基礎老化研究 46（3）; 11－13, 2022

【名誉会員寄稿】

私の老化研究歴

相垣　敏郎
東京都立大学　理学研究科

１．老化研究の始まり

ショウジョウバエは言わずと知れた遺伝学の好材料である。飼育が容易で世代時間が短く、同時に多数の個体を扱えることは老化や寿命の研究にも適している。ショウジョウバエを使った遺伝学的研究に興味があり、東京都立大学の遺伝学研究室に所属した。指導教員の大羽滋教授から提案されたテーマが二つあった。一つは、自然集団に存在するアイソザイムの変異維持機構に関する集団遺伝学的な研究、そしてもう一つがエイジングに関するものであった。先輩たちと議論をしていく中で、分子レベルの変異維持機構については、大部分が突然変異と遺伝的浮動によるものという中立説で勝負がついているそうであり、なかなか厳しそうな感じがした。一方、老化の研究は世の中でまだ始まったばかりの新しい分野であった。未熟な自分でも何かできそうな気がして、寿命の研究をやることにした。手始めに研究室にあった十数系統のショウジョウバエの寿命を測定してみると、系統ごとに異なっていた。繰り返しの実験で再現性があることから、遺伝的にコントロールされていることが一目瞭然であった。しかし、寿命に差がある系統間の交配実験によってわかったことは、多数の遺伝子が関わっているということであった。ゲノムワイドな多形マーカーなどない時代であり、寿命に関連する遺伝子を追究するのは不可能であった。そこで、マクロな視点で解析できそうなテーマを考えてみた。ショウジョウバエのメスは生涯にわたって多数の卵を産むので、生殖活動は寿命と関係していそうな気がした。遺伝的に均一な系統を用いて生殖と寿命の関係を実験的に解析する実験を始めた。以下にその研究結果とその後の展開を紹介する。

２．性的条件が寿命に及ぼす影響

一つの飼育瓶で雌雄共存させた場合と、雌雄を別々に飼育した場合で寿命が大きく異なることがわかった。メスはメスのみで飼育した方が長命なのに対して、オスはオスのみだと短命になった。メスとオスの割合を変えて共存させると、メス、オスともにオスの数が多いほど短命になり、メスの数が多いほど長命になった。雌雄が共存すると、交尾が起こるが、寿命への影響が雌雄で異なることから、交尾の影響は雌雄別々に論じるべきであろう。メスは交尾すると活発な産卵を行うことから、寿命の短縮は交尾のコストによるものと考えられた。一方、オスの寿命については交尾の影響がどのように影響するのか不明である。そこで、異なる性的条件下でオスの行動を観察してみた。その結果、雌が少ない環境では、オスの行動が雌雄を問わず他個体に対して攻撃的になること、逆にメスが多い条件下では、オスの攻撃性が低下して大人しくなることがわかった。メスにおいては、交尾のコストに加えて、オスの攻撃性によるストレスが寿命短縮に寄与しているのではないかと考察した。この研究を修士２年のときに基礎老化研究会で発表した。私にとって初めての学会発表であった。その後も生殖機能に関連した研究をしばらく続けることになる。

３．精液成分の生化学的研究

博士２年で中退し、東京都老人総合研究所・生物学部の助手として勤務した。小山内実部長の下で同じく昆虫のカイコガを材料として研究を行った。カイコガにおいても、交尾によってメスの寿命が短縮されることから、種を超えて保存されたメカニズムの存在を示唆する。交尾によって精子を含む精液がメスに移送される。精液中にはさまざまな物質が含まれており、交尾したメスの生理学的変化を引き起こす因子が含まれている可能性があるが、昆虫の精液成分の性状について解明されたものは数少ない。私たちは精液中に存在する高いアルギナーゼ活性を手がかりにして、解糖系、TCA 回路、およびアミノ酸代謝に関わる酵素や基質が精液中に豊富に存在することを突き止めた。そして、オス由来のこれらの物質は交尾した雌の体内で代謝経路が活性化されることを明らかにした。ショウジョウバエで交尾後のメスの行動変化を研究していたチューリッヒ大学の P.S.Chen 教授と共同研究を行い、ショウジョウバエにおいても同様にオス由来のアミノ酸が交尾後のメスで代謝されることを確認した。その機会に Chen 教授の下に留学する話がまとまった。

