

【総 説】

老化遺伝子 *clk-1* の哺乳動物における機能

高橋真由美、白澤 卓二*

東京都健康長寿医療センター研究所・老化制御研究チーム 分子老化制御

*順天堂大学大学院 医学研究科 加齢制御医学講座

要約

clk-1 遺伝子は線虫の長寿命変異体の原因遺伝子として同定された。変異した *clk-1* 遺伝子が機能喪失することにより、*clk-1* 変異線虫は発生や運動リズムが遅延し寿命が延長する。*clk-1* 遺伝子産物はミトコンドリア呼吸鎖の電子伝達体であるユビキノン (コエンザイム Q: CoQ) の合成酵素である。また CoQ は ATP 産生と同時に活性酸素の最大の発生源であり、老化制御に深く関わっているとされる。本稿では *clk-1* 欠損マウスを用いた研究を中心に、哺乳動物における生体リズムや老化の制御における *clk-1* 遺伝子のかかわりについて紹介する。

キーワード: *clk-1*, coenzyme Q, mitochondria, apoptosis, ultradian rhythm

1. 老化遺伝子としての *clk-1*

たった一つの細胞・受精卵が分裂を繰り返し、様々な機能を持った細胞に分化しダイナミックな形態形成を繰り返しながら複雑な生命体が形成される。そのメカニズムを研究する発生生物学は古くから科学者達の興味を引き、近年の分子生物学の発展に伴って分子の言葉で発生過程が語られるようになってきた。ところがこれに比べ同じ時間軸上にありながら、老化現象はただ役割を終えた生物が崩れ落ちていく過程に過ぎず、科学的な研究対象とは遠いかに思われた。実際初期の老化研究は過程や現象の記述が主で、科学的研究とは言いがたいものも多々あった。しかし近年、特に線虫 *C. elegans* など比較的下等な生物を用いた解析により老化研究は目覚ましい発展を遂げ、科学者達にとって充分魅力的な研究対象になってきた。

線虫では1900年代後半より多くの寿命変異体が発見され、その原因遺伝子も次々特定されて寿命を規定する老化遺伝子(gerontogene)の存在が確かなものとなり、老化は遺伝子により制御される生命現象であることが広く認識されるようになった。そのようななか、1995年に寿命が野生型の約1.5倍に延長し、発生や咽頭部のポンピング、スイミング、脱糞などの生体リズム(ウルトラディアンリズム: 縮日リズム)が遅くなる突然変異体が発見され、その原因遺伝子は運動や発生のタイミングに係わるものとして *clk-1* (クロック1) と命名された[1]。*clk-1* 遺伝子の変異しその機能を失う事 (loss of func-

tion) により寿命が延長し、ウルトラディアンリズムが遅延することから *clk-1* は寿命を規定し、ウルトラディアンリズムを制御する遺伝子の1つであると考えられた。

寿命を制御するシグナル伝達経路のうち現在最も解析が進んでいるのはインスリン/インスリン様成長因子 (IGF-1) シグナル伝達経路である[2]。この経路の最上流に位置する *daf-2* はインスリン/IGF-1受容体の相同体をコードしている遺伝子で、*daf-2* が変異した線虫は野生型線虫の2~3倍に寿命が延長する。この *daf-2* 遺伝子と *clk-1* 遺伝子との二重変異体は野生型の約6倍にも寿命が延長し、長寿命変異体の中でも最も寿命の長い線虫のひとつとして知られている[3]。*daf-2* 遺伝子と *clk-1* 遺伝子とが寿命に関して相乗的に作用していることから、両遺伝子が関与している老化制御機構は互いに独立したものであると考えられている。

当初 *clk-1* 遺伝子産物 CLK-1 の機能は不明であったが、その後線虫や酵母の研究から、ミトコンドリア呼吸鎖の電子伝達体であるユビキノン (コエンザイム Q: CoQ) の合成経路で、デメトキシユビキノン (DMQ) の3位に水酸基を付加する水酸化酵素として機能している事が明らかにされた[4-6] (図1)。従って *clk-1* の機能が欠損した *clk-1* 変異線虫には CoQ がなく、代わりに中間代謝物である DMQ が蓄積していることが報告された[7]。

CoQ は酸化還元活性の高いレドックスアクティブな疎水性の分子で、ベンゾキノン骨格とそこから伸びるイソプレニル側鎖から成っている[8,9]。イソプレニル側鎖の数は種によって異なり高等動物ほど多い傾向がある (図2)。CoQ には多様な機能が知られているが、最も主要な役割はミトコンドリア内膜に局在する電子伝達系の呼吸鎖複合体 I から III へあるいは複合体 II から III へ電子を運搬しエネルギー源である ATP 産生に寄与している点である[10]。一方、CoQ は電子伝達の際漏出した電子とミトコ

