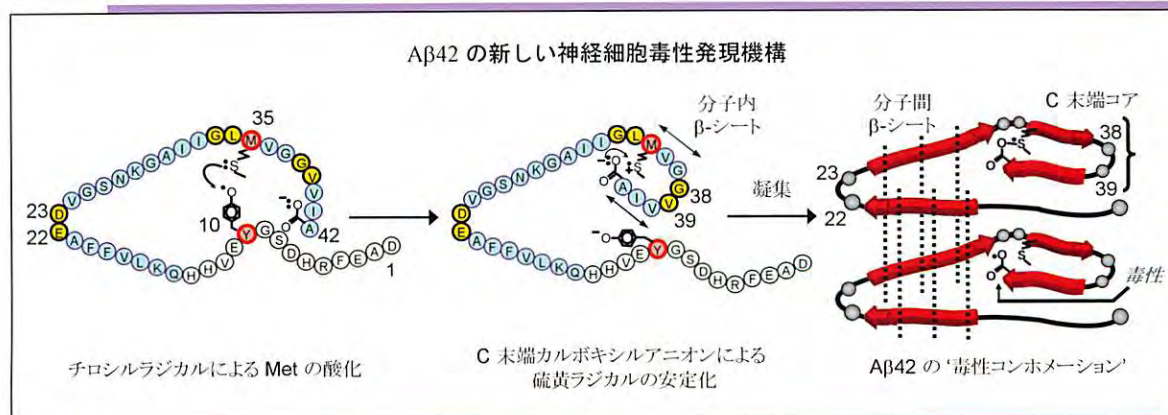


BIOMEDICAL GERONTOLOGY

基礎老化研究

- 総説** ■ 晩年のBenzer研究室の動向からみるショウジョウバエの分子老年遺伝学 森 望
 ■ ショウジョウバエをモデルとした老化・加齢性神経疾患の研究
 —ケミカルジェネティクスによるアプローチ— 津田玲生
 ■ カロリー制限による寿命延長・抗老化機構
 —神経内分泌仮説に基づく代謝調節の重要性— 千葉卓哉 山座治義 下川 功
- トピックス** ● TCA回路を中心とした代謝調節と寿命制御 木下善仁 津田 学 相垣敏郎
トピックス ● アミロイドβ (Aβ42)の毒性コンホメーションの提唱
 村上一馬 清水孝彦 白澤卓二 入江一浩
- 随筆** ● 老化研究事始め——老化と寿命の起源、進化は？ 三井洋司
- 研究室紹介** ● 東京理科大学薬学部生命創薬科学科分子病理・薬物代謝研究室 樋上賀一
- 附** ● 基礎老化学会サーキュラー 第79号



- 編集委員会委員長： 白澤卓二 順天堂大学大学院医学研究科 寄付講座加齢制御医学講座
〒113-8421 文京区本郷2-1-1
- 編集委員会幹事： 堀田晴美 東京都老人総合研究所 老化ゲノム機能研究チーム
〒173-0015 板橋区栄町35-2
- 編集委員会委員： 後藤佐多良 東京都老人総合研究所 老化ゲノムバイオマーカー研究チーム
〒173-0015 板橋区栄町35-2
- 丸山和佳子 国立長寿医療センター 老年病研究部
〒474-8511 大府市森岡町源吾36-2
- 田中雅嗣 東京都老人総合研究所 健康長寿ゲノム探索チーム
〒173-0015 板橋区栄町35-2
- 戸田年総 東京都老人総合研究所 老化ゲノムバイオマーカー研究チーム
〒173-0015 板橋区栄町35-2
- 内田洋子 東京都老人総合研究所 老年病のゲノム解析チーム
〒173-0015 板橋区栄町35-2
- 五味不二也 東京都老人総合研究所 老年病のゲノム解析チーム
〒173-0015 板橋区栄町35-2
- 内田さえ 東京都老人総合研究所 老化ゲノム機能研究チーム
〒173-0015 板橋区栄町35-2
-

- Editor-in-Chief: Takuji Shirasawa, Department of Ageing Control, Graduate School of Medicine, Juntendo University, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, JAPAN
- Managing Editor: Harumi Hotta, Research Team for Functional Genomics, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, JAPAN
- Editors: Sataro Goto, Research Team for Molecular Biomarkers, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, JAPAN
- Wakako Maruyama, Department of Geriatric Research, National Center for Geriatrics and Gerontology, 36-2 Gengo, Morioka-cho, Obu City, Aichi 474-8511, JAPAN
- Masashi Tanaka, Research Team for Longevity and Health, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, JAPAN
- Toshifusa Toda, Research Team for Molecular Biomarkers, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, JAPAN
- Yoko Uchida, Research Team for Geriatric Disorders, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, JAPAN
- Fujiya Gomi, Research Team for Geriatric Disorders, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, JAPAN
- Sae Uchida, Research Team for Functional Genomics, 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。
専門用語: 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, 田久保海峯 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: 白澤卓二 (shirasawa@sirasawa-alc.net)

または、編集幹事: 堀田晴美 (hhotta@tmig.or.jp)

目 次

総説

晩年のBenzer研究室の動向からみるシヨウジョウバエの分子老年遺伝学 森 望……………1-5

総説

シヨウジョウバエをモデルとした老化・加齢性神経疾患の研究
—ケミカルジェネティックスによるアプローチ 津田玲生……………7-14

総説

カロリー制限による寿命延長・抗老化機構 —神経内分泌仮説に基づく代謝調節の重要性—
千葉卓哉、山座治義、下川 功……………15-20

トピックス

TCA回路を中心とした代謝調節と寿命制御 木下善仁、津田 学、相垣敏郎……………21-23

トピックス

アミロイド β (A β 42) の毒性コンホメーションの提唱
村上一馬、清水孝彦、白澤卓二、入江一浩……………25-29

随筆

老化研究事始め——老化と寿命の起源、進化は？ 三井洋司……………31-32

研究室紹介

東京理科大学薬学部生命創薬科学科分子病理・薬物代謝研究室 樋上賀一……………33-34

附

基礎老化学会サーキュラー 第79号

CONTENTS

<REVIEW>

Molecular genetics of aging in *Drosophila melanogaster*: A lesson from Benzer' s laboratory in his closing years.
Nozomu Mori……………1-5

Chemical genetics using *Drosophila* for studying age and age-related neuronal diseases
Leo Tsuda……………7-14

Mechanisms of longevity and anti-aging effects of calorie restriction by neuroendocrine adaptation: a hypothesis.
Takuya Chiba, Haruyoshi Yamaza and Isao Shimokawa……………15-20

<Topics>

Regulation of TCA cycle and longevity.
Yoshihito Kishita, Manabu Tsuda and Toshiro Aigaki
Toxic conformation of 42-mer amyloid β peptide (A β 42) in Alzheimer' s disease.
Kazuma Murakami, Takahiko Shimizu, Takuji Shirasawa and Kazuhiro Irie……………25-29

【総 説】

晩年のBenzer研究室の動向からみるショウジョウバエの分子老年遺伝学

森 望

長崎大学・医学部・神経形態学 (旧 第一解剖)

要約

老化研究においてモデル生物の果たす役割は大きい。それは寿命制御の分子機構を探る研究において特に顕著である。個体寿命の比較的短い無脊椎動物である線虫やショウジョウバエの遺伝子変異体の解析から様々な寿命遺伝子 (あるいは寿命関連遺伝子) が明らかにされてきている。本稿では、長年、ショウジョウバエの発生分化や行動遺伝学の研究を世界的に牽引してきたカリフォルニア工科大学のSeymour Benzerの晩年の老化研究を紹介する。ショウジョウバエの成虫脳に特異的な遺伝子を網羅的に探索し、その中から神経変性や寿命制御に関連した遺伝子を次々と明らかにした、その軌跡から何を知ることができたのか? 緻密な研究戦略から得たものは何だったのか? 行動遺伝学の重鎮であった彼の晩年の研究の基礎老化研究へ果たした役割を論じる。

