誘導性のストレスタンパク質としても知られている。Tra 2β 遺伝子は10のエクソンからなるが、エクソン 2 には複数の終止コドンがあるため、通常はエクソン 2 を含まない mRNA が転写される。図 1 に示したように、ラットに水浸拘束ストレスを負荷すると、エクソン 2 を含む高分子量の Tra 2β mRNA アイソフォームが新たに発現してくる。この mRNA アイソフォームからはエクソン 4 の翻訳開始点から低分子 Tra 2β タンパク質が翻訳される。通常の状態では翻訳される高分子の Tra 2β タンパク質とストレスで誘導される低分子 Tra 2β タンパク質をそれぞれ過剰発現させた細胞

を用いて機能解析を行うと、ストレス誘導性 Tra 2β タンパク質を過剰発現させた細胞では、増殖能は低下するが酸化ストレスに対する抵抗力が増大する。このように、ストレス時に遺伝子の再構成を行い、合目的に細胞機能を変化させる仕組みも存在する。

もう一つの新たな経路として1つの mRNA から異なった翻訳開始点を使い分けることで長さや機能の異なるタンパク質を合成する反応もある。Cap 依存性翻訳とは別に、internal ribosome entry site (IRES) と呼ばれる GC に富んだ 5' UTR 領域に43S リボソームが結合し、短絡的に CUG の翻訳開始点から高分子量のタンパク質(トランスレーションバリエーション)が合成される経路がある。ストレス下ではこの IRES 依存性の翻訳活性が高まり、トランスレーションバリエーションによる細胞機能制御の存在が注目されている。こうした IRES 構造を 5' UTR にもつ代表的な mRNA として fibroblast-derived growth factor 2 (FGF 2) が知られており、その様式を図 2 に示した。

このように、RNA をめぐる制御機構は、RNA 干渉、マイクロ RNA や non-coding RNA などを含めて大きなトピックとなっており、RNA ワールドはストレス研究の分野でも重要なテーマとなるだろう。

### A



### B



図 1. ストレスによる transformer beta 2 (Tra2β) mRNA のスプライシングアイソフォームの発現  
tra2β mRNA には (A) で示したような 5 つのスプライシングバリエーションの存在が報告されている。エクソン 2 には複数の終止コドンが存在するため、通常はエクソン 2 を含まない tra2β 1 が発現している。ラットに水浸拘束ストレスを負荷すると、(B) に示したように、胃粘膜にエクソン 2 を含む 2.5 kb の tra2β 4 が新たに発現してくる。この tra2β 4 mRNA からは、エクソン 4 の翻訳開始コドンから低分子量の Tra2β タンパク質が合成される。

## 3. ヒトにおけるストレスをどう評価するか

培養細胞を用いた細胞応答の研究や実験動物を用いた生理機能の研究は、ストレス研究の分野でも動物愛護の制限はあるものの比較的容易に行うことができる。しかしながら、ヒトのストレス研究については極めて困難である。まず、何がストレスなのかについての議論から始めなければならない。さらに、ストレス反応自体が複雑系の反応であるのに加えて、ストレスに対する感受性は、個人を取り巻くさまざまな生活環境要因や個人の生物学的特性はひとりひとり全く異なるため、個人にかかるストレスを評価することは極めて難しい。従来、個人のストレス評価は、ライフイベントや日常苛立ちごとなどから個人にかかるストレスを評価し、生物学的特性は性格テストや心理テストで判定し、ストレスホルモンなどの限られた因子を測定することで生理反応を評価し、さらに、臨床的な評価が加わり、膨大な時間と労力が必要とされてきた。これらの評価法は一定の成果をあげたものの客観性に欠けが現状である。

