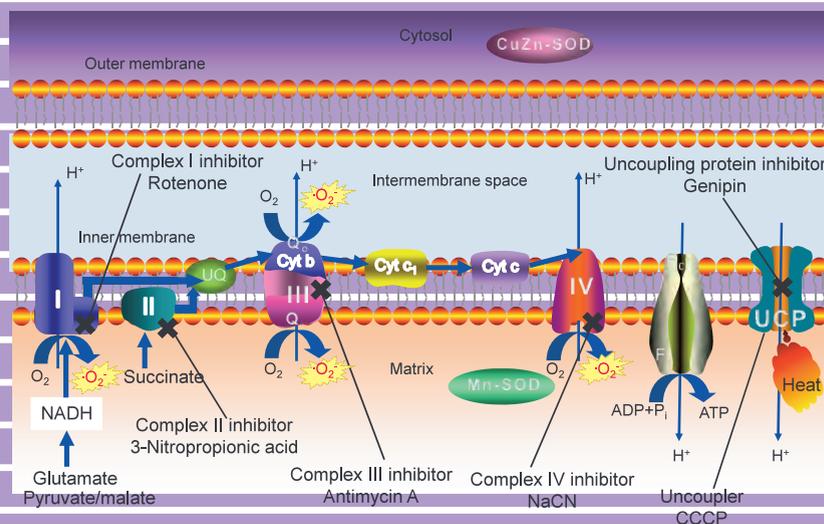


BIOMEDICAL GERONTOLOGY

基礎老化研究

- 総説 | **β アミロイドによるcalsyntenin-3の誘導と神経変性**
内田 洋子
- 総説 | **社会心理的ストレスによる老化の促進とテアニンの抗ストレス作用**
海野けい子
- 総説 | **活性酸素の生理機能 —エネルギー代謝亢進の解除時における活性酸素の生成亢進—**
佐々木 徹
- 総説 | **哺乳動物の加齢に伴う DNA メチル化の変動**
下田 修義
- 学会報告 | **The 21st International Conference of the Korean Society for Gerontology: Intervention of Aging and Age-related Diseasesに参加して**
丸山 直記
- 学会報告 | **微笑みの国の老年学**
丸山 直記
- 随筆 | ● **老化研究事起こし——老化クロマチンに動的変化が?** 三井 洋司
- 附 | ● **基礎老化学会サーキュラー 第91号**



基礎老化研究

35巻 第4号(2011年)

日本基礎老化学会会誌

- 編集委員会委員長: 重本 和宏 東京都健康長寿医療センター研究所 老年病研究チーム
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2
- 編集委員会幹事: 三浦 ゆり 東京都健康長寿医療センター研究所 老化機構研究チーム
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2
- 編集委員会委員: 内田 さえ 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
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2
- 島田 厚良 愛知県心身障害者コロニー 発達障害研究所 病理学部
〒480-0392 愛知県春日井市神屋町713-8
- 清水 孝彦 東京都健康長寿医療センター研究所 老化機構研究チーム
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2
- 樋上 賀一 東京理科大学薬学部生命創薬科学科
〒278-8510 千葉県野田市山崎2641
- 福 典之 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
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2
-

BIOMEDICAL GERONTOLOGY

Vol. 35 No. 4 2011

Official Journal of The Japan Society for Biomedical Gerontology

- Editor-in Chief: Kazuhiro Shigemoto, Research Team for Geriatric Medicine,
Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku,
Tokyo 173-0015, JAPAN
- Managing Editor: Yuri Miura, Research Team for Mechanism of Aging, Tokyo
Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku,
Tokyo 173-0015, JAPAN
- Editors: Sae Uchida, Research Team for Functional Biogerontology, Tokyo
Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku,
Tokyo 173-0015, JAPAN
- Atsuyoshi Shimada, Institute for Developmental Research, Aichi Human
Service Center, 713-8 Kamiya-cho, Kasugai, Aichi 480-0392, JAPAN
- Takahiko Shimizu, Research Team for Mechanism of Aging, Tokyo
Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku,
Tokyo 173-0015, JAPAN
- Yoshikazu Higami, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of
Science, 2641 Yamazaki, Noda-shi, Chiba-ken 278-8510
- Noriyuki Fuku, Research Team for Functional Biogerontology, Tokyo
Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku,
Tokyo 173-0015, JAPAN

この雑誌について（投稿される方へ）

「基礎老化研究」(Biomedical Gerontology)は、日本基礎老化学会の会誌で、年4回:2月、5月、8月、11月発行される。内容は、本学会員から投稿された、または、本学会員及び編集委員会より依頼を受けた者からの巻頭言、総説(老化理論を含む)、トピックス、学会報告、随筆、書評、その他で構成される。但し、2号には年次大会のプログラムと発表抄録が、4号には基礎老化学会シンポジウムの抄録も掲載される。本誌は会員に無料で配布されるほか、希望に応じて頒価(現在は2,000円)で販売される。

1. 依頼・投稿による総説を含み全ての原稿の採用については、編集委員会で決定する。総説については、編集委員または編集委員会で依頼した審査委員(評議委員)による査読を行う。
2. 著者による校正は、総説、トピックスについてのみ1回行う。その際の追加、変更は出来ない。
3. 本誌に掲載された記事の著作権は、日本基礎老化学会に帰属する。但し、自分の著作を使用する場合には、本学会に断り無く自由に使用できる。
4. 目次、総説の要旨、およびトピックスはインターネットのホームページに掲載される。発行後2年経過した総説、は公開される。
5. 総説、トピックスの著者には、別刷り30部を無料で進呈する。30部以上希望の場合は有料(実費)となるので、投稿・原稿提出時にその旨連絡すること。
6. 原稿の執筆に際しては、本誌の執筆要領に従うこと。

執筆要領

原稿は全てワードプロセッサを使用する(原稿はコンピュータファイルとハードコピーで提出する)。1) 第1頁には、原稿の表題、著者名、所属機関、所在地を和文、英文で、また、電話番号、FAX番号、E-mailアドレス記載する。

著者が複数の場合は、連絡先の著者を明記する。2) 第2頁にも初めに、表題、氏名を書き、その後に本文を書く。3) 本文に節を設ける場合、1.、2.、3.、・・・を付けて節を示す。以下の項目は1)、2)、3)・・・、a)、b)、c)・・・とする。原稿のハードコピーはA4用紙を用い、横書きにプリントする。また、イタリック体、ギリシャ文字、記号が正しく出力されていることに注意する。同時に提出するコンピュータファイルは、テキストファイルまたはMSワードファイルで(欧語・数字は半角を用いる)、CDディスクに記録したものとする。図・表および写真は、EPS形式またはJPEG形式に圧縮したもの(使用ソフトを明記する)あるいはAdobe Acrobatで作製したPDFファイルおよびプリントアウトしたものを提出する。雑誌への印刷は白黒またはグレースケールで行う。カラー希望の場合は著者の負担とする。図表の挿入部位はプリントアウトしたものの欄外に示す。尚、本誌1ページは約1,600字に相当する。図の大きさを考慮して、全体の長さを調節すること。原稿(コンピュータファイル)はE-mailに添付して送付することができる。コンピュータファイルについては、印刷所あるいは編集委員会で対応できない場合は、著者に協力を求めることがある。

1. 巻頭言(展望) 刷り上がり1頁に収まるようにする。本文の長さは1,500字以内(タイトルと氏名を除く)。
2. 総説 一つのテーマについて、専門的知識に基づき、関連する多くの研究論文を総括、解説、評価した、所謂ミニレビュー。和文。
 - 1) 本文の長さ: 図、表も含めて刷り上がりで6ページ(9,600字)程度を基本とする。
 - 2) 題名: 40字以内とし、内容を的確に表したもので、且つ、読者の興味を引くよう工夫する。
 - 3) 要約およびキーワード: 要約およびキーワード(5個以内の英語)を必ず付す。要約は日本語(400字以内)、およびその英訳(200 words 以内)とする。
 - 4) 用語: 本文中の用語はなるべく日本語にする。但し、欧語の方が一般的なもの、解りやすい場合は欧語でよい。外国の人名は原語、地名はカタカナで表記する。

専門術語: それぞれの専門分野の用語集に従う。動植物の学名、遺伝子名などでイタリック体で印刷されるべきものについては、原稿に下線をつけるなどして区別する。

略語: 初出箇所にフルタームの後に括弧で括った略語を記入する。可能なら日本語を入れる。

文体: 「である」調とする。

数字・単位: 数字はアラビア数字とし、単位は国際単位系を用いる。
- 5) 引用・参考文献: 引用文献は論文中に引用した順に番号をつけて表示する。本文中では該当する位置に[]で括って表示する。1つの事柄に複数の論文を引用する場合には[1,5,7]または[2-6]のように記述する。著者名を引用する場合で3名以上の連名の時は、それ以下を“ら”を用いて省略する。末尾文献リストは引用した順とし、記載は以下の通りとする。未発表論文、私信は末尾文献リストには加えず、本文中の該当す

る位置に [] で括って表示する。

1. Sun J and Tower J. FLP recombinase-mediated induction of Cu/Zn-superoxide dismutase transgene expression can extend the life span of adult *Drosophila melanogaster* flies. *Mol Cell Biol* 19:216-228, 1999.
 2. Roth GS, Ingram DK and Cutler RG. Primate models for dietary restriction research. In: *Biological Effects of Dietary Restriction*, edited by Fishbein L. Berlin: Wiley, 1991, p. 193-204.
 3. 仲村賢一, 下村・泉山七生貴, 田久保海誉 ヒト組織の加齢に伴うテロメア短縮. *基礎老化研究* 24:72-76, 2000.
- 6) 図、表、写真: そのまま印刷できるものに限る (手書きのもの受け付けない)。文献から引用する場合は、引用を明記すると共に、引用の許可が必要な場合には、著者の責任で許可を取っておくこと (許可証のコピーを原稿と共に提出すること)。白黒またはグレースケールが原則。
- 7) 図、写真にはタイトルと説明文を付ける。
3. トピックス 最近の話題性のある研究及び最近行った自身の研究の紹介。長さは刷り上がり4頁以内 (1,600 - 6,400字)。その他は総説に準じる。但し、要旨は不要である。
 4. 学会報告、海外便り 国内外の学術集会の紹介記事。長さは1,600字以内。留学などで滞在しているまたは過去に滞在していた研究室、訪問した研究施設の見聞の紹介記事。
 5. 書評 最近出版された書籍の紹介。1,600字以内。
 6. 随筆 長さは刷り上がり2頁 (3,200字) 以内。
 7. その他
 8. 原稿の送付およびその他の問い合わせは、下記宛に。(e-mail の使用が望ましい。)
編集委員会委員長: 重本和宏 (kazshige@tmig.or.jp)
または、編集幹事: 三浦ゆり (miura@tmig.or.jp)

目 次

総説

*β*アミロイドによるcalsyntenin-3の誘導と神経変性

内田 洋子……………1-7

総説

社会心理的ストレスによる老化の促進とテアニンの抗ストレス作用

海野けい子……………9-15

総説

活性酸素の生理機能 – エネルギー代謝亢進の解除時における活性酸素の生成亢進 –

佐々木 徹……………17-25

総説

哺乳動物の加齢に伴うDNAメチル化の変動

下田 修義……………27-37

学会報告

The 21st International Conference of the Korean Society for Gerontology:

Intervention of Aging and Age-related Diseasesに参加して

丸山 直記……………39

学会報告

微笑みの国の老年学

丸山 直記……………41

随筆

老化研究事起こし----- 老化クロマチンに動的変化が? 三井 洋司……………43-45

附

基礎老化学会サーキュラー 第91号

CONTENTS

<REVIEW>

Possible role of calsyntenin-3 accumulation in layer-specific vulnerability of cortical neurons in Alzheimer's disease.

Yoko Uchida……………1-7

<REVIEW>

Aging acceleration under psychosocial stress and anti-stress effect of theanine

Keiko Unno……………9-15

<REVIEW>

Increasing a generation of reactive oxygen in brain tissue at resting period after the enhanced energy metabolism -Physiological functions of reactive oxygen-

Toru Sasaki……………17-25

<REVIEW>

Changes in DNA methylation upon mammalian aging

Nobuyoshi Shimoda……………27-37

表紙：ミトコンドリアの電子伝達

詳しい説明は17ページ（総説）を参照

【総 説】

β アミロイドによるcalsyntenin-3の誘導と神経変性

内田 洋子

東京都健康長寿医療センター研究所・老化制御チーム

要約

アルツハイマー病の原因物質は β アミロイド (A β) oligomerであり、その最初期病変はシナプス機能障害であることが確認されつつある。しかし、A β によるシナプス機能障害の分子機構については、不明な点が多い。私たちは、A β oligomerによる遺伝子発現誘導を網羅的に検索し、シナプス蛋白の遺伝子calsyntenin-3を同定した。Calsyntenin-3はアルツハイマー病で脆弱なニューロンに主として分布することから、A β と神経変性を結びつける重要な分子の一つと考えている。本稿では、calsyntenin-3のシナプス機能障害への関与について、私たちの研究を中心に紹介する。

キーワード：アルツハイマー病、 β アミロイド、Calsyntenin-3、 γ -secretase

はじめに

アルツハイマー病は、原因不明の進行性の認知症で、大脳皮質や皮質下に老人斑や神経原線維変化が出現し、ニューロンが脱落する。老人斑は、 β アミロイド (A β) がニューロン外に沈着したものであり、神経原線維変化は、主としてリン酸化されたタウ蛋白から成るPHF(paired helical filament)がニューロン内に蓄積したものである。そして、多数の剖検脳の観察から、最初に老人斑が出現し、それから長い年月を経て、神経原線維変化や神経細胞の脱落が見られるようになると推測されてきた。しかも、認知障害のない老人の脳にも多数の老人斑が出現していることや、認知機能の低下と老人斑密度は必ずしも相関しないことから、A β の沈着が直接アルツハイマー病の発症を引き起こすという仮説には疑問が投げかけられていた。

アルツハイマー病のなかには特定の遺伝子に変異が認められる家族性アルツハイマー病があり、これまでに3種類の原因遺伝子(amyloid precursor protein, APP; presenilin-1, PS1; presenilin-2, PS2)が同定された。APPはA β の前駆体蛋白であり、PS1やPS2はA β を前駆体から切り出す酵素 (γ -secretase) の構成蛋白である。そして、それらの点突然変異は、いずれもA β 1-42の合成・分泌を促進することがわかった[1]。さらに、APPやPS1に変異を持つモデル動物 (マウス) が作製され、変異APPマウスの脳内にA β 斑 (老人斑) ができることや[2-5]、変異PS1の導入によって早期にA β 斑が出現することが確かめられた[6,7]。さらに、どのような順番で病変が現れるかを調べられるようになり、次のような順で病変が現れることがわかった[8] (図1)。① 可溶性のA β

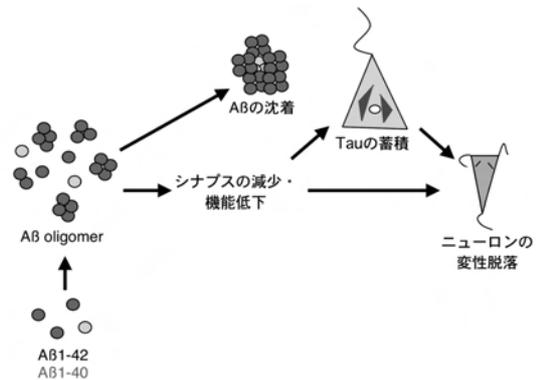


図1. ADマウスモデルから推測されるAD病変の経時変化 (文献8より改変)

oligomer (β アミロイド斑ではない)が増加する→②シナプスの数が減少し、その機能が低下する→③A β が沈着する (アミロイド斑の出現) という順に病変が現れる。そして、アルツハイマー病患者脳にもA β oligomerが存在することがわかり、認知機能の低下は、老人斑の密度ではなく、A β oligomer量と相関することが明らかとなった[9,10]。つまり、A β oligomerによるシナプス機能低下が、最初期病変であることが示唆されるに至った。それでは、(1)A β がどのような機構でシナプスの変性を引き起こすのか? (2) A β は大脳皮質全体に分布するのに対し、なぜ、特定の領域のニューロンだけが変性するのか?

この問いに答えるため、私たちは、可溶性のA β oligomerが、どのような遺伝子の発現を変化させるのかを網羅的に検索した。その結果、A β oligomerによって発現誘導される遺伝子として、アルツハイマー病で脆弱なニューロンに多く分布するシナプス蛋白の遺伝子、calsyntenin-3を同定した。

連絡先：〒173-0015 板橋区栄町35-2
 Phone: 03-3964-3241 ex 3050
 Fax: 03-3579-4776
 e-mail: 57uchida@tmig.or.jp

1. Aβ oligomerによるcalsyntenin-3の選択的発現誘導と大脳ニューロンの脆弱性

(1) Calsyntenin-3はAβ oligomerによって選択的に発現誘導される

Calsyntenin familyは、cadherin superfamilyに属するtype I膜貫通蛋白で、脳のシナプス膜に存在する[11]。Calsyntenin familyとして3種類(calsyntenin-1, calsyntenin-2, calsyntenin-3)が同定されており[12]、いずれのC-末端にもWDDS motifが存在し、kinesin-1 light chainに結合すると考えられている[13] (図2A)。

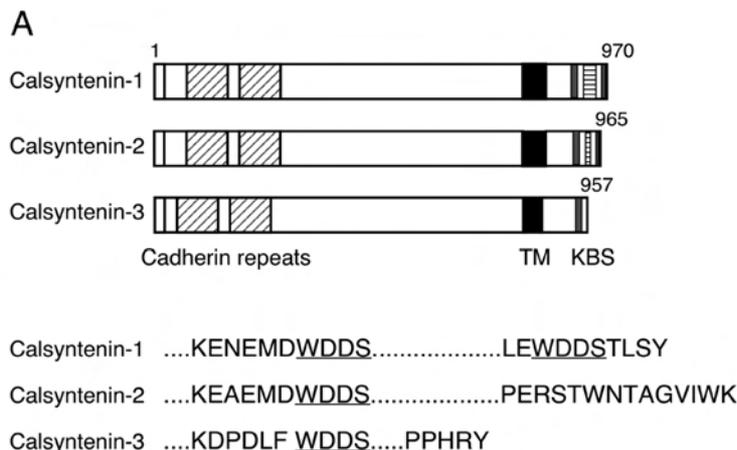
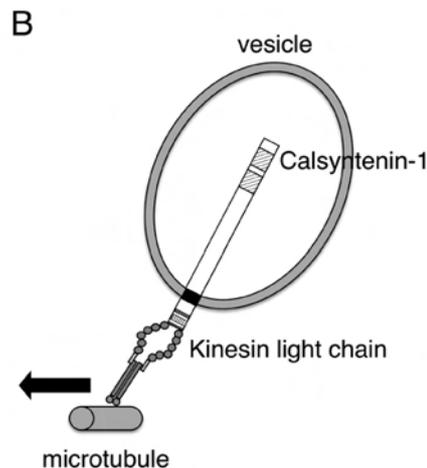


図2.

(A) Calsyntenin familyの分子構造 KBS (kinesin light chain 1 binding segment) (文献12, 13より改変)
 (B) Calsyntenin-1のcargo-docking proteinとしての役割の模式図 (文献13, 14より改変)

個々のcalsyntenin蛋白がそれぞれどのような機能を担っているのかは、わかっていない。Calsyntenin-1に関しては、kinesin-1を介した膜小胞の輸送の際に、cargo-docking proteinとして働くこと[13,14] (図2B)、また、線虫ではcalsyntenin-1のorthologであるCAS-1が学習・記憶に重要な役割を果たしていることがわかっている[15,16]。Calsyntenin-2, とcalsyntenin-3について明らかとなっているのは、アミノ酸配列と代謝切断部位、そして、脳内における局在のみである[12,17]。

そこで、私たちは、Aβ oligomerによって発現誘導さ



れるのは、calsyntenin-3だけなのか、それとも、すべてのcalsynteninが発現誘導されているのかを、Aβ処理した培養大脳ニューロンとADマウスモデル (APP670/671に変異の入ったAPPを持つTgマウス, Tg2576)の大脳皮質で調べた。その結果、*in vitro*, *in vivo*共に、calsyntenin-3 mRNAの発現のみがAβによって誘導されていることがわかった[18] (図3)。さらに、calsyntenin-3の発現を誘導するのは、Aβ oligomerなのかAβ fibrilなのかを培養大脳ニューロンを用い調べたところ、Aβ fibrilよりもAβ oligomerによってcalsyntenin-3は発現誘導されることがわかった[18]。

(2) 大脳皮質では、calsyntenin-3は第2/3層と第5層のニューロン以外にAβ斑周囲の変性突起にも分布する[18]

Calsyntenin familyの脳内分布は、それぞれの蛋白により異なる。例えば、大脳皮質では、calsyntenin-1はどのニューロンにもほぼ均一に分布するのに対し、calsyntenin-2は、第5、6層のニューロンに多く、calsyntenin-3は第2/3層と第5層のニューロンに多く分布することが知られている[12]。それでは、ADマウスモデルであるTg2576では、どの部分でcalsyntenin-3が増加しているのか？

私たちはcalsyntenin-3のC-末端部分のペプチドに対する抗体を作製し、immunofluorescenceを行った。老

齢の野生型マウスでは、calsyntenin-3は大脳皮質第2-3層と第5層ニューロンに中程度の蛍光が認められるのに対し、老齢Tg2576マウスでは、第2-3、5層ニュー

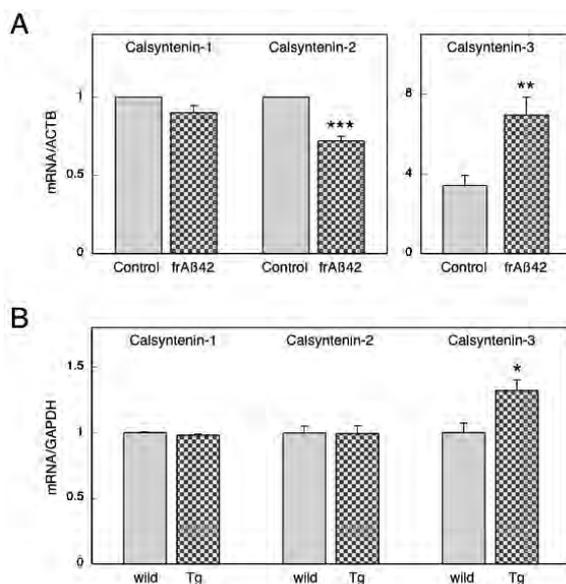


図3. Aβによるcalsyntenin-3の選択的誘導

(A) Aβ oligomer添加による培養大脳ニューロンでのcalsyntenin family mRNAsの発現変化
 (B) 24ヵ月令のADマウスモデルでのcalsyntenin family mRNAsの発現変化 (文献18より改変)

ロン以外に、A β 斑周囲の変性突起にも強い蛍光が認められた (図4)。A β 斑周囲の変性突起でのcalsyntenin-3の染色パターンは、リン酸化タウの蛍光パターンとは異なり、むしろ、A β 斑形成初期に現れるリン酸化APP (T668)の染色パターンと類似していた。

A β 斑周囲の変性突起にcalsyntenin-3が沈着することは、培養系での実験結果 (calsyntenin-3の発現を誘導するのは、A β fibrilではなくA β oligomerであること) と矛盾するように見える。しかし、A β oligomerはA β 斑 (core) 周囲に大量に存在することがわかっているため[19]、A β 斑周囲に突起を伸ばしているニューロンに、A β oligomerがcalsyntenin-3を誘導させ、突起内に蓄積させると考えても矛盾はない。

(3) Calsyntenin-3の過剰発現は培養大脳ニューロンを脆弱にする[18]

それでは、A β oligomerによるcalsyntenin-3の過剰発現は、大脳ニューロンにどのような影響をあたえるのか？ Calsyntenin-3が、アルツハイマー病で変性しやすいニューロンに多く存在することと、A β 斑周囲の変性突起にcalsyntenin-3が蓄積していることから、

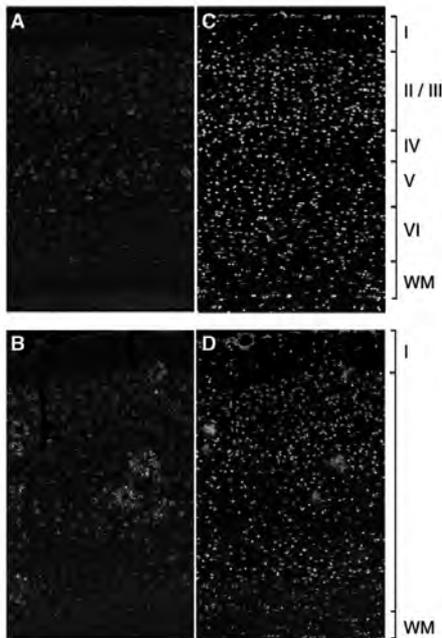


図4. Calsyntenin-3の局在 (AとB)