キーワード: 老化、寿命、分子遺伝学、ショウジョウバエ、methuselah

1. はじめに

老化研究の中でも、生物の寿命決定のメカニズムを探る研究に関しては遺伝学を無視して語ることはできない。マウス、ラットではなく、線虫やショウジョウバエなどの無脊椎動物のモデル系を用いた研究は、最近の寿命研究の中心的役割を果たしている。この十年来、精細な分子遺伝学を駆使できるモデル生物を使った老化の分子遺伝学研究では、カリフォルニア大学サンフランシスコ校 (UCSF) のCynthia Kenyonの線虫遺伝学と、マサチューセッツ工科大学 (MIT) のLenny Guarente、あるいはそこから独立したハーバード大学 (Harvard) のDavid Sinclairの酵母遺伝学による研究が凄まじい勢いで展開されている感がある。しかし一方で、ショウジョウバエを使った老化/寿命研究も大きな展開を見せている。英国ロンドンのLinda Partridge [1]、米国ロードアイランドのBrown大学のMarc Tatar [2]、南カリフォルニア大学のJohn Tower [3]、あるいは東京の相垣ら [4] の研究である。これに加えて、元来、老化の研究というよりもむしろショウジョウバエの行動遺伝学の領域を開拓し、世界的に先導してきたカリフォルニア工科大学 (通称、カルテック) のSeymour Benzerが、その晩年、ショウジョウバエの老化/寿命研究に大きな足跡を残した事実がある。カルテックのBenzer研究室は

Thomas MorganやEdward Lewisなどショウジョウバエ遺伝学でノーベル賞を受賞した研究室の流れを汲む、米国西海岸きっての分子生物学、分子遺伝学の中核だった。ここでは、このBenzerの晩年の研究からショウジョウバエの老化や寿命に関して明らかになったことを概観し、今日の老化・寿命研究の中での意味を考えてみたい。

2. 成虫脳特異的遺伝子および後期発現変動遺伝子の同定

Benzerが老化研究を意識し始めたのは通常なら大学を定年になる65歳ころからだった。1980年代、これはちょうど、線虫 (*C. elegans*) や酵母 (*S. cerevisiae*) で寿命遺伝子が明確に存在することがわかりはじめた時期でもあった。しかし、線虫や酵母に比べてはるかに複雑な体制と生活環をもつハエの老化や寿命研究には、まだまだ新たな研究手法や概念の導入が必要な時代だった。言うまでもなく、ハエには幼虫と成虫の時期があり、変態する動物である。また、ゲノムサイズも組織構成も線虫のそれよりはるかに大きく複雑化している。

80年代の終盤、Benzerは同じキャンパスのEliot Meyerowitzのラボと共同で、この複雑なショウジョウバエの後期の分化過程の制御に関わる遺伝子を探究するため、このハエの幼虫期と成虫期において発現の異なる遺伝子 (cDNA) を網羅的に解析する新たなシステムを確立した。その結果、成虫バエの頭部に特異的に発現する436遺伝子を特定した [5]。それらの遺伝子の中から、成虫脳において神経変性を誘導する変異体を複数単離して、90年代後半、その変異個体の性状を解析し、ヒトの加齢依存性神経変性疾患と対比させて論じた。*Swiss cheese*, *spongecake*, *eggroll*, *drop-dead* などである [6-11] (表1)。

連絡先: 〒852-8523

長崎市坂本1-12-4

長崎大学 医学部 神経形態学/大学院

医歯薬学総合研究科 医療科学専攻 形態制御解析

Tel/Fax: 095-812-7017

E-mail: morinosm@nagasaki-u.ac.jp

表1 Benzer らによるショウジョウバエの老化および寿命変異体

遺伝子	産物	表現型	文献
<i>swiss cheese</i>	SWS	加齢依存性神経変性を生じ、短命となる。成虫での神経変性の主因はグリア細胞の多重被服による。SWS 蛋白は A キナーゼの制御領域に相同性を含むドメインをもつが、機能は未知。	[6]
<i>spongecake</i>		25C では寿命は不変だが、29C の飼育で神経変性を生じて短命。軸索の膨潤化と膜空胞の増大に特徴。ヒトのクロイツェルヤコブ病 (CJD) に類似。	[9]
<i>eggroll</i>		25C でも 29C でも神経変性により短命。軸索に異常な髄鞘化を生じる。ヒトのテイサックス病 (TSD) に類似。	[9]
<i>drop-dead</i>		神経細胞は正常だがグリアが未熟化し神経機能に障害を与える。極度に短命 (通常 25C で平均寿命 35 日が、5 日程度となる)。老化マーカーの <i>wg</i> 遺伝子 (いわゆる加齢性β-ガラクトシダーゼ SAG をコード) の発現が亢進。早老症 (プロジェリア) モデル。	[7,8]
<i>bubblegum</i>	長鎖脂肪酸合成酵素	成虫での神経変性、特に視覚神経の軸索変性を生ずる。長鎖脂肪酸濃度が高まる。この症状はいわゆる "Loreozo's oil" で改善される。ヒトの副腎白質ジストロフィー (ALD) に似る。	[10]
<i>HDJ1</i>	熱ショック蛋白 dHSP40	神経細胞におけるポリグルタミン毒性に拮抗するサプレッサー遺伝子。熱ショック蛋白 HSP40 に類似。ヒトのハンチントン舞蹈病に関連。寿命効果は不明。	[11]
<i>TRP2</i>	dTRP2	HDJ1 と同様、ポリグルタミン毒性へのサプレッサーとして機能。	[11]
<i>TOL</i>	dTOR	機能抑制および発現抑制により長命化。カロリー制限の状態に近い。	[13]
<i>dS6k</i>	dS6K	ドミネガ体の発現により長命化。	[13]
<i>dTsc1, dTsc2</i>	dTSC, dTSC2	強制発現により長命化。TOR 受容体の機能を抑える。	[13]
<i>hyperswirl (hys)</i>	HYS	ミトコンドリアの形態異常を生じ、特に骨格筋の機能形態劣化を来す。酸素高感受性。ホモは短命 (平均寿命 7 日程度)、ヘテロは野生株と同等。	[23]
<i>hsp26, hsp27</i>	HSP26, HSP27	それぞれ単独の過剰発現によりいずれも 30% 程度延命。種々のストレスに耐性となる。産子数は減少。	[14]
<i>Glaz</i>	ApoD/Grial Lizarillo	過剰発現により酸素耐性を獲得し、29% 程度延命。強度のハイポキシア、虚血再還流、飢餓に耐性。	[15]
<i>sdhB</i>	SDH b サブユニット	酸素に高感受性。ミトコンドリアの形態異常あり。機能的には複合体 II の電子伝達系の異常を伴う。短命。	[16]
<i>EcR</i>	Ecdyson 受容体	ヘテロ変異体で 40~50% の延命。種々のストレスに耐性となる。	[20]
<i>DTS-3</i>	Ecdyson 合成酵素 Kruppel 型転写因子	温度感受性変異体で高温飼育下ほど長寿となる。エクダイソンを投与すると延命効果が消失する。	[20]
<i>methuselah</i>	クラス II GPCR (Mth)	ホモ変異体で 35% の延命。酸素ストレス、飢餓、高温に耐性。	[12]
<i>R8-12</i>	R8-12 ペプチド	強制発現により 30% 程度の延命。Mth のアンタゴニスト。長寿化シグナルを誘導か。	[21]

3. メトセラ (Methuselah) の発見

しかし、この90年代後半のBenzer研の研究成果の中で、「老化」の観点で最も注目を浴びたのはショウジョウバエの長寿命遺伝子Methuselah (メトセラ: 969歳まで生きたといわれるユダヤの長老) の発見だろう[12]。この変異体はストレス耐性を獲得して寿命が(平均寿命も最長寿命も) 35%程度延びる。ちょうど、マウスにおける*p66-shc*変異体、線虫における*daf-2*や*age-1*変異体と似た状況にある。このMethuselah (*mth*) 遺伝子はいわゆるG蛋白共役型受容体 (GPCR) をコードしており、そのリガンドや受容体の薬理的性状については不明だったが、このような新たなGPCRが細胞や組織のストレス耐性に関わり、また寿命制御にも関わっていることを初めて明らかにした。