連絡先: 〒173-0015

東京都板橋区栄町35-2

Tel: 03-3964-3241 ex.3022

Fax: 03-3579-4776

E-mail: mmtaka@tmig.or.jp

ンドリア内に存在する酸素とが結合してできる細胞傷害性の活性酸素の最大の発生源でもあるため[9]、老化のメカニズムを探る上で最も重要な分子である。

本稿では線虫で発見された老化遺伝子*clk-1*の哺乳動物における生物学的役割について*clk-1*欠損マウスを用いて行った我々の研究を中心に紹介し、老化制御メカニズムと*clk-1*遺伝子との関係について考察してみたい。

2. 哺乳動物における*clk-1* 遺伝子の機能

線虫で発見された*clk-1*が哺乳動物においても寿命とウルトラディアンリズムを制御しているか明らかにする目的で、まず哺乳動物においても*clk-1* 遺伝子が保持されているかを調べた。*clk-1*のマウスおよびヒト相同遺伝子を単離、同定した結果、*clk-1*遺伝子の構造は原核生物や酵母から、マウス、ヒトにいたるまで広く保存されていることがわかった[11-14]。ヒトのCLK-1は217個のアミノ酸からなる分子量約24 kDaのタンパクで、1分子あたり2個のFe原子を配位し、アミノ末端にあるミトコンドリアターゲティングシグナルによりミトコンドリアに移行しミトコンドリア内膜に局在していた[12,15,16]。次に我々はマウスあるいはヒトの*clk-1*相同遺伝子を*clk-1*変異線虫に遺伝子導入する事により、*clk-1*変異線虫の寿命と生体リズムを野生型線虫のレベルに回復させる事に成功した[17]。この結果から哺乳動物においても*clk-1*遺伝子は構造とともに機能的にも進化的に保存されている可能性が強く示唆された。従って、*clk-1*遺伝子による老化制御機構には種を超えて共通のメカニズムが存在する可能性が考えられた。

1) *clk-1*欠損マウスの作成

*clk-1*遺伝子がどのようなメカニズムで寿命と生体リズムを制御しているかを哺乳動物において解明する目的で常法に則り*clk-1*欠損マウスを作成した[18]。*clk-1*遺伝子の第2エクソンをネオマイシン耐性遺伝子で置換したターゲティングベクターを作成して電気穿孔法でES細胞(胚幹細胞)に導入し、相同組み換えを起こしたES細胞をクローン化して凝集法により仮親の子宮に移植しキメラマウスを誕生させた。キメラマウスと野生型マウスとの交配により得た*clk-1*ヘテロ接合体(*clk-1*^{+/-})マウス同志を交配し*clk-1*ホモ接合体(*clk-1*^{-/-})マウスの誕生を期した。

ところが期待に反し、*clk-1*^{-/-}マウスは胎生(E) 8.5日からE11.5日の間に致死となった。死亡直前のE10.5の胎児は野生型に比べ著しく小さく、神経管が未閉鎖であることから約48時間の発生遅延があることがわかった(図3)。また胎児抽出物を高速液体クロマトグラフィー及び質量分析した結果、*clk-1*^{-/-}マウスには、CoQが全く同定されず、代わりにCoQの前駆体であるDMQの蓄積が確認された[18]。一方*clk-1*^{+/-}マウスでは*clk-1*

の遺伝子量およびCLK-1タンパク量は野生型(*clk-1*^{+/+})マウスの半分であるにもかかわらず合成されるCoQ量はほぼ同じであった。

線虫においてもその後の研究により、*clk-1*変異線虫の寿命が延長するのはエサとして与える大腸菌がCoQを産生する野生株のときに限られ、CoQを合成できない変異大腸菌で育てた*clk-1*変異線虫は幼虫期に死亡することが報告された[7]。これらの結果は*clk-1*遺伝子産物に依存