(AとC) 21ヵ月令の野生型マウス大脳では、calsyntenin-3は皮質第2/3層と第5層のニューロンに主として分布する。

(BとD) 21ヵ月令のADマウスモデル大脳では、calsyntenin-3は第2/3層と第5層のニューロンへの局在に加え、A β 斑周囲の変性突起に蓄積している。CとDは、Hoechst33342による核染色。

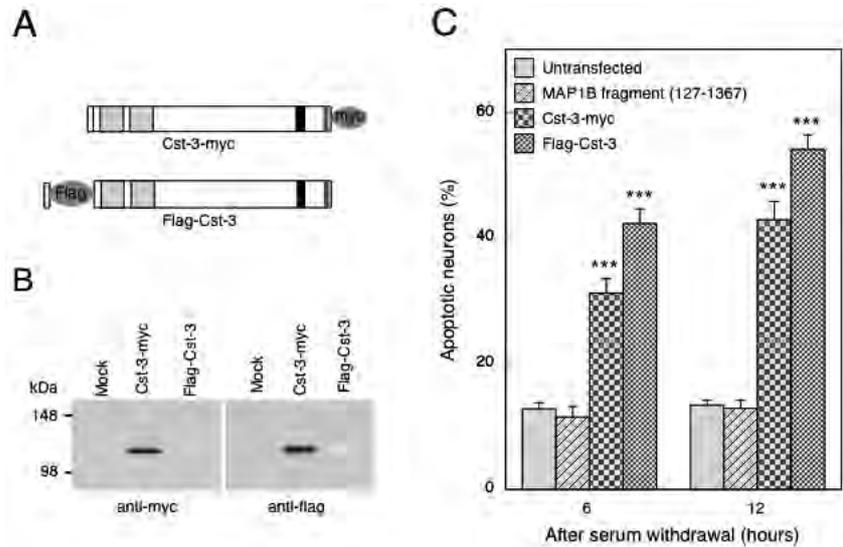


図5. Calsyntenin-3の過剰発現は培養大脳ニューロンを脆弱にする

(A) 使用した2種類のcalsyntenin-3 constructs

(B) Myc-tag付加したcalsyntenin-3とflag-tag付加したcalsyntenin-3の培養大脳ニューロンでの発現をWestern blottingで確認。

(C) Calsyntenin-3遺伝子導入による大脳ニューロン脆弱性の変化。培養大脳ニューロンにcalsyntenin-3遺伝子を導入し、血清除去により細胞死を誘導した。細胞死の指標として、核が濃縮・断片化したmyc-tagおよびflag-tag陽性ニューロンの数を数えた。

calsyntenin-3の過剰発現は、ニューロンの脆弱性を高めることが想像される。そこで、私たちは、myc- または flag-tagをつけた calsyntenin-3 constructsを作製し、培養大脳ニューロンに導入し、その後、培地からの血清除去によって、細胞死を誘導させた。細胞死の指標として、Myc- または flag-tagの付いたニューロンのうち、核が濃縮・断片化した細胞を数えた。その結果、calsyntenin-3を過剰発現したニューロンは、血清除去による細胞死に対し、脆弱であることが明らかとなった (図5)。

アルツハイマー病では、A β 斑は大脳皮質全体に沈着するのに対し、ニューロンの変性は、第2/3層と第5層 (錐体細胞) に出現する。これは、ニューロンによってA β に対する感受性が異なり、大脳皮質第2/3層と第5層のニューロンはA β 感受性が高いためではないかと推測される。そして、この感受性の違いは、ニューロン内の遺伝子発現の違いによって規定される可能性がある。Calsyntenin-3は、他のcalsynteninとは異なり、大脳皮質では第2/3層と第5層のニューロンに多く分布することから、calsyntenin-3を多く発現するニューロンがアルツハイマー病で変性しやすくなると考えてもおかしくはない。実際に、培養ニューロンでのcalsyntenin-3の過剰発現はニューロンの脆弱性を増加させ、また、ADマウスモデルでは、A β 斑周囲のニューロンの突起にcalsyntenin-3が蓄積していて、変性突起を形成していることは、この仮説の裏付けとなっていると考える。

2. Calsyntenin-3の代謝とその代謝産物の作用

Calsyntenin-3は他のcalsynteninと同様に、APPと類似した2段階の蛋白代謝を受けることが知られている (図6A) [17]。すなわち、 α -secretaseによって、まず、

細胞外ドメイン (N-末端側) sCst-3と、膜貫通部分を含むN-末端側断片 CTFに分解され、さらに、CTFは γ -secretaseによって、p3ペプチドと細胞内ドメインICDに分解される。sCst-3とp3ペプチドは細胞外(脳脊髄液中)に分泌され、CTFとICDは細胞内に残る。それでは、AB斑周囲の変性突起に沈着したcalsyntenin-3は、全長蛋白なのか、それとも、代謝産物CTFやICDなのか?さらに、calsyntenin-3の代謝産物も全長蛋白と同様に、その過剰発現によって、大脳ニューロンの脆弱性を増加させるのか?

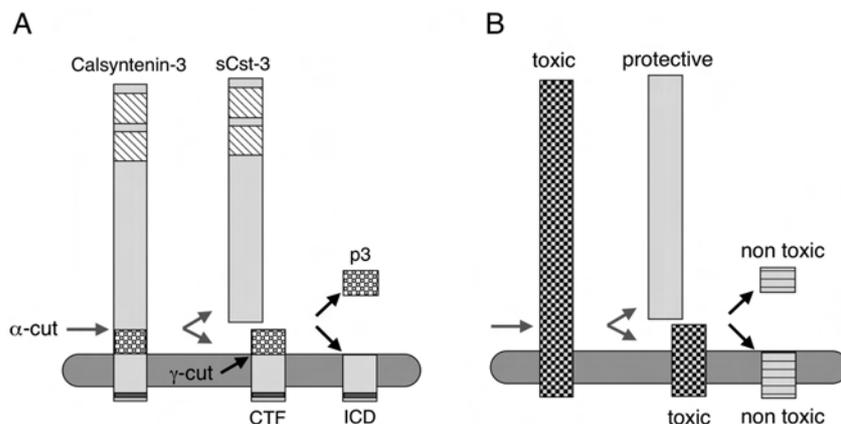


図6. Calsyntenin-3の代謝様式とその代謝産物の生理作用

- (A) Calsyntenin-3の代謝様式 (文献17より改変)
 (B) Calsyntenin-3の代謝産物の生理作用

(1) ADマウスモデルにおけるCalsyntenin-3の代謝[20]

私たちは、まず、マウス大脳でのcalsyntenin-3代謝をC-末端抗体を用いたWestern blottingによって調べた。若齢から老齢の近交系マウスC57B6では、全長calsyntenin-3量に加齢変化はないのに対し、CTF量は加齢に伴い減少していた。ICDに相当する位置にはバンドは認められなかった。そして、老齢Tg2576と老齢野生型マウスでのCTF量を比較したところ、Tg2576マウスではCTF量が有意に増加していることがわかった。全長calsyntenin-3量はTg2576と野生型との間で差はなかった。

次に、calsyntenin-3のN-末端細胞外ドメインを認識する抗体を入手し、老齢Tg2576と老齢野生型マウスに対し、immunofluorescenceを行った。この抗体は、C-末端部分の抗体とは異なり、野生型およびTg2576マウスの大脳皮質第2/3層と第5層のニューロンを染めるが、Tg2576マウスに見られるAB斑周囲の変性突起を染めないことがわかった。

以上の結果は、老齢Tg2576の大脳では、全長のcalsyntenin-3が増加しているのではなく、代謝産物CTFが、特に、AB斑周囲の変性突起で蓄積していることを示唆した。

(2) Calsyntenin-3の α -代謝産物、CTFの蓄積は、大脳ニューロンの脆弱性を増加させるが、CTFの γ -代謝産物は、大脳ニューロンの脆弱性を増加させない[20]

老齢Tg2576の大脳、特にAB斑周囲の変性突起にCTFが蓄積していることから、CTFがシナプスなどニューロンの突起を変性させている可能性がある。そこで私たちは、この点を確認するために、CTF constructやICD constructを作製し、EYFP vectorと共発現させ、それらの過剰発現が培養大脳ニューロンの脆弱性を増加させるかどうかを調べた。CTFの過剰発現は、全長calsyntenin-3のそれと同様に大脳ニューロンの脆弱性を増加させたが、ICDの過剰発現は、ニューロンの脆弱性を増加させなかった。また、p3 peptideを培地に添加して、神経毒性を調べたが、0.2~5 μ Mのp3 peptideに

は神経毒性は見られなかった (図 6B)。

以上の結果は、AB斑周囲のニューロンの突起に蓄積するCTFには神経毒性があり、それが変性突起を誘導することを示唆した。また、CTFを γ -切断すると神経毒性がみられなくなることから、障害からニューロンをrescueするためには、 γ -切断を促進することが必要であると考えた。

(3) Calsyntenin-3の α -代謝産物、sCst-3にはニューロンへの保護作用があり、CTFを過剰発現したニューロンの脆弱性を減少させる[20]。

それでは、Calsyntenin-3のもう一つの α -代謝産物、sCst-3にも神経毒性があるのか?私たちはCOS7細胞に発現させたsCst-3を精製し、培養大脳ニューロンを使い、その毒性を調べた。sCst-3には、5 nM以上の濃度で、MTT還元能を上昇させ、ニューロン死を抑制することがわかった (図 6B)。さらに、全長calsyntenin-3やCTFを過剰発現したニューロンの脆弱性を減少させることも明らかとなった。

これらの結果は、APPの細胞外ドメインsAPPに神経保護作用があること[21-26]や、CASY-1の細胞外ドメインが学習記憶に必要であること[16]と、共通しており、興味深い。

3. おわりに

アルツハイマー病の最初期病変は、AB oligomerによるシナプス機能障害であることが確認されつつある。それでは、どのような分子機構で、シナプス機能障害がおこるのか?答えは、まだよくわかっていない。しかし、私たちが述べてきた、「AB oligomerによるcalsyntenin-3の選択的発現誘導があり、その代謝産物の蓄積がニューロンの突起を変性させる」という仮説が、AB oligomerによるシナプス機能障害を説明できるかもしれない。特に、calsyntenin-3が、アルツハイマー病で変性しやすいニューロンに多いことは、神経変性のregional specificityを説明できる可能性が高い。私たちはあえて、アルツハイマー病患者脳を研究対象とせず、変異

APPマウス脳を使い研究を進めてきた。このマウスではAB産生の増加とAB斑の出現、学習記憶障害が認められるものの、神経原線維変化やニューロンの脱落は見られない。そのため、「神経原線維変化を無視しているのは、けしからん」というお叱りを受けるかもしれない。しかし、神経原線維変化の出現より前に、すでに、シナプス機能の障害が起きており、その分子機構を探ることの方が重要と考えている。また、私たちが最初期病変にこだわったのは、後発病変の分子機構を探ろうとすると、得られた実験結果が、ある現象の原因なのか結果なのか判断に窮することが多いためでもある。

我々が使用した変異APPマウスでは、神経変性はAB斑周囲に限局している。そして、ABは、AB斑周囲のニューロンの突起に直接作用して毒性を発揮する[27]と言われていることから、病変は次のような時系列でAB斑周囲のニューロンの突起に起きると考えられる。まず、AB斑周囲のニューロンでcalsyntenin-3が増加する→ α -secretaseによってcalsyntenin-3が代謝され、細胞内にCTFが残る→何らかの理由で γ -secretase活性が抑えられているため、ICDへの代謝が進まず、CTFが細胞内に蓄積する→CTFの蓄積がニューロンの突起を変性させる。この仮説は、「ニューロンの突起変性を阻止するためには、 α -secretaseと γ -secretaseを活性化させる必要がある」ことを示唆しており、これまでのアルツハイマー病治療薬の探索・開発に注意を喚起することになると思われる。

アルツハイマー病の根本治療薬として、 γ -secretase阻害剤 (GSI, ABの生成を抑制) が注目されて久しい。 γ -secretaseはAPPのみならずNotchの切断も阻害することから、GSIの副作用には注意が払われてきた。しかし、著明な副作用のないGSIとして期待が集まっていたSemagacestatは、第III相治験途中、病気の進行を遅らせることはできず、かえって認知機能の低下を引き起こすことがわかり、開発が中止された。ABの生成を抑制する薬物として γ -secretase阻害剤を探索することは理にかなっているのかもしれない。しかし、 γ -secretaseはAPPやNotchだけではなく、calsyntenin familyを含め、かなり多くの蛋白を基質としているため、 γ -secretaseがAPPを切断する場合にのみ働く γ -secretase modulatorでないという意味が無いと言える。そのためにも、APPやその類似蛋白 (calsyntenin familyを含む)の代謝調節機構全容の解明が待たれる。

引用文献

- 1 Hardy J: Amyloid, the presenilins and alzheimer's disease. Trends Neurosci 1997;20:558-559.
- 2 Chishti MA, Yang DS, Janus C, Phinney AL, Horne P, Pearson J, Strome R, Zuker N, Loukides J, French J, Turner S, Lozza G, Grilli M, Kunicki S, Morissette C, Paquette J, Gervais F, Bergeron C, Fraser PE, Carlson GA, George-Hyslop PS, Westaway D: Early-on-

- set amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. J Biol Chem 2001;276:21562-21570.
- 3 Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, et al.: Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing v717f beta-amyloid precursor protein. Nature 1995;373:523-527.
- 4 Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G: Correlative memory deficits, abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. Science 1996;274:99-102.
- 5 Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Burki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B: Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with alzheimer disease-like pathology. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:13287-13292.
- 6 Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, Morgan D, Gordon MN, Holcomb L, Refolo L, Zenk B, Hardy J, Younkin S: Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. Nature 1996;383:710-713.
- 7 Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, Wright K, Saad I, Mueller R, Morgan D, Sanders S, Zehr C, O'Campo K, Hardy J, Prada CM, Eckman C, Younkin S, Hsiao K, Duff K: Accelerated alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. Nat Med 1998;4:97-100.
- 8 Selkoe DJ: Alzheimer's disease is a synaptic failure. Science 2002;298:789-791.
- 9 Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J: Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in alzheimer's disease. Am J Pathol 1999;155:853-862.
- 10 McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL: Soluble pool of abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in alzheimer's disease. Ann Neurol 1999;46:860-866.

- 11 Vogt L, Schrimpf SP, Meskenaite V, Frischknecht R, Kinter J, Leone DP, Ziegler U, Sonderegger P: Calsyntenin-1, a proteolytically processed postsynaptic membrane protein with a cytoplasmic calcium-binding domain. *Mol Cell Neurosci* 2001;17:151-166.
- 12 Hintsch G, Zurlinden A, Meskenaite V, Steuble M, Fink-Widmer K, Kinter J, Sonderegger P: The calsyntenins—a family of postsynaptic membrane proteins with distinct neuronal expression patterns. *Mol Cell Neurosci* 2002;21:393-409.
- 13 Konecna A, Frischknecht R, Kinter J, Ludwig A, Steuble M, Meskenaite V, Indermuhle M, Engel M, Cen C, Mateos JM, Streit P, Sonderegger P: Calsyntenin-1 docks vesicular cargo to kinesin-1. *Mol Biol Cell* 2006;17:3651-3663.
- 14 Araki Y, Kawano T, Taru H, Saito Y, Wada S, Miyamoto K, Kobayashi H, Ishikawa HO, Ohsugi Y, Yamamoto T, Matsuno K, Kinjo M, Suzuki T: The novel cargo alcadein induces vesicle association of kinesin-1 motor components and activates axonal transport. *Embo J* 2007;26:1475-1486.
- 15 Hoerndli FJ, Walser M, Frohli Hoier E, de Quervain D, Papassotiropoulos A, Hajnal A: A conserved function of *c. Elegans* casy-1 calsyntenin in associative learning. *PLoS One* 2009;4:e4880.
- 16 Ikeda DD, Duan Y, Matsuki M, Kunitomo H, Hutter H, Hedgecock EM, Iino Y: Casy-1, an ortholog of calsyntenins/alcadeins, is essential for learning in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:5260-5265.
- 17 Hata S, Fujishige S, Araki Y, Kato N, Araseki M, Nishimura M, Hartmann D, Saftig P, Fahrholz F, Taniguchi M, Urakami K, Akatsu H, Martins RN, Yamamoto K, Maeda M, Yamamoto T, Nakaya T, Gandy S, Suzuki T: Alcadein cleavages by amyloid beta-precursor protein (app) alpha- and gamma-secretases generate small peptides, p3-als, indicating Alzheimer disease-related gamma-secretase dysfunction. *J Biol Chem* 2009;284:36024-36033.
- 18 Uchida Y, Nakano S, Gomi F, Takahashi H: Up-regulation of calsyntenin-3 by beta-amyloid increases vulnerability of cortical neurons. *FEBS Lett* 2011;585:651-656.
- 19 Koffie RM, Meyer-Luehmann M, Hashimoto T, Adams KW, Mielke ML, Garcia-Alloza M, Micheva KD, Smith SJ, Kim ML, Lee VM, Hyman BT, Spires-Jones TL: Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:4012-4017.
- 20 Uchida Y, Nakano S, Gomi F, Takahashi H: α - and γ -cleavage of calsyntenin-3 attenuates neurotoxicity of calsyntenin-3 overexpression by β -amyloid. 投稿中
- 21 Araki W, Kitaguchi N, Tokushima Y, Ishii K, Aratake H, Shimohama S, Nakamura S, Kimura J: Trophic effect of beta-amyloid precursor protein on cerebral cortical neurons in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181:265-271.
- 22 Goodman Y, Mattson MP: Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid beta-peptide-induced oxidative injury. *Exp Neurol* 1994;128:1-12.
- 23 Mattson MP, Cheng B, Culwell AR, Esch FS, Lieberburg I, Rydel RE: Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron* 1993;10:243-254.
- 24 Roch JM, Masliah E, Roch-Leveq AC, Sundsmo MP, Otero DA, Veinbergs I, Saitoh T: Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid beta/a4 protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:7450-7454.
- 25 Smith-Swintosky VL, Pettigrew LC, Craddock SD, Culwell AR, Rydel RE, Mattson MP: Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect against ischemic brain injury. *J Neurochem* 1994;63:781-784.
- 26 Stein TD, Anders NJ, DeCarli C, Chan SL, Mattson MP, Johnson JA: Neutralization of transthyretin reverses the neuroprotective effects of secreted amyloid precursor protein (app) in appsw mice resulting in tau phosphorylation and loss of hippocampal neurons: Support for the amyloid hypothesis. *J Neurosci* 2004;24:7707-7717.
- 27 Meyer-Luehmann M, Spires-Jones TL, Prada C, Garcia-Alloza M, de Calignon A, Rozkalne A, Koenigsknecht-Talboo J, Holtzman DM, Bacskai BJ, Hyman BT: Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 2008;451:720-724.

Possible role of calsyntenin-3 accumulation in layer-specific vulnerability of cortical neurons in Alzheimer's disease.

Yoko Uchida

Molecular Neurobiology, Research Team for Functional Biogerontology,
Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

Abstract

β -amyloid (A β) may play an important role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. However, a causal relationship between A β oligomers and layer-specific neurodegeneration has not been clarified. Here we review possible role of calsyntenin-3 in layer-specific vulnerability of cortical neurons in Alzheimer's disease. Calsyntenin-3 was cloned as a homolog of calsyntenin-1, which is type 1 transmembrane protein of cadherin superfamily and is found in the synaptic membrane in the adult brain. Little was known about the function and the regulation of calsyntenin-3, except its distribution in brain: calsyntenin-3 is distributed in large neurons in layers 2-3 and 5 of the cerebral cortex. Recently, we found that calsyntenin-3 is selectively up-regulated in cultured neurons treated with A β oligomers and in Tg2576 mice. Calsyntenin-3 immunoreactivity is accumulated in dystrophic neurites surrounding A β -plaques in Tg2576 mice. Overexpression of calsyntenin-3 in cultured cortical neurons increases in vulnerability of neurons. Calsyntenin-3 undergoes two-step proteolytic processing like amyloid precursor protein: The primary cleavage with α -secretase generates a N-terminal ectodomain and a C-terminal fragment. The C-terminal fragment is subsequently cleaved into p3 peptide and an intracellular domain by γ -secretase. We found that the C-terminal fragment increased in Tg2576 mouse brain, especially in dystrophic neurites surrounding A β plaques. Transfection experiments with calsyntenin-3 fragments revealed that the overexpression of the C-terminal fragment but not of the intracellular domain in cortical neurons resulted in the acceleration of neuronal death. The addition of p3 peptide to the culture medium did not accelerate neuronal death. Moreover, purified N-terminal ectodomain attenuated death of cortical neurons overexpressing the full length or C-terminal fragment of calsyntenin-3. These findings suggest that accumulation of neurotoxic C-terminal fragment in neurites surrounding A β plaques may lead to synaptic dysfunction. Proteolytic processing of calsyntenin-3 by α - and γ -secretase may attenuate neuronal dysfunction by A β .

Keywords: calsyntenin-3, β -amyloid, gene expression, neurotoxicity

【総 説】

社会心理的ストレスによる老化の促進とテアニンの抗ストレス作用

海野けい子

静岡県立大学薬学部

要約

多くの人が日常生活において何らかのストレスを感じている。ストレスの負荷が長期間続くと心身の疾患を引き起こすとともに、老化を促進させると考えられている。本研究ではマウス間で社会心理的ストレスが負荷されるような実験系を作成し、老化への影響を検討した。その結果、長期にわたり社会心理的ストレスを負荷されたマウスでは寿命が短縮し、さらに大脳萎縮および学習能低下などの脳の老化が促進することを明らかにした。

また、ストレスによる生体への影響を緩和することができる抗ストレス作用物質として、緑茶中に含まれるテアニンの有効性を検討した。その結果、テアニンを摂取していたマウスでは、ストレスが負荷されていた場合でも寿命短縮が抑制されるとともに、脳の老化が抑制された。これらの結果から、社会心理的ストレスの蓄積により老化が促進され、テアニン摂取はストレスによる老化の促進を抑制する効果があることが明らかとなった。

キーワード：Psychosocial stress, aging, longevity, brain dysfunction, theanine

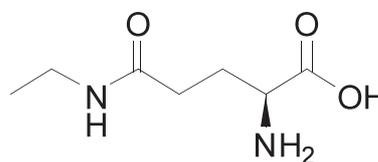
1. はじめに

現代はストレス社会と言われ、多くの人が何らかのストレスを抱えている。適度なストレスは必要であり生体に良い効果をもたらすと考えられているが、ストレスが長期にわたり負荷された場合、「うつ」や気分障害、心血管系疾患、加齢関連疾患など様々な疾病を引き起こすと考えられている[1-6]。また長期のストレスはアルツハイマー病の潜在的危険因子であることも報告されている[7]。したがってストレスによって生ずる悪影響を抑制あるいは軽減することは、多くの疾病の予防・軽減につながる重要な鍵となると考えられる。

ヒトが「ストレス」と感じる様々な要因の中で、職場や学校、家庭における対人関係に起因する社会心理的ストレスは主要なストレスと考えられる。これまで多くの実験動物を用いたストレスによる生体への影響が検討されているが、ストレス負荷実験としてよく用いられている方法は、電気ショックや拘束、強制水泳などの物理的苦痛を与える方法である[8]。これらの方法は簡便で結果が得られやすいことなどにより、よく用いられている。しかし、身体に直接加えられる強いストレスが比較的短期間に加えられた場合と、直接的危害が加わるのではないが心理的ストレスが長期間にわたり負荷された場合とでは、共通してみられるストレス応答もあるが、異なる生体の応答も生じる可能性が考えられる。そこで実験動

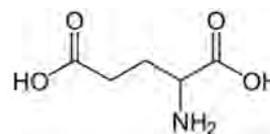
物においても、ヒトでのストレス状態に近い社会心理的ストレスが負荷されるような実験条件を設定し、その影響を調べてみる必要があると考え、従来用いられてきた方法に改良を加えた実験系を作成し、マウスを用いて寿命および脳機能への影響を検討した。

ところでテアニン(図1)は、茶葉に含まれるアミノ酸の中で量的に最も多いアミノ酸である。緑茶のまろやかな旨味は、主にこのテアニンに由来する。茶葉の種類、産地、収穫時期などによりその含量には変動があるが、緑茶の浸出液中には1.6-3.4%、紅茶には0.5-4.1%含まれていると報告されている[9]。テアニンはグルタミン酸誘導体であり、カフェインによる興奮作用を抑制する作用[10]、脳に対する保護作用[11-16]、神経伝達物質への



Theanine

(γ -glutamylethylamide)