その後、このMethuselah以外にも、TOR (the target of rapamycin) 受容体系を抑制すると延命すること[16]、ストレス応答に関わる*hsp26*、*hsp27*を過剰発現して熱ショック蛋白質HSP機能を亢進すると延命すること[18]、アポリポ蛋白のうちApoDのショウジョウバエホモログ (*GLaz*) を過剰発現しても酸素耐性を獲得して30%近く延命すること[21]を相次いで見いだしている。また、一方、ミトコンドリアの電子伝達系複合体IIのsuccinate dehydrogenase (SDH) のbサブユニットの変異体では酸素ストレス感受性が高く短命になることを報じた[22]。これなどは東海大学の石井直明らの発見になる線虫の*mev-1*変異に相当する、あるいはそれに類するものであろう。

4. 寿命制御システムの多様性

2000年代に入ってからのお老化研究には少し傾向の変わったものもある。いわば、生物寿命への環境要因あるいは栄養因子の効果を問うたもので、結果がユニークだ。近年ではよく酵母や線虫の老化に赤ワインに含まれるポリフェノールであるレスベラトロールの効能がよく議論されるが、それに関するショウジョウバエのデータはまだないと思われる。それに対して、Benzer研は、その独自の研究から、ショウジョウバエの延命には 4-phenylbutylate (PBA) の投与が有効であること[13]や、成虫期の最初の1週間、細菌に触れさせておくこと延命効果があること[19]などを報じた。また、ショウジョウバエの分化ホルモンであるエクダイソン (Ecdyson) の経路を抑制するとやはり延命することも発見している[14]。合成経路を抑制しても、受容体系を阻害しても同様の寿命効果が現れている。このエクダイソン系の寿命への効果などは、生化学的性状は全く異なるが、成長期の分化制御因子が老化制御にも積極的に関わるという点では、今日、寿命制御の根幹シグナルとして議論されるいわゆるインスリン様成長因子 (IGF1) 系のアナロジーと捉えることもできよう。あるいはまた、最近、UCSFのCynthia Kenyonらが線虫の寿命制御で見いだしているステロイドホルモンpregnenolone (PREG)の寿命効果と同一ではないにせよ、関連するようにも思える。

5. メトセラ (Methuselah) の分子シグナル

上述のように、十年近く前に、聖書の中の超高齢者、最長寿命記録者として登場するユダヤの長老Methuselahの名を冠したショウジョウバエの長寿命変異体の解析を報告したBenzerは、その後この寿命制御系についてどこまで理解を深めたのだろうか? そのひとつの答えは最近のNature Chemical Biologyの論文[23]に見ることができる。Benzerの最後のポストクのひとりであるBill Jaを中心に、彼らはMethuselah受容体の内在性のアンタゴニストを発見した。それを継続的に発現するようにしたショウジョウバエの組換え体は、予想どおり、長寿命となることを見いだしたのである。Methuselahは細胞外ドメインが比較的大きく、ペプチド性リガンドに結合すると想定されるクラスIIのGPCRに分類される。この推定を元に、彼らは、このGPCRの細胞外ドメイン (ectodomain) に特異的に結合するペプチドを、いわゆるmRNA display法を用いて単離してきた。彼らがRWRモチーフと呼んだ $-[R/P]XXWXXR-$ を含むペプチドが集約されたが、それらはいずれも新規の内在性ペプチドだ。その多くはMethuselah受容体に対して拮抗的に (アンタゴニストとして) 作用した。そのうちの代表格である彼らがR8-12と呼んだペプチドを強制的に発現するように改変したショウジョウバエは、寿命が30%程度延びた。これはMethuselah変異による寿命延長とほぼ相同の結果である。

Methuselahに作用する内在性ペプチドとしては、今回のBenzerグループの発見以前にコーネル大学のXin-Yun HuangのグループによるStunted (Sun)ペプチドの発見がある[24]。このペプチドはミトコンドリアや細胞膜に存在するF₁F₀ATPaseのεサブユニットであり、酵母から哺乳動物に至るまで進化的保存性がある。このStuntedペプチドの変異株 (機能抑制株) は長命となることから、StuntedはMethuselahのアゴニストであると想定されている。ふだんはATPaseの一部でありながら、何らかの状況ではそこから遊離して細胞外へ放出され、Methuselah受容体へ作用するのではないかと考えられている。

もし、われわれ人間を含めた哺乳動物にMethuselahとこの内在性ペプチドに相当するものが存在するとすれば、このR8-12ペプチドに相当するものはわれわれの延命ホルモンとなる可能性がある。しかし、話はそう単純ではなかろう。今のところマウスにもヒトにもMethuselahに相当するGPCRは同定されていない。また、R8-12に相当するペプチドもない。しかし、GPCRは進化上最も多様化され汎用された7回膜貫通型受容体であり、ヒトでは創薬のひとつの大きなターゲットになっている。今後、ヒトゲノムやマウスゲノム上で精細に検討がなされるべき課題であろう。

6. おわりに

今日、基礎老化研究に携わる人の多くが寿命制御シグナルの根幹はいわゆるインスリン様成長因子 (IGF-1) からその受容体 (IGFR)、PI3K、AKTからFoxO/FKHR

へ至るシグナル伝達経路であると認識している。このシグナル系を弱めれば寿命延長へ進む。さて、Benzerらが発見したR8-12リガンドからII型GPCR、Methuselahを介した寿命制御系は、脊椎動物へも進化的保存性があるのだろうか？今のところ、それは未知である。これは、マウスにもヒトにもp66-Shcがありストレス応答に作用することで延命効果をもつと考えられながら、今でも、線虫でもショウジョウバエでもp66-Shcやそれに類する相同分子が見いだされていないことにも類似する。

(ショウジョウバエにはDShcが存在するが、哺乳動物にみられるようなp52/p46とp66という機能的に異なる分子種の産生がない。また、線虫にはPTBドメインとSH2ドメインが一つずつShcに見られるようにタンデムに並んだアダプター分子が見当たらない。) 遺伝子レベルでの老化研究は、ヒトでのWerner症候群の遺伝子(いわゆるウェルナーのヘリケース)や線虫の*age-1* (PI3K)や*daf-2* (IGFR)の発見以来、この十数年、ずいぶんと進んで多くの論理的な議論が可能になってきたが、それでも基礎老化研究はまだ真の普遍性を確信するまでには至っていない。Benzer博士は昨年(2006年)の11月30日に亡くなったが、ヒトゲノムの中の*Methuselah*、それはまだ夢の中である。

後記: 本原稿は、当初、カルテックのBenzerが亡くなったのを昨年末に知り、その追悼文の形で原稿を書いていたものだが、基礎老化学会誌の編集委員と連絡を重ねる過程で、時期を逸し、ここでは晩年のBenzer研究室のショウジョウバエの老化・寿命研究をまとめる総説の形とした。この間、他誌からの要請もあり、追悼を強調して科学的には同様の内容を他誌にも掲載したことをお断りしておく[26]。Benzerの老化研究以外の経歴や考え方に興味のある読者はそちらも参照されたい。