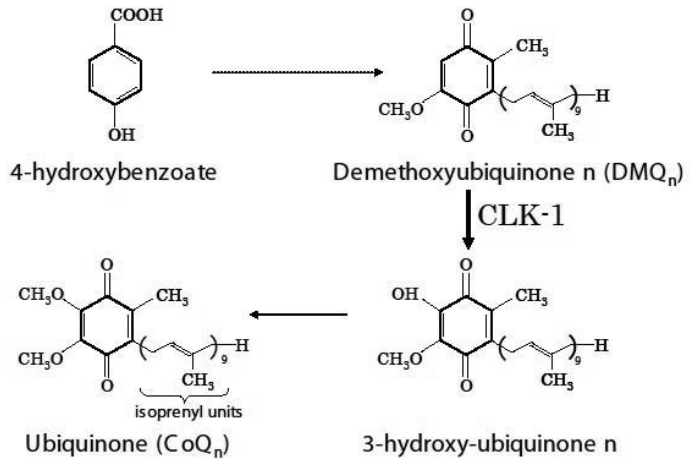


図1: CoQ合成経路

CLK-1タンパクはデメトキシビキノンの水酸化酵素としてCoQの合成に関わっている。

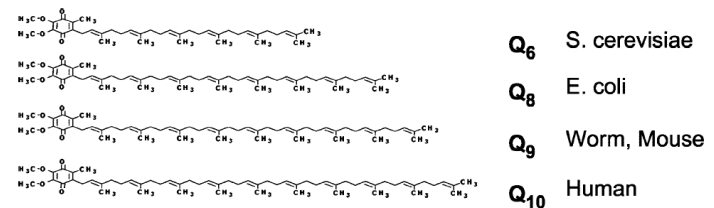


図2: 種によるCoQ側鎖長の多様性

CoQのイソプレニ側鎖は種によって異なり高等動物ほど長い傾向がある。

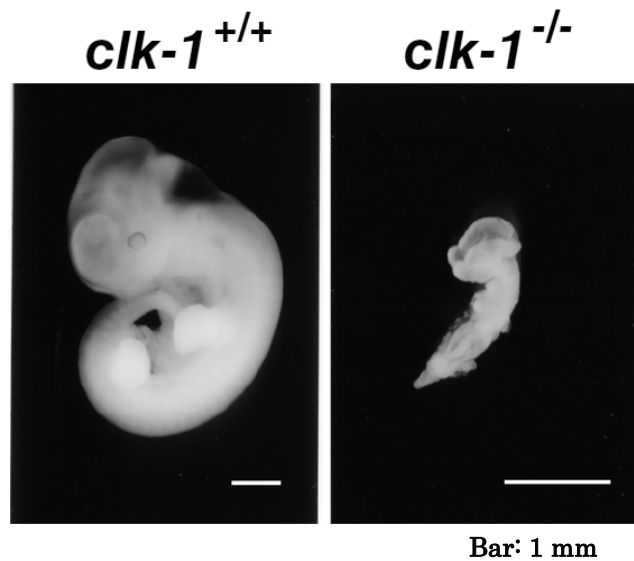


図3: *clk-1*^{-/-}マウスの発生遅延

胎生10.5日目のマウス胎児。野生型に比べ欠損マウスは非常に小さく、約48時間の発生遅延が認められた。

(Takahashi et al., 2008からの引用)

して産生されるCoQは線虫およびマウスの初期発生に必須であることを示唆している。

2) *clk-1*欠損マウス胎生致死の原因

*clk-1*欠損マウスの作成は我々とほぼ同時にカナダのHekimiらのグループにより報告された[18,19]。両者ともCoQがマウスの発生に必須であるという点では一致したが、我々が*clk-1*欠損によるミトコンドリアの形態異常を報告したのに対し、Hekimiらはミトコンドリア呼吸にCoQは必須ではないとの考えを示した。これを受けScienceのSAGEKE (Science of Aging Knowledge Environment) においてミトコンドリア呼吸が正常のになぜ胎児は死ぬのかとのコメントが寄せられた[20]。

そこで我々は致死直前のE10.5日目のマウス胎児及び胎児由来細胞を用いて解析を行った。まずマウス胎児のパラフィン切片をヘマトキシリン・エオジン染色したところ、*clk-1*^{-/-}マウスでは全身にアポトーシスを示す典型的な核の凝縮および断片化が多数観察された。そこでアポトーシスによるDNAの断片化を検出するTUNEL法により胎児切片を免疫染色した結果、TUNEL陽性細胞は*clk-1*^{+/+}マウスではほとんど見られなかったのに対し、*clk-1*^{-/-}マウスでは多数認められた。さらにアポトーシスの指標であるphosphatidylserineの細胞膜上での外在化とcaspase-3の活性化をそれぞれ免疫染色及びウエスタンブロット法により確認した。その結果*clk-1*^{-/-}マウスの胎児の細胞ではアポトーシスが高頻度で誘導されている事が明らかとなった[21]。

アポトーシスの誘導にはいくつかの経路が知られている。CoQがミトコンドリア機能に深くかかわっていることから、ミトコンドリア経路のアポトーシスが誘導されている可能性を検討した。ミトコンドリア依存性アポトーシスの指標としては、チトクロームCの細胞内局在、ミトコンドリア膜電位変化、ATP量について解析した。*clk-1*^{-/-}マウス胎児の細胞をチトクロームCに対する抗体で免疫染色した結果、ミトコンドリアから細胞質へのチトクロームCの放出が確認された。また、JC-1蛍光染色法によるミトコンドリア膜電位測定およびシフェラーゼ法によるATP定量の結果、*clk-1*^{-/-}マウス胎児由来細胞では野生型マウスに比べミトコンドリア膜電位とATPレベルが有意に低下していることが明らかとなった(図4A&B)。以上の結果から*clk-1*^{-/-}マウスで誘導されているアポトーシスはミトコンドリア由来であることが強く示唆された[21]。

既に述べたように*clk-1*^{-/-}マウスはCoQを合成することが出来ない。そこで*clk-1*^{-/-}マウスにおけるミトコンドリア機能不全やアポトーシスの誘導がCoQ処理により回避できるかを検討した。*clk-1*^{-/-}細胞を無血清条件下で5時間25 μM CoQ₁₀処理した結果、CoQ₁₀はミトコンドリア機能を有意に回復させ、またアポトーシス

の頻度も有意に低下させた(図4C) [21]。以上の結果から、*clk-1*欠損マウスは*clk-1*の欠損によりCoQが合成できず、CoQ欠失に伴うミトコンドリア機能不全によるアポトーシスが全身の細胞で誘導された結果、胎生致死にいたると考えられた。すなわちCoQはミトコンドリア機能を維持してATP産生に寄与し、アポトーシスの誘導を抑制する事によりマウスの初期発生に必須な役割を担っていると考えられた。