Glutamic acid

図1. テアニンおよびグルタミン酸の構造

連絡先：〒422-8526 静岡市駿河区谷田52-1

TEL: 054-264-5731

FAX: 054-264-5909

E-mail: unno@u-shizuoka-ken.ac.jp

影響[17, 18]、短期ストレス時の軽減効果[19]などがこれまでに報告されている。今回、テアニンを長期間摂取した場合の抗ストレス効果について検討した。

2. 社会心理的ストレスの負荷方法

実験動物に社会心理的ストレスを負荷する方法の一つとしてよく用いられているのは、オス動物のナワバリ意識を利用した対面飼育という方法である[20-24]。居住者（マウス、ラットなど）のケージに、別のケージから侵入者を入れ対面させる。この場合、侵入者は居住者から激しい攻撃を受けるため、社会心理的ストレスだけでなく、身体への直接的ストレスも無視できない。またケージが変わるとい物理的ストレスも侵入者には加わることになる。

そこでこれらを改善した新たな方法を考案した[25]。2匹の雄マウスを、ステンレス製の仕切り板で2つに区切ったケージに1匹ずつ入れ単独飼育を行うことで、マウスにナワバリ意識を確立させた後、仕切り板を外して2匹の対面飼育を行う（図2）。マウスは互いを侵入者とみなすが、これらマウスは2匹とも居住者でもある。仕切り板を外した直後に2匹の間では互いのニオイを嗅ぐ、追いかける、一方が他方に乗りかかる、などの行動が観察されることから、2匹の間には優劣の関係が成立している。しかしその後2匹のマウスはどちらも外傷を負うことはなく普通に生活し、体重の減少なども認められない。

マウス等がナワバリ意識に基づき相手を攻撃する際のシグナルの一つは、相手がオスであることで、去勢したオスには攻撃が減少する[26]。また、若い時から同じケージで飼育したマウス同士にはほとんど攻撃しないことから、マウスは同じ群れの仲間であるかどうか、ということを知っており、その情報源の一つが尿のニオイである[27]。仕切り板を用いた対面飼育の方法では、単

独飼育の条件下でも少なくともニオイの情報は共有していることから、同じケージ仲間として認識していることが、激しい攻撃には至らない一因ではないかと推察している。

ここで紹介する実験系では、1月齢で購入したマウスを1ヶ月間、仕切り板を入れたケージで単独飼育を行った後、2月齢の時点で仕切り板を外して対面飼育を開始し、寿命への影響を見る場合は死亡するまで、また脳機能等を測定する場合は9月齢になるまで対面飼育を継続した。対照群としては、1ケージ6匹での群飼育群のマウスを用いた。

3. 寿命の変化

実験には老化促進モデルマウス(SAMP10)を用いた。このマウスは生後4-5ヶ月で正常に成熟期に達するが、その後老化徴候が早期に現れ、平均生存期間が通常のマウスに比べやや短いという特徴を示す。われわれの実験施設で飼育した場合、群飼育のSAMP10マウスの平均生存期間は 17.6 ± 1.2 月齢であった。一方、対面飼育下にあったマウスでは成熟後早い時期から死亡するマウスが見られ、平均生存期間は 13.6 ± 1.5 月齢であった。（図3a）。これら早期に死亡したマウスに外傷はみられなかった。対面飼育のマウスでは群飼育のマウスに比べ約4ヶ月寿命が短くなっており、ストレス負荷により生存期間が3/4に短縮されたことになる。

次に対面飼育の条件下で、マウスの飲水中にテアニンを $20 \mu\text{g/ml}$ の濃度に溶解し自由摂取させた。テアニンの摂取量は $5-6 \text{ mg/kg}$ であった。テアニン摂取群と水摂取群では、摂水量および体重に違いは認められなかった。しかし対面飼育下にあるにもかかわらず、テアニン摂取群では平均生存期間が 17.9 ± 1.4 月齢に延長しており、群飼育の場合とほぼ同じ平均生存期間となった（図3b）。群飼育群のマウスと同様にテアニンを摂取させた場合は 16.9 ± 1.4 月齢であり、水摂取群と変わらない平均生存期間であった（図3c）。このことからテアニンの寿命延長効果は、対面飼育により生じた寿命短縮作用を打ち消しているものであり、通常の群飼育の条件下ではそれ以上の寿命延長効果をもたらすものではないことが示された。

4. ストレス負荷による副腎の肥大と大脳の萎縮

対面飼育条件下で、マウスは実際にストレスを感じていたのだろうか？ ストレスが負荷された時、ヒトも他の動物も共通して内分泌系および神経系を介したストレス応答がおこり、生体はストレスに対処していると考えられている。内分泌系では、視床下部の室傍核から副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)が放出され、次いで下垂体前葉から副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)が、そして副腎皮質からグルココルチコイドが血中に放出される視床下部-下垂体-副腎(HPA)軸の機能の活性化がおこることが知られている。また自律神経系では視床下部-交感神経-副腎髄質系を介して、副腎髄質からアドレナリンが分泌される。このように副腎は感受性の高い重

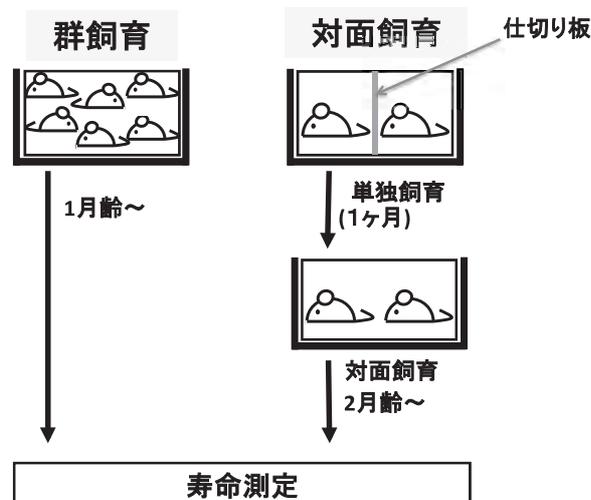


図2. 対面飼育法

2匹のマウスを、仕切り板を入れたケージで1匹ずつ単独飼育を行い、ナワバリ意識を確立させた。その後、仕切り板を除いて対面飼育を行った。対照として、群飼育（6匹/ケージ）のマウスを用いた。

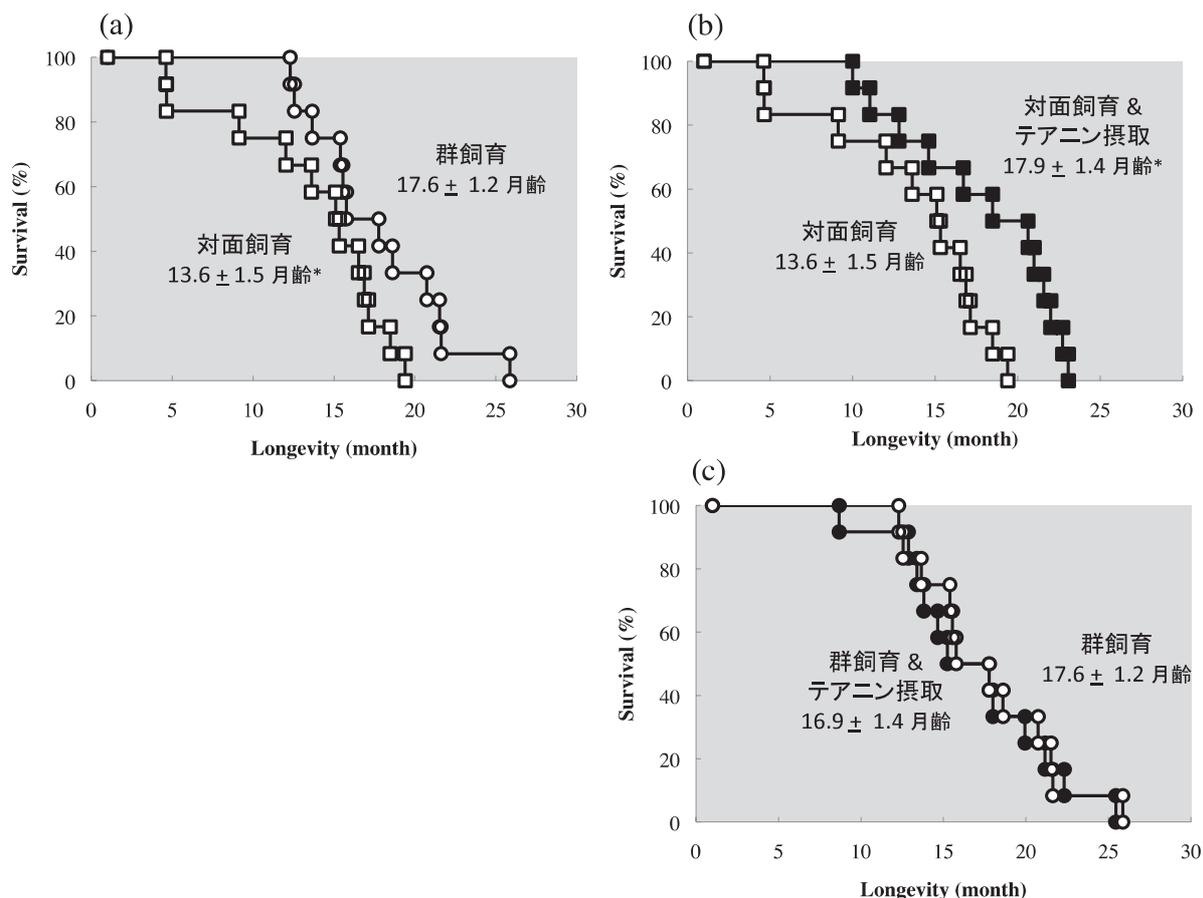


図3. 対面飼育下でのマウスの寿命

対面飼育群および群飼育群のマウスについて、生存期間を比較した。(a) 対面飼育群 (□) の平均生存期間 (13.6 ± 1.5 月齢) は群飼育群 (○) の平均生存期間 (17.6 ± 1.2 月齢) に比べ有意に短かった。(b) 対面飼育下でテアニン ($20 \mu\text{g/ml}$) を摂取していたマウス (■) の平均生存期間 (17.9 ± 1.4 月齢) は、水を摂取していた場合に比べ有意に長くなった。(c) 群飼育下でテアニンを摂取していたマウス (●) の平均生存期間 (16.9 ± 1.4 月齢) は、水を摂取していた場合と変わらなかった。(n=12, *p<0.05)

要なストレス応答器官であり、ストレスの指標の一つとして副腎の肥大が共通して見られる。

対面飼育を行ったマウスについて、9月齢の時点で副腎湿重量を比較した結果、対面飼育群では群飼育群のマウスに比べ副腎の湿重量が有意に増加していた (図4 a)。対面飼育を開始してから7ヶ月経過した時点でも、ストレスに応答するHPA軸が活性化していることが示唆された。

ところで、対面飼育下の2匹のマウスの間では優劣の関係が成立していたが、劣位のマウスの方が優位のマウスに比べ副腎がわずかに大きい傾向が見られたものの両者の差はわずかであり、優位および劣位どちらのマウスの副腎も、群飼育群のマウスに比べ顕著に肥大していた。このことから、優劣の違いはあっても対面飼育下では2匹のマウスはほぼ同等のストレス応答反応がおきていることが示された。一方、テアニンを摂取していたマウスでは対面飼育条件下でも、副腎の肥大は観察されなかった (図4 a)。

本実験に用いたSAMP10の場合、寿命の短縮に加え加齢に伴い脳が萎縮するという特徴を示し、若齢のマウスの脳に比べ高齢マウスでは大脳前部に萎縮が認められるようになる [28, 32]。対面飼育群のマウスの大脳の湿

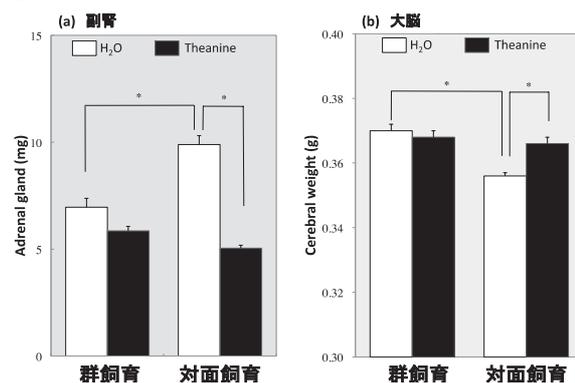


図4. 対面飼育による副腎および大脳への影響

対面飼育および群飼育条件下で、テアニン (closed column) あるいは水 (open column) を摂取していたマウスの、副腎 (a) および大脳 (b) の湿重量を9月齢の時点で比較した (n=19-32, *p<0.05)。

重量を測定した結果、群飼育群に比べ有意に大脳の萎縮が促進していることが見いだされた (図4 b)。一方、テアニンを摂取していた場合は対面飼育条件下でも大脳の萎縮は促進していなかった。

5. ストレス負荷による脳機能低下の促進

(1) 学習能

対面飼育の条件下で飼育したマウスについて、ステップスルー装置を用いた受動回避試験を行った。予めマウスを明室に入れ、となりの暗室への入口を開けると、マウスは暗所を好むことから素早く暗室に移動する。暗室に入った時に床に弱い電流を流し、暗室に入ると電気ショックが与えられることを学習させる。暗室から明室にマウスを移動し上記の作業をくり返すと、若いマウスではすぐに学習し暗室に入らず明室に留まるようになるが、高齢になると学習能力が低下し、繰り返し暗室に入ってしまう明室になかなか留まることができず、学習に要する時間が長くなる。SAMP10の場合、脳の萎縮に伴い学習記憶能も低下し、通常の群飼育では11月齢以降になると有意に学習能が低下する[28]。

8月齢の時点で対面飼育群と群飼育群のマウスの学習能を比較した結果、対面飼育群のマウスでは顕著に学習に要する時間が長くなり、学習能が低下していることが見いだされた(図5a)。群飼育群のマウスでは、8月齢の時点ではまだ有意な学習能の低下は観察されなかったことから、対面飼育により脳機能の低下が促進されることが見いだされた。一方、テアニンを摂取していた対面飼育群のマウスでは脳機能の低下は認められなかった。

(2) 脳の酸化傷害の蓄積

脳は大量の酸素を消費することから、代謝の過程で多くの活性酸素種(ROS)を産生し、抗酸化酵素が他の組織に比べ少ないこと等により、酸化傷害に脆弱な組織である[29]。SAMP10では通常のマウスに比べ若齢時から脳内で産生されるROSが多いこと[30]、ならびに抗酸化酵素の中のグルタチオンペルオキシダーゼの活性が高齢マウスで低下していること等により[31]、他の系統のマウスに比べDNAの酸化傷害が蓄積しやすい。

対面飼育群のマウスについて9月齢の時点で解剖し、大脳皮質DNAの酸化傷害の程度を調べた。酸化傷害のマーカーとして8-oxodeoxyguanosineのレベルを比較した結果、対面飼育群では同じ月齢の群飼育群のマウスに比べ有意に酸化傷害が高まっていることが見いだされた(図5b)。しかし、テアニン摂取により対面飼育下でも酸化傷害の蓄積は有意に抑制されていた。テアニンには直接的な抗酸化作用は見られないことから、テアニンは脳内におけるROS産生/消去のバランス保持に対し間接的に作用し、酸化傷害の軽減をもたらしているものと考えられる。

ところで著者らはこれまでに強い抗酸化作用を示す緑茶カテキンが、脳のDNA酸化傷害の蓄積および脳機能低下を抑制することを明らかにしてきた[28, 32]。そこで緑茶カテキンについても、対面飼育群のマウスに対する作用を検討した。しかし残念ながら緑茶カテキンにはテアニンのような、対面飼育時における脳機能低下に対する抑制効果は認められなかった。一方、群飼育下のマウスに対し認められた緑茶カテキンの脳機能低下抑制効果と同等の作用は、テアニンには認められなかった。こ

のことから、テアニンは緑茶カテキンとは異なる作用経路を介して、ストレス負荷時にのみ脳内の酸化傷害の蓄積を抑制しているものと考えられる。

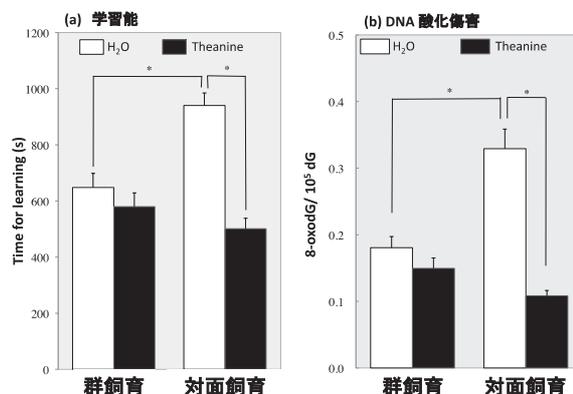


図5. 対面飼育による脳への影響

対面飼育および群飼育条件下で、テアニン (closed column) あるいは水 (open column) を摂取していたマウスについて、学習能(a)を8月齢の時点で、大脳皮質DNAの酸化傷害(b)を9月齢の時点で比較した (n=6-12, *p<0.05)。

(3) うつ様行動

長期にわたるストレスの負荷は、「うつ」の要因となると考えられている。テアニン摂取により対面飼育群のマウスについて、うつ様行動が変化するか観察した。強制水泳および尾懸垂試験により、諦めて動かなくなってしまう時間を測定することにより「うつ」の状態を推測した。その結果、いずれの測定方法においても対面飼育群のマウスにおいて、水を摂取していたマウスに比べテアニンを摂取していたマウスでは、諦めて動かなくなってしまう時間が短縮していたことから、テアニンの摂取は「うつ様行動」を抑制していることが見いだされた(図6)。

(4) ストレスと脳内グルタミン酸代謝

テアニンは飲水として摂取された後小腸から吸収され、一部は脳血液関門のL-システムを介して脳内に取り込まれる[33, 34]。脳内に取り込まれたテアニンはグルタミントランスポーターに強力に作用し、細胞外のグルタ

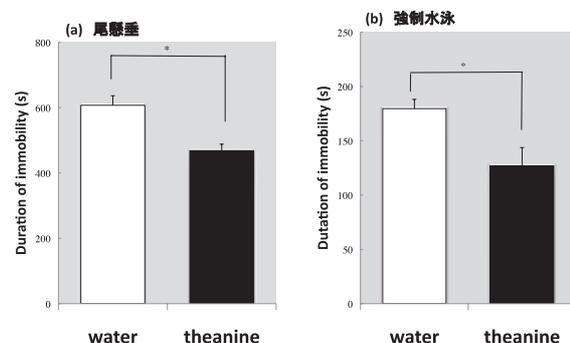


図6. 対面飼育によるうつ様行動への影響

対面飼育条件下で、テアニン (closed column) あるいは水 (open column) を摂取していたマウスについてうつ様行動を、尾懸垂(a)強制水泳(b)により9月齢の時点で比較した (n=5-6, *p<0.05)。

ミンの神経細胞内への取込みを阻害する。グルタミン酸はグルタミンからグルタミナーゼによって変換され供給されていることから、テアニンはグルタミン酸の供給を抑制していることが考えられる[17, 35]。グルタミン酸は主要な興奮性神経伝達物質であり、視床下部の室傍核にあるグルタミン酸受容体を介してHPA軸を調節していることから[36]、テアニンは脳内におけるグルタミン酸代謝を調節することにより、HPA軸の活性化および副腎の肥大を抑制していることが考えられる(図7)。

6. まとめ

長期にわたるストレスの負荷は、心身の健康に有害に作用すると考えられている。本研究では、ヒトが対人関係により生じる社会心理的ストレスに近いと考えられるストレス状態を、マウスに負荷する実験系を作成した。2匹のマウスを、仕切り板を入れたケージ内で1匹ずつ飼育した後、仕切り板を除いて対面飼育を行った。単独飼育によりマウスにはナワバリ意識が生じるが、同一ケージにいたことによる仲間意識(尿のニオイ等の情報)により、ナワバリ意識から生ずる攻撃性が軽減されているものと考えられる。このような対面飼育の条件下で飼育されたマウスでは、身体の創傷、体重減少等は認められなかったが、ストレス応答反応の一つである副腎肥大が認められたことから、確かにマウスはストレスを感じていたことが示された。

対面飼育下のマウスでは通常の群飼育のマウスに比べ平均生存期間が短縮しており、また脳の萎縮、学習能の低下、大脳皮質での酸化傷害の蓄積等が認められ、老化が促進されていることが明らかとなった。一方、対面飼育条件下においても、テアニンを含む水を飲水として摂取していたマウスでは、老化の促進は全く認められなかった。このことから、テアニンはストレスを緩和することにより、老化の促進を抑制していることが示唆された。テアニンは脳内におけるグルタミン酸代謝を介して作用を及ぼしていることが考えられるが、今後テアニンの作用機構については更なる研究が必要である。また老化の機構解明の切り口の一つとして、社会的ストレスによる老化促進についての例を今回紹介した。今後、ストレスと老化との密接な関係を更に明らかにしたいと考えている。

引用文献

1. Thayer JF, Yamamoto SS, Brosschot JF, The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease risk factors. *Int J Cardiol* 141: 122-131, 2010.

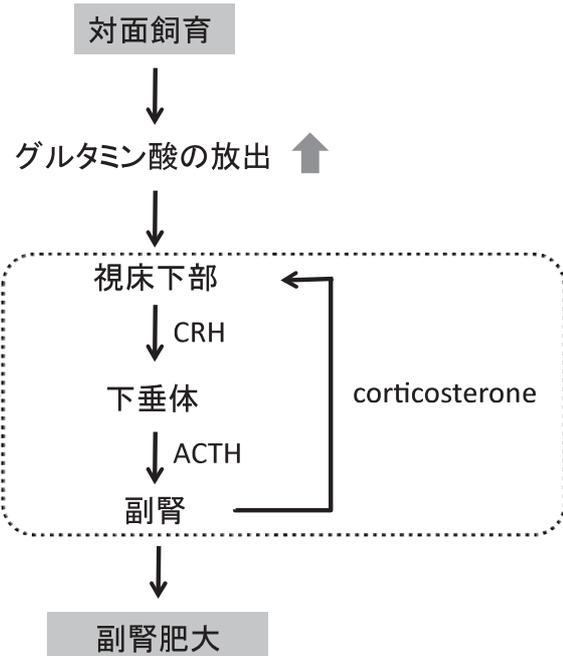


図7. 対面飼育によるHPA軸の活性化と副腎の肥大

対面飼育により脳内で興奮性神経伝達物質のグルタミン酸の放出が高まり、視床下部-下垂体-副腎(HPA)軸が活性化し副腎の肥大をもたらしていると考えられる。テアニンはグルタミン酸の放出を抑制して、副腎肥大を抑制していることが推察される。

2. Bellinger DL, Lubahn C, Lorton D, Maternal and early life stress effects on immune function: relevance to immunotoxicology. *J Immunotoxicol* 5: 419-444, 2008.
3. Gareri P, De Fazio P, De Sarro G, Neuropharmacology of depression in aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev* 1: 113-134, 2002.
4. Pedersen WA, Wan R, Mattson MP, Impact of aging on stress-responsive neuroendocrine systems. *Mech Ageing Dev* 122: 963-983, 2001.
5. McEwen BS, Magarinos AM, Stress effects on morphology and function of the hippocampus. *Ann N Y Acad Sci* 821: 271-284, 1997.
6. Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res Rev* 4: 141-194, 2005.
7. Rothman SM, Mattson MP. Adverse stress, hippocampal networks, and Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 12: 56-70, 2010.
8. Thiébot MH, Martin P, Puech A J, Animal behavioural studies in the evaluation of antidepressant drugs. *Br J Psychiatry. Suppl* 15: 44-50, 1992.
9. Alcázar A, Ballesteros O, Jurado JM, Pablos F, Martín MJ, Vilches JL, Navalón A, Differentiation of green, white, black, Oolong, and Pu-erh teas according to their free amino acids content. *J Agric Food Chem* 55: 5960-5965,