参考文献

1. Giannakou ME, Partridge L. Role of insulin-like signalling in *Drosophila* lifespan. *Trends Biochem Sci.* 2007; 32(4): 180-188.
2. Min KJ, Yamamoto R, Buch S, Pankratz M, Tatar M. *Drosophila* lifespan control by dietary restriction independent of insulin-like signaling. *Aging Cell.* 2008 Mar; 7(2): 199-206.
3. Tower J. Sex-specific regulation of aging and apoptosis. *Mech Ageing Dev.* 2006 Sep; 127(9): 705-718.
4. Aigaki T, Seong KH, Matsuo T. Longevity determination genes in *Drosophila melanogaster*. *Mech Ageing Dev.* 2002 Nov; 123(12): 1531-1541.
5. Palazzolo MJ, Hyde DR, VijayRaghavan K, Mecklenburg K, Benzer S, Meyerowitz E. Use of a new strategy to isolate and characterize 436 *Drosophila* cDNA clones corresponding to RNAs detected in adult heads but not in early embryos. *Neuron.* 1989 Oct; 3(4): 527-539.
6. Kretschmar D, Hasan G, Sharma S, Heisenberg M, Benzer S. The swiss cheese mutant causes glial hyperwrapping and brain degeneration in *Drosophila*. *J Neurosci.* 1997 Oct 1; 17(19): 7425-7432.
7. Buchanan RL, Benzer S. Defective glia in the *Drosophila* brain degeneration mutant drop-dead. *Neuron.* 1993 May; 10(5): 839-850.
8. Rogina B, Benzer S, Helfand SL. *Drosophila* drop-dead mutations accelerate the time course of age-related markers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jun 10; 94(12): 6303-6306.
9. Min KT, Benzer S. Spongecake and eggroll: two hereditary diseases in *Drosophila* resemble patterns of human brain degeneration. *Curr Biol.* 1997 Nov 1; 7(11): 885-888.
10. Min KT, Benzer S. Preventing neurodegeneration in the *Drosophila* mutant bubblegum. *Science.* 1999 Jun 18; 284(5422): 1985-1988.
11. Kazemi-Esfarjani P, Benzer S. Genetic suppression of polyglutamine toxicity in *Drosophila*. *Science.* 2000 Mar 10; 287(5459): 1837-1840.
12. Lin YJ, Seroude L, Benzer S. Extended lifespan and stress resistance in the *Drosophila* mutant methuselah. *Science.* 1998 Oct 30; 282(5390): 943-946.
13. Kang HL, Benzer S, Min KT. Life extension in *Drosophila* by feeding a drug. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jan 22; 99(2): 838-843.
14. Simon AF, Shih C, Mack A, Benzer S. Steroid control of longevity in *Drosophila melanogaster*. *Science.* 2003 Feb 28; 299(5611): 1407-1410.
15. Seroude L, Brummel T, Kapahi P, Benzer S. Spatio-temporal analysis of gene expression during aging in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell.* 2002 Oct; 1(1): 47-56.
16. Kapahi P, Zid BM, Harper T, Koslover D, Sapin V, Benzer S. Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr Biol.* 2004 May 25; 14(10): 885-890.
17. Walker DW, Benzer S. Mitochondrial "swirls" induced by oxygen stress and in the *Drosophila* mutant hyperswirl. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jul 13; 101(28): 10290-10295.
18. Wang HD, Kazemi-Esfarjani P, Benzer S. Multiple-stress analysis for isolation of *Drosophila* longevity genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Aug 24; 101(34): 12610-12615.
19. Brummel T, Ching A, Seroude L, Simon AF, Benzer S. *Drosophila* lifespan enhancement by exogenous bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.*

- 2004 Aug 31; 101(35): 12974-12979.
20. Carvalho GB, Kapahi P, Benzer S. Compensatory ingestion upon dietary restriction in *Drosophila melanogaster*. *Nat Methods*. 2005 Nov; 2(11): 813-815.
21. Walker DW, Muffat J, Rundel C, Benzer S. Overexpression of a *Drosophila* homolog of apolipoprotein D leads to increased stress resistance and extended lifespan. *Curr Biol*. 2006 Apr 4; 16(7): 674-679.
22. Walker DW, Hájek P, Muffat J, Knoepfle D, Cornelison S, Attardi G, Benzer S. Hypersensitivity to oxygen and shortened lifespan in a *Drosophila* mitochondrial complex II mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Oct 31; 103(44): 16382-16387.
23. Ja WW, West AP Jr, Delker SL, Bjorkman PJ, Benzer S, Roberts RW. Extension of *Drosophila melanogaster* life span with a GPCR peptide inhibitor. *Nat Chem Biol*. 2007 Jul; 3(7): 415-419.
24. Cvejic S, Zhu Z, Felice SJ, Berman Y, Huang XY. The endogenous ligand Stunted of the GPCR Methuselah extends lifespan in *Drosophila*. *Nat Cell Biol*. 2004 Jun; 6(6): 540-546.
25. McGarrigle D, Huang XY. Methuselah antagonist extends life span. *Nat Chem Biol*.
26. 森望 Seymour Benzer—Methusekahの夢と足跡、*実験医学* 26 (8) (5月号) 1271-1276, 2008

Molecular genetics of aging in *Drosophila melanogaster*: A lesson from Benzer's laboratory in his closing years

Nozomu Mori

Department of Anatomy and Neurobiology, Nagasaki University School of Medicine,
1-12-4, Sakamoto, Nagasaki 852-8523

Model organisms play critical roles in aging research. It is particularly of importance in exploring the mechanisms of organismal longevity control. Accumulative evidence indicate the presence of a variety of genes being involved directly or indirectly in longevity control have been elucidated by the analyses of mutant worms and flies, i.e., *C. elegans* and *D. melanogaster*. I will discuss about the aging research by Dr. Seymour Benzer at Caltech in his later scientific life; Dr. Benzer was a leading scientist not only in the field of developmental biology and behavior genetics of *Drosophila*, but also in aging research using this model organism. Dr. Benzer explored the battery of genes that are specifically expressed in the head of the adult fly, and revealed many genes that are involved in neurodegeneration and/or longevity control. What can we learn from the studies he produced during his closing years? I will give an overview of the aging research in his later life, and discuss the roles and significance of his studies in the aspect of current research of biomedical gerontology.

Keywords: aging, longevity, molecular genetics, *Drosophila melanogaster*, methuselah

【総 説】

ショウジョウバエをモデルとした老化・加齢性神経疾患の研究

ケミカルジェネティクスによるアプローチ

津田 玲生

国立長寿医療センター研究所 老化機構研究部 生体機能研究室

要約

わが国では、2015年には65歳以上の高齢者が総人口の1/4を越え、2050年には1/3に達すると予想されている。これから超高齢化社会を迎える我が国では、高齢者に多く見られる認知症や老人性難聴といった加齢性神経疾患に対する予防・治療法の確立が求められているが、加齢性疾患の発症には長い時間がかかることから、モデルシステムを使った新たな研究手法の導入が必要であると考えられている。これらのニーズに答えるため、寿命が短く遺伝学的な解析が容易なショウジョウバエが用いられている。最近、遺伝学を用いた詳細な解析に加え、新規研究アプローチとして、化学物質を出発点としたケミカルバイオロジーと遺伝学的解析を組み合わせた、いわゆるケミカルジェネティクスによる研究も展開されはじめている。本稿では老化過程に關与する酸化ストレス応答を中心として寿命制御や神経疾患の発症メカニズムに関して、ショウジョウバエを使った研究を紹介したい。

はじめに

活性酸素は多様な病態に深く關与していると考えられているが、特に老化に関しては、1956年にHarmanにより活性酸素が老化に關与しているのではないかと提唱されて以来、さまざまなシステムを使って検証されてきている[1]。ここでは、ショウジョウバエを用いた研究について紹介し、次に新たな研究手法であるケミカルバイオロジーによる酸化ストレスや老化研究について解説したい。

1. 酸化ストレス応答と老化

1) ROSの産生

強い酸化力を持つ活性酸素種 (Reactive Oxidative Species: ROS) は主に細胞質 (ミトコンドリアを含む) で生成されるが、老化との関係から特に注目されているのはミトコンドリアである。ミトコンドリアでは内膜に存在する呼吸鎖酵素複合体 (複合体I~IV) とATP合成酵素 (複合体V) を介した酸化的リン酸化反応 (酸素呼吸) によりATPが合成されている。このとき、複合体Iによりミトコンドリア内部へ、複合体III