われわれは、ストレス応答を制御する新たなストレス

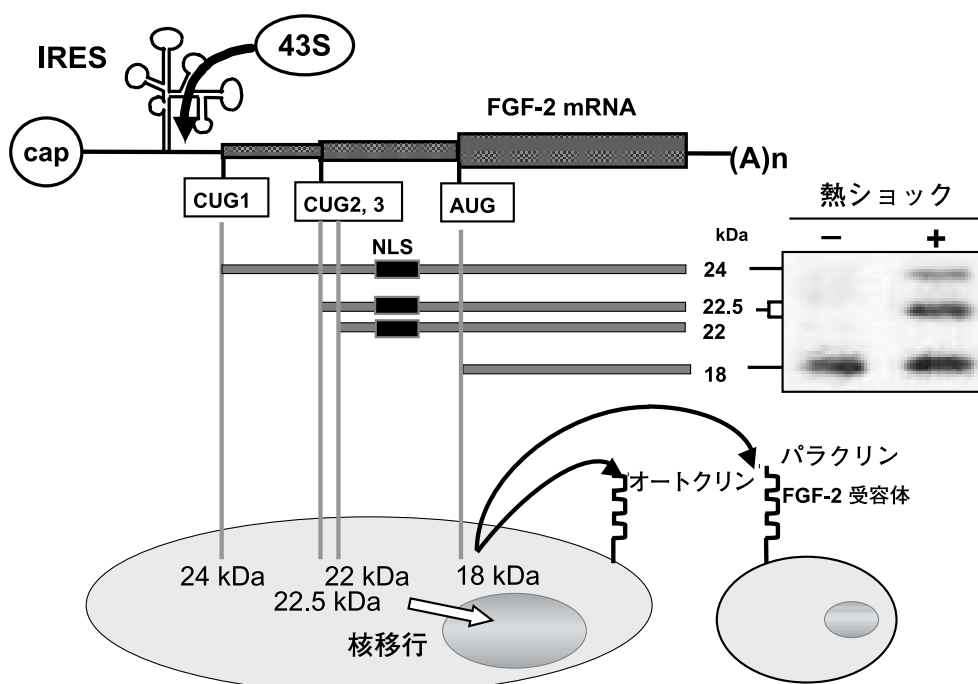


図2．ストレスによる FGF 2のトランスレーションバリエーションタンパク質の誘導

FGF 2 mRNA の 5' UTR には IRES 構造があり、熱ショックなどのストレス下では、cap 依存性の翻訳の他に、IRES を経由する翻訳が生じ、5' UTR の CUG コドン を翻訳開始点として高分子タンパク質が翻訳される。これらの高分子バリエーションタンパク質は核移行シグナル (NLS) をもつため、従来のオートクリン、パラクリン増殖因子としての働きの他に、核内で何らかの働きをする可能性が示唆されている。

関連遺伝子に加え、細胞周期、増殖及びアポトーシスに関与する因子、細胞内情報伝達因子、受容体、薬物代謝酵素などのカテゴリーに属する合計1,500遺伝子を搭載した DNA チップを開発した<sup>2)</sup>。健康管理や臨床の場で広く利用されるためには、生体内の遺伝子発現状態を正確に反映する mRNA を、安全に、簡便に、かつ安定して調整できることが求められる。幸い末梢白血球はストレスに関連因子に対する数多くの受容体を発現していることから、白血球に伝えられた脳内の変化(こころの動き)を mRNA の発現変化を網羅的に解析し、それをパターン化して評価するコンセプトである。

#### 4．ストレス評価用 DNA チップ

DNA チップのプロープ(基板上に固定する DNA)は、それぞれの標的 mRNA と結合する特異的な配列を持っていること、かつ、プロープと mRNA のすべての結合反応(ハイブリダイゼーション)が同じ条件で行われることが要求される。このため、均等化した融解温度( $T_m$ )やプロープができるだけ二次構造をとらないような配列が求められる。本 DNA チップで用いるプロ-