４．雄が雌の寿命をコントロールする分子メカニズム

交尾したメスは活発な産卵を開始すると共に、再交尾を拒否するようになる。主要な精漿成分は雄生殖器付属腺で産生される。チューリッヒ大学の Chen 教授は、付

連絡先：相垣　敏郎
〒 192-0397　東京都八王子南大沢 1-1
TEL：042-677-2583
FAX：042-677-2559
E-mail：aigaki-toshiro@tmu.ac.jp

属腺抽出物をメスに注射しても同じ反応が起こることを見出し、交尾後行動を誘発する付属腺由来の活性物質を性ペプチド（sex-peptide) と命名した。付属腺抽出物から出発して性ペプチドを精製し、その一次構造を決定しようとしていた。しかし、ペプチドは修飾されたアミノ酸残基を含んでいたため、部分的な配列しか得られていなかった。ペプチドの構造と機能を証明するには、ペプチド全長の配列を決める必要があった。私は 1987 年から２年間教授の下に留学して、ショウジョウバエの性ペプチドに関する研究を行った。私のミッションは、ペプチドの部分的アミノ酸配列を手がかりにして、全長 cDNA をクローニングすることであった。チューリッヒ大学にはショウジョウバエの遺伝学と分子生物学の先端をいく研究者が集まっており、彼らから有益な助言をもらいながら仕事を進めた。約半年ほどかけて性ペプチドをコードする全長 cDNA をクローニングすることに成功した。cDNA 配列から予測される性ペプチドは 36 アミノ酸残基からなり、修飾を受けていた残基はいずれもプロリンをコードしていた。合計６個の被修飾残基はいずれもヒドロキシプロリンであり、この領域が交尾後行動に関与していることがわかった。

性ペプチド遺伝子はオス生殖器付属腺で高発現しているが、メスでは全く発現していなかった。私は、未交尾雌で性ペプチドの発現を熱ショックで誘導できるように hsp-70 プロモーターにペプチド cDNA を繋いだ融合遺伝子を作製し、トランスジェニックフライを作製した。未交尾のメスに熱ショックを与えたところ、交尾したメスと同様に活発な産卵を行い、再交尾を拒否するようになった。この実験によって、性ペプチドが交尾行動を誘発する因子であることを決定的に証明することができた。その時の感激は忘れられない。その後、別の実験でも再び感激した。性ペプチド遺伝子の転写開始点を決めるための mRNA のダイレクトシークエンシングである。プライマーエクステンション法とジデオキシヌクレオチドシークエンシング法を組み合わせて，転写開始点までの RNA 配列を直接読み取る方法を試みたところ，一発で成功した。5' 非翻訳領域の長さがわずか７塩基であり，当時知られていたものでは世界最短であった。

性ペプチドに興味を持つ研究者が増えて、いろいろと新しいことがわかってきた。産卵の促進と再交尾の抑制だけでなく、免疫応答遺伝子の発現、食嗜好性の変化（炭水化物からタンパク質）、それに加えてなんと寿命の短縮を引き起こすことも明らかになった。また、ペプチドの受容体も同定された。これらの研究には、私が作製したトランスジェニックフライが使われている。大学院時代に研究した交尾によるメスの寿命短縮現象の分子メカニズムに意外と早くたどり着いていた。この機構は、メスを独占しようとするオス同士の競争によって進化すると考えられている。