によりミトコンドリア内部および内腔、その結果、細胞質へと活性酸素が放出されている。酸素呼吸に伴い、約5%程度のROSが産生するといわれている。

2) 酸化ストレス関連因子と寿命制御

ショウジョウバエは寿命が短く (8~9週間)、ゲノム配列の研究からヒト疾患関連遺伝子の7割近くが保存されているという推定もあり、ヒト遺伝子疾患のモデル系としても注目されている。これまで、遺伝学的な解析手法を用いて、酸化ストレス関連因子と寿命の關係が詳細に解析されている。

a) Superoxide dismutase (SOD)

CuZnSOD (Sod1)は主に細胞質に存在し、一部ミトコンドリア内腔での存在が確認されている因子で、細胞内部で発生する活性酸素の除去に働いていると考えられている。sod1のnull変異体では寿命が野生型に比較して約85~90%減少していた[2]。さらに、この変異体では酸化ストレスに対して高感受性を示し、雄と雌共にほとんど生殖能力を欠いていることが観察されている。このsod1変異体は、複眼における光受容細胞および色素細胞の変性が観察されていることから、神経疾患との関連が予想されている[3]。

ミトコンドリアに存在するZnSOD (Sod2)についてはDuttaroyらにより変異体が分離され、著しい寿命の短縮とヘテロ個体での酸化ストレス高感受性が観察されている[4]。これらsod1, sod2いずれについても、過剰発現により寿命延長および酸化ストレスに対する抵抗性が観察されている[5]。

b) Glutamate-cysteine ligase

グルタチオンはショウジョウバエや哺乳動物にお

連絡先: 〒474-8522

愛知県大府市森岡町源吾36-3

国立長寿医療センター研究所 老化機構研究部

生体機能研究室

Tel: 0562-46-2311 (内線5114)

FAX: 0562-46-8461

E-mail: ltsuda@nils.go.jp

いて主要な酸化ストレス因子であるが、グルタミン酸システインリガーゼ (Glutamate-cysteine ligase, GCL) はグルタチオン合成における律速酵素である。このGCLの過剰発現の効果が検討され、細胞内グルタチオン濃度の上昇および寿命の延長が確認されている[6]。さらに、面白い事にGCLを神経細胞で特異的に過剰発現させただけで寿命が約50%延長することが示された。このGCLの効果は平均および最長寿命も延ばすことから、神経系における酸化ストレス応答が寿命の制御に関わっていることが強く示唆されている。

c) Apolipoprotein D (ApoD)

ApoDはアラキドン酸やステロール等の膜脂脂肪酸の輸送に関わる因子で、酸化ストレス等でダメージを受けた膜の修復に関わっているのではないかと考えられている。このApoDの過剰発現でも寿命の延長および酸化ストレス抵抗性が確認されている[7]。さらに、ApoDの機能欠損型変異体が単離されており、ApoD変異は過剰発現とは逆に、寿命短縮と酸化ストレスに対する高感受性を示すことが確認されている[8]。ApoDはアルツハイマー病やパーキンソン病の発症に関わっている事が予想されていることから、酸化ストレス応答と加齢性神経疾患の関係においても注目されている。

d) SdhB (ミトコンドリアII型複合体)

SdhBは酸化ストレス条件下で生存率が減少する変異体として同定された[9]。SdhB変異体では、ミトコンドリアのII型複合体の機能が阻害され、ROSの産生が野生型に比べて約30%上昇していることが確かめられている。SdhB変異体では野生型と比較して、寿命の著しい短縮が観察された。さらに、ショウジョウバエは負の重力走性 (Geotactic) を示す性質があり、老化に伴ってこの行動が減少することが解っているが、SdhB変異体ではGeotacticな行動に対しても加齢早期に抑制が見られている。

e) Jun-N-terminal Kinase (JNK)

JNKは哺乳動物における酸化ストレス応答で働くシグナル伝達因子として知られている。WangらはショウジョウバエにおけるJNK活性の変化に伴う遺伝子発現と酸化ストレス応答による遺伝子発現を比較し、非常に類似した遺伝子群が変化していることを明らかにし、酸化ストレス応答におけるJNKの重要性を*in vivo*で確認している[10]。さらに、この論文でWangらはJNKの活性化により個体レベルで寿命延長と酸化ストレスに対する抵抗性の獲得を見いだしている。面白い事に、JNKの活性化による効果は神経細胞特異的であることから、神経細胞における酸化ストレス応答の重要性が予想された。

これらはショウジョウバエを用いた研究のほんの一部にすぎないが、このように酸化ストレスが老化と深く関わっているということが明確に示されている。

3) 老化制御因子methuselahと酸化ストレス応答

先程も述べたように、ショウジョウバエは寿命が短く、老化過程を遺伝的に解析する系として優れている。そこで、これまでに老化制御に影響を与える変異体が多数分離されてきている。単独の変異で寿命に影響を与える因子としては、インシュリンリセプター (InR)、Chico, Foxo等のインシュリンシグナル伝達で機能する因子や細胞膜で働く7回膜貫通型分子Methuselah等が挙げられる[11]。このうちインシュリンシグナル分子については後述することとして、methuselah (*mth*) について解説したい。

*mth*は機能欠損で寿命延長を示す変異体として1998年にBenzer博士の研究室で同定された[12]。ホモ接合体では野生型に比較して約35%寿命の延長が見られ、酸化ストレスに対して抵抗性を示すことが明らかになっている。MthはクラスBのG-蛋白依存性レセプター (GPCRs) をコードしていることから老化制御機構において非常に重要であると考えられ、Mthに対するリガンドや結合分子が生化学的に同定されている。リガンドの同定には*mth*をHEK293に発現させ (HEK-*mth*)、GPCRの活性化に伴うCa²⁺の流入を指標としてスクリーニングが行なわれた[13]。この結果同定されてきたStunted (Sun)はミトコンドリアに存在するF₁F₀-ATP合成酵素のε-サブユニットであることが明らかになった。このSunはミトコンドリアでのATP合成酵素としての機能とは別にミトコンドリアから放出されるGPCRのリガンドとしての機能があると考えられ、このSun-Mthシステムにより個体の寿命および酸化ストレス応答が制御されていると考えられている。さらに、最近、B-タイプGPCRの特徴を考慮して、MthのN末端細胞外ドメインが重要であると予想され、MthのN末端配列に結合するペプチドがmRNAディスプレイ法を利用したハイスループット解析から同定された[14]。同定されてきた18~27アミノ酸からなるペプチド分子はMthに対するアンタゴニストと考えられ、過剰発現によりショウジョウバエ個体の寿命を延長する効果が示されている。これらの結果は、寿命制御因子の同定とそれに続くハイスループット解析系の有効性を示していると共に、比較的低分子量の物質で寿命の制御が可能であることを示唆している。

4) 酸化ストレス応答と老化の分子レベルでの共通性

酸化ストレス応答と老化はどのように関わっているのかは、完全に明らかにされたわけではないが、分子レベルでの解析が進められている。このうちLandlsらはショウジョウバエを使って、酸化ストレスをかけた時に発現変化する遺伝子群と老化に伴い変化する遺伝子群を比較した[15]。その結果、発現上昇する遺伝子の35% (97/276)、発現抑制される遺伝子の21% (154/728) が共通していることを見いだしている。このことから、老化制御と酸化ストレス応答には共通した分子メカニズムが存在していることが予想され、両過程に関わるシグナル伝達の間には密接な関係があることが示唆されている。

酸化ストレス応答に作用するシグナル伝達としては

上述したJNKシグナル伝達があるが、WangらはJNKの活性化による寿命延長効果がインシュリンシグナル伝達の下流で働くFoxoに依存的であることを突き止め、JNKの活性化によるFoxoの核内移行を*in vivo*で確認している[10,16]。このことから、FoxoはJNKシグナルの下流で機能して老化や酸化ストレス応答を制御していると考えられている。