ープは独自のソフトウェアを用いて、%マッチ、 $T_m$  差、G 差の3重のチェックをして類似配列を除外するという処置を施し、クロスハイブリダイゼーションを起こさない塩基配列を設計している。

末梢血 5 ml から総 RNA 10 - 20 $\mu$ g を抽出する。T7 based RNA 増幅法により mRNA を増幅し、Cy 3 あるいは Cy 5 の蛍光色素でラベルを行った後、一晚、スライドガラス上でハイブリダイゼーションを行った後、蛍光スキャナーで個々の遺伝子の発現量を読み取る。3 - 5 $\mu$ g の総 RNA サンプルから、全スポットによる再現性(CV 値)は cDNA プロープで 20% 以下、オリゴヌクレオチドプロープで 10% 以下、ダイナミックレンジ 3 桁を実現している。得られた発現データは、2 項間相関、クラスタリング、機械学習などの解析を行い、データベース化を行っている。

#### 5．ストレス評価用 DNA チップの特徴

本 DNA チップは特定の疾患遺伝子や遺伝子の変異を検出するものでないため倫理面での障害も少ない。現在、血液 5 ml を使用しているが、2.5 ml でも十分である。

現在は cDNA チップを使用しているが順次オリゴヌクレオチドチップに変換している。ストレス評価用 DNA チップを用いて、健常人及び精神疾患患者など約500例の医学的データと遺伝子発現のデータベースを既に構築している。実用化オリゴヌクレオチドチップの開発と平行して、日本人のこころのデータベース化を行う作業の中で、本遺伝子発現プロファイリング手法を応用することで、従来精神・心理学的視点から漠然と捉えられてきた個人の“こころ”を映し出せることに着目した。ゲノム情報学の導入が行われていない“こころ”の領域において、中枢神経と末梢細胞との相互作用のデータベース化、規則性の抽出、相互作用の予測のための情報解析技術とその表記技術のソフト開発などに取り組み、21世紀の重要テーマである“こころと遺伝子”を推進する新たな分野への挑戦を行っている。

すでに、医学データと遺伝子発現情報とのデータマイニングとバイオインフォマティクスから有用遺伝子を絞り込み、これらの遺伝子のみを搭載した簡易型オリゴヌクレオチドチップも作製している(図3)。具体的には、ストレス・うつ病の診断に特化したチップの試作品を完成させている。さらに安価な DNA チップを目指した開発も民間企業と取り組んでいる。DNA チップの国内診断ビジネス市場は2010年には当初の予想の10倍以上に達

すると試算されており、われわれは国内外の巨大市場へのいち早い参入を目指している。

おわりに

「中枢神経の動きを末梢血で捉える」という試みから発したわれわれの研究は、すでにおもしろい研究の段階を過ぎ、実用化を目指した研究段階に入っている。知的所有権の問題から具体的なデータは示さないが、こころを描出する DNA チップは、メンタルヘルス分野で中核的なバイオ・メディカル技術として期待が寄せられている。国内の複数の施設・団体・企業から参加希望が寄せられており、16年度をめどに産業創出の整備を行う予定である。

謝 辞

ストレスの基礎研究は、栄養学科栄養生理学講座の岸恭一教授のご指導をうけ、同講座の教官や多くの学生といっしょに取り組んできた研究です。DNA チップのプロジェクトに関しては、齊藤史郎前学長のあたたかい支援を受けて生まれてきた研究です。現在も、青野敏博学長をはじめ、渋谷雅之副学長、地域共同研究センター佐