５．ゲノム時代

ショウジョウバエのゲノム配列が決定されたのは 2000 年３月である。全ゲノムショットガンシークエンス法を高等真核生物に適用した最初の例である。ゲノム配列からアノテーションされた遺伝子は約 13600 個であった。ゲノム配列がわかると、遺伝子クローニングに費やしていた時間は大幅に短縮される。しかし、配列がわかっても、遺伝子の機能を解明するには突然変異体が不可欠である。EMS（エチルメタンスルホン酸）等の変異原を投与して、目的の表現型を示す変異体をスクリーニングするのが一般的であるが、多大な時間と労力を要する。ゲノム配列が決定されたことで、トランスポゾンのランダムな挿入による変異体の作製が盛んに行われるようになった。トランスポゾンの配列は既知であるため、挿入位置をゲノム上に容易にマップできるからである。研究上の利便性を付加したさまざまなトランスポゾンベクターがデザインされ、挿入変異体の作成に用いられた。私がデザインしたのは、ゲノムの挿入位置に隣接する遺伝子を強制的に発現させることができるベクターである。GAL4 という酵母由来の転写因子のターゲット配列（UAS）をトランスポゾン末端に配置したものである。ゲノムに挿入されただけでは何も起こらないが、GAL4 を発現する系統と交配することにより、その子世代で GAL4 が発現する細胞において、トランスポゾンに隣接する遺伝子が強制的に発現される。それによって引き起こされる表現型をスクリーニングするシステムである。しかし、私が始めた時点では、ゲノム配列は未完成であったため、ゲノム上に即座にマップすることはできなかった。そこで、強制的に発現された遺伝子の cDNA を増幅して、それらの配列を決定した。これは、ゲノムの遺伝子を迅速に検出できる技法であり、遺伝子探索システムと命名した。ゲノム配列の決定後にベクターの挿入位置をマップしたところ、大部分の挿入は遺伝子の転写開始点近傍で起こっており、研究者にとって大変都合の良いトランスポゾンであることも判明した。このベクターの開発は JST のさきがけ研究により、またそれを用いた大規模な挿入系統ライブラリーの作製は文科省のゲノム特定領域研究により支援を受けた。当初は研究室で変異体ライブラリーを維持し、外部からのリクエストに応えて分譲していたが、年間数千系統のリクエストがあり、労力と費用の両面で難しくなった。というのは、FEDEX Japan が生き物を引き受けてくれないため、受取人支払いができず、郵便（EMS）で発送せざるを得なかったのである。例外はオーストラリアの研究機関であった。研究用の材料がカスタムを通過できる特別な証明書を用意してくれた。その書類を FEDEX に見せると、あっさり受け取ってもらえた。外来生物の侵入に対して厳しい国であるため、研究者が研究用材料を確実に入手するためのプロトコルが確立されているのであろう。幸運なことに、ちょうどその頃、国のバイオリソースプロジェクトが始まった。ショウジョウバエは京都のストックセンターが拠点となったので、変異体ライブラリーを寄託した。センターで維持管理された系統は、国内外の多くの研究者に利用されている。重要な研究リソースを開発し、コミュニティに貢献できたことは大きな喜びである。

６．寿命延長遺伝子の探索

遺伝子探索システムを構想した時から、この方法を使って寿命延長効果をもつ遺伝子を見つけようと考えていた。強制発現を誘導する GAL4 系統として、温度によって発現を調節できるもの（hsp70-GAL4）を用いた。ベクター挿入系統と交配して、次世代の発生段階は常温（25℃）で飼育し、成体になった後は飼育温度を 30℃にシフトし、寿命を測定する。コントロールに比べて長寿命であれば、強制発現された遺伝子には寿命延長効果があるといえる。約 600 系統をスクリーニングにしたところ、10 数個の遺伝子が強制発現によって寿命延長効果を示した。これらのうちの多くがストレス応答に関わるものであった。その中で、チオレドキシンと *POSH* 遺伝子について、機能喪失変異体を作製し、詳細な遺伝子機能の解析を行なった。