インシュリンシグナル伝達以外に進化上保存された寿命制御因子としては、SIRTファミリー分子がある。ショウジョウバエSIRTファミリー分子であるSir2でも過剰発現で寿命延長効果を示し、機能欠損ではカロリー制限依存的な寿命延長を抑制することが確認されている[17]。Sir2はNAD依存性脱アセチル化酵素群であるが、最近、哺乳類Sir2の基質の一つがFoxo3aであることが示され、Sir2とFoxoが同じ機能に関与していることが示唆されている[18]。これらのことから、JNK、Foxo、Sir2という分子は相互に関連しながら寿命制御や酸化ストレス応答に働いていることが予想されている[19]。

ミトコンドリアの機能調節に伴って産生されるROSがどのように細胞内で働いているかはあまりわかっていないが、最近、興味ある結果がカリフォルニア大学Banerjee博士の研究室から報告されている。かれらは、ショウジョウバエの複眼を使って、細胞周期のG1期からS期への移行に異常を示す変異体をスクリーニングして、ミトコンドリアI型複合体Pds^wとVI型複合体cytochrome c oxidaseVa (CoVa)の変異体を得た。解析の結果、Pds^wではROSの産生が増加し、ASK1-JNK-Foxoの経路を介して*dacapo* (p27ホモログ)の過剰発現が生じていることを明らかにしている[20]。一方、CoVa^wではROSの産生に異常はなく、ATPの産生が減少していた。この結果、AMP濃度が上昇することによりAMPK-p53経路の活性化が起こり、最終的にcycEの分解が促進されていることが示されている[21]。このことから、ミトコンドリアの機能欠損によるG1チェックポイントの活性化には2つの異なった経路が存在することが明らかになった。さらに、この結果はミトコンドリア機能調節の結果産生されたROSやAMPは、低濃度では細胞内シグナル伝達を介した細胞機能調節に働くことを示唆している。

2. 加齢性神経疾患と酸化ストレス

パーキンソン病やアルツハイマー病等の認知症や老人性難聴において、疾患の発症と酸化ストレス応答との関係がわかってきている。ショウジョウバエでは、これらの疾患を研究するモデルシステムが確立されてきているが、ここではパーキンソン病についての解析結果を取り上げたい。常染色体劣性遺伝型若年性パーキンソン病の家系の遺伝子解析から同定されたParkin遺伝子は、N末端にユビキチン様ドメインをC末にRINGフィンガードメインを持つ蛋白質をコードしている。この*parkin*のショウジョウバエホモログ (*parkin*) の変異体が単離され、表現型が解析された。その結果、*parkin*変異体では寿命

が減少し、酸化ストレスに対する高感受性を示すことが明らかにされている[22]。さらに、この時の作用メカニズムとして*parkin*が酸化ストレスシグナルであるJNKシグナル伝達に対して抑制的に働いていることが示されていることから、パーキンソン病における神経変性の表現型に酸化ストレス応答が関わっているのではないかという、従来の予想が支持されている[23]。さらに、劣性遺伝形式の若年性パーキンソン病の原因因子として同定されたPINK1についてもショウジョウバエホモログが単離され、*parkin*と非常に類似した表現型を示すことが明らかにされている[24]。

ショウジョウバエの系においてパーキンソン病と酸化ストレス応答の関係を示唆するもう一つの報告は、ショウジョウバエのドーパミン作動性神経が酸化ストレス応答に対して高感受性であることが明らかにされた[25]。ショウジョウバエでは、パラコートに餌に混入するだけで酸化ストレスを全身性に作用させることができる。このとき、パラコートに高感受性の組織が脳内にあるドーパミン作動性神経だということが示された。ドーパミン作動性神経は、上述したGeotacticな行動等を制御していることから、後述するようなパラコートに対する感受性のスクリーニングにおいて、Geotacticな行動を指標に選別することによりパーキンソン病の発症に関わる現象が見いだされる可能性が期待される。

3. ケミカルバイオロジーによるアプローチ

これまで見て来たように、ショウジョウバエ遺伝学を用いて老化制御における酸化ストレス応答の機能が詳細に解析されてきているが、解析手法としては、機能欠損変異体の同定と機能解析といういわゆるフォワードジェネティクスあるいは酸化ストレス関連因子について過剰発現やRNAiの手法を使ったリバースジェネティクスである。最近、これらの手法を相補する形で、化学物質を出発点としたケミカルバイオロジー (chemical biology, 化学生物学) による研究アプローチが注目されている。

1) レスベラトロール (Resveratrol, RSV)

ケミカルバイオロジーが寿命の研究に使われるきっかけとしては、2003年に報告された酵母を使った寿命制御に関わる化学物質のスクリーニングの論文があげられる[26]。Howitzらは、出芽酵母を用いスクリーニングから赤ワインに多く含まれるポリフェノールであるレスベラトロール (Resveratrol, RSV) に寿命延長効果がある事を明らかにした (Howitzら, 2003年)。RSVの作用機序の一つとしては、寿命制御に働く脱アセチル化酵素であるSIRTファミリー分子に直接結合して活性化させていることが明らかにされている[27]。最近の研究では、RSVは酵母ばかりではなく、哺乳動物に対してもカロリー制限下での寿命の制御に関わっていることが明らかにされるとともに、加齢性神経疾患に対しても抑制効果を示すことが報告されている[28, 29]。これらの結果は、薬剤を出発点としたケミカルバイオロジーによる研究から寿命や加齢性神経疾

患の発症メカニズムにも迫れる可能性を示唆している。従って、RSVの研究は、これからの研究の一つの方向性を示しているといえる。フォワードジェネティクスによる解析では、表現型を持つ突然変異の同定を出発点として、原因因子そしてメカニズム解析へと向かって行く研究の流れが、ケミカルバイオロジーでは低分子量の化学物質の同定を出発点として、遺伝学的に作用機序の解明を行なっていくという流れになっている。このように、ケミカルバイオロジーと遺伝学を組み合わせた研究アプローチはケミカルジェネティクスとよばれ、1990年代半ばにハーバード大学のSchreiber博士によって提唱されてきた[30]。このアプローチのひとつの方向性として、特定の表現型を示す化合物をスクリーニングより見だし、つぎにその標的分子（結合蛋白質）を決定してこの蛋白質の生体内における機能を遺伝学的に解明するという手法である。これは、表現型を持つ化合物の同定を出発点とした、いわゆる“フォワードケミカルジェネティクス (Forward Chemical Genetics)”と考えられ、免疫抑制効果を示すシクロスポリンAやFK506の発見がのちのイムノフィリンの発見と機能の解明につながったこ

とを契機として、この手法の価値が広く認識されている[31]。この手法では、複数機能を持つ因子でも同定される可能性を持ち、標的分子の機能調節（濃度変化等で）が可能になるという特徴を持っている。

筆者らは、このフォワードケミカルジェネティクスのアプローチを使って、寿命、酸化ストレスそして加齢性神経疾患の研究を行なっている。ここでは、筆者らが行なっている研究の一部を紹介したい。

2) RSVによる酸化ストレス抑制と寿命延長

ショウジョウバエは寿命が短いとはいえ、8~9週もあるので、寿命を指標にしたケミカルバイオロジーのスクリーニング系の確立は困難である。そこで、より短期間でスクリーニングが行なえる系として酸化ストレス応答に注目した。上述のように酸化ストレス応答は寿命や加齢性神経疾患の発症にも密接に関わっていることから、酸化ストレスを指標にしたスクリーニング系でも、寿命や加齢性神経疾患の発症にかかわる因子の少なくとも一部の同定は可能であると考えた。まず、コントロールとして前述のRSVを用いることによりアッセイ系の確立を行なった。酸化ストレス源としてはパラコート (7.5mM) を餌に混入させて作用させ