- 2007.
10. Kakuda T, Nozawa A, Unno T, Okamura, N, Okai O, Inhibiting effects of theanine on caffeine stimulation evaluated by EEG in the rat. *Biosci Biotechnol Biochem* 64:287-293, 2000.
 11. Nagasawa K, Aoki H, Yasuda E, Nagai K, Shimohama S, Fujimoto S. Possible involvement of group I mGluRs in neuroprotective effect of theanine. *Biochem Biophys Res Commun* 320: 116-122, 2004.
 12. Egashira N, Hayakawa K, Mishima K, Kimura H, Iwasaki K, Fujiwara M. Neuroprotective effect of γ -glutamylethylamide (theanine) on cerebral infarction in mice. *Neurosci Lett* 363: 58-61, 2004.
 13. Egashira N, Hayakawa K, Osajima M, Mishima K, Iwasaki K, Oishi R, Fujiwara M. Involvement of GABAA receptors in the neuroprotective effect of theanine on focal cerebral ischemia in mice. *J Pharmacol Sci* 105: 211-214, 2007.
 14. Egashira N, Ishigami N, Pu F, Mishima K, Iwasaki K, Orito K, Oishi R, Fujiwara M. Theanine prevents memory impairment induced by repeated cerebral ischemia in rats. *Phytother Res* 22: 65-68, 2008.
 15. Cho H-S, Kim S, Lee S-Y, Park JA, Kim S-J, Chun HS. Protective effect of green tea component, L-theanine on environmental toxins-induced neuronal cell death. *Neurotoxicology* 29: 656-662, 2008.
 16. Kim TI, Lee YK, Park SG, Choi IS, Ban JO, Park HK, Nam S-Y, Yun YW, Han SB, Oh KW, Hong, JT. L-Theanine, an amino acid in green tea, attenuates β -amyloid-induced cognitive dysfunction and neurotoxicity: reduction in oxidative damage and inactivation of ERK/p38 kinase and NF- κ B pathway. *Free Radic Biol Med* 47:1601-1610, 2009.
 17. Kakuda T, Hinoi E, Abe A, Nozawa A, Ogura M, Yoneda Y. Theanine, an ingredient of green tea, inhibits [3 H] glutamine transport in neurons and astroglia in rat brain. *J Neurosci Res* 86:1846 -856, 2008.
 18. Yamada T, Terashima T, Wada K, Ueda S, Ito M, Okubo T, Juneja LR, Yokogoshi H. Theanine, γ -glutamylethylamide, increases neurotransmission concentrations and neurotrophin mRNA levels in the brain during lactation. *Life Sci* 81: 1247-1255, 2007.
 19. Kimura K, Ozeki M, Juneja LR, Ohira H. L-Theanine reduces psychological and physiological stress responses. *Biol Psychol* 74: 39-45, 2007.
 20. Walke FR, Masters LM, Dielenberg RA, Day TA, Coping with defeat: acute glucocorticoid and forebrain responses to social defeat vary with defeat episode behavior. *Neuroscience* 162: 244-253, 2009.
 21. Ebner K, Wotjak CT, Landgraf R, Engelmann M, Neuroendocrine and behavioral response to social confrontation: residents versus intruders, active versus passive coping styles. *Horm. Behav* 47: 14-21, 2005.
 22. Bartolomucci A, Pederzani T, Sacerdote P, Panerai AE, Parmigiani S, Palanza P, Behavioral and physiological characterization of male mice under chronic psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology* 29: 899-910, 2004.
 23. Stefanski, V., Social stress in loser rats: opposite immunological effects in submissive and subdominant males. *Physiol Behav* 63: 605-613, 1998.
 24. Teskey GC, Kavaliers M, Aggression, defeat and opioid activation in mice: influences of social factors, size and territory. *Behav Brain Res* 23: 77-84, 1987.
 25. Unno K, Fujitani K, Takamori N, Takabayashi F, Maeda K, Miyazaki H, Tanida N, Iguchi K, Shimoi K, Hoshino M, Theanine intake improves the shortened lifespan, cognitive dysfunction and behavioural depression that are induced by chronic psychosocial stress in mice. *Free Radic Res* 45: 966-974, 2011.
 26. Nakamura K, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y, The critical role of familiar urine odor in diminishing territorial aggression toward a castrated intruder in mice. *Physiol Behav* 90: 512-517, 2007.
 27. Nakamura K, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y, Influences of pre- and postnatal early life environments on the inhibitory properties of familiar urine odors in male mouse aggression. *Chem Senses* 33: 541-551, 2008.
 28. Unno K, Takabayashi F, Kishido T, Oku N. Suppressive effect of green tea catechins on morphologic and functional regression of the brain in aged mice with accelerated senescence (SAMP10). *Exp Gerontol* 39:1027-1034, 2004.
 29. Taylor DL, Edwards AD, Mehmet H. Oxidative metabolism, apoptosis and perinatal brain injury. *Brain Pathol* 9: 93 -117, 1999.
 30. Sasaki T, Unno K, Tahara S, Shimada A,

- Chiba Y, Hoshino M, Kaneko T. Age-related increase of superoxide generation in the brains of mammals and birds. *Aging Cell* 7: 459-469, 2008.
31. Kishido T, Unno K, Yoshida H, Choba D, Fukutomi R, Asahina S, Iguchi K, Oku N, Hoshino M. Decline in glutathione peroxidase activity is a reason for brain senescence: consumption of green tea catechin prevents the decline in its activity and protein oxidative damage in ageing mouse brain. *Biogerontology* 8: 423-430, 2007.
32. Unno K, Takabayashi F, Yoshida H, Choba D, Fukutomi R, Kikunaga N, Kishido T, Oku N, Hoshino M. Daily consumption of green tea catechin delays memory regression in aged mice. *Biogerontology* 8: 89-95, 2007.
33. Yokogoshi H, Kobayashi M, Mochizuki M, Terashima T. Effect of theanine, γ -glutamylethylamide, on brain monoamines and striatal dopamine release in conscious rats. *Neurochem Res* 23: 667-673, 1998.
34. Terashima T, Takido J, Yokogoshi H. Time-dependent changes of amino acids in the serum, liver, brain and urine of rats administered with theanine. *Biosci Biotechnol Biochem* 63: 615-618, 1999.
35. Kakuda T. Neuroprotective effects of theanine and its preventive effects on cognitive dysfunction. *Pharmacol Res* 64, 162-168, 2011.
36. Evanson NK, Van Hooren DC, Herman JP. GluR5-mediated glutamate signaling regulates hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress responses at the paraventricular nucleus and median eminence. *Psychoneuroendocrinology* 34, 1370-1379, 2009.

Aging Acceleration under Psychosocial Stress and Anti-stress Effect of Theanine

Keiko Unno

School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka

To evaluate the psychosocial effect on lifespan and cognitive function, this study investigated the effect of confrontational housing on mice because conflict among male mice is a psychosocial stress. In addition, we investigated the anti-stress effect of theanine (γ -glutamylethylamide), an amino acid in tea. Two male mice were separately housed in the same cage with a partition for establishing the territorial imperative in each mouse. Then, the partition was removed and mice were co-housed confrontationally (confrontational housing) using a model mouse of accelerated-senescence (SAMP10) that exhibited cerebral atrophy and cognitive dysfunction with ageing. It was found that mice began to die earlier under confrontational housing than group housed control mice. Additionally, it was found that cerebral atrophy and learning impairment were higher in mice under the stressed condition of confrontational housing than age-matched mice under group housing. Furthermore, the level of oxidative damage in cerebral DNA was higher in mice housed confrontationally than group housed control mice. On the other hand, the consumption of purified theanine (20 μ g/ml, 5–6 mg/kg) suppressed the shortened lifespan, cerebral atrophy, learning impairment, and oxidative damage in cerebral DNA. These results suggest that psychosocial stress accelerates age-related alterations such as oxidative damage, lifespan and cognitive dysfunction. The intake of theanine might be a potential candidate for suppression of disadvantage under psychosocial stress.

【総 説】

活性酸素の生理機能

－エネルギー代謝亢進の解除時における活性酸素の生成亢進－

佐々木 徹

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所老化機構研究チーム

要約

活性酸素の生成とエネルギー代謝には相関関係があると考えられている。筆者らは、脳生組織を対象にex-vivo光イメージング法を用いて、活性酸素とエネルギー代謝の関係を調べた。その結果、活性酸素の生成とエネルギー代謝は単純な正の相関関係にないこと、活性酸素の生成は組織のエネルギー代謝の亢進に伴って生ずる低酸素の解除により亢進することが示された。このことは、組織の活性酸素の生成が活動時ではなく、活動から休止に移行する過程で亢進することを意味する。この現象の背景には、組織の低酸素とそれを原因とする「還元ストレス」の関与が示唆された。近年、活性酸素にはレドックスシグナルとしての役割があることがわかってきた。今回、筆者らは生理的に生成する活性酸素の一端を捉えることができたと考えている。これまで、「活性酸素毒性説」による説明が試みられてきた老化や疾患の理論を、「活性酸素の生理機能」の視点で再構築する必要がある。

キーワード：活性酸素、酸化還元ストレス、エネルギー代謝、低酸素、生理機能

1. はじめに

老化の進行や寿命は、身体内外の環境因子の影響を受ける。環境因子の一つとして有力視されるのが酸化ストレスである。老化のフリーラジカル学説は、酸化ストレスの原因物質である活性酸素が生体分子を酸化的に損傷し、その蓄積によって細胞機能低下を招き、老化の原因となるという考え方である[1]。活性酸素は老化だけではなく、様々な疾患の原因として考えられている。そこで、毒性因子としての活性酸素を制御することで疾患の治療を目指す「抗酸化療法」が考案されている。しかし、動物実験レベルで一定の学術的根拠は得られているが、臨床応用にまで至ったものは一例のみである[2]。一方で、脆弱な学術的根拠をもって、抗酸化療法を標榜した民間療法が先行している現状もある。

活性酸素は、外因のみならず内要因によっても生成される。ミトコンドリアでは、エネルギー産生の過程で副生成物として活性酸素が生成する。ある種の食細胞は、細菌などの異物処理のために活性酸素を産生する。活性酸素は必ずしも生物に都合の悪い存在ではない側面もある。活性酸素の一種でもある一酸化窒素の生体内での役割の再発見は、活性酸素を「シグナル分子」として捉える契機となった。その後の研究で、活性酸素に生理活性

物質、レドックスシグナル分子としての役割があることがわかってきた[3,4]。本稿では、脳の虚血・再灌流や加齢と活性酸素の関係について、筆者らが開発したイメージング法を用いて、「活性酸素毒性説」の視点で進めてきた研究結果を示すとともに、「活動状態にある組織が休止に移行する過程で活性酸素の生成が亢進すること」を示す最近の研究結果を提示して、「生理機能調節因子」としての活性酸素の可能性についても述べる。

2. インビボとインビトロをつなぐ新しいイメージング法の開発

「バイオラジオグラフィ法」は、生きて機能している組織の代謝や機能を、ラジオルミノグラフィ上に放射性探索子（主にポジトロン断層撮像法用トレーサ）の二次元分子画像として記録して、それを繰り返すことで動的に解析する方法論である[5]。筆者らは、この画像収集（放射線計測）と化学発光計測を融合して、複合の二次元分子画像としてリアルタイムに解析する方法「リアルタイムバイオラジオグラフィ法」を開発した[6-8]（図1）。ここで対象とする生組織では、生体と同様に糖代謝や酸素代謝が、脳組織では加えて神経伝達物質の生合成と放出、神経受容体への結合、細胞応答機能も維持されている。本法は、それらの過程をインビトロ実験に準じた精度で解析することができる[9-16]。活性酸素は、生体分子と反応する性質が強く、寿命が極めて短いため、他の物質のように測定することは容易でない。そこで筆者らは、このイメージング法を活性酸素の動的解析に応用し

連絡先：〒173-0015 板橋区栄町35-2
TEL: 03-3964-3241 (内3061)
FAX: 03-3579-4776
E-mail: tsasaki@center.tmig.or.jp

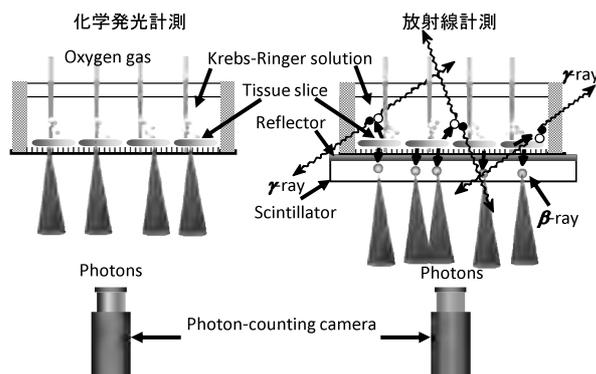
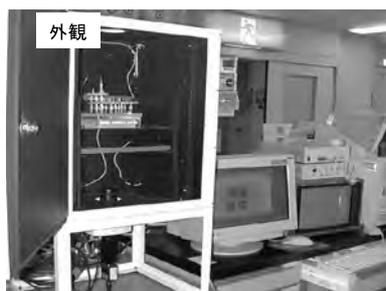


図1. リアルタイムバイオラジオグラフィ法

た。その結果、スーパーオキシド生成をルシゲニンによる化学発光から、糖代謝を [18 F] 2-フルオロ 2-デオキシグルコース (FDG) 集積から、画像化・解析することに成功した[6-8]。本法は、培養細胞や生体成分を用いたインビトロ計測法と、個体を対象とするインビボ計測法の中間に位置づけられ、インビトロの研究成果を臨床に結びつけるための有用な基礎データを提供するほか、基礎医学研究に有用な手段として期待される。

3. 老化の過程で活性酸素の生成亢進と寿命との関係

「老化のフリーラジカル説」は、活性酸素・フリーラジカルを「毒性因子」として捉え、老化を説明する[1]。実際、加齢に伴って酸化修飾を受けた生体内分子（タンパク質、脂質、DNA）の組織濃量が増加することが報告されており、この説の傍証とされる[17-21]。酸化ストレスの指標となる組織の酸化修飾物質の量は、(1) 活性酸素生成、(2) 活性酸素消去系、(3) 酸化修飾物

質修復・分解系、の三要因によって決定される。筆者らは、酸化修飾物質の量を規定する因子を明らかにすべく、活性酸素の組織レベルの加齢変化を、上述のイメージング法を用いて検討した。その結果、脳組織の活性酸素レベルは加齢に伴い直線的に増加し、その増加率は動物種固有の最大寿命と逆相関があること

を示した。一方、抗酸化酵素の活性は加齢に伴って変化しないことから、活性酸素の生成が第一義的に酸化修飾物質の量を決定すると考えられた[8,22,23](図2)。さらに、活性酸素の消去能の評価に関する研究も行った。組織の活性酸素レベルは、抗酸化物質であるアスコルビン酸の欠損[24]、スーパーオキシドデスムターゼの欠損[25]で増加、SODミミックの添加[8]、水素ガス処理[26]で低下することを示した(詳細は総説等を参照されたい)。

4. 低酸素-再酸素過程における活性酸素の生成機序

虚血-再灌流過程の活性酸素生成の分子機序解明は、脳、腎、心虚血の治療法や臓器移植医療の開発に重要である。活性酸素は虚血-再灌流、低酸素-再酸素過程に見られる細胞傷害の機序に重要な役割を果たすと考えられている[27-29]。虚血-再灌流過程の活性酸素の生成には、キサンチンオキシダーゼ[30-33]、ミトコンドリア電子伝達系[34-36]、シクロオキシゲナーゼ、NADPHオキシダーゼ、ミエロペルオキシダーゼ[27,29]の関与が示唆されている。

脳は酸化ストレスに特に脆弱である。臓器重量は体重の2%であるにもかかわらず、吸入した酸素の20%を消費する[37]。活性酸素の標的になる多価不飽和脂肪酸を多く含む一方で、脳の抗酸化物質、酵素レベルは他の臓器に比べ低い[38]。筆者らは、虚血-再灌流のモデル実験として、ラット脳生切片を対象に低酸素-再酸素過程におけるスーパーオキシド生成をルシゲニンによる化学発光から、糖代謝をFDGの集積から、リアルタイムバイオラジオグラフィ装置で画像化・解析した[8]。その結果、スーパーオキシド依存性の化学発光は再酸素処理時に著しく増強し、その部位に局在性が認められた(図3)。この化学発光強度は、細胞膜透過性を有するSODミミック(EUK-8)の添加で減少するが、Cu,Zn-SOD添加では変化しなかったことから、計測された化学発光は細胞内のスーパーオキシドレベルを反映するものと結論された。

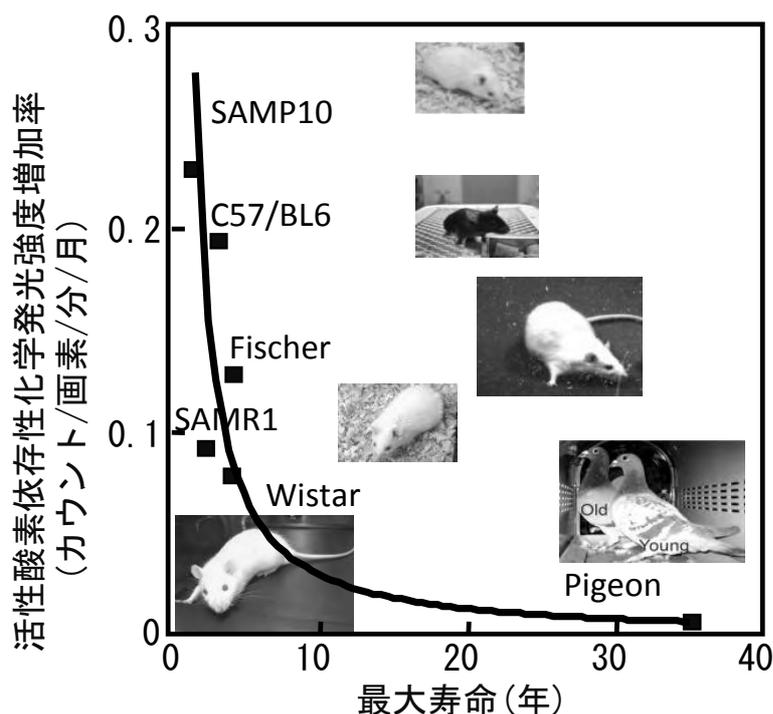


図2. 脳の活性酸素生成と寿命の関係

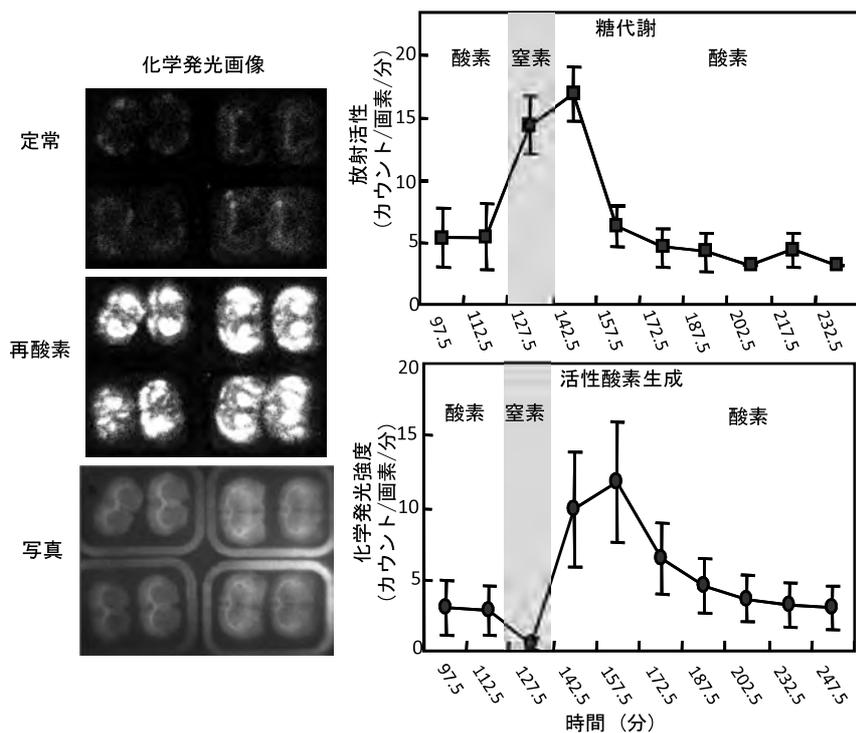


図3. 低酸素-再酸素過程における脳の活性酸素の生成と糖代謝の時間変化

細胞内におけるスーパーオキシドの生成に関して、ミトコンドリアを有力とするいくつかの証拠が得られている。ミトコンドリア電子伝達系の阻害剤であるシアン、ロテノン、アンチマイシンAでの処理は化学発光強度を一過性に亢進した。ミトコンドリア電子伝達系での活性酸素の主要な生成場所として、複合体IとIIIが示唆されている[39-43]。ミトコンドリア電子伝達系を阻害すると、活性酸素の放出は阻害部位の上流に位置する酸化還元反応中心で亢進する一方で、下流の放出は低下すると考えられている(図4)[39-43]。複合体Iの阻害剤であるロテノン、複合体IIIの阻害剤であるアンチマイシンA、複合

体IVの阻害剤であるシアンによる処理によって、複合体IとIIIからの活性酸素の放出が亢進することが単離ミトコンドリアと亜ミトコンドリア粒子において示されている[40-45]。しかし、複合体IIの阻害剤である3-ニトロプロピオン酸処理では化学発光の亢進を認めなかった。これは複合体IとIIの酸化還元反応中心は、複合体IIの阻害部位の上流には存在しないためと考えられる[41,45]。また、ミトコンドリアの熱産生に関連して、脱共役剤の影響を検討した(図4)。プロトン勾配を解消する脱共役剤のシアン化カルボニル*m*-クロロフェニルヒドラゾン(CCCP)は、化学発光強度を低下させ、脱共役タンパク質2(uncoupling protein2)の阻害剤であるゲンピンはそれを亢進した。一方、キサンチンオキシダーゼの阻害剤であるアロプリノールとNADPHオキシダーゼの阻害剤であるアポサイニン処理による変化は認められなかった。スーパーオキシドの分解酵素であるSODには3種類のアイソザイムが存在する。そのうちCu,Zn-SOD(SOD1)は細胞質に、Mn-SOD(SOD2)はミトコンドリアに局在する。脳特異的Mn-SOD欠損マウス、Cu,Zn-SOD欠損マウスから作成した脳組織生切片のスーパーオキシド依存性化学発光を野生マウスのものと比較することで、細胞質とミトコンドリアのスーパーオキシドのレベルに関する情報を得ることを試みた[25]。定常状態の化学発光は、SOD1欠損とSOD2欠損で野生に比べて亢進した。それぞれの亢進の割合の比較から、定常状態の細胞質とミトコンドリアのスーパーオキシドの総量は、同等か細胞質の方が多いと見積られた。一方、再酸素時の発光亢進はSOD2欠損が顕著で、再酸素時には特にミトコンドリアでスーパーオキシドの生成が亢進すると考えられた。さらに、ミトコンドリアの体積(細胞の1/5程度)を考慮して、スーパーオキシドを濃度で比較すると、ミトコンドリアのスーパーオキシドは定常状態で細胞質の2倍程度、再酸素時で8倍程度に達すると見積られた。以上の検討結果から、虚血-再灌流における活性酸素の生成に対するミトコンドリア電子伝達系の関与が示唆された。

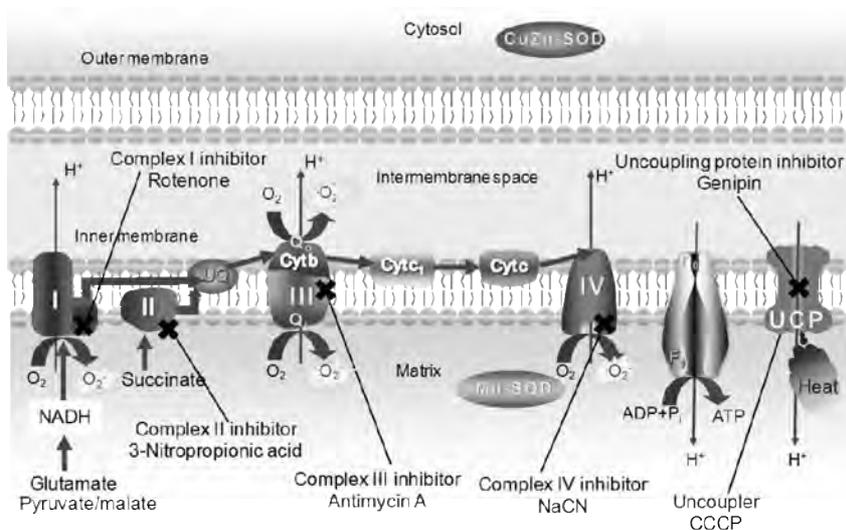


図4. ミトコンドリアの電子伝達阻害剤、脱共役剤および阻害剤の作用部位

5. 生活代謝学説と活性酸素・フリーラジカル学説の接点

寿命とエネルギー代謝率は反比例の関係にあり、老化は代謝率が高いほど早く進行する。生活代謝学説では、老化・寿命をエネルギー消費の視点から説明している[46-48]。この説は、ミトコンドリアを介して、活性酸素・フリーラジカル学説と接点を持つと考えられる。すなわち、ミトコンドリアはエネルギー産生場であり、生体内の主要な活性酸素の生成場とされる。外呼吸で取り込んだ酸素の90%以上は、内呼吸場であるミトコンドリアでエネルギー(ATP)産生のために消費される。その際、最終電子受容体として酸素が使われるが、一部(1-2%)が活性酸素に変わると考えられている[49](0.1%程度という説もある[48])。酸素消費はエネルギー需要の充進により増加するので、一般にはエネルギー代謝が充進すると活性酸素の生成も増加すると考えられる。