ショウジョウバエが短寿命と言えども、寿命の測定が終わるまでには１ヶ月ほどかかる。そこで、インスリンシグナル経路の変異体で体のサイズが小さくなるものは、寿命が長くなることに注目した。約 750 系統をスクリーニングし、強制発現によってサイズが小さくなるものとして、13 個の遺伝子を同定した。その中で、インスリンシグナルに関わることが予想された二つの遺伝子（*lkb1*、*wdb*）について、強制発現して寿命をみたところ、共に有意な寿命延長効果を示した。その他、mRNA の翻訳調節に関わる *Larp4B* 遺伝子も強制発現によって体のサイズが小さくなり、寿命を延長することを見出した。興味深いことに Larp4B の強制発現は Myc 遺伝子の発現を抑制することがわかった。詳細なメカニズムは不明であるが、タンパク質合成の低下が寿命延長に関わっているかもしれない。

７．厳しい批判もある

この実験系には我ながら自信を持っていたのだが、厳しい批判をいただいたこともある。それは 1998 年４月、Cold Spring Harbor Laboratory で開催されたエイジングの集会でのことである。ショウジョウバエを使っている研究者も多数参加していて、楽しい時間を過ごしていたのだが、突然目の前に現れた人物が私に対して、「お前の実験系は全く無意味だ。老化の研究に全くなっていない」と怒りをぶちまけるように厳しく批判されたのである。私には何が問題なのかよく理解できなかった。このちょっとした騒動に気がついて何人かが集まってきて、その中に超有名な Seymour Benzer 博士の姿があった。博士は私に「気にするな、大丈夫だ。あいつは変なやつだ」と励ましの言葉をいただいた。実は、国内でも似たような批判を受けたことがある。もちろんもっと穏やかな表現であったが、お二人とも自然集団を相手にしている研究者ということが共通していた。自然界では起こり得ない状況を無理やり作り出している技法に違和感を感じたようだ。

８．疾患遺伝子バリアントの研究

最近、興味を持っているのは疾患遺伝子のバリアントに関する研究である。疾患に関連するヒト遺伝子のホモログをハエで解析するのは特に目新しいものではない。近年の新しい要素は、例数が少ない疾患のゲノム解析から次々に見出されている新しいバリアントである。私は進化的保存性の高い代謝酵素のバリアントに注目している。ショウジョウバエの代謝酵素は古くから知られているものが多いが、遺伝学的な解析はほとんど行われていない。代謝酵素の変異の影響はメタボローム解析で定量的な表現型として解析できることも利点である。CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術や GAL4-UAS システムによる強制発現などの技法を使って、ヒト遺伝子のバリアントまたはハエホモログでバリアントを作成し、その機能解析を行うのである。現時点では希少疾患で見つかったバリアントを解析の対象にしているが、ヒトの寿命やフレイルに関わる可能性のある代謝酵素のバリアントが見つかれば、ぜひショウジョウバエで検証したいと考えている。

９．Zoom meeting は楽しい

1993 年に HFSP（ヒューマンフロンティアサイエンスプログラム ）研究グラントが採択された。ショウジョウバエ性ペプチドの研究成果をベースにした提案で、メンバーはスイス、アメリカ、ドイツ、イギリス、日本の研究者で構成された。HFSP 終了後もこのメンバーを中心にして定期的にミーティングを開いてきた。採択時からほぼ 30 年になり、当初からのメンバーは数名になってしまったが、新しいメンバーを加えて現在も続いている。コロナ禍で対面のミーティングができないため、昨年から Zoom を使って２ヶ月に１回程度でセミナーを開いている。フライトの疲れもなく、自宅から気軽に国際的なミーティングに参加できるのは快適である。アメリカとヨーロッパからの参加者が多いので、時間帯はアメリカ東海岸のお昼、ヨーロッパの夕方、必然的に日本は深夜になってしまうが、それほど苦にならない。眠い時には寝れば良い。今のところセミナーの楽しさの方が勝っている。

名誉会員授与式にて、写真左から三浦ゆり編集理事、石神昭人理事長、樋口京一名誉会員、著者、海野けい子名誉会員