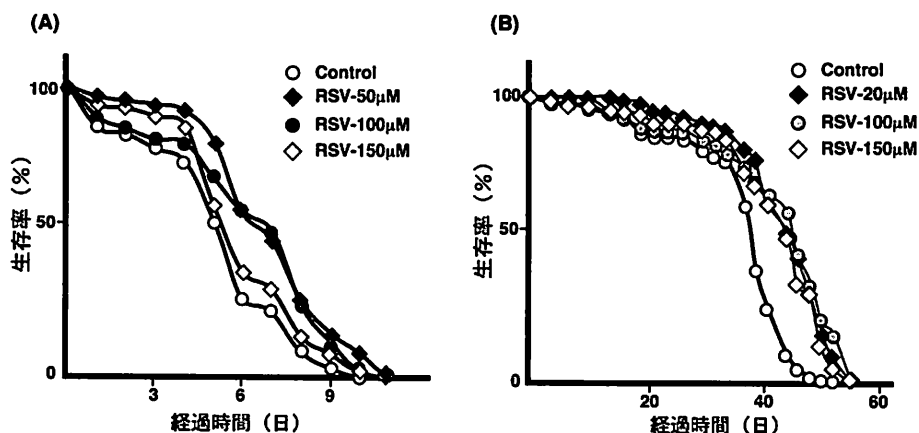


図1 レスベラトロール (RSV) による酸化ストレス応答抑制および寿命延長効果
 (A) パラコート入り (7.5mM) の培地にレスベラトロール (RSV) を各濃度(0~150μM)混入して雄の生存数 (パラコート処理後の) をカウントした(n=160)。
 (B) 餌にレスベラトロール (RSV) を各濃度 (0~150μM) 混入して雄の生存数 (羽化後の) をカウントした(n=160)。

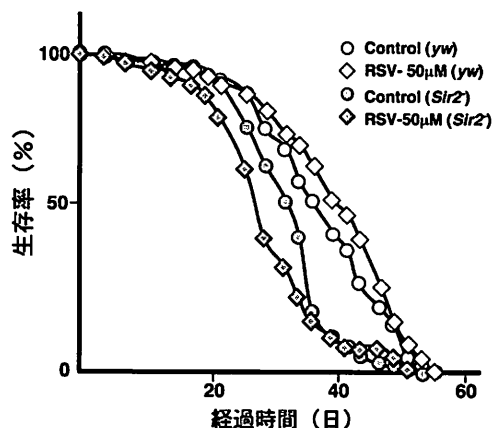


図2 Sir2 null変異体におけるレスベラトロール (RSV) の寿命延長効果
 餌にレスベラトロール (RSV) を混入 (0あるいは50μM)して雄の生存数 (羽化後の) をカウントした(n=160)。
 $yw=y^1, w^{1118}$
 $Sir2=yw; Sir2^{17-2}/Df(2L)BSC30$

たところ、図1のようにパラコート依存的な生存率の減少がRSVの混入(50~100 μ M)により約20%抑制されることが確かめられている(図1A)。さらに、ショウジョウバエの寿命に対してもRSVは約20%の延長効果を示した(図1B)。

3) 遺伝学を用いた作用点の解析

RSVの作用としては、Sir2に依存していることが予想されていることから、Sir2の変異体におけるRSVの作用を検討した。この系で、Sir2変異体は野生型に比較して寿命が若干短くなる(図2)。これにRSVを作用させても、野生型でみられたような寿命延長効果が見られなくなることが確かめられた(図2)。このようにRSVの作用としてSir2に依存していることが確認できたが、これからのスクリーニング系を確立するために、さらに詳しい遺伝的な解析を行なった。Sir2の作用としては、先程も述べたようにFoxoの機能と関連していることが予想される[19]。図3に示すようにFoxoの変異体では酸化ストレス高感受性および寿命短縮が観察される(図3A,B)。これに、RSVを投与しても抑制効果が見られないことが確認できた(図3A,B)。さ

らに、Foxoの下流で機能するd4E-BPの変異体についても同様な作用を検討した結果、RSVの効果が失われることが確認できている(データは示さない)。

以上の結果から、RSVの作用が遺伝的に分離されることが確認できた。そこで、酸化ストレスを指標として、化合物ライブラリーや天然物ライブラリーから生理活性を持つ物質の同定が可能であると考えた(図4)。これまでに、天然物から酸化ストレス応答抑制を示す複数物質の同定に成功している。これらの中には、寿命延長効果を示し、RSVと同様にSir2やFoxoの変異体に対しては作用を示さないものを確認している[投稿準備中]。

4) 作用機序解析

このスクリーニングから得られてきた物質の作用機序を解明するためには、この物質に結合する標的蛋白質の同定が必須である。低分子量の化合物に対する結合蛋白質の同定法は、最近、アフィニティーを利用した方法やmRNAディスプレイ法等さまざまな手法が工夫されてきており、これらについては他の総説や原著論文等を参照していただきたい[32,33,34]。ここで

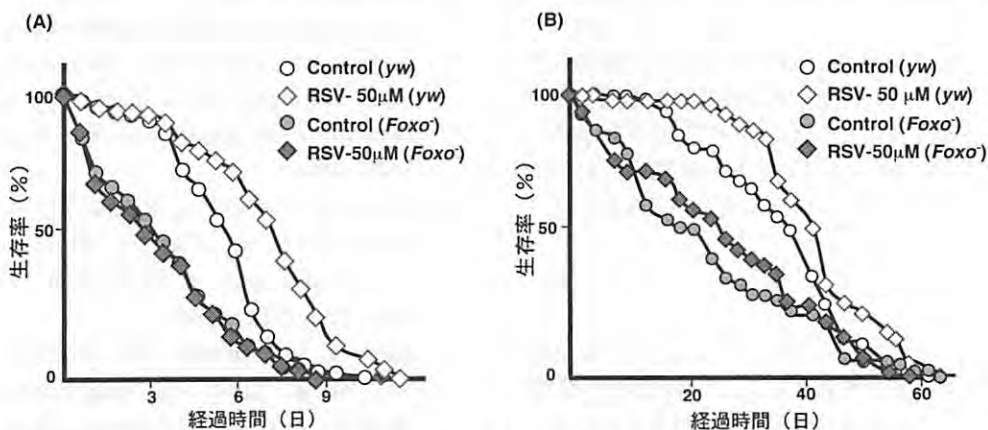


図3 Foxo null変異体におけるレスベラトロール (RSV) の酸化ストレス抑制および寿命延長効果
(A) パラコート (7.5mM) 入りの培地にレスベラトロール (RSV) を混入 (0 or 50 μ M) して雄の生存数 (パラコート処理後の) をカウントした(n=160)。
(B) 餌にレスベラトロール (RSV) を混入 (0 or 50 μ M) して雄の生存数 (羽化後の) をカウントした(n=160)。
 $yw=y^1, w^{1118}$
 $Foxo^1=yw, Foxo^{25}/Foxo^{21}$

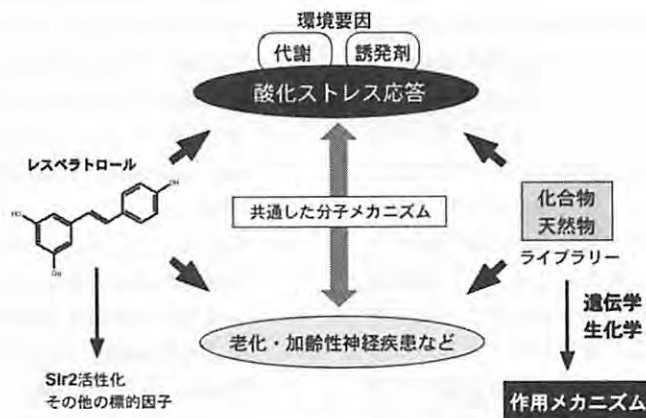


図4 ケミカルバイオロジーによる老化・加齢性神経疾患の研究アプローチ
レスベラトロールは酸化ストレス応答の抑制および寿命延長効果を示す。この結果に基づいて、化合物・天然物ライブラリーから、この両過程に働く未知の化学物質を同定し、作用機序を生化学および遺伝学を用いて解明することにより、寿命や酸化ストレス応答におけるメカニズム解明が期待できる。