筆者らは、活性酸素の生成とエネルギー代謝の関係を明らかにすべく、上述の脳生組織を対象にした低酸素-再酸素モデルにおいて、溶液中のカリウムの濃度を段階的に増加させ、活性酸素の生成量を調べた。体内の酸素消費の80%はATP合成に共役する。そのATPの20%をNa/K-ATPaseが消費するが、特に脳ではそれが70%にも達する[50]。実際に、エネルギー代謝率がカリウム濃度に依存して充進することが、エネルギー指標(糖代謝率と酸素摂取率)の変化から確認された(図5)。しかし、このような状況にもかかわらず、定常状態のスーパーオキシドの生成は変化せず、逆に減少傾向を示した。この結果は、活性酸素の生成とエネルギー代謝は単純な正の関係にはないことを示唆する。「エネルギー代謝が充進すると活性酸素の生成は増加する」と考える根拠としては、以下の現象が知られている。(1)動物の寿命は体重あたりのエネルギー代謝率と逆相関を示す。身体サイズの小さい動物の単位体積あたりの体表面積は大きい。このような動物は体重あたりのエネルギー代謝率は大きくなり、単位体積あたりの活性酸素生成率は高い[46-48]。(2)寿命延長効果が知られるカロリー制限下ではエネルギー代謝率の低下と酸化ストレスの軽減を認める[51,52]。(3)エネルギー消費の充進を伴う運動で、組織

の活性酸素や酸化修飾物質の量が増加する[53,54]。一方、否定的な報告も知られる。(1)運動を嗜好する「ランナーマウス」は対照マウスより~30%エネルギー消費が増加していたが、寿命は対照マウスと変わらなかった[55]。(2)ミトコンドリアのState 3(ADP存在下の促進呼吸で生体の活動充進に相当)の活性酸素の生成は、State 4(ADP非存在下の抑制呼吸で活動休止に相当)の生成量より低い。State 4の活性酸素の生成は加齢に伴って増加あるいはカロリー制限によって低下するが、State 3にはそのような変化は認めない[56-58]。また、State 4の活性酸素の生成は動物の寿命と逆相関を示すが、State 3とは相関を認めない[59]。

6. 供給性低酸素と需要性低酸素

筆者らは、再酸素時の活性酸素の生成がエネルギー代謝率と一致して充進することを発見した(図5)。当初、この現象の理解は困難であったが、低酸素の背景にある二つの要因に着目するに至った。一つは、酸素の供給低下による低酸素であり、もう一つは、組織、細胞の酸素消費が充進した結果生ずる低酸素である。低酸素は、単に組織、細胞の環境の酸素濃度が低くなった状態ではない。血流による酸素の供給と組織の酸素消費のバランスで考えるべきである。酸素の消費の低下した状態(低温、冬眠など)では、呼吸が緩慢になり酸素の供給は低下するが、低酸素とはならない。一方、酸素消費が充進した状態(運動時、病的な例ではてんかんの発作時など)では、酸素は供給されるが低酸素の状態に相当すると考えた。筆者らは、先に酸素の供給低下による「供給性低酸素」に続く再酸素時(低酸素を解除した時)に、活性酸素の生成充進が認められることを示したが(図3)、酸素消費充進による「需要性低酸素」を解除した時にも、活性酸素の生成充進が起こるという作業仮説を立てた(図6)。その検証のために、濃度の異なるカリウム処理を組み合わせた実験をデザインした。その結果、高カリウム処理によって充進したエネルギー代謝の状態を解除(低カリウム処理)した時に、活性酸素の生成が充進することを認めた。一方、カリウム処理の順序を逆転(低濃度→高濃度)させたネガティブコントロールではそのような変化は認めなかった(図7)。

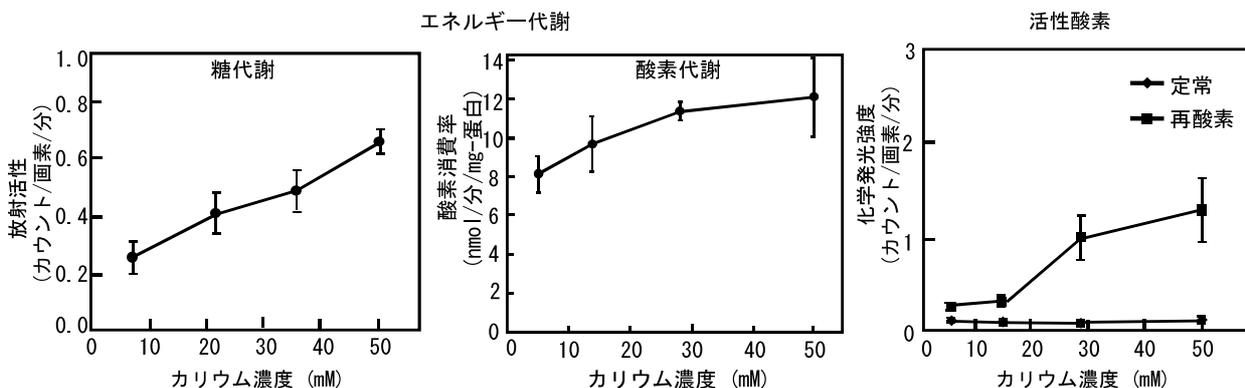


図5. 活性酸素の生成とエネルギー代謝の関係

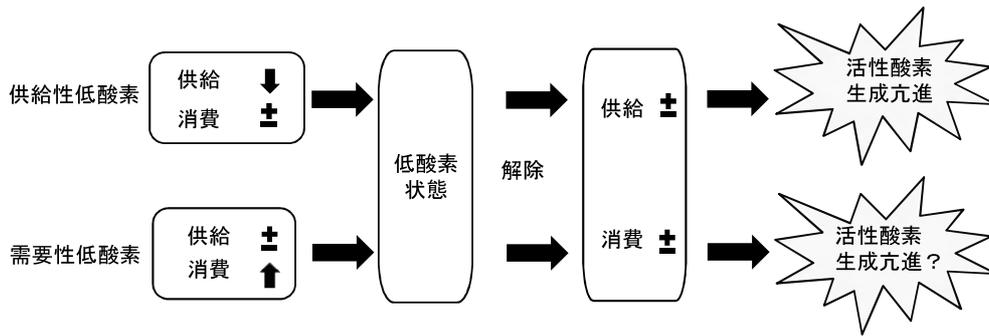


図6. 供給性低酸素と需要性低酸素の解除時における活性酸素の生成亢進

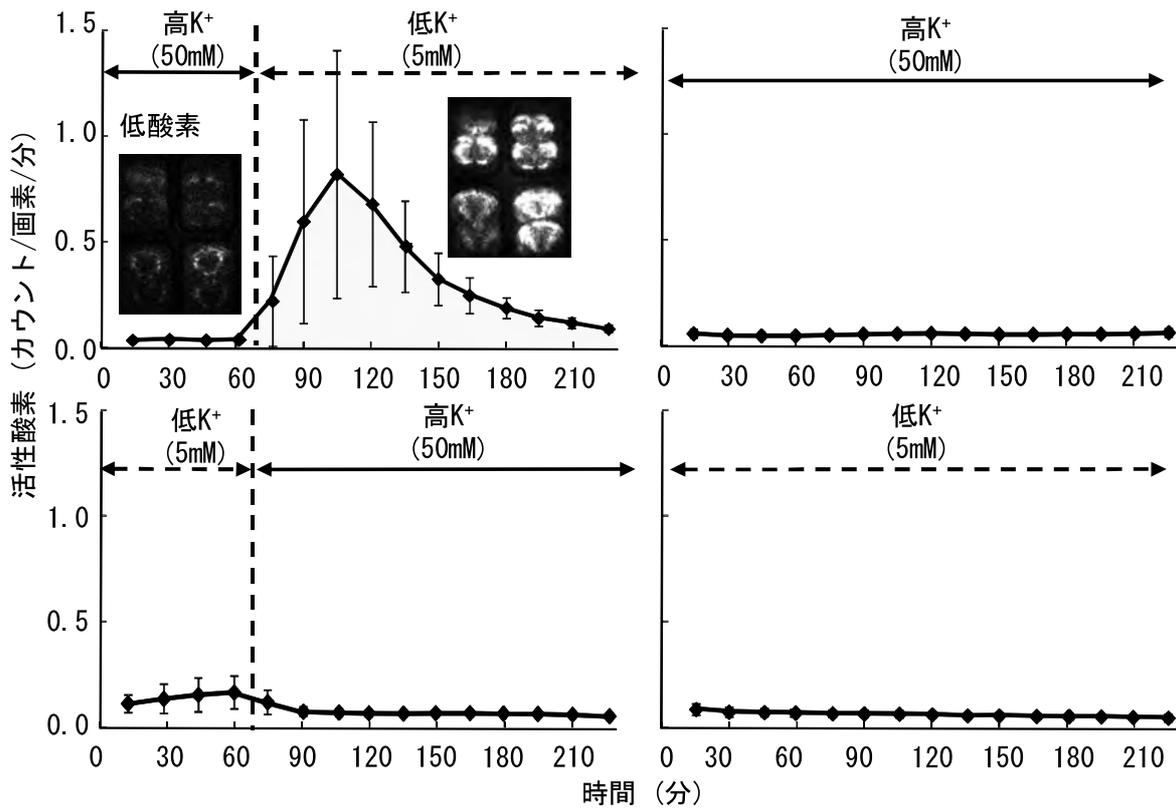


図7. 需要性低酸素の解除時における活性酸素の生成亢進

7. 活性酸素：毒性因子から生理機能因子へ

筆者らは、酸素の供給低下による低酸素に続く再酸素時に、活性酸素の生成亢進が認められることを示した(図3)が、今回、酸素消費亢進による低酸素を解除した時にも、活性酸素の生成が亢進することを発見した(図7)。前者は虚血・再灌流のモデルという病的な状況下に生成する活性酸素を再現した。一方、後者は生理的に発生する活性酸素「生理的活性酸素」を捉えたと考えられる。身体活動の強化と緩和は日常的に繰り返されている。身体活動の強化はエネルギー消費を高め、新たなエネルギー産生のために、より多くの酸素が消費される。これに伴い、組織内の酸素濃度は一時的に低下(低酸素)する[60]。ミトコンドリアの酸素濃度は酸素の供給と消費によって、3-30 μ Mの範囲で変動する[61]。今回の発見は、活性酸素の生成が身体活動を強化した時ではなく、それを緩和した時に亢進することを示唆する。

現時点で、この活性酸素の生成機序は明らかにはなっていないが、低酸素を解除したタイミングで活性酸素の生成が亢進したことから、基本的には供給性低酸素の再酸素モデルと同様に、ミトコンドリアに関連していると考えている。脳生組織において、低酸素と酸化還元状態(レドックス)の変化に関連して、以下のことが知られている。脳組織を高カリウム処理や電氣的に刺激すると、エネルギー消費の亢進とそれに伴うエネルギー産生の賦活が起こる。エネルギー産生は酸素を要求するため、組織の酸素消費の亢進に伴う酸素濃度の低下が起こり、レドックスが還元側にシフトする。このような還元シフトは、血流の低下などによる供給性の低酸素時にも、NADH/NAD⁺比を指標にして示されている[62-64]。好気的環境下では、ミトコンドリアの酸化的リン酸化によって効率的にATPを合成することができる。解糖と酸

化的リン酸化により、一分子のブドウ糖から合わせて38分子のATPが得られる。一方、嫌気的環境下の解糖は非効率で、ATPの生成は2分子である。このような嫌気的環境下では、ワールブルグ効果（がん組織に見られる、低酸素時の代償的な解糖系の賦活）[65]と同様に、より多くのブドウ糖を取り込むことになる。筆者らは、低酸素処理による酸素代謝の低下（図3）とブドウ糖代謝の亢進を脳スライスで示した[6]。低酸素条件下では、解糖によって生成するNADHとピルビン酸の一部は乳酸脱水素酵素によってNAD⁺と乳酸に変換されるが[66,67]、NADHの還元力をミトコンドリアの電子伝達を介して受け取るのに十分な酸素が供給されないため、組織のNADH/NAD⁺比は還元側にシフトする[62-64]。脳組織の酸素濃度は、酸素の供給量の低下や酸素消費の亢進（高カリウム処理や電気刺激等による）によって低下する。このような低酸素時の活性酸素の生成は、定常時より低いことも明らかになった（図3）。一方で、ミトコンドリアからの活性酸素の生成は酸素濃度に依存すると考えられるが、低酸素処理下で活性酸素の生成の亢進が観察されるという事実が知られている。酸素から生成する活性酸素が、低酸素下で生成する矛盾「低酸素パラドクス」と呼ばれる[68,69]。この現象の説明として、(1)低酸素による、complex IIIのユビセミキノラジカル（ubisemiquinone radical）の安定化[70]や抗酸化酵素の阻害 [70-72]、(2)低酸素の実験の酸素濃度が、体内酸素濃度に比して十分低くないこと[70, 71]、などが示唆されている。活性酸素の生成亢進の背景因子として、CoQH₂/CoQ、NADH/NAD⁺比の上昇による組織の還元シフトが示唆されているが[69]、活性酸素が分子状酸素から生成されるならば、その生成には一定量の酸素の存在が必須である。したがって、活性酸素生成の背景には組織の過剰な還元（過還元）が必要であるが、その状態で活性酸素が生成するのではなく、この過還元が酸素の存在によって酸化側へ移行（レドックスシフト）することが重要であると考えられる。このようなレドックスシフトは生体内で実際に起こっている。脳組織のレドックスが、活動亢進に伴い一過性に還元シフトしたのち、血流の増加に伴って酸化側に変化することが知られている[60]。機能的磁気共鳴画像（fMRI）や近赤外光脳機能イメージング装置（fNIRS）は、脳の神経細胞の活動に伴って還元状態となった組織が、脳血流量の増加により酸化側に移行する過程を、脳血管内のヘモグロビンの酸化還元状態の磁気あるいは光画像として収集する。それらの画像データを解析することで、脳の活動部位を評価する[73,74]。筆者らの実験結果は、活性酸素の生成は活動時（還元状態）ではなく、休止（酸化状態）へ移行する過程で亢進することを示唆した。近年、活性酸素やガス状低分子化合物を一括にシグナル分子と捉える考え方が示されている[75]。今回、活性酸素の生成が身体活動の亢進と休止に伴う組織酸素需要と供給のバランスに呼応して変化することを示した。今後、酸素センサーやエネルギー調節因子としての活性酸素の役割を検討する必要があると考える。

8. 終わりに

生命存続の基本的要素の一つは、内部環境の恒常性の維持である。恒常性の一つが生体内の酸化と還元バランスによって調節されるレドックスホメオステイタスで、それが酸化に偏った状態が酸化ストレスである。筆者らは、活性酸素の生成に組織のレドックス還元シフトが関与することを示唆した。過還元状態（「還元ストレス」と呼称）を活性酸素の生成亢進の背景因子とするモデルを提案する（図8）。本研究では生理的に生成する活性酸素を捉えた可能性がある。これまで「活性酸素毒性説」で論じられてきた、老化や疾患の機序を活性酸素の生理機能の視点で捉え直し、理論を再構築する必要があると考える。

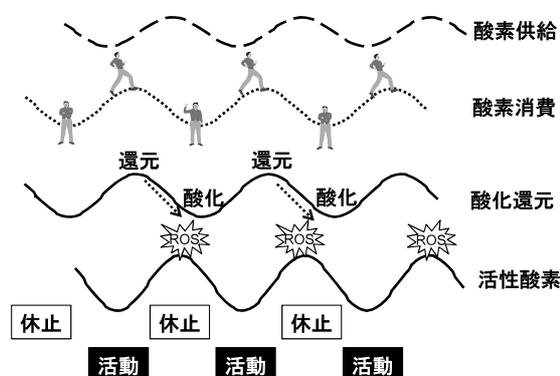


図8. 活性酸素の生成モデル

参考文献

1. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol* 11:298-300, 1956.
2. Watanabe T, Tanaka M, Watanabe K, et al. Research and development of the free radical scavenger edaravone as a neuroprotectant. *Yakugaku Zasshi* 124:99-111, 2004.
3. Forman HJ, Fukuto JM, Torres M. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C246-56, 2004.
4. Owusu-Ansah E, Banerjee U. Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature* 461:537-541, 2009.
5. Matsumura K, Bergstrom M, Onoe H, et al. In vitro positron emission tomography (PET): use of positron emission tracers in functional imaging in living brain slices. *Neurosci Res* 22:219-229, 1995.
6. Sasaki T, Iwamoto A, Tsuboi H, et al. Development of real-time bioradiographic system for

- functional and metabolic imaging in living brain tissue. *Brain Res* 1077:161-169, 2006.
7. 佐々木徹, 岩本明憲, 坪井寿ほか, リアルタイムバイオラジオグラフィ法, *Radioisotopes* 55:585-598, 2006.
 8. Sasaki T, Unno K, Tahara S, et al. Age-related increase of superoxide generation in the brains of mammals and birds. *Aging Cell* 7:459-469, 2008
 9. Murata T, Matsumura K, Onoe H, et al. Receptor imaging technique with ¹¹C-labeled receptor ligands in living brain slices: its application to time-resolved imaging and saturation analysis of benzodiazepine receptor using [¹¹C]Ro15-1788. *Neurosci Res* 25:145-154, 1996.
 10. Sasaki T, Senda M, Ohno T, et al. Effect of in vitro ischemic or hypoxic treatment on mitochondrial electron transfer activity in rat brain slices assessed by gas-tissue autoradiography using. *Brain Res* 28: 25-31, 2001.
 11. Sasaki T, Kawamura K, Tanaka Y, et al. Assessment of choline uptake for the synthesis and release of acetylcholine in brain slices by a dynamic autoradiographic technique using [¹¹C]choline. *Brain Res Brain Res Protoc*10:1-11, 2002.
 12. Sasaki, T, Ishiwata K, Murata T, et al. Demonstration of competition between endogenous dopamine and [¹¹C]raclopride binding in in vitro brain slices using a dynamic autoradiography technique. *Synapse* 44: 42-50, 2002.
 13. Sasaki T, Funaki Y, Shozushima M, et al. Effect of anoxia on choline uptake and release of acetylcholine in brain slices estimated with a bioradiographic technique using [¹¹C]choline. *Radioisotopes* 52: 677-685, 2003.
 14. Sasaki T, Yamaguchi M and Kojima S. Demonstration of hyperaccumulation of [¹⁸F]2-fluoro-2-deoxy-D-glucose under oxygen deprivation in living brain slices using bioradiography. *Synapse*55:252-261, 2005.
 15. Sasaki T, Nariai T, Maehara T, et al. A comparative study of bioradiography in human brain slices and preoperative PET imaging. *Brain Res* 1142:19-27, 2007.
 16. Sasaki T, Sato K, Umeda I, et al. Effects of aging and every-other-day feeding on the levels of oxygen radicals in rat brain slices. *Neuroscience Lett* 469:84-87, 2010.
 17. Adelman R, Saul RL and Ames BN. Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:2706-2708, 1988.
 18. Gil P, Farinas F, Casado A, et al. Malondialdehyde: A possible marker of aging. *Gerontology* 48: 209-214, 2002.
 19. Kaneko T, Tahara S and Matsuo M. Non-linear accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxy-guanosine, a marker of oxidized DNA damage, during aging. *Mutat Res* 316:277-285, 1996.
 20. Leon TI, Lim BO, Yu BP, et al. Effect of dietary restriction on age-related increase of liver susceptibility to peroxidation in rats. *Lipids* 36:589-593, 2001.
 21. Stadtman ER. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 928:22-38, 2001.
 22. 佐々木徹, 自然老化動物を用いた酸化ストレスの解析と抗老化研究, *YAKUGAKU ZASSHI* 130: 29-42, 2010.
 23. Sasaki T, Unno K, Tahara S, et al. Age-related increase of reactive oxygen generation in the brains of mammals and birds: Is reactive oxygen a signaling molecule to determine the aging process and life span? *Geriatr. Gerontol. Int* 10:S10-24, 2010.
 24. Kondo Y, Sasaki T, Sato Y, et al. Vitamin C depletion increases superoxide generation in brains of SMP30/GNL knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun*377:291-296, 2008.
 25. Sasaki T, Shimizu T, Koyama T, et al. Superoxide dismutase deficiency enhances superoxide levels in brain tissues during oxygenation and hypoxia-reoxygenation. *J Neurosci Res* 89:601-10, 2011.
 26. Sato Y, Kajiyama S, Amano A, et al. Hydrogen-rich pure water prevents superoxide formation in brain slices of vitamin C-depleted SMP30/GNL knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 375:346-350, 2008.
 27. Li C and Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C227-241, 2002.
 28. Dhar-Mascareño M, Cárcamo JM and Golde DW. Hypoxia-reoxygenation-induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells are inhibited by vitamin C. *Free Radic Biol Med* 38: 1311-1322, 2005.
 29. Margaill I, Plotkine M and Lerouet D. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radic Biol Med* 39:429-443, 2005.
 30. Korthuis RJ, Granger DN, Townsley MI, et al. The role of oxygen-derived free radicals in ischemia-induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability. *Circ Res* 57:599-

- 609, 1985.
31. Taylor MD, Mellert TK, Parmentier JL, et al. Pharmacological protection of reoxygenation damage to in vitro brain slice tissue. *Brain Res* 347: 268-273, 1985.
 32. Inauen W, Payne DK, Kviety PR, et al. Hypoxia/reoxygenation increases the permeability of endothelial cell monolayers: role of oxygen radicals. *Free Radic Biol Med* 9:219-223, 1990.
 33. Phillis JW, Sen S and Cao X. Amflutizole, a xanthine oxidase inhibitor, inhibits free radical generation in the ischemic/reperfused rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 169:188-190, 1994.
 34. Asimakis GK, Lick S and Patterson C. Post-ischemic recovery of contractile function is impaired in SOD2 (+/-) but not SOD1 (+/-) mouse hearts. *Circulation* 105:981-986, 2002.
 35. Kim G.W, Kondo T, Noshita N, et al. Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal cerebral ischemia/reperfusion in mice: implications for the production and role of superoxide radicals. *Stroke* 33: 809-815, 2002.
 36. Sims NR and Anderson MF. Mitochondrial contributions to tissue damage in stroke, *Neurochem. Int* 40:511-526, 2002.
 37. Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 221:1256-1264, 1983.
 38. Rice-Evans C and Burdon R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res* 32:71-110, 1993.
 39. Herrero A and Barja G. 8-oxo-deoxyguanosine levels in heart and brain mitochondrial and nuclear DNA of two mammals and three birds in relation to their different rates of aging. *Ageing (Milano)* 11:294-300, 1999.
 40. Sun J and Trumpower BL. Superoxide anion generation by the cytochrome bc1 complex. *Arch Biochem Biophys* 419:198-206, 2003.
 41. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, et al. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 278:36027-36031, 2003.
 42. Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, et al. Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem* 279:4127-4135, 2004.
 43. Adam-Vizi V. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal* 7:1140-1149, 2005.
 44. Turrens JF and Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 191:421-427, 1980.
 45. Barja G and Herrero A. Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon. *J Bioenerg Biomembr* 30:235-243, 1998.
 46. Tolmasoff JM, Ono T and Cutler RG. Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77:2777-2781, 1980.
 47. Holloszy JO and Smith EK. Longevity of cold-exposed rats: a reevaluation of the "rate-of-living theory". *J Appl Physiol* 61:1656-1660, 1986.
 48. Speakman JR. Body size, energy metabolism and lifespan. *J Exp Biol.* 208:1717-1730, 2005.
 49. Sas K, Robotka H, Toldi J, et al. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J Neurol Sci* 257:221-239, 2007.
 50. Cohadon F, Rigoulet M, Avéret N, et al. Membrane damage in acute brain trauma. *Ital J Neurol Sci* 10:147-155, 1989.
 51. Sohal RS and Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273:59-63, 1996.
 52. Sohal RS. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic Biol Med* 33:37-44, 2002.
 53. Jackson MJ, Edwards RH and Symons MC. Electron spin resonance studies of intact mammalian skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 847:185-190, 1985.
 54. Ohkuwa T, Sato Y and Naoi M. Glutathione status and reactive oxygen generation in tissues of young and old exercised rats. *Acta Physiol Scand* 159:237-244, 1997.
 55. Vaanholt LM, Daan S, Garland T Jr, et al. Exercising for life? Energy metabolism, body composition, and longevity in mice exercising at different intensities. *Physiol Biochem Zool* 83:239-251, 2010.
 56. Barja G. Mitochondrial free radical production and aging in mammals and birds. *Ann N Y Acad Sci* 854:224-238, 1998.
 57. Merry BJ. Calorie restriction and age-related oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci* 908:180-

- 198, 2000.
58. López-Torres M, Gredilla R, Sanz A, et al. Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Radic Biol Med* 32:882-889, 2002.
 59. Sohal RS, Ku HH and Agarwal S. Biochemical correlates of longevity in two closely related rodent species. *Biochem Biophys Res Commun* 196:7-11, 1993.
 60. Offenhauser N, Thomsen K, Caesar K et al. Activity-induced tissue oxygenation changes in rat cerebellar cortex: interplay of postsynaptic activation and blood flow. *J Physiol* 565:279-294, 2005.
 61. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552:335-344, 2003.
 62. Merrill DK and Guynn RW. The calculation of the cytoplasmic free [NADP⁺]/[NADPH] ratio in brain: effect of electroconvulsive seizure. *Brain Res* 221:307-318, 1981.
 63. Perez-Pinzon MA, Mumford PL, Rosenthal M, et al. Antioxidants, mitochondrial hyperoxidation and electrical recovery after anoxia in hippocampal slices. *Brain Res* 754: 163-170, 1997.
 64. Perez-Pinzon MA, Mumford PL, Carranza V, et al. Calcium influx from the extracellular space promotes NADH hyperoxidation and electrical dysfunction after anoxia in hippocampal slices. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:215-221, 1998.
 65. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*. 124:269-270, 1956.
 66. Harik SI, Lust WD, Jones SC, et al. Brain glucose metabolism in hypobaric hypoxia. *J Appl Physiol* 79:136-140, 1995.
 67. Schurr A, West CA and Rigor BM. Lactate-supported synaptic function in the rat hippocampal slice preparation. *Science* 240:1326-1328, 1988.
 68. Duranteau J, Chandel NS, Kulisz A, et al. Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 273:11619-11624, 1998.
 69. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417:1-13, 2009.
 70. Guzy RD and Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol* 91:807- 819, 2006.
 71. Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, et al. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11715- 11720, 1998.
 72. Sanjuan-Pla A, Cervera AM, Apostolova N, et al. A targeted antioxidant reveals the importance of mitochondrial reactive oxygen species in the hypoxic signaling of HIF-1 α . *FEBS Lett* 579:2669- 2674, 2005.
 73. Buxton RB, Uludağ K, Dubowitz DJ, et al. Modeling the hemodynamic response to brain activation. *Neuroimage* 23:S220-233, 2004.
 74. Miyai I, Tanabe HC, Sase I, et al. Cortical mapping of gait in humans: a near-infrared spectroscopic topography study. *Neuroimage* 14:1186-1192, 2001.
 75. Pryor WA, Houk KN, Foote CS, et al. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291:R491-511, 2006.