3) *clk-1*欠損マウスにおけるウルトラディアンリズムの遅延

生体リズムの中で最もポピュラーで分子レベルにまで機構解明が進んでいるのは、24時間周期のサーカディアンリズム(概日リズム)である[22]。ウルトラディアンリズム(縮日リズム)は24時間より短い周期のリズムで、知名度は低いものの多くの重要な生命現象に関係している。たとえば、数時間周期のホルモン分泌、90分周期のレムノンレム睡眠、数十ミリ秒周期の心臓の拍動、数時間周期の細胞分裂やタンパク合成など非常に多岐にわたっている。しかしその調節機構についてはサーカディアンリズムに比べ解析が遅れている。

*clk-1*欠損マウスは胎生致死である為、リズムの解析を行うのは不可能かに思われた。致死直前のE10.5の*clk-1*^{+/+}および*clk-1*^{+/-}マウス胎児由来細胞は無血清培地で生存可能であるが、*clk-1*^{-/-}マウス胎児由来の細胞は生体内と同様E10.5を超えて生存することは出来なかった[18]。しかし我々は10%牛胎児血清を培地に添加するこ

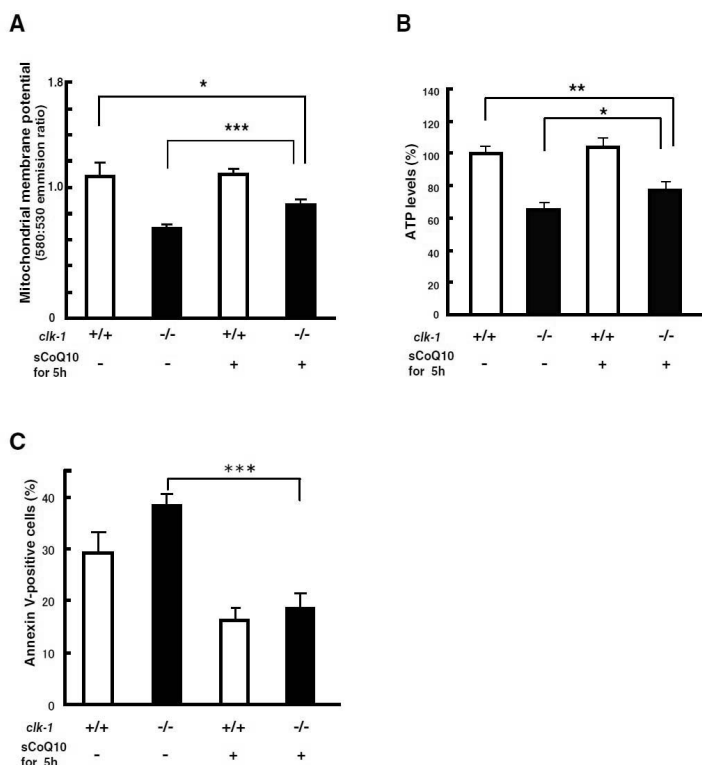


図4: ミトコンドリア機能とアポトーシスに対するCoQの効果

マウス胎児由来の解離細胞を25 μM CoQ₁₀添加無血清培地で5時間培養した。CoQ₁₀添加により*clk-1*欠損マウスのミトコンドリア機能が有意に回復し、アポトーシスの誘導が抑制された。

(Takahashi et al., 2008からの引用)

とにより *clk-1*^{-/-} マウス由来の細胞の培養を可能とし細胞を生存させることに成功した。そこでこの培養系を用いて胎児由来の細胞および心臓におけるリズム解析を行い、*clk-1* 遺伝子が哺乳動物においてもウルトラディアンリズムの制御に関与しているか検討した。

胎児を酵素処理して細胞を解離し、細胞培養した結果、*clk-1*^{-/-} 細胞は *clk-1*^{+/+} や *clk-1*^{+/-} 細胞に比べゆっくり増殖することがわかった。この *clk-1*^{-/-} 細胞における増殖遅延がウルトラディアンリズムの1つである細胞分裂速度の遅れによるものか、あるいはより多くの細胞が死ぬ事により見かけ上増殖に遅れが見られるのかを明らかにする為、単位時間当たりのBrdUの取り込みとTUNEL ELISA法によるアポトーシスの発生頻度を調べた。その結果、*clk-1*^{-/-} 細胞では *clk-1*^{+/+} 細胞や *clk-1*^{+/-} に比べ細胞分裂速度が半分以下であると共アポトーシスの発生頻度は4倍以上であった。従って、*clk-1*^{-/-} 細胞の増殖遅延は細胞分裂の遅延と細胞死の増加との合算によることが明らかとなった。