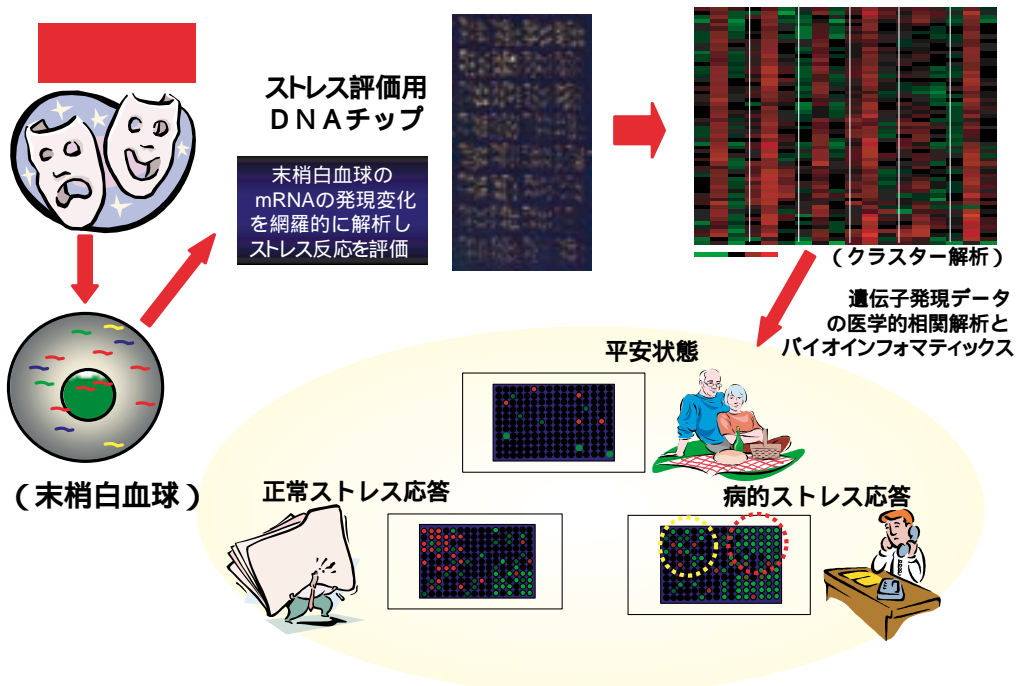


図3 . ストレス評価用 DNA チップを用いた研究の流れ

竹弘教授，などたくさんの先生方のご支援とご指導を受けております。また，本総説の内容については，ストレス制御医学分野の森田恭子先生，近藤茂忠先生，精神医学分野大森哲郎教授との共同研究の成果です。あらためて深謝いたします。平成15年10月より，あらたに設置されたストレス制御医学分野を担当させていただいておりますが，“ストレス制御医学”は日本では唯一の分野名です。オンリーワン・ナンバーワンの研究拠点を目指して努力する所存ですので，宜しくご指導・ご支援くださいますようお願い申し上げます。

## 文 献

- 1) 六反一仁：ストレス研究はいま．ブラックウエルサイエンス，東京，1999
- 2) 六反一仁，加藤宏一，奈良原正敏，富田裕之 他：ストレス評価用 DNA チップを用いたメンタルジェネティクスの展開．バイオインダストリー，19(2)：19-24 2002

## *Application of DNA chip and bioinformatics in stress assessment*

*Kazuhito Rokutan*

*Division of Stress Science, Course of Proteomics Medical Science, The University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan*

### SUMMARY

Stress is an essential response for all organisms to adapt new, hazardous environments and is mediated by mutation, reconstitution, and transcription of distinct genes. In mammals, stress response is regulated by complex neuro-endocrine-immune systems. Recently, RNA splicing and cap-independent translation are suggested to be involved in stress responses by facilitating the synthesis of novel stress-related gene products. The human genome project and microarray techniques make it possible to correctly evaluate complex stress response. We have developed a DNA chip specifically designed to examine the expression profile of stress-related genes in human peripheral leukocytes. This novel biometal technique is a powerful tool to simply, objectively assess stress responses in healthy individuals and patients with psychiatric disorders. The diagnostic system consisting of the DNA chip and stress bioinformatics may provide a new insight into the pathogenesis of stress-related disorders.

Key words : stress, stress-related genes, stress assessment, DNA chip