Increasing a generation of reactive oxygen in brain tissue at resting period
after the enhanced energy metabolism
-Physiological functions of reactive oxygen-

Toru Sasaki

Research Team for Mechanism of Aging, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

Abstract

Energy metabolic rate is known to correlate with the generation of reactive oxygen. To clarify the relationship between reactive oxygen generation and energy metabolic rate, we examined reactive oxygen-dependent chemiluminescent signals in ex-vivo brain slices using a novel photonic imaging method "real-time bioradiography". The results indicated that reactive oxygen generation is not correlated with metabolic rate, and that is transiently enhanced after the cancelation of hypoxia, which is induced by enhanced metabolic demand with high potassium treatment. The state of "hyper-reduction" under the hypoxia would be cause of the enhanced reactive oxygen generation. Recent reports indicate that reactive oxygen and free radical could be kinds of chemical messengers to play important roles in cell signaling, a process termed redox signaling. Here we show the physiologically generated reactive oxygen in brain tissue, which increases following the transient metabolic stimulation. We suggest that mechanism of aging and various diseases which had been elucidated by "reactive oxygen toxicity theory" has to reconstruct with "physiology of reactive oxygen" .

Keywords: reactive oxygen species, oxidative-reductive stress, energy metabolism, hypoxia, physiological function

【総 説】

哺乳動物の加齢に伴うDNAメチル化の変動

下田 修義

国立長寿医療研究センター再生再建医学研究部門

要約

DNA のメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティック変化が老化に重要な役割を果たしているのではないかという見方が広まりつつある。これはひとつにはエピジェネティック修飾が環境により変化する、また細胞分化のために変化するよう運命づけられているなどの、多少の不安定性を内包していることによる。しかしその最大の理由は哺乳動物の初期発生においてエピジェネティック修飾が完全にリセットされることにあると筆者は考える。本稿では哺乳動物の加齢に伴う DNA メチル化の変化を記載した論文について方法論にやや重点を置いて紹介する。

キーワード：DNA methylation, CpG island, CpG island shore

1. はじめに

加齢とともに何らかの生体内高分子が微細な構造変化（ダメージ）を蓄積していき、それがやがて老化個体の表現型として表出されると古くから推測されている。この推測が正しければ、寿命は世代ごとにリセットされるから、変化した老化原因分子を次世代に伝えないための仕組みが存在するはずである。見方を変えれば次世代のスタート時、すなわち受精前後に加齢変化が解消されている分子は老化原因分子の候補になる。このような分子について次の三つのタイプが知られている。

一つ目は不変タイプで、体細胞でおこる加齢変化が例外的に生殖細胞では起きない。核ゲノムの一次構造がそれで、体細胞のDNA 配列は活性酸素や紫外線などの遺伝毒性ストレス (genotoxic stress) により徐々に突然変異を蓄積するのに対し、生殖細胞での変異は体細胞に比べ低く抑えられているという[1,2]。ただしこれには反論もある[3,4]。また体細胞では複製のたびに短縮してしまうヒトのテロメア配列も生殖細胞は高いテロメラーゼ活性をもつため一次構造が保存される。

二つ目は除外タイプで、加齢変化した分子が生殖細胞形成時に、あるいは初期胚で選択的に排除される。いくつかの生物種で加齢に伴いカルボニル化されたタンパク質が増えることが観察されているが、成熟期にある線虫の卵やマウスの栄養外胚葉からカルボニル化されたタンパク質が除去される [5,6]。また最近、老化した出芽酵母から配偶子(胞子)が形成される時に、老化酵母に蓄積した凝集タンパク質や染色体外環状リボソーム DNAが配偶子には伝わらないことが示された[7]。

三つ目は新生タイプで、その構造が生殖細胞で加齢変

化しているか否かはっきりしないが、受精後の胚において前世代でつくられた構造が一度解消され、新たに作り出される。これが哺乳動物ゲノムのメチル化で見られる [8-11]。この現象はこれまでインプリンティングや細胞の初期化を理解するための研究対象とされてきたが、変化が次世代でリセットされることから老化の視点から見てもおもしろい。そのためか最近のエピジェネティクス研究の興隆に伴い、一時下火となっていた、加齢に伴うDNAメチル化の増減を記載した研究が再び報告されるようになってきた。ただしそれらは研究ごとに採用された手法が異なるため、読み比べするのにも骨が折れる。そこで本稿ではそれぞれの手法をやや詳しく解説しつつ、哺乳動物の加齢に伴うDNAメチル化の変化を追跡した研究を解説する。読者の方々がメチル化解析を自身の研究に取り入れる際の参考になれば幸いである。

2. 脊椎動物におけるDNAメチル化のパターン

哺乳類染色体 DNAの5% のシトシンはピリミジン環5位の炭素にメチル基が共有結合している。メチル化を受けるシトシンはCpG というパリンドロミックな並びのシトシンに限られていて、CpG配列のシトシンはその7割がメチル化を受けている[12,13]。それ以外の並びの、非パリンドロミックなCpA, CpT, CpC、のシトシンがメチル化されるケースは体細胞ではほとんどない[12]。この CpG 配列の新規のメチル化は DNAメチル化酵素 (DNA methyltransferase, Dnmt)、Dnmt3aとDnmt3bが行い、複製の際のメチル化の維持をDnmt1が担当する (図1) [14,15]。Dnmt1はDNA複製の際にDNA複製機構に局在しており、親鎖のCpG がメチル化されていると、それを認識して新生鎖の相補的な CpG 配列をメチル化することでメチル化パターンを維持する [16,17]。

哺乳動物ゲノムの半分を占めるレトロトランスポゾンをはじめ、遺伝子間領域、さらに大部分のジーンボディ、

連絡先：〒474-8522

愛知県大府市森岡町源吾 3 5

電話・ファックス：0562-46-8629

Email address: shimoda@ncgg.go.jp

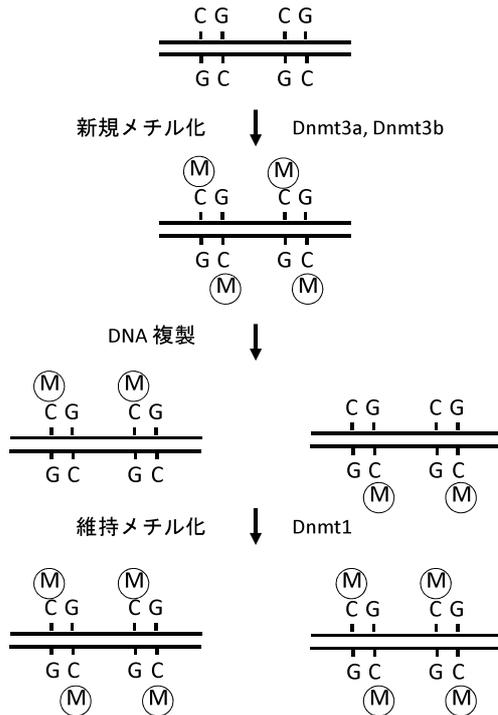


図1 哺乳動物のシトシンメチル化機構
 新規メチル化酵素 Dnmt3a と Dnmt3b が CpG ジヌクレオチドのシトシンをメチル化する。複製に際してヘミメチル化状態になった DNA を維持メチル化酵素 Dnmt1 がメチル化することで、複製後もメチル化のパターンが保たれる。

すなわち遺伝子の転写領域部分も通常は重度にメチル化されている(図2)[18]。例外はおおよそ 70% の遺伝子のプロモーター領域周辺に見つかる「CpG アイランド」と名付けられた領域である [19]。CpG アイランドはシトシンとグアニンに富む平均して 1kb の領域で、この領域における CpG 配列は基本的に転写の有無によらず、ほぼ完全にメチル化を免れている [20]。CpG アイランドがどのようにしてメチル化を免れているのかは未だ解明されていないが、脱メチル化酵素の本命候補と目されている Tetタンパク質が関与している可能性がある

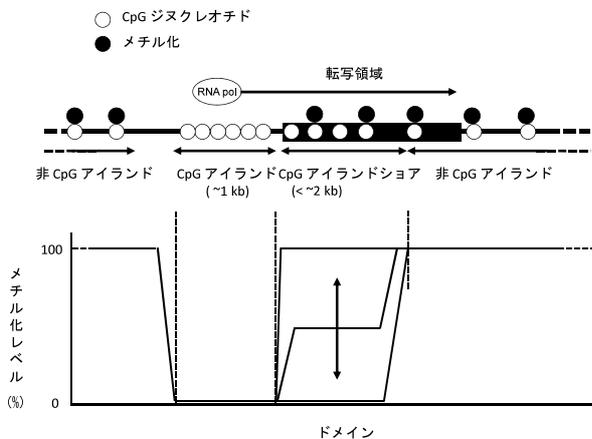


図2 脊椎動物ゲノムにおけるメチル化シトシンの分布様式
 哺乳類を含め脊椎動物のゲノムは重度にメチル化されている。例外は遺伝子上流にある CpG アイランドで、この領域は通常転写の有無にかかわらずほぼ完全にメチル化を免れる。CpG アイランドの端にはしばしば中間的なメチル化レベルを示す CpG アイランドショアが存在する。

[11]。また CpG アイランドに隣接した、シトシンやグアニンがそれほど密に存在しないおおよそ 2 kb 以内の領域は CpG アイランドショアと名付けられ、ヒトの異なる組織の間やガン細胞と正常細胞の間[21]、造血前駆細胞の分化の過程[22]、あるいはiPS 細胞とその元になった繊維芽細胞の間 [23] でメチル化を比較したときに差異が頻繁に見られる領域として注目されている [24]。

このように哺乳動物核ゲノムのメチル化レベルはだまかに3つに分けられる：(1) CpG アイランド(非メチル化状態、プロモーター周辺に多い)、(2) CpG アイランドショア(中程度のメチル化、)、(3) 非 CpG アイランド(高メチル化状態、ゲノムの大半を占める)。

3. DNA メチル化の役割

Dnmt1, 3a, 3b のどれを欠損しても胚性、あるいは出生後致死となることから、DNA メチル化は哺乳動物の生存に不可欠であることが判明した[25,26]。Dnmt1 ノックアウトマウスではゲノム全体が極度に低メチル化し、遺伝子間領域やイントロンに存在するレトロエレメント IAP が過剰発現する[27]。一方、ガン細胞においてガン抑制遺伝子が抑制されているときにその CpG アイランドがメチル化されていること [28]、脱メチル化剤の5-アザシチジン処理すると、メチル化された CpG アイランドのメチル化が外れ遺伝子発現が回復することなどから[29]、DNAメチル化は転写を抑制する機能を持つことがわかっている。

DNA メチル化の発現抑制が哺乳動物の正常な発生過程において果たす役割としてはX染色体の不活性化とゲノムインプリンティングが有名である。X染色体の不活性化ではメスの2本ある X 染色体の内1本が発生初期にほぼ全域にわたって不活性化されるが、そのとき不活性化X染色体上の数百の CpG アイランドは活性 X 染色体上のそれに比べ高度にメチル化されている[29]。一方、ゲノムインプリンティングではインプリント遺伝子の発現調節に関わるメチル化可変領域 (CpG アイランド) を性別に依存してメチル化する。これによりインプリント遺伝子が父親のみ、あるいは母親のみで発現ようになる[30]。Dnmt1 変異胚ではメチル化可変領域の脱メチル化とともにインプリント遺伝子の発現異常が認められる[31]。

そのほか個別の遺伝子についてメチル化・脱メチル化が遺伝子発現のオン・オフに関与している例もいくつかあるがここでは文献を挙げるにとどめる[32-34]。

4. DNA メチル化と老化の関連

DNA メチル化が老化の原因であることを実験的に示した例はない。そのことを示唆するデータが一例あるのみである [35]。ここではその一例と、そのほかは加齢に伴うメチル化変動を記載した研究について紹介する。その記載は重要である。加齢に伴うメチル化変動の正確な記載があつてはじめて、将来そこに介入する有効な手立てをたてられ、その評価が可能になるからである。

1) メチル化低下によるマウスの早期老化症

クロマチンリモデリング因子である SNF に似た PASG/Lsh (proliferation associated SNF-2-like gene/lymphoid specific helicase) のノックアウトマウスのゲノムではリピート領域とシングルコピー領域がともに低メチル化し、出生前後に死亡する [35,36]。PASG/Lsh それ自身はメチル化酵素活性をもたないが、DNA メチル化酵素 Dnmt3a および 3b と複合体を形成する [37]。Arceci らが PASG/Lsh の機能低下型マウスを作製したところ、その6割は生後数日で死ぬが、残りの4割は数週間生き延び、そのとき成長遅滞と骨粗鬆症、脊柱後湾症、白髪、皮下脂肪の減少、悪液質等の老化の症状を示した (図3) [35]。その PASG/Lsh の機能低下マウスでもゲノムの低メチル化が見られ、またいくつかの組織で老化のバイオマーカーとされる SA- β ガラクトシダーゼの発現が見られたことから、ゲノムのメチル化異常により老化表現型がもたらされることが示唆された。しかし PASG/Lsh の機能低下で見られるようなリピート領域の低メチル化は正常な加齢の過程では見られないことから、老化の表現型というアウトプットは似ているかもしれないが、そこに至る経路については正常な老化の場合と異なることも予想される。

2) 加齢に伴うメチル化の変化

バイサルファイトクロニング法 (後述) をするとわかるが、あるゲノム領域をみたとき、それが同じ組織由来であっても個々の CpG 部位でのメチル化の有無には多少のばらつきがみられる。つまり DNA 配列とは異なり DNA のメチル化は隣り合う細胞の間で違いが見

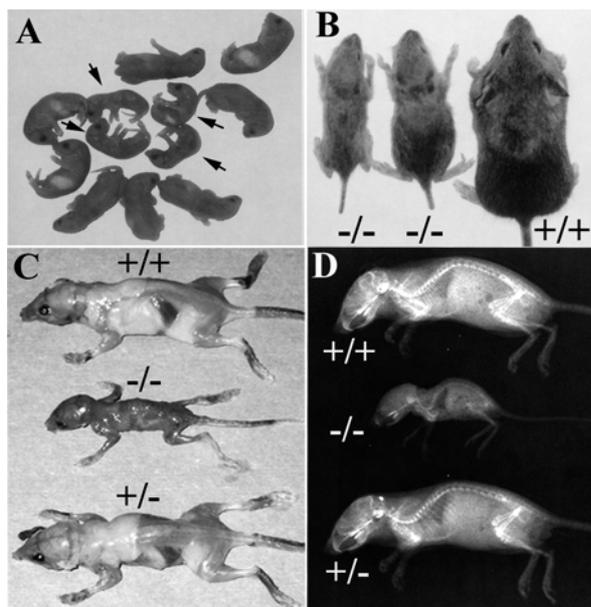


図3 DNA 低メチル化変異体 PASG-/-

PASG/Lsh のノックアウトマウスではゲノムのさまざまな領域で低メチル化が生じ、機能低下型の変異体では成長遅滞 (A, 矢印) の他、白髪やはげ (B)、筋萎縮 (C)、脊柱後湾症 (D) など早期老化症の表現型が現れる (Arceci 博士より提供)。

られることがある。ばらつきの度合いは細胞の種類やゲノム領域により異なる。このようにゲノムのメチル化は確率的なものであるが、集団としてみると細胞のタイプに典型的なゲノムのメチル化パターン (エピゲノム) をもつ。したがって、緩慢と予想されるメチル化加齢変化を見出すには、できるだけ正確に、かつ多くのサンプルについてメチル化の変化を測定し、統計学的な検定にかけなければならない。この技術的および労力的な問題が加齢とメチル化の関連を調べる研究の壁となってきたが、バイサルファイト法にスループットの高い塩基配列解析装置を組み合わせることでその問題も克服できるようになってきた。それらの技術が開発される以前の研究を含めて、以下に加齢とメチル化の関連を調べた研究を手法ごとに紹介する。現在老化のメチル化解析に用いられる手法は大別して、メチル化感受性制限酵素かバイサルファイト法のどちらかあるいは両方を基礎として用いている。これらの他にもう一つ、抗メチル化シトシン抗体やメチル化シトシン結合タンパク質を利用するメチル化解析法があるが、この手法はまだ老化研究に適応された報告がないので本稿では省略する。

a) TLC/HPLC

1983年に、マウスとヒトの初代培養細胞に含まれるメチル化シトシン量が時間経過とともに低下することが薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて示された [38]。これを端緒として加齢に伴うメチル化シトシン量の変化を、液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて記載する研究が続いた。そこではヒトやマウスのいくつかの組織でも加齢によりゲノムのメチル化シトシン含量が低下見られると報告されたが [39,40]、それに加えて、組織によっては加齢変化しない [41,42]、細胞の種類によっては、むしろ上昇するというデータも含まれていた [43]。これらの結果は生物の種や組織ごとのメチル化変動の違いを反映したものと見なせる一方で、加齢に伴う組織のメチル化変動をゲノム全体のレベルで解析することの難しさを示したとも考えられる。その理由は、TLC や HPLC によるメチル化解析では、ゲノム DNA をモノヌクレオチドやモノヌクレオチドにまで分解し、もともと全塩基のうちおよそ 1% しか含まれないメチル化シトシンの増減を検出するという技術が求められる上に、後でわかったことだが、組織では加齢によりメチル化の上昇する領域と低下する領域が存在し、それらが相殺されることによりメチル化シトシンのゲノム含量の変化が TLC や HPLC の検出限界付近の微々たるものになる可能性があるからである。また当然のことながら TLC や HPLC では、メチル化シトシンが増減するゲノム領域までは不明であった。

b) メチル化感受性制限酵素

制限酵素にはその認識配列の中にある CpG 部位がメチル化されていると切断できないメチル化感受性制限酵

素が多くある。その一方で同じ認識配列をもちながら（アイソシゾマー）メチル化に非感受性の酵素もあり、両者を対にして用いるとメチル化の差を切断頻度の差に変換できる。この差を直接可視化したり、さらに PCR の増幅効率や増幅限界に転換したりすることでメチル化レベルを測定できる。当然ながら解析の対象となる領域は制限酵素部位の存在する領域に制限されるが、逆にそれを利用して CpG アイランドや CpG アイランドショアに出現しやすい酵素を使えば、それらの領域におけるメチル化変動を効率よく調べることもできる。

b)-1 サザンハイブリダイゼーションとの組み合わせ

特定の遺伝子領域における加齢に伴うメチル化変化を調べるため、最初に用いられたのがメチル化感受性制限酵素とサザンハイブリダイゼーションの組み合わせである。これはメチル化レベルの変化を、X線フィルム上のバンドパターンの変化としてとらえる。後述のバイサルファイトシーケンス法に比べれば一度に広い領域を調査できるという利点はあるが、解析したい領域に必ずしも適切な制限酵素部位が見つかるわけではないという点や、微妙なバンドの変化をもとにメチル化の定量を行うという手技上の難しさもあり、この解析法は現在あまり用いられない。しかし小野らはこの手法でマウスやヒトの *c-fos*、*c-myc* 遺伝子を詳細に解析し、いくつかの重要な知見を得た [44,45]。たとえば 1) これらの遺伝子において DNA メチル化レベルが加齢により上昇し、その上昇が現在でいう CpG アイランドショアに限定して起こること、2) *c-fos* の場合メチル化の上昇に伴い発現が低下すること、3) もともと同じ遺伝子でも組織によりメチル化レベルは異なり、加齢によるメチル化の変化も組織により異なること、4) 老化だけでなく発生の時期にも遺伝子のメチル化の変動は起こること。そして加齢の過程で見られるメチル化変動は、発生時期に起こる変動の傾向が続いたものであること、などである。小野らはこの最後の知見から、老化は「発生過程の継続」によるという着想を得た。

一方、Issa の研究グループはヒト大腸の腫瘍で発現が抑制されていたエストロゲン受容体遺伝子 (ER) のメチル化をサザンハイブリダイゼーションにより調べた [46]。その結果、腫瘍では ER の CpG アイランドがメチル化していることがわかったが、予期せぬことに、ER の CpG アイランドは正常な大腸粘膜においても加齢に伴い徐々にメチル化されていくことを見出した。彼らはその後、同じ手法で IGF2 [47] や MYOD [48] という遺伝子にも大腸粘膜で加齢依存的に CpG アイランドのメチル化が見られることを報告した。これらの結果は加齢が危険因子となる病気について、その下地にメチル化異常が潜んでいることを示唆した点で重要である。DNA のメチル化は確率的なもので、個体間である程度の差が生じる。この問題を克服するため、彼らはさまざまな年齢から多数の検体を得て解析することで、加齢依存的なメチル化を回帰分析により証明した。

b)-2 Methylated CpG island Amplification (MCA) との組み合わせ

Issa グループの豊田らは、*XmaI/SmaI* というともに CCGGGG 配列を認識するアイソシゾマーを巧妙に使い分けることで、ガン細胞で異常なメチル化を受けた CpG アイランドを増幅できることを示し、この方法を Methylated CpG island Amplification (MCA) と名付けた [49]。大腸ガンから得られた 33 の MCA クローンのうちのひとつ Versican (CSPG2) を詳細に解析し、ER 遺伝子同様、加齢依存的なメチル化を受けること、同時に発現量が減少することを示した。彼らはこの Versican を含め、他 4 つの MCA クローンが CpG アイランドの端、つまり CpG アイランドショアに位置することを記述している。なお筆者が上記 33 の MCA クローンを現在のヒトゲノムデータベースに照らし合わせると、そのおよそ半数が CpG アイランドショアと予想される領域に位置しており、その数は CpG アイランドの内部に由来する MCA クローン数より多かった。MCA で使用された *XmaI/SmaI* 部位の出現頻度は CpG アイランドショアより CpG アイランド内部の方が高いはずだが、それにもかかわらず CpG アイランドショア由来の DNA が濃縮されたということは、CpG アイランドショアがガン細胞でメチル化されやすい領域であることを示唆する。その後、豊田らは大腸ガンでメチル化される 30 個の MCA クローンを新たに単離し、そのうちの 19 クローン (63%) が正常な大腸において加齢によるメチル化を受けることを見出した [50]。彼らはこれらの結果から、加齢に伴う遺伝子のメチル化が大腸ガンのリスクファクターになると考えた。