次にもう1つのウルトラディアンリズムである心臓の拍動リズムを解析した。胎児の心臓を酵素処理して細胞培養した所、*clk-1*^{+/+} マウスや *clk-1*^{+/-} マウスの心筋細胞が1分間に約150回拍動したのに対し *clk-1*^{-/-} マウスの心筋細胞は約1/3のゆっくりとしたリズムで拍動していた。*clk-1*^{-/-} マウス心臓の拍動リズムの遅れは胎児由来の心臓をまるごと器官培養することでも確認された。以上の結果から、マウスにおいても *clk-1* 遺伝子の欠損によりウルトラディアンリズム-細胞分裂速度と心臓の拍動-が遅延することが明らかとなった。

次にウルトラディアンリズムの制御にCoQが関与しているかを調べる目的で、培地にCoQ₁₀を添加し胎児解離細胞の増殖に対する効果を調べた。*clk-1*^{-/-} 細胞の見かけ上の増殖は25 μM CoQ₁₀により *clk-1*^{+/+} 細胞と同等のレベルに回復した。この時、外来性CoQの添加は *clk-1*^{-/-} 細胞の増殖速度を *clk-1*^{+/+} 細胞レベルに回復させるとともにアポトーシス頻度を有意に減少させた。さらに心臓の拍動に対するCoQの効果を検討したところ、培養心筋細胞に対しては50 μM、器官培養した心臓に対しては150 μM CoQ₁₀により拍動リズムが完全に回復した。

CoQにはいろいろな作用があることが報告されているが、最も重要な機能としてATPを産生するためのミトコンドリア電子伝達系における電子の運搬が挙げられる。そこで、リズム遅延に対するCoQの効果がミトコンドリア機能を介しているのかを検討した。ミトコンドリア膜電位を調べるため、培養7日目の細胞をJC-1染色した。その結果CoQ₁₀の添加により *clk-1*^{-/-} 細胞のミトコンドリア膜電位が有意に上昇した。さらに4日間器官培養した心臓のATP量をルシフェラーゼ法により測定したところ、CoQ₁₀添加により *clk-1*^{-/-} マウスの心臓のATP産生量は有意に増加することがわかった。

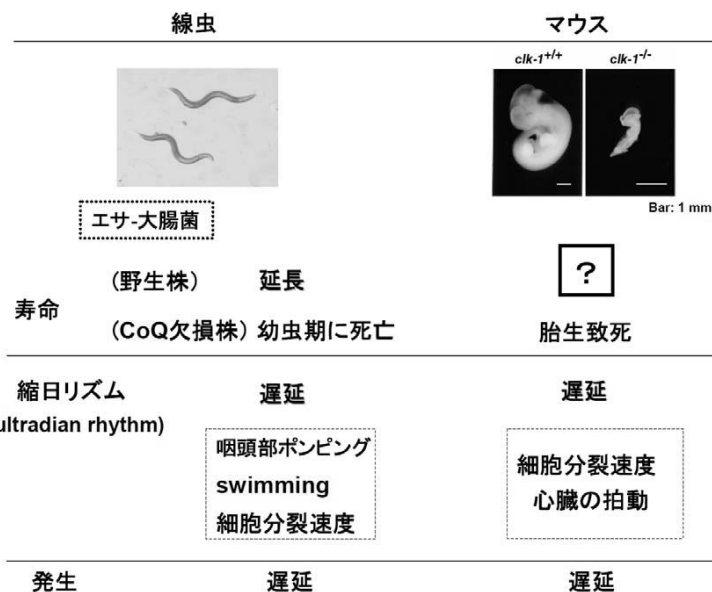


図5: *clk-1* 変異線虫と *clk-1* 欠損マウスの表現型の比較

clk-1 欠損マウスは線虫同様、発生とウルトラディアンリズムの遅延が認められた。線虫、マウスともにCoQがないと胎生致死になることからCoQは初期発生に必須であることがわかった。成長後、マウスにおいてもCoQが少ないと寿命が延命するかは *clk-1*^{-/-} Tgマウスの寿命解析により明らかになるであろう。(文献 [1] [7] [18] [21] および未発表データ)

以上の結果から、線虫同様、哺乳動物においても *clk-1* 遺伝子の欠損によりウルトラディアンリズムが遅延することが明らかとなった。またこのリズム遅延がCoQ₁₀添加により回復することから、少なくとも細胞分裂及び心拍のウルトラディアンリズムの制御にCoQがミトコンドリア機能を介して関与していることが強く示唆された。

4) まとめ

clk-1 欠損マウスを用いた機能解析の結果、リズム遅延を伴う長寿変異体線虫の原因遺伝子 *clk-1* は、哺乳動物においてもウルトラディアンリズムの制御に関与していることが明らかとなった (図5)。 *clk-1* 変異線虫においてウルトラディアンリズムが遅延するメカニズムはまだ明らかにはなっていない。しかし一つの可能性としてCoQを合成できないが、エサとして取り入れた外来のCoQで生育している線虫では代謝が低下し、その結果様々な運動リズムの遅延が引き起こされるのではないかと考えられている[23]。昔から代謝速度あるいはウルトラディアンリズムの1つである心臓の拍動リズムと寿命とは反比例することが知られている[24,25]。すなわち寿命と代謝およびウルトラディアンリズムとの制御には共通のメカニズムが関与している可能性が示唆される。従って種を超えてリズム制御に関与している *clk-1* 遺伝子は、この共通のメカニズム解明に迫ることが可能な重要な遺伝子であると考えられる。

また哺乳動物においても線虫同様[26] *clk-1* 遺伝子の欠損によりマウスが胎生致死となることから、*clk-1* 遺伝子あるいは *clk-1* 遺伝子産物により合成されるCoQは線虫およびマウスの初期発生に必須であることが明らかとなった。寿命に関係する遺伝子の中で若齢においては生

存にとって不可欠な機能を果たすが、繁殖後はむしろ生存力を低下させるよう作用する多面発現的 (pleiotrophic) な遺伝子の存在が指摘されている [27,28]。clk-1 遺伝子はまさに pleiotrophic な遺伝子であることが線虫において示唆された。では線虫同様哺乳動物においても、成長後 clk-1 遺伝子あるいは CoQ がいない方が長寿となるのであろうか？ 今後の研究が待たれるところである。

3. clk-1 遺伝子と老化

老化仮説の中で、現在最も注目されている仮説のひとつにフリーラジカル仮説 (酸化傷害仮説) がある [29]。フリーラジカル (活性酸素) は正常な代謝の副産物として発生し、DNA、タンパク質、脂質などの生体高分子物質に酸化傷害を与え、酸化傷害の蓄積により細胞機能が低下して老化が進行すると考えられている。細胞内における活性酸素の最大の発生源はミトコンドリア内膜に存在する CoQ であり [30,31]、ミトコンドリア内の 0.4~4% の酸素が、電子伝達時に漏出した電子と結合し活性酸素になると試算されている [32,33]。ミトコンドリアでの呼吸が盛んになるほど、電子の漏れも増え、活性酸素の発生も増加し、老化が加速すると考えられる。clk-1 の遺伝子産物は CoQ の合成酵素であることから clk-1 変異線虫が長寿であるのは clk-1 変異線虫のミトコンドリアでは代謝が低く活性酸素の発生が低下しているのではないかと示唆されている [34]。実際 clk-1 変異線虫に存在する外来性 CoQ₈ の量は野生型線虫で合成される CoQ₉ の量よりはるかに少なく [35]、clk-1 変異線虫の単離ミトコンドリアの解析から呼吸鎖複合体 I から III への電子伝達速度は 70~80% 低下し、酸化傷害も低下しているとの報告がある [36]。一方、clk-1 変異線虫では野生型に比べ代謝関連および抗酸化酵素群の遺伝子発現が亢進し、ミトコンドリアの生合成が増加していることが判明した [34]。これらの変化は酵母や哺乳動物の細胞でミトコンドリア機能不全により呼吸が阻害された時に見られる 'retrograde response' とよく似たパターン [37] であると指摘された。またミトコンドリア生合成の増加はカロリー制限 (CR) により寿命が延長する場合にも報告されている [38-40]。従って、clk-1 変異体と CR とにおいては共通のメカニズムで寿命が延長している可能性があり [41]、両者ともに、必要なエネルギーを確保するためにミトコンドリア生合成の増加という補償作用が働き、最終的に寿命延長に繋がると予想されるが、詳細なメカニズムについては今後の解析を待たねばならない。

前述のように、clk-1^{+/-}マウスでは CLK-1 タンパクが clk-1^{+/+}マウスの半分しか合成できないにも拘らず、CoQ 量は clk-1^{+/+}マウスと同程度確認された。また clk-1^{+/-}マウス胎児由来細胞の分裂速度、心拍数および成体マウスのミトコンドリア呼吸活性 (未発表データ) も clk-1^{+/+}マウスと変わらなかった。これらの結果から clk-1^{+/-}マウスが clk-1^{+/+}マウスと同じ表現型を示すのは CLK-1 タンパクの減少にも拘らず CoQ 合成量は clk-1^{+/+}マウスと変わらないためではないかと考えた。そこで、clk-1^{-/-}マウスに clk-1 遺伝子をトランスジーン (Tg) し

てレスキューした clk-1^{-/-}Tg マウスの中で、野生型マウスに比べ CoQ の合成量が少ないラインを用いて解析を行った結果、clk-1^{-/-}Tg マウスの腎臓から単離したミトコンドリアでは呼吸酵素活性および 2 種類の活性酸素種の発生が低下していた [42]。これらの結果は生体リズムの調節、ミトコンドリアの呼吸機能および活性酸素の発生は CLK-1 タンパク量よりも CoQ 量に依存していることを示唆している。

一方寿命に関して、Hekimi らのグループは CoQ 量が clk-1^{+/-}マウスと clk-1^{+/+}マウスで差がないにも拘らず、clk-1^{+/-}マウスの方がより長寿であるとの報告をしている [43]。この結果から彼らは、CLK-1 タンパクに CoQ 合成以外の機能が存在する可能性と、CoQ 量ではなく CLK-1 タンパク自体が寿命制御に関与している可能性を指摘している [44]。