同じく Issa グループの Maegawa らは MCA にマイクロアレイを組み合わせた MCAM という方法で、マウス小腸の加齢依存的なメチル化変化を網羅的に調べた [51]。彼らはまず 3 ヶ月齢と 35 ヶ月齢マウスのそれぞれの小腸ゲノムから MCA を行った。これによりメチル化された CpG アイランドおよびその周辺が選択的に増幅すると期待された。次いでそれぞれのアンプリコンを Cy3、Cy5 で別々にラベルした後、市販のプロモーターオリゴヌクレオチドアレイにかけ、メチル化の差のある遺伝子をスクリーニングした。これにより総遺伝子の 1 割程度、3,627 遺伝子がサーベイできると見積もられたがそのうち、加齢に伴いメチル化が亢進する遺伝子が 2 割、低下する遺伝子が 1 割、合計 3 割もの遺伝子においてメチル化の変化が認められた。一方、いくつかの反復性配列には加齢変化が検出されなかった。彼らはメチル化の変化する遺伝子数が予想以上に高いので、いくつかの遺伝子についてそのプロモーター領域の近辺についてバイサルファイトシーケンス法 (後述) やバイサルファイトシーケンス法という別の手法でもメチル化レベルを調べ、加齢変化を確かめた。さらに彼らは同じ方法でヒトの大腸に対しても調べ、サーベイした遺伝子の内 1 割が加齢によるメチル化を受け、1% が低メチル化することを報告した。

b)-3 HELP 法

HpaII tiny fragment Enrichment by Ligation-mediated PCR の略称で、MCAM 法と同じく、メチル化感受性制限酵素とマイクロアレイの組み合わせでメチル化の変動した領域を同定する手法である。ただし制限酵素には HpaII (メチル化感受性) と MspI (メチル化非感受性) というどちらも CCGG を認識するアイソゾマーを用いる。2種類のゲノムをそれぞれの制限酵素で消化し、200 bp ~ 2,000 bp の断片を回収後、それぞれを PCR で Cy3、Cy5 標識しつつアンプリコンを作成し、最後にアレイにかける。Thompson らはラットの肝臓と脂肪細胞での加齢に伴うメチル化変化を HELP で調べるためにカスタムメイドのアレイを作製した [52]。まずラットゲノムのデータベースから *in silico* で4万の HpaII フラグメントを抽出し、それらの断片にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを設計、アレイに搭載した。彼らの解析では、肝臓と脂肪とも5%程度の領域で変化が見られること、ただし肝臓と脂肪ではメチル化に変動する領域に差があることが示された。この値は Maegawa が認めたマウスの3割の領域における加齢依存的なメチル化変動と比較すると随分低い。さらに、Thompson らは CpG アイランドやプロモーター領域でメチル化は変動するが、その割合が解析した他の領域、たとえば遺伝子間領域より低いという結果を得ている。このことは加齢依存的なメチル化変化が CpG アイランド、もしくは CpG アイランドショアで好んで起こるといった他の研究結果と異なる。これらの違いは実験上のいくつかの違い、たとえば使用された制限酵素やラベリング法、アレイのタイプによる感度の違い、種と組織の違い、などの複合的な要因によりもたらされたのかもしれない。また彼らは遺伝子近傍に存在し、メチル化変動した 347 の領域について、対応する遺伝子の発現を調べた結果、はっきりした変化を示したのはそのうちのおよそ1割であった。

c) バイサルファイトシーケンス法

現在さまざまな手法でメチル化解析が行われているが、その多くに前段階として早津によりその原理が見出された、非メチル化シトシンをウラシルに変換させるバイサルファイト法が用いられる。このバイサルファイト反応後、さまざまな下流の分析の手法と組み合わせることで目的や予算に応じたメチル化解析を選択できる。たとえばゲノムの局所的なメチル化解析には、COBRA 法や MSP 法、あるいは手間は少しかかるが取り組みやすいクローンシーケンス法、機械が高額だがハイスループットで高い定量性が得られるパイロシーケンス法や質量分析法が用いられる。一方、ゲノム全体を対象にしたメチル化解析には、メチル化解析用のマイクロアレイが用いられている。以下に老化研究に用いられた例を紹介する。

c)-1 ダイレクトシーケンスとの組み合わせ

Eckhardt らはバイサルファイト法を初めて染色体レベルの網羅的解析に利用し、加齢によるメチル化の変化の有無を調べた [53]。彼らはまず3つのヒト染色体を選び、それらを Ensemble のアノテーションに基づき、あらかじめ6つのカテゴリー (5'-UTR、コーティング領域、ノンコーディング領域など)に分けた。次に6つのカテゴリーの領域からアンプリコン (バイサルファイト処理した初代培養細胞や組織ゲノム由来の PCR 産物)を合計2,524 個作製し、それらのダイレクトシーケンスを行った。これは PCR 産物を直接シーケンサーにかけ、CpG のシトシンの位置でのメチル化シトシンのピークと非メチル化シトシンのピークの高さを比較することでメチル化レベルを計測する手法である。彼らは、肝臓、骨格筋、心筋について平均26歳と68歳のグループを比較したが、どのカテゴリー配列においても有意なメチル化の差を認めなかった。この結果から Eckhardt らは、メチル化の加齢変化はゲノムの中でかなり限定的に、上記のカテゴリーに取まらない領域で生じている可能性、あるいは彼らが使ったメチル化の測定法 (検出限界を20%のメチル化の差としている) では見過ごされる可能性があることを示唆した。ちなみにこの研究を指揮した Beck は後にこのプロジェクト (おそらく他の染色体も解析対象とする) は失敗したとサイエンス誌に語るところをみると [54]、彼らが採った手法には問題があったのかもしれない。

c)-2 クローンシーケンス法

現在メチル化解析のスタンダードとされている方法で、他の手法で得られた結果を確認するため、あるいは試す前の予備実験としてもしばしば用いられる。まずゲノムをバイサルファイト処理後、MethPrimer などのソフトでバイサルファイト PCR 用のプライマーを選ぶ。このときプライマーは CpG 配列を含まない領域から選ぶことで、テンプレートのメチル化状態が増幅に偏りを与えないようにする。次にメチル化の解析をしたい領域を PCR で増幅後、適当なベクターにクローニングし、複数シーケンスして CpG 部位のメチル化、非メチル化を調べる。Jiang らは加齢によるインシュリン感受性の減少の原因を探るため、ラットの肝臓における糖分解の主要な酵素であるグルコキナーゼ遺伝子の発現量とメチル化を調べた [55]。彼らは30のクローンをシーケンスすることでグルコキナーゼ遺伝子のプロモーター領域が、幼若 (14週齢) からアダルト (40週齢)、そして老化 (80週齢) のどのステージの間でもメチル化が亢進することを示した。そしてリアルタイム PCR で、その発現がメチル化に反比例して加齢とともに低下していくことを明らかにした。

c)-3 MSP 法

Methylation-specific PCR の略で、バイサルファイト処理後のゲノムに対してPCR を行い、増幅の有無からターゲット領域のメチル化を調べる方法である。この方法ではプライマーを設計する際、クローンシーケンス法の場合と逆で、プライマー配列がCpG 部位を含むようにする。プライマーの結合部位がメチル化されている場合と、メチル化されていない場合ではそれぞれアニールするプライマー配列が異なるので、両方のプライマーセットを用意し、メチル化選択プライマーと非メチル化選択プライマーでの増幅の度合いによりターゲット領域のメチル化のレベルを測定する。Akintola らは老化ラットの腎臓で N-cadherin が低下していることを見出し、その原因としてプロモーター領域のメチル化を疑った。そして4ヶ月齢と24ヶ月齢のラットの腎臓における N-cadherin の CpG アイランドショアを MSP で調べたところ、老化ラットではメチル化が起きていた [56]。また彼らは興味深いことに、カロリー制限により老化ラットでの N-cadherinメチル化が防げることも示した。カロリー制限が加齢によるメチル化変動を抑制する効果があるのか、今後の研究が期待される。

c)-4 COBRA法

バイサルファイト処理の前後で、調べたいメチル化部位に制限酵素部位が生まれたり消えたりすることがある。その場合、バイサルファイト処理後のゲノムに対し、調べたい CpG サイトを挟むように PCR をかけ、続いて制限酵素で切断すると、PCR 産物の切断・非切断の比率からサンプル中のメチル化レベルを測定できる。これを COBRA 法 (combined bisulfite restriction analysis) と呼ぶ。

高杉はCOBRA法にマイクロチップ型の電気泳動を取り入れて、CpG アイランドの外ではあるが、マウス遺伝子の転写開始点からそれほど離れていない、316 個の CpG 配列のメチル化レベルを若齢 (3週齢)、アダルト (17週齢)、老化マウス (83週齢) の組織間で比較した [57]。その結果、メチル化の加齢変化は増加と減少の両方向あること、メチル化は若齢期からアダルトの過程ですでに始まっていて、アダルトから老化の過程での変化はその延長であること、などが示された。後者の結果は前述の小野らの結果と一致しており、メチル化の加齢変化が少なくとも老化の結果ではないことを示している。一方でメチル化の加齢変化と発現変化については有意な相関が見られないという結果が得られたが、その点について著者は、発現変化が偽陰性になった可能性を考察している。

c)-5 パイロシーケンス法

プライマーからDNA の伸長反応をさせるときに通常は4種の塩基 (dNTP) を同時に加える。しかしここで

各塩基を個別に加えていくと、テンプレート鎖に相補的な「当たりの」塩基を加えたときだけプライマーの伸長反応が起きる。塩基が取り込まれたときにはピロリン酸 (PPi) が生じる。そのピロリン酸を化学発光に変換し、それを専用の装置で検出することができる。これを繰り返し行い、プライマーからDNA合成をしつつ塩基配列を決定する方法がパイロシーケンス法である。バイサルファイト処理後のゲノムから調べたいメチル化部位を PCR 増幅し、そのPCR 産物を直接パイロシーケンスにかけると、個々の CpG 部位のメチル化レベルを測定できる。調べられる領域はせいぜい 30 bpと短く、測定に必要とされる装置がやや高額という短所はあるが、定量性とスループットの点で優れている。

Issa らは大腸ガンだけでなく、前立腺ガンでも年齢依存的な遺伝子のメチル化が見られるかをパイロシーケンス法で調べた [58]。その結果、大腸ガンでのケース同様、前立腺ガンにおいてプロモーター領域にメチル化を受けることが知られているいくつかの遺伝子、pi-class glutathione S-transferase gene (GSTP1), ras association domain family protein 1, isoform A (RASSF1A), でも、正常な前立腺において年齢依存的なメチル化を受けること、ガンではそのメチル化が亢進していることを見出した。

c)-6 DNAチップ法

イルミナ社からヒトゲノムのメチル化解析用チップが発売されている。このチップに載るプローブは、その3'末端がヒトゲノム上の特定の CpG 部位に来るように設計されている。ハイブリダイゼーション後にプローブの伸長反応を行うと、解析対象となるシトシンのメチル化、非メチル化に応じて、蛍光ラベルした塩基が取り込まれる、あるいはメチル化、非メチル化に対応した異なるプライマーが取り込まれるよう工夫しており、そのシグナルを読み取ることでメチル化レベルを測定する。Rakyan らはこのチップを用いて、ヒトの血液を対象にDNA メチル化の加齢変化を初めてゲノム規模で解析した [59]。彼らはまず全血液を対象に27,578 箇所の CpG を調べ 213 箇所で見出され、高メチル化、147 箇所で見出され、低メチル化を検出し、高メチル化を示す CpG 部位が CpG アイランドに集中していること、さらに血液から CD4⁺ T 細胞と CD14⁺ 単球を分離して同様に測定しても全血液サンプルと同じゲノム領域でメチル化が変化していたことから、加齢のメチル化変化が造血前駆細胞 (中胚葉由来) に生じていることを示唆した。また血液でメチル化の加齢変化を示した領域は口腔粘膜 (外胚葉由来) でも同様にメチル化変化していることを見つけ、メチル化の加齢変化が異なる胚葉由来でも共通して起こりうることを見出した。Hernandez らはヒトの脳における加齢に伴うメチル化変化を同チップで解析し、27,578 箇所の CpGの内、およそ4%、1,141 箇所にメチル化変動を見つけた [60]。特徴的なのは、その8割、932 箇所もが CpG アイランド内に存在し、そのほ

100%が加齢とともにメチル化の上昇を示したということである。そして gene ontology 解析から、加齢によるメチル化を受ける CpG 部位の近くには DNA 結合因子や転写調節因子をコードする遺伝子がよく見られることを明らかにした。

本節では加齢とメチル化を調べる際に採られたいろいろな研究を紹介した。もともとできるだけ多くの手法を紹介したいとの意図があったが、まず筆者が注目した研究を列記してみたら結果として互いに手法が異なっていた。それにも関わらず1例を除いて他はすべてメチル化の加齢変化を検出しているということは、哺乳動物の加齢によるメチル化変動が確実で、手技によらず検出できることを示している。そして上記の結果をまとめると、哺乳動物ゲノムにおけるメチル化の加齢変化についていくつかの共通項が浮かび上がってくる。一つ目は変化する領域の多くがCpG アイランドショアや CpG アイランド内で起こること、ただしそれは特定のショアやアイランドに限られるうえ、さらに組織特異性が見られること、二つ目は、メチル化の上昇と減少の両方向の変化が見られること、三つ目はメチル化と遺伝子の発現には負の相関がしばしば見られること、最後はメチル化の変化は性成熟より前に始まっており、老化の結果ではなさそうだとということである。ここから筆者が浮かべるイメージは、加齢とともに性成熟までは必然性をもっていた組織特異的なメチル化変動が、もはやその必要がなくなったアダルトにおいてもゆるやかに継続し、しまいには細胞や組織のホメオスタシスを低下させるまでに遺伝子発現のプロファイルをゆがめていくというものだがどうだろうか。このイメージは Magalhães が主張する「老化の発生説 (developmental theory of aging)」— 発生のプログラムは発生終了時に完全に終わらず、アダルトから老化の過程でフェードアウトしていく。したがって発生のメカニズムがすでにそれを必要としなくなった時期にまで及び、それが老化を引き起こす— と合う [61]。またウイリアムズの老化の拮抗的多面発現理論にも近い。Somel らはヒトやサル的大脑で存在量が加齢変化するメッセンジャー RNAや miRNA そしてタンパク質について、その変化がやはり発生・成長段階ですでに始まっていたことから「老化の発生説」を支持し、老化を発生の延長と見なしている [62]。

5. 老化との因果関係の証明

加齢に伴うメチル化の変動と老化の因果関係をモデル動物で問うには、加齢依存的なメチル化の変動パターンを加速あるいは遅延させられればよい。マウスやラットでメチル化の可変領域が複数わかってきたので、その変化をマーカーとして、メチル化の変動パターンを加速あるいは遅延させる変異や低分子化合物のスクリーニングをモデル動物で行えるだろう。逆に早期老化症を示すとされるヒトやマウスで、エピゲノムの状態がどのようになっているかは上記の手法で直ちに解析が可能であるが未だ報告がない。それらの症状はしばしば “acceler-

ated aging” と表現されるが、もし本当に加齢の促進が起きているなら、DNA メチル化の変化も促進しているはずである。

一方、ヒトにおいて加齢によるメチル化変動と老化の因果関係は、高齢者特有の疾患の発症に関与すると認められるか、少なくとも発症を予測することが可能かどうかで問えるではないか。原因か結果かは不明であるが、高齢者で増加するガンにおいて遺伝子メチル化異常は明らかである。また最近では脳におけるリボソーム遺伝子のプロモーター領域のメチル化がアルツハイマー病のマーカーになり得ることが示されるなど [63]、老年病の発症原因としてメチル化異常がすでに注目されている。一方、エピゲノムを発症前後の診断に利用するとなれば細胞の非・低侵襲的なサンプリングが望まれる。たとえば血液中の DNA など病変部とは別の細胞由来のエピゲノムにマーカーを見つけることが必要になる。そのためにはまずさまざまなヒト細胞における加齢依存的なメチル化変動の部位と変動レベルの精緻な記載が不可欠である。イルミナ社は現在、解析できるヒトゲノムの CpG サイトを45 万カ所以上に増やし、レファレンス遺伝子の 99% を対象としたアレイを比較的安価に発売している。このアレイには CpG アイランドとは別に CpG アイランドショアも一つのカテゴリーとして組み込まれるなど、メチル化を調査できる領域が格段に広がっている。このような高密度メチル化アレイからヒトの加齢によるメチル化変動領域が細胞種類ごとに詳細にマッピングされるだろう。また究極的には後述の国際ヒトエピゲノムコンソーシアムにより、ほぼすべての CpG サイトについて老若の標準メチル化のレベルが次世代シーケンサーにより決定されるだろう。そしてそれらの情報をもとに、将来的にはメチル化の加齢変化を示す CpG 部位に特化したエイジチップとも呼ばれるマイクロアレイが作製され、老年病に関連したメチル化多型 (m-SNP) が見出されるようになるかもしれない。あるいは逆に、老年病に関連するメチル化多型を予断無くゲノムワイドで調べ、見つかった m-SNPが加齢変化で生じるということがわかれば、それにより加齢によるメチル化変化と老化の因果関係が認められるようになるかもしれない。そのための実験デザインがすでに提案されている [64]。

6. ヒトエピゲノムプロジェクト

ヒト細胞のエピゲノムのリファレンスマップを作成するために国際ヒトエピゲノムコンソーシアム (IHEC) が 2010 年に発足し、日本も 2011 年に参加を表明し承認された。ここでのエピゲノムは DNA メチル化の他、ゲノム全域にわたるヒストン修飾、ノンコーディング RNA 解析などを含む (<http://ihc-epigenomes.org/>)。解が一つしかなかったゲノムの一次配列と異なり、エピゲノムは組織や幹細胞の種類、生活環境、疾患の有無、そして年齢等によってそれぞれ異なる。そこで今後 7~10 年の間に少なくとも 1000 のエピゲノムを解読することを IHEC は目標にしている。このエピゲノムプ

プロジェクトではiPS 細胞や疾患と並び老化が6つの主要ターゲットのうちの一つとして選ばれており、近い将来、老化の組織別リファレンスエピゲノムマップができることが期待される。

7. まとめ

今回取り上げたDNA メチル化の変動と老化の関連を調べた研究は、ほぼすべて記載的なものである。それにも関わらず実利的な IHEC がエピゲノムプロジェクトの主要ターゲットの一つに老化を据えたのは、上記の研究が組織や種を超えた加齢に伴うメチル化変動を明確に示し、両者の因果関係を疑わずにはいられない説得力をもつからであろう。

ちなみにもし DNA メチル化のようなエピジェネティクスの乱れが老化に関与しているとしたら、酵母や線虫のようなDNA メチル化をもたない生物ではどうなのかという疑問がわく。同じエピジェネティクスであるヒストンの修飾変化を老化の原因に疑うのは単純に過ぎるだろうか。しかし寿命遺伝子として有名な *sir2* はヒストンの脱アセチル化酵素をコードしており、他にもヒストンヒストン修飾と寿命の関連を実証的に示した例がある [65,66]。総遺伝子のおよそ5%が機能阻害により寿命延長効果をもたらすという線虫の結果は [67]、寿命の変化に依る老化研究の難しさ、危うさを示しており、その判断は慎重になるべきだが、酵母の*Sir2*は加齢により減少するというヒストン修飾タンパク質の加齢変化も報告され [68]、ヒストン修飾が正常な老化に関与する可能性が出てきた。DNA のメチル化修飾とヒストン修飾は相互に依存的ともいわれ、またヒトの加齢で高メチル化する領域はクロマチンの二価領域 (bivalent domain) に対応するという報告もあり [59]、老化研究において今後、DNAメチル化修飾とヒストン修飾の両者が合わせて論じられる日も近いかもしれない。

すでにお気づきのように上記の研究には多くの日本人研究者が貢献している。今後も知恵と勇気を持った日本の若い研究者がこの分野に参加することを期待したい。

引用文献

1. Kohler SW, Provost GS, Fieck A, et al. Spectra of spontaneous and mutagen-induced mutations in the *lacI* gene in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA 88:7958-7962, 1991.
2. Walter CA, Intano GW, McCarrey JR, et al. Mutation frequency declines during spermatogenesis in young mice but increases in old mice. Proc Natl Acad Sci USA 95:10015-10019, 1998.
3. Douglas GR, Gingerich JD, Gossen JA, et al. Sequence spectra of spontaneous *lacZ* gene mutations in transgenic mouse somatic and germline tissues. Mutagenesis 9:451-458, 1994.
4. Nishino H, Buettner VL, Haavik J, et al. Spontaneous mutation in Big Blue transgenic

- mice: analysis of age, gender, and tissue type. Environ Mol Mutagen 28:299-312, 1996.
5. Goudeau J and Aguilaniu H. Carbonylated proteins are eliminated during reproduction in *C. elegans*. Aging Cell 9:991-1003, 2010.
6. Hernebring M, Brolén G, Aguilaniu H, et al. Elimination of damaged proteins during differentiation of embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 103:7700-7705, 2006.
7. Ünal E, Kinde B and Amon A. Gametogenesis eliminates age-induced cellular damage and resets life span in yeast. Science 332:1554-1557, 2011.
8. Kaneko-Ishino T, Kohda T and Ishino F. The regulation and biological significance of genomic imprinting in mammals. J Biochem 133:699-711, 2003.
9. Morgan HD, Santos F, Green K, et al. Epigenetic reprogramming in mammals. Hum Mol Genet 14:R47-R58, 2005.
10. Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. Nature 447:425-432, 2007.
11. Wu SC and Zhang Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. Nat Rev Mol Cell Biol 11:607-620, 2010.
12. Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. Nature 462:315-322, 2009.
13. Li Y, Zhu J, Tian G, et al. The DNA methylome of human peripheral blood mononuclear cells. PLoS Biol 8: e1000533, 2010.
14. Siedlecki P and Zielenkiewicz P. Mammalian DNA methyltransferases. Acta Biochim Pol 53:245-256, 2006.
15. Latham T, Gilbert N, Ramsahoye B. DNA methylation in mouse embryonic stem cells and development. Cell Tissue Res 331:31-55, 2008.
16. Chuang, LS, Ian HI, Koh TW, et al. Human DNA-(Cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21^{WAF1}. Science 277:1996-2000, 1997.
17. Sharif J, Muto M, Takebayashi, S et al. The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. Nature 450:908-912, 2007.
18. Suzuki MM and Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. Nat Rev Genet 9:465-476, 2008.
19. Saxonov S, Berg P and Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in

- the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1412-1417, 2006.
20. Deaton AM and Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 25:1010-1022, 2011.
 21. Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet* 41:178-186, 2009.
 22. Ji H, Ehrlich LI, Seita J, et al. Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors. *Nature* 467:338-342, 2010.
 23. Doi A, Park IH, Wen B, et al. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet* 41:1350-1353, 2009.
 24. Pollard S, Stricker SH and Beck S. A shore sign of reprogramming. *Cell Stem Cell* 5:571-572, 2009.
 25. Li E, Bestor TH and Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69:915-926, 1992.
 26. Okano M, Bell DW, Haber DA, et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99:247-257, 1999.
 27. Walsh CP, Chaillet JR and Bester TH. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet* 20:116-117, 1998.
 28. Herman JG, Merio A, Mao L, et al. Inactivation of the *CDKN2/p16/MTS1* gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 55:4525-4530, 1995.
 29. Hansen RS and Gartler SM. 5-Azacytidine-induced reactivation of the human X chromosome-linked PGK1 gene is associated with a large region of cytosine demethylation in the 5' CpG island. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4174-4178, 1990.
 30. Grant SG and Chapman VM. Mechanisms of X-chromosome regulation. *Annu Rev Genet* 22:199-233, 1988.
 31. Li E, Beard C and Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366:362-365, 1993.
 32. Futscher BW, Oshiro MM, Wozniak RJ, et al. Role for DNA methylation in the control of cell type-specific maspin expression. *Nat Genet* 31:175-179, 2002.
 33. Shimozaki K, Namihira M, Nakashima K, et al. Stage- and site-specific DNA demethylation during neural cell development from embryonic stem cells. *J Neurochem* 93:432-439, 2005.
 34. Mohn F, Weber M, Rebhan M, et al. Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol Cell* 30:755-766, 2008.
 35. Sun LQ, Lee DW, Zhang Q, et al. Growth retardation and premature aging phenotypes in mice with disruption of the SNF2-like gene, PASG. *Genes Dev* 18:1035-1046, 2004.
 36. Dennis K, Fan T, Geiman T, et al. Lsh, a member of the SNF2 family, is required for genome-wide methylation. *Genes Dev* 15:2940-2944, 2001.
 37. Zhu H, Geiman TM, Xi S, et al. Lsh is involved in de novo methylation of DNA. *EMBO J* 25:335-345, 2006.
 38. Wilson VL and Jones PA. DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. *Science* 220:1055-1057, 1983.
 39. Singhal RP, Mays-Hoopes, LL and Eichhorn GL. DNA methylation in aging of mice. *Mech Ageing Dev* 41:199-210, 1987.
 40. Golbus J, Palella TD and Richardson BC. Quantitative changes in T cell DNA methylation occur during differentiation and ageing. *Eur J Immunol* 20:1869-1872, 1990.
 41. Helden EG and Helden PD. Age-related methylation changes in DNA may reflect the proliferative potential of organs. *Mutation Res* 219:263-266, 1989.
 42. Tawa R, Ueno S, Yamamoto K, et al. Methylated cytosine level in human liver DNA does not decline in aging process. *Mech Ageing Dev* 62:255-261, 1992.
 43. Fuke C, Shimabukuro M, Petronis A, et al. Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study. *Ann Hum Genet* 68:196-204, 2004.
 44. Uehara Y, Ono T, Kurishita A, et al. Age-dependent and tissue-specific changes of DNA methylation within and around the c-fos gene in mice. *Oncogene* 4:1023-1028, 1989.
 45. Ono T, Takahashi N and Okada S. Age-associated changes in DNA methylation and mRNA level of the c-myc gene in spleen and liver of

- mice. *Mutat Res* 219:39-50, 1989.
46. Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, et al. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet* 7:536-540, 1994.
 47. Issa JP, Vertino PM, Boehm CD, et al. Switch from monoallelic to biallelic human IGF2 promoter methylation during aging and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11757-11762, 1996.
 48. Ahuja N, Li Q, Mohan AL, et al. Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res* 58:5489-5494, 1998.
 49. Toyota M, Ho C, Ahuja N, et al. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res* 59:2307-2312, 1999.
 50. Ueki T, Toyota M, Skinner H, et al. Identification and characterization of differentially methylated CpG islands in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 61:8540-8546, 2001.
 51. Maegawa S, Hinkal G, Kim HS, et al. Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. *Genome Res* 20:332-340, 2010.
 52. Thompson RF, Atzmon G, Gheorghie C, et al. Tissue-specific dysregulation of DNA methylation in aging. *Aging Cell* 9:506-518, 2010.
 53. Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, et al. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet* 38:1378-1385, 2006.
 54. Pennisi E. Are epigeneticists ready for big science? *Science* 319:1177, 2008.
 55. Jiang MH, Fei J, Lan MS, et al. Hypermethylation of hepatic *Gck* promoter in ageing rats contributes to diabetogenic potential. *Diabetologia* 51:1525-1533, 2008.
 56. Akintola AD, Crislip, ZL, Catania JM, et al. Promoter methylation is associated with the age-dependent loss of N-cadherin in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 294:F170-F176, 2008.
 57. Takasugi M. Progressive age-dependent DNA methylation changes start before adulthood in mouse tissues. *Mech Ageing Dev* 132:65-71, 2011.
 58. Kwabi-Addo B, Chung W, Shen L, et al. Age-related DNA methylation changes in normal human prostate tissues. *Hum Cancer Biol* 13:3796-3802, 2007.
 59. Rakyan VK, Down TA, Maslau S, et al. Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains. *Genome Res* 20:434-439, 2010.
 60. Hernandez DG, Nalls MA, Gibbs JR, et al. Distinct DNA methylation changes highly correlated with chronological age in the human brain. *Hum Mol Genet* 20:1164-1172, 2011.
 61. de Magalhães JP and Church GM. Genomes optimize reproduction: aging as a consequence of the developmental program. *Physiology* 20:252-259, 2005.
 62. Somel M, Guo S, Fu N, et al. MicroRNA, mRNA, and protein expression link development and aging in human and macaque brain. *Genome Res* 20:1207-1218, 2010.
 63. Pietrzak M, Rempala G, Nelson PT, et al. Epigenetic silencing of nucleolar rRNA genes in Alzheimer's disease. *PLoS One* 6:e22585, 2011.
 64. Rakyan VK, Down TA, Balding DJ, et al. Epigenome-wide association studies for common human diseases. *Nat Rev Genet* 12:529-541, 2011.
 65. Greer EL, Maures TJ, Hauswirth AG, et al. Members of the H3K4 trimethylation complex regulated lifespan in a germline-dependent manner in *C. elegans*. *Nature* 466:383-387, 2010.
 66. Maures TJ, Greer EL, Hauswirth AG, et al. H3K27 demethylase UTX-1 regulates *C. elegans* lifespan in a germline-independent, insulin-dependent, manner. *Aging Cell* in press.
 67. Hamilton B, Dong Y, Shindo M, et al. A systematic RNAi screen for longevity genes in *C. elegans*. *Genes Dev* 19:1544-1555, 2005.
 68. Dang W, Steffen KK, Perry R, et al. Histone H4 lysine 16 acetylation regulates cellular lifespan. *Nature* 459:802-807, 2009.

Changes in DNA methylation upon mammalian aging

Nobuyoshi Shimoda

Department of Regenerative Medicine
National Institute for Longevity Sciences
National Center for Geriatrics and Gerontology

There is a growing perception that epigenetic modification, such as DNA methylation and histone modification, may play an important role for aging of the organism partly because epigenetic modification is susceptible to environmental changes and intrinsically destined to change for cellular differentiation, thus only partially stable. But I believe the main reason is that epigenetic modification is thoroughly reset during early development of mammals. Here I introduce studies describing age-related DNA methylation changes in mammals with the methodologies used.

Keywords: DNA methylation, CpG island, CpG island shore

【学会報告】

The 21st International Conference of the Korean Society for Gerontology:
Intervention of Aging and Age-related Diseasesに参加して

丸山 直記

東京都健康長寿医療センター研究所

7月中旬に韓国老化学会が主催する第21回国際シンポジウムに参加するために釜山を訪問しました。多くの韓国の友人との再会と欧米からの参加者との出会いを楽しみました。私は最初の日本人発表者として東北大地震に対する温かいメッセージと支援に対する謝辞を述べました。東京に於ける放射能問題については研究者なので皆さん冷静な判断をしていました。多くの講演の中から、私の友人であり当研究所に何度も来ているソウル大学のSang Chul Park先生の講演についてご紹介したいと思います。彼は韓国のハンセン病患者が収容されていた島で高齢者の健康調査を行いました。日本ではもう新患者が発症していませんが、韓国も同様に新しい発症例は無く、施設が外に対して閉ざされてはなりません。しかし社会的差別を恐れて多くの高齢の元患者が暮らしています。Park先生はこの島に住んでいる高齢者が概して健康であることに興味を持たれて住民の健康調査を行ったのです。その結果、この島の住民は他の地域に居住する高齢者より健康状態が良いことを確認しました。

Park先生はその理由を様々な観点から解析しました。長い間、社会的に差別されてきたことから地域の結びつきが強いことも特徴的でしたが、調査の中で老化の生化学者であるPark先生が最も興味を持ったことは、ハンセン病の治療薬の働きでした。その薬はDDS (4,4'-diaminophenylsulfone) という一種の抗生物質です。実

は多くの元患者は、もはや必要は無いのですが、再発を恐れて治癒後も服薬を続けていました。Park先生は線虫を用いてDDSの働きを詳細に解析しました。そしてDDSは顕著に体内の活性酸素を低下させることを見つけました。その結果、線虫の動きが活発になり寿命を延長させるという結論を得ました。分子生物学的には細胞内におけるDDSが作用する体内の分子はpyruvate kinase-1 (pyg-1)酵素であり、DDSがこの酵素の働きを高めた結果、特に筋肉への良い効果があり寿命の延長につながっているという結論です。Park先生はこの研究を進めて、より良い健康長寿のための研究を行いたいとのことでした。Park先生の研究経過は我々の活動に重要な示唆を与えてくれます。現在、私達の職場でも領域を超えた研究の連携が奨励されています。地域においてなされた様々な健康調査から得られた研究を、基礎老化学研究者が異なった角度から見ることにより新しい展開が開かれる可能性があります。シンポジウムでは私が尊敬する名誉会員のByung Pal Yu先生は領域を超えた幅広い研究に大きな期待を寄せていることを講演してくれました。

追記：韓国における国立の老化研究所の設立は政治状況の変化に振り回されているようで、なかなか決着がつかないとのことでした。またSang Chul Park先生はGachon University (Inchon) に移られました。



【学会報告】

微笑みの国の老年学

丸山 直記

東京都健康長寿医療センター研究所

タイ老年学会の招きでバンコクを訪れました。タイ老年学会が主催する「Improving Geriatric and Gerontology through Cultural Diversity」と題するセミナーでした。講演を行ったのは私とソウル国立大学のSung Jae Choi先生でした。どうして2人が講演をする事になったのか行く前はわからなかったのですが、現地で気がつきました。タイ老年学会は2015年のアジア・オセアニア老年学会議に立候補しており、その招致活動の一環ではないかと思われまます。Choi先生も私もアジア地域のcouncil memberなのです。セミナーではChoi先生は韓国の高齢化社会の問題とそれに関する政策決定について講演しました。Choi先生は其中で韓国に於ける多くの課題について、日本がモデルであったということは何度も話されました。それを聴くたびに我々、日本の老年学の課題はアジアの課題でもあり、日本が果たす役割の重要性を認識しました。私は一般的な老化の生物学的な事柄について私の考え方を簡単に紹介し、我々の組織における自然科学、社会科学、そして病院との連携について紹介し、研究領域を超えた研究活動を力説しましたが、意図するところは伝わったと思われまます。ただ基礎的な研究についてはまだ体制が整っていないとの事でした。現在のタイ老年学会の会長はPranom Othaganont先生というチュラロンコン(Chulalongkorn)大学の看護学の教授ですが、王家とのつながりのある方で、皇太后が看護師であったことから、王家からは様々なサポートがあるとのことでした。タイでは老年看護学は勢いがよいとのことでした。次回のアジア・オセアニアの大会長となるのは現副会長のSutthichai Jitapunkul先生で、チュラロンコン(Chulalongkorn)大学の老年医学の教授です。彼はGGIにはよく投稿しているそうです。講演会の後の夕食会は学会会場に予定されている国際会議場と隣接するホテルCentara Grandで行われましたが、国際会議場は極めて立派でした。会場の周辺は極めて近代的なオフィス・ショッピング街で、また治安も良いとのことでした。またこの地域は多くの観光寺院や王宮が近い事もあり、実際に夜の10時頃でも多くの市民が歩いていました。日本からは約2000人程の参加者を期待しているとのことですが、韓国のChoi先生と私は多くの参加者を期待するには「安全性、治安の良さ」と

「現代的な施設と伝統の共存」がアピールポイントであることを強調しました。その観点では現在、立候補するとされている他の国よりも極めて良い条件であることは間違いないと思います。招待されたのが理由ではありませんが、必ず参加しようと思いました。タイは極めて親日的であることを実感しました。バンコク市内を走る自動車の95%以上が日本車であり、それも左側を走っています。夕食の際にお酒の話が出た時にJitapunkul先生はタイに焼酎の製法を伝えたのは日本人ですと言われました。それは誰ですかと尋ねると「ヤマダ!」と答えました。そう私たちが子供の頃に知っていた山田長政でした。実際に彼が伝えたのかは知りませんが、タイが日本に期待している事を私たちは忘れてはいけません。この国が「微笑みの国」と呼ばれていることはご承知でしょうが、どこでも穏やかな微笑みを見る事ができ極めて楽しい滞在となりました。タイ老年学会が私を招聘した目的は十分に達成されたのかもかもしれません。



【随 筆】

老化研究事起こし--- 老化クロマチンに動的变化が？

三井 洋司
徳島文理大学

はじめに

大きな誤解がありそうです。老化と言えは個体のレベルでも、臓器の機能障害が多くて、人のお役に立ちそうもなく、時には老害を晒す邪魔者扱いをされていないでしょうか？でも全体を見て、優れた判断をする老賢人も居ますね。

その老害イメージは、老化細胞にも有りそうです。外観的には、平たく広がって動きも鈍く、子孫細胞をつくれません。生体高分子にも傷害がたまり、遺伝子の発現も低くて働きが鈍くなり、その存在は臓器、器官の機能を阻害して邪魔者になっているかも知れません。

でも本当にそうなのでしょうか？老化生物の発生の由来から始めて、老化細胞のお役の立ち方まで、一緒に考えて見ましょう。老化クロマチン迄、たどり着けるでしょうか。

第8話 老化細胞に存在意義は？

進化の過程で生物に寿命が生じたのは、およそ、真核生物で有性生殖をするようになった頃だと述べました。ここで生物の寿命とは、同一遺伝子構成の細胞からなる個体が絶える事と、先に定義しましたね。だから、原核生物の細菌では多くの子孫細胞を造りますが、正確なDNA複製をすれば、同一遺伝子構成のクローンが続くわけで、細菌に寿命は無いと言えます。

真核生物になっても、単細胞生物のゾウリムシは無性的な分裂と有性の接合との両方で増えます。また、多細胞生物のヒドラも、無性的な出芽に加えて、配偶子を使った有性生殖も行います。つまり寿命をリセットする機構を獲得したのです。自然界では環境の悪化が起こりますから、遺伝子の組み換えで、それに対処する仕組みを作ったようです。そのつど新しいクローン個体の誕生です。遺伝子プールとしては、確実にすべてが次世代に受け継がれますから、問題は生じません。

むしろ問題はもう一方の古いクローン個体です。細胞の寿命から言えば、テロメラーゼや、ALT機構の獲得、進化によって、DNAのend replication問題はせっかく解決したのに関わらず、体細胞ではどうしてTERTの発現を抑制してしまい、分裂寿命に至るのでしょうか。老化細胞、即ち、老化生物出現の謎です。

個体レベルからすれば、生殖の意味で役目を果たし終えた老化生物に、余分なエネルギーを割けないと言う事でしょうか。

こうした老化細胞は死を待つだけの細胞なのでしょうか。いいえ、最近では過形成や良性腫瘍の組織内に、老化細胞が出現して来る事や、がん遺伝子を人為的に発現させると細胞は急速に老化が誘導されるところから、細

胞の老化、すなわち、不可逆的な分裂停止は、細胞のがん化を予め防ぐ為のバリアと考えられるようになりました。其れとは別に、老化細胞は分裂能力は衰えたけれどサイトカイン等の増殖や細胞遊走を刺激する因子を分泌する能力を高めた結果、傷の修復に役立っていると考えられる人もいます。

老化細胞で発現亢進するp53タンパクは、分裂を停止する働きを持ちますが、一方でプログラム細胞死を誘導する働きもあります。なのに、老化細胞は長期に生存を続けます。個体はそれを生かし続ける理由が在るのでしょうか。

老化細胞は、全体を考えてwiseな生き方を選んでいるのかも知れません。

事起こし⑦です。

そうなるとぜひとも老化細胞を特異的に除去してその結果をみたいですね。

例えば、p16とp53を同時に発現する細胞を老化細胞に見立てて、それら遺伝子プロモーターの下流にそれぞれが合体すれば、毒素（分解の早い）となる因子の遺伝子をつなぎ、老化細胞で生産させるようにtransgenic mouseを造ってみましょう。何が起こりますか、楽しみです。

第9話 リンカー Histone H1を失う老化細胞

老化細胞は、平たく大きく広がった細胞です。分裂寿命の尽きて来た頃ですから、DNA複製や増殖に関わる多数の遺伝子群や、細胞骨格、運動に関わるタンパクの遺伝子群も働いていないと思われます。そこで、一般的に遺伝子の転写が不活発になっており、クロマチンもheterochromatin 化していると想像されます。

もう30年も前ですが、私達は核タンパク質を抽出後、二次元電気泳動で分離する事によって、老化で変動するタンパクを同定した事が有ります。その中で、ヒストン各分子種の割合が、微妙に違う事に気がきました。事の重要性を鑑みて、アミノ酸のCまたはHを放射性物質で標識したリジンを使って、細胞のヒストン分画への取り込みを解析したのです。その結果、ヌクレオソームのコアーヒストンにあたるH2A、H2B、H3、H4は一定の比率で存在するのに対して、リンカー DNA部分に結合する筈のヒストンH1が老化細胞で喪失する事が発見されました。ECR(Mitsui et al 1980)に、その詳細を報告したところです。しかし、当時のクロマチン科学では、histoneの外れる事は、転写活性が高まるだろうとの認識にあって、深い考察は出来ませんでした。

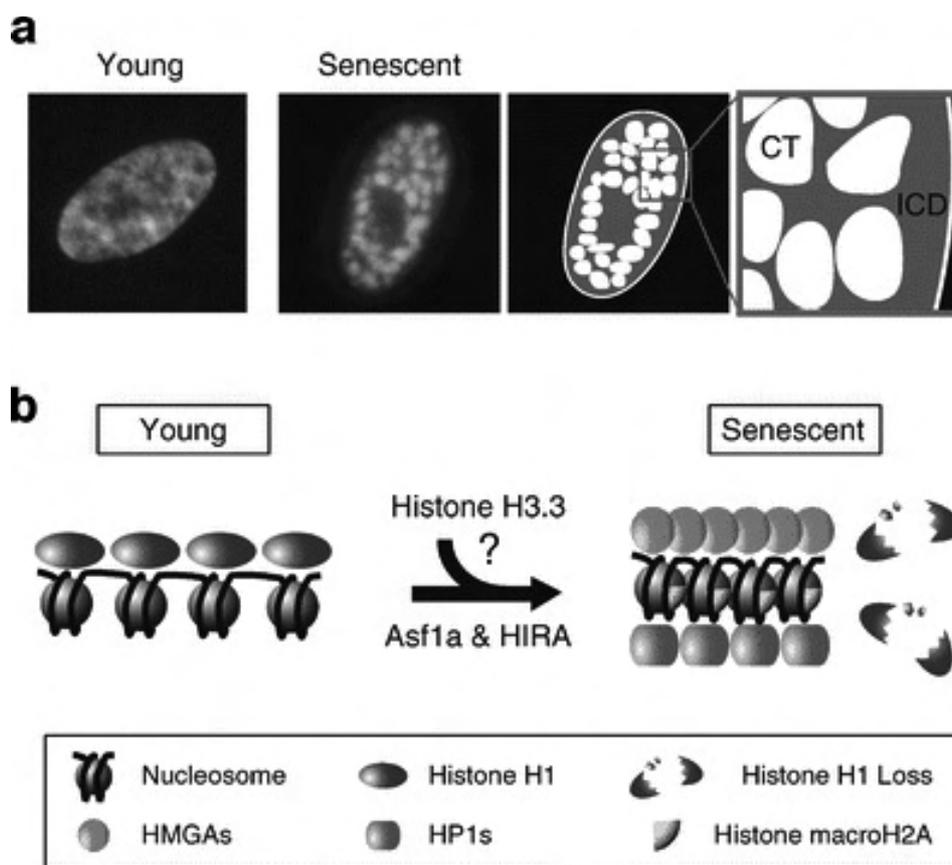


図 老化細胞におけるリンカー histone H1の喪失とSAHFの形成

- a DAPI染色によるSAHFを示す。Focus一つが各chromosomeにあたる。
 b 若い細胞のnucleosomeをつなぐリンカー DNAに結合していたhistone H1は、老化細胞で喪失し、代わりにHMGAが結合する。生じたSAHFにhistone variantsのmacroH2AやH3.3が入り込む。Heterochromatin proteinのHP 1 sも入る。AsF1aやHIRAは、SAHFに組み込まれないが、その形成を助ける。Chromosoma 116, 431-440, 2007(R Funayama, F Ishikawa)より

ところが25年以上経った2006年、石川冬木教授のグループが、ヒストンH1の喪失と言う事実を、違う視点から再発見してくれたのです。それはクロマチンの凝縮、heterochromatinization との関係です。老化細胞で、histone H1が失われて、代わりに競合するHMGAという非ヒストンタンパクが、リンカー DNAに結合してしまって、nucleosomeが折り畳まれ、ヘテロクロマチン化が起こるといことです。但し、これだけでは有りません。

第10話 老化細胞のSAHFで、役者は踊る

それより3年前の2003年、米国のM.Naritaらは老化関連ヘテロクロマチン斑 (senescence-associated heterochromatin foci: SAHF) を初めて報告しました。DAPI染色すると、DNAが凝縮している部分、即ちヘテロクロマチン領域は、濃く染まります。老化細胞の核をDAPI染色すると、上図aの左2番目にあるように、focusが30-50個も見られます。不活化X染色体の染まり方にそっくりのようです。個々のfocusは、それぞれ1個のchromosomeを示すと分かってきました。SAHFには、数種のhistone variantsだけでなく転写抑制に働くheterochromatin protein 1 (HP1) が入り込みます。そして、老化細胞では、Rbの低リン酸化が起こりますから、

E2Fを結合して不活性化し、そのtarget遺伝子群の転写を出来なくして細胞増殖を止めるのですが、老化細胞のSAHFにおいて、このE2F target geneにHP1 γ が結合して安定的な転写抑制をおこし、非可逆的な分裂停止をもたらすと、Naritaらは主張しています。老化の不可逆性の説明です。

ヘテロクロマチン化は、動原体付近、核小体付近、そしてテロメア領域などの反復配列領域に生ずるだけでなく、不活性X染色体や特定の分化における転写の不活化でもおきます。老化の場合とちがいは有るのでしょうか。ヒストンの修飾については、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、そしてメチル化がおこなわれますが、老化では先ずヒストンの脱アセチル化が関わります。サチューインはそのinhibitorであることは、ご存知でしょう。メチル化については、ヒストンH3の9番目のリジンでメチル化(H3K9me2/3)の起こる事が重要です。

ここに、HP1が結合して転写を抑制するのです。しかしH3のメチル化といっても、4番目リジンのメチル化や、9番目リジンの最初のメチル化(H3K9me1)は、むしろ転写を上げるほうで、老化に関わりません。しかも、その近隣に有るH3の10番目セリンのリン酸化は先のHP1を追い出してしましますが、これは細胞分裂期におけるchromosome凝縮で起こることです。ついでに云えば、

H3の27番目のリジンのメチル化は、転写抑制タンパクのpolycombであるPRC1を結合させますが、近隣の28番目セリンのリン酸化がおこれば、PRC1をはずして、転写をあげるといふのです。

一方で、ヒストンH1、H2、H3には、多数のvariantsが存在していて、遺伝子の活性化、修復、分化、転写抑制に関わります。その内、老化細胞のSAHFに含まれるのが、macroH2A及びH3.3として注目されています。

更には、こうした老化細胞SAHFの形成やその維持に関わるタンパクとして、histone chaperoneが重要です。特にHIRAやASF1aの造るcomplexが注目されています。それ自身はSAHF内には取り込まれないものの、ヒストンvariants、特にH3.3のfoldingとSAHFへの取り込みに関与するのです。

先に、テロメア領域はくり返し配列を持ち、ヘテロクロマチン化していると言いましたが、老化細胞においてそれは、短縮化あるいは構造異常にあるわけで、SAHFには取り込まれていないと言うのは、示唆的であります。

こうして述べたSAHFは、生体内でも老化細胞や前がん組織で確認出来ますが、完全な普遍性が有るか気になります。

ヒト細胞の分裂老化でも、WI38やIMR90とちがってBJ細胞ではその形成が弱い事、ヒトとマウスでその形成度が違う事等が指摘されています。

争起こし⑧です。

とは言え、SAHFを構成する重要なタンパク、例えばHMGAをknockdownすると、*in vitro*では、SAHFができ

ません。マウス個体では、どうなるでしょう。老化は？腫瘍形成は？是非やってみたいですね。

第11話 老賢人なのか

さて、こうしたクロマチンをつくるタンパクは、安定しているのでしょうか。

一般に、DNA複製をする増殖細胞では、複製時にクロマチン構造がほどけますから、元の構造に再構築される必要が有ります。そのヘテロクロマチン領域でも、S期の初めか終わりに、短時間で複製を行い、転写抑制のクロマチン構造を再現するのです。

では、分裂停止にいたった老化細胞では、クロマチンはDNAに固定されているのでしょうか。いいえ、そうではありません。DNAからmRNAに転写する折には、ほどけるでしょう。老化細胞は意外と代謝が盛んです。事実、いろいろな増殖因子、プロテアーゼ、炎症性サイトカインなどsecretomeをより多く分泌する事が知られています。更には、DNAへの傷害が多くなっていますから、repairのDNA合成も盛んな筈です。

かくして老化細胞でも、そのクロマチンの各タンパクは、大変に動的でありながら、物質的にも高次構造的にも、再現性よく再統合されていると考えられます。そうであるからには、老化細胞は単に死を待つ細胞でなく、がん抑制、傷修復、そして分化機能発揮だけでなく、さらにwiseな働きを果たしているかも知れません。そのことに、SAHFがどれほど貢献しているかも、知りたいですねー。

複写される方へ

本誌に掲載された著作物を複写されたい方は、日本複写権センターと包括複写許諾契約を締結されている企業の従業員以外は、著作権者から複写権等の委託を受けている次の団体から許諾を受けて下さい。尚、著作物の転載・翻訳のような複写以外許諾は、直接本会へご連絡下さい。

107-0052 東京都赤坂 9-6-41 乃木坂ビル 9F 学術著作権協会
TEL: 03-3475-5618; FAX: 03-3475-5619; E-mail: kammori@msh.biglobe.ne.jp

Notice about photocopying (In the USA)

In order to photocopy any work from this publication, you or your organization must obtain permission from the following organization which has been delegated for copyright for clearance by the copyright owner of this publication.

Copyright Clearance Center, Inc.
222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA
TEL: 978-750-8400; FAX: 978-750-4744; www.copyright.com

基礎老化研究 第35巻 第4号

平成23年（2011）11月10日

発行者 日本基礎老化学会
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2
東京都健康長寿医療センター研究所内
電話 03-3964-3241

編集 編集委員会

印刷所 三陽工業株式会社