今後 clk-1^{+/-}マウスおよび clk-1^{-/-}Tg マウスの寿命解析およびミトコンドリア機能、代謝速度、活性酸素の発生量をさらに調べることにより哺乳動物の老化制御における clk-1 遺伝子、CLK-1 タンパク、CoQ あるいは活性酸素の関与を明らかにしていきたい。

引用文献

- [1] Wong, A., Boutis, P. and Hekimi, S. (1995). Mutations in the clk-1 gene of *Caenorhabditis elegans* affect developmental and behavioral timing. *Genetics* 139, 1247-59.
- [2] Wolkow, C.A., Kimura, K.D., Lee, M.S. and Ruvkun, G. (2000). Regulation of *C. elegans* life-span by insulinlike signaling in the nervous system. *Science* 290, 147-50.
- [3] Lakowski, B. and Hekimi, S. (1996). Determination of life-span in *Caenorhabditis elegans* by four clock genes. *Science* 272, 1010-3.
- [4] Marbois, B.N. and Clarke, C.F. (1996). The COQ7 gene encodes a protein in *saccharomyces cerevisiae* necessary for ubiquinone biosynthesis. *J Biol Chem* 271, 2995-3004.
- [5] Miyadera, H. et al. (2001). Altered quinone biosynthesis in the long-lived clk-1 mutants of *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 276, 7713-6.
- [6] Jonassen, T., Proft, M., Randez-Gil, F., Schultz, J.R., Marbois, B.N., Entian, K.D. and Clarke, C.F. (1998). Yeast Clk-1 homologue (Coq7/Cat5) is a mitochondrial protein in coenzyme Q synthesis. *J Biol Chem* 273, 3351-7.
- [7] Jonassen, T., Larsen, P.L. and Clarke, C.F. (2001). A dietary source of coenzyme Q is essential for growth of long-lived *Caenorhabditis elegans* clk-1 mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 421-6.
- [8] Ernster, L. and Dallner, G. (1995). Biochemical, physiological and medical aspects of

- ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta* 1271, 195-204.
- [9] Turunen, M., Olsson, J. and Dallner, G. (2004). Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta* 1660, 171-99.
- [10] Crane, F.L., Hatefi, Y., Lester, R.L. and Widmer, C. (1957). Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 25, 220-1.
- [11] Ewbank, J.J., Barnes, T.M., Lakowski, B., Lussier, M., Bussey, H. and Hekimi, S. (1997). Structural and functional conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene *clk-1*. *Science* 275, 980-3.
- [12] Asaumi, S., Kuroyanagi, H., Seki, N. and Shirasawa, T. (1999). Orthologues of the *Caenorhabditis elegans* longevity gene *clk-1* in mouse and human. *Genomics* 58, 293-301.
- [13] Vajo, Z., King, L.M., Jonassen, T., Wilkin, D.J., Ho, N., Munnich, A., Clarke, C.F. and Francomano, C.A. (1999). Conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene *clk-1* from yeast to human: a gene required for ubiquinone biosynthesis with potential implications for aging. *Mamm Genome* 10, 1000-4.
- [14] Jonassen, T., Marbois, B.N., Kim, L., Chin, A., Xia, Y.R., Lusic, A.J. and Clarke, C.F. (1996). Isolation and sequencing of the rat *Coq7* gene and the mapping of mouse *Coq7* to chromosome 7. *Arch Biochem Biophys* 330, 285-9.
- [15] Rea, S. (2001). CLK-1/Coq7p is a DMQ monooxygenase and a new member of the di-iron carboxylate protein family. *FEBS Lett* 509, 389-94.
- [16] Stenmark, P., Grunler, J., Mattsson, J., Sindelar, P.J., Nordlund, P. and Berthold, D.A. (2001). A new member of the family of di-iron carboxylate proteins. *Coq7 (clk-1)*, a membrane-bound hydroxylase involved in ubiquinone biosynthesis. *J Biol Chem* 276, 33297-300.
- [17] Takahashi, M. et al. (2001). Mouse *coq7/clk-1* orthologue rescued slowed rhythmic behavior and extended life span of *clk-1* longevity mutant in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* 286, 534-40.
- [18] Nakai, D. et al. (2001). Mouse homologue of *coq7/clk-1*, longevity gene in *Caenorhabditis elegans*, is essential for coenzyme Q synthesis, maintenance of mitochondrial integrity, and neurogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 289, 463-71.
- [19] Levavasseur, F., Miyadera, H., Sirois, J., Tremblay, M.L., Kita, K., Shoubridge, E. and Hekimi, S. (2001). Ubiquinone is necessary for mouse embryonic development but is not essential for mitochondrial respiration. *J Biol Chem* 276, 46160-4.
- [20] Davenport, R.J. (2001). Clocked Out: Mice missing *clk-1* die young (Mitochondrial respiration). *Science's SAGE KE* 2001, 38.
- [21] Takahashi, M., Shimizu, T., Moriizumi, E. and Shirasawa, T. (2008). *Clk-1* deficiency induces apoptosis associated with mitochondrial dysfunction in mouse embryos. *Mech Ageing Dev* 129, 291-8.
- [22] Reppert, S.M. and Weaver, D.R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418, 935-41.
- [23] Anson, R.M. and Hansford, R.G. (2004). Mitochondrial influence on aging rate in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 3, 29-34.
- [24] Cutler, R.G. (1982). Longevity is determined by specific genes: testing the hypothesis. *Testing the theories of aging*, 25-114.
- [25] Zhang, G.Q. and Zhang, W. (2009). Heart rate, lifespan, and mortality risk. *Ageing Res Rev* 8, 52-60.
- [26] Larsen, P.L. and Clarke, C.F. (2002). Extension of life-span in *Caenorhabditis elegans* by a diet lacking coenzyme Q. *Science* 295, 120-3.
- [27] Williams, G.C. (1957). Pleiotrophy, Natural Selection and the Evolution of Senescence. *Evolution* 11, 398-411.
- [28] Kirkwood, T.B. (2002). Evolution of ageing. *Mech Ageing Dev* 123, 737-45.
- [29] Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11, 298-300.
- [30] Ambrosio, G. et al. (1993). Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow. *J Biol Chem* 268, 18532-41.
- [31] Kudin, A.P., Bimpong-Buta, N.Y., Vielhaber, S., Elger, C.E. and Kunz, W.S. (2004). Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem* 279, 4127-35.
- [32] Giulivi, C., Boveris, A. and Cadenas, E. (1995). Hydroxyl radical generation during mitochondrial electron transfer and the formation of 8-hydroxydesoxyguanosine in mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys* 316, 909-16.
- [33] Guduz, T.I., Tserng, K.Y. and Hoppel, C.L. (1997). Direct inhibition of mitochondrial respi-

- ratory chain complex III by cell-permeable ceramide. *J Biol Chem* 272, 24154-8.
- [34] Cristina, D., Cary, M., Lunceford, A., Clarke, C. and Kenyon, C. (2009). A regulated response to impaired respiration slows behavioral rates and increases lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 5, e1000450.
- [35] Jonassen, T., Marbois, B.N., Faull, K.F., Clarke, C.F. and Larsen, P.L. (2002). Development and fertility in *Caenorhabditis elegans* *clk-1* mutants depend upon transport of dietary coenzyme Q8 to mitochondria. *J Biol Chem* 277, 45020-7.
- [36] Kayser, E.B., Sedensky, M.M., Morgan, P.G. and Hoppel, C.L. (2004). Mitochondrial oxidative phosphorylation is defective in the long-lived mutant *clk-1*. *J Biol Chem* 279, 54479-86.
- [37] Butow, R.A. and Avadhani, N.G. (2004). Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol Cell* 14, 1-15.
- [38] Drew, B., Phaneuf, S., Dirks, A., Selman, C., Gredilla, R., Lezza, A., Barja, G. and Leeuwenburgh, C. (2003). Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284, R474-80.
- [39] Nisoli, E. et al. (2005). Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* 310, 314-7.
- [40] Lopez-Lluch, G. et al. (2006). Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1768-73.
- [41] Stepanyan, Z., Hughes, B., Cliche, D.O., Camp, D. and Hekimi, S. (2006). Genetic and molecular characterization of CLK-1/mCLK1, a conserved determinant of the rate of aging. *Exp Gerontol*
- [42] Nakai, D., Shimizu, T., Nojiri, H., Uchiyama, S., Koike, H., Takahashi, M., Hirokawa, K. and Shirasawa, T. (2004). *coq7/clk-1* regulates mitochondrial respiration and the generation of reactive oxygen species via coenzyme Q. *Aging Cell* 3, 273-81.
- [43] Liu, X., Jiang, N., Hughes, B., Bigras, E., Shoubridge, E. and Hekimi, S. (2005). Evolutionary conservation of the *clk-1*-dependent mechanism of longevity: loss of *mclk1* increases cellular fitness and lifespan in mice. *Genes Dev* 19, 2424-34.
- [44] Lapointe, J. and Hekimi, S. (2008). Early mitochondrial dysfunction in long-lived *Mclk1*^{+/-} mice. *J Biol Chem* 283, 26217-27.

“ Functions of the gerontogene *clk-1* in mammals ”

Mayumi Takahashi and Takuji Shirasawa*

Aging Regulation Section

Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

*Department of Aging Control Medicine, Juntendo University Graduate School of Medicine

The *clk-1* gene has been initially identified as a responsible gene for a long-lived mutant of nematode *C. elegans*. Loss of function in the mutated *clk-1* gene causes delays in development and behavioral ultradian rhythm, and extended lifespan in the mutant nematode. Gene product of *clk-1* is a synthetic enzyme of ubiquinone/coenzyme Q (CoQ) that is an electron transporter in mitochondrial respiratory chain. Since CoQ drives the ATP synthesis and serves as the major source of the reactive oxygen species at the same time, it is thought to be involved in regulation of senescence. We show here the induction of mitochondrial-mediated apoptosis and delay in ultradian rhythm in *clk-1*-deficient mice we established. Involvement of the *clk-1* gene in regulation of mammalian senescence will be discussed.

Keywords: *clk-1*, coenzyme Q, mitochondria, apoptosis, ultradian rhythm