は、ショウジョウバエを用いたケミカルバイオロジー研究の利点について考えてみたい。低分子量の化合物に対する結合蛋白質を同定する場合、アフィニティーカラムを作成して細胞あるいは組織から候補因子を同定してゆくという流れになる。この場合、アフィニティーカラムの効率にもよるが、候補因子として複数の蛋白質が同定される場合が予想される。マウスでは複数因子を検定するには、かなりの時間と労力を必要とするのに対して、ショウジョウバエは、寿命が短く、既存の変異体や発現可能なRNAi等の手法を用いる事により複数因子の検定を同時に進めることができる。

筆者らはフォワードケミカルジェネティックスの次のステップとして、同定した化合物に対する結合蛋白質の検索を開始している。生化学と遺伝学を組み合わせた解析から、寿命や酸化ストレス応答に対する新規の調節メカニズムに迫って行けることを期待している(図4)。

先程も説明したように、ショウジョウバエではパラコートに高感受性の組織としてドーパミン作動性神経が見つまっている[25]。このスクリーニングではパラコートに対する感受性を指標にして化合物の検索を行なうことから、同定されてきた化合物の中にはパーキンソン病の発症を抑制するものが含まれる可能性も予想される。筆者らは、同定した化合物が加齢性神経疾患の発症に影響するかどうかについてアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞踏病のショウジョウバエによるモデルシステムを用いて検討している。

今後の展望

レスベラトロールの例から考えると、このアプローチで同定される化学物質の性質として、生体内因子の活性化に働くものが存在する可能性が期待される。これは、機能欠損型変異を主体とするフォワードジェネティックスと大きく異なる点で、遺伝学的な解析では同定されなかった因子やredundantな機能がある因子等の同定がこのアプローチでは期待できる。

本研究ではショウジョウバエを用いて、老化・酸化ストレス・加齢性神経疾患の発症抑制に働く薬剤の同定を中心に進めるが、興味としてはヒトを含む哺乳動物にたいしても作用を持つかどうかという点である(図4)。レスベラトロールのように種を超えて機能する薬剤も存在するが、全ての薬剤が種を超えて機能するわけではないと考えられる。これについては、ケミカルバイオロジー研究の一つの特徴として、低分子量化合物と標的因子との結合を中心として研究が行なわれることから、構造活性相関やハイスループット解析系に発展することにより種の問題は解決すると思われる。実際にハイスループット解析系に発展した例としては、SIRT1結合物質のスクリーニングから、SIRT1に対してRSVより1000倍も強力に結合する低分子化合物が同定され、これがII型糖尿病を抑制することが示されている[35]。これは、RSVによるSIRT1への結合と活性化という事実に基づいて行な

われた研究で、ケミカルジェネティックスによる解析結果自体が新たな創薬につながっていく可能性を示している。

天然物ライブラリーによる研究は名古屋大学大学院生命農学研究科、大澤俊彦博士との共同研究で行なっている。またショウジョウバエを使ったケミカルバイオロジーは国立長寿医療センター研究所、老年病研究部・丸山和佳子部長との共同研究で行いました。この場をお借りして深謝いたします。

引用文献

1. Harman D, Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11: 298-300, 1956.
2. Phillips JP, Campbell SD, Michaud D, et al. Null mutation of copper/zinc superoxide dismutase in *Drosophila* confers hypersensitivity to paraquat and reduced longevity. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2761-2765, 1989.
3. Phillips JP, Tainer JA, Getzoff ED, et al. Subunit-destabilizing mutations in *Drosophila* copper/zinc superoxide dismutase: neuropathology and a model of dimer dysequilibrium. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8574-8578, 1995.
4. Duttaroy A, Paul A, Kundu M, et al. A Sod2 Null Mutation Confers Severely Reduced Adult Life Span in *Drosophila*. *J Biol Chem* 165: 2295-2299, 2003.
5. Spencer CC, Howell CE, Wright AR. Testing an 'aging gene' in long-lived drosophila strains: increased longevity depends on sex and genetic background. *Aging Cell* 2: 123-130, 2003.
6. Orr WC, Radyuk SN, Prabhudesai L, et al. Overexpression of glutamate-cysteine ligase extends life span in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 280: 37331-37338, 2005.
7. Walker DW, Muffat J, Rundel C, et al. Overexpression of a *Drosophila* homolog of apolipoprotein D leads to increased stress resistance and extended lifespan. *Curr Biol* 16: 674-679, 2006.
8. Sanchez D, Lopez-Arias B, Torroja L, et al. Loss of glial lazardillo, a homolog of apolipoprotein D, reduces lifespan and stress resistance in *Drosophila*. *Curr Biol* 16: 680-686, 2006.
9. Walker DW, Hájek P, Muffat J, et al. Hypersensitivity to oxygen and shortened lifespan in a *Drosophila* mitochondrial complex II mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 16382-16387, 2006.

10. Wang MC, Bohmann D. and Jasper H. JNK Signaling Confers Tolerance to Oxidative Stress and Extends Lifespan in *Drosophila*. *Dev Cell* 5: 811-816, 2003.
11. Aigaki T, Seong KH, Matsuo T. Longevity determination genes in *Drosophila melanogaster*. *Mech Ageing Dev* 123: 1531-1541, 2002.
12. Lin YJ, Seroude L, Benzer S. Extended lifespan and stress resistance in the *Drosophila* mutant methuselah. *Science* 282:943-946, 1998.
13. Cvejic S, Zhu Z, Felice SJ, et al. The endogenous ligand Stunted of the GPCR Methuselah extends lifespan in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 6: 540-546, 2004.
14. Ja WW, West AP Jr, Delker SL, et al., Extension of *Drosophila melanogaster* life span with a GPCR peptide inhibitor. *Nat Chem Biol* 3: 415-419, 2007.
15. Landis GN, Abdueva D, Skvortsov D, et al. Similar gene expression patterns characterize aging and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 7663-7668, 2004.
16. Wang MC, Bohmann D, Jasper H. JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling. *Cell* 121:115-125, 2005.
17. Rogina B, Helfand SL. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15998-16003, 2004.
18. Brunet A, Lora B, Sweeney J, et al. Stress-Dependent Regulation of FOXO Transcription Factors by the SIRT1 Deacetylase. *Science* 303:2011- 2015, 2004.
19. Giannakou ME and Partridge L. The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival. *Trends Cell Biol* 14: 408-412, 2004.
20. Owusu-Ansah E, Yavari A, Mandal S, et al. Distinct mitochondrial retrograde signals control the G1-S cell cycle checkpoint. *Nat Genet* 40: 356-361, 2008.
21. Mandal S, Guptan P, Owusu-Ansah E, et al. Mitochondrial regulation of cell cycle progression during development as revealed by the tenured mutation in *Drosophila*. *Dev Cell* 9: 843-854, 2005.
22. Pesah Y, Pham T, Burgess H, et al. *Drosophila parkin* mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress. *Development* 131: 2183-2194, 2004.
23. Cha GH, Kim S, Park J, et al. Parkin negatively regulates JNK pathway in the dopaminergic neurons of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 10345-10350, 2005.
24. Clark IE, Dodson MW, Jiang C, et al. *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 441: 1162-1166, 2006.
25. Chaudhuri A, Bowling K, Funderburk C, et al. Interaction of Genetic and Environmental Factors in a *Drosophila* Parkinsonism Model. *J Neurosci* 27: 2457-2467, 2007.
26. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425: 191-196, 2003.
27. Baur JA and Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nat Rev Drug Discov* 5: 493-506, 2006.
28. Parker JA, Arango M, Abderrahmane S, et al., Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons. *Nat Genet* 37: 349-350, 2005.
29. Baur JA, Pearson KJ, Price NL. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444: 337-342, 2006.
30. Schreiber SL. "Chemical genetics resulting from a passion for synthetic organic chemistry". *Bloorg Med Chem* 6: 1127-1152, 1998.
31. Schreiber SL. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* 251: 283-287, 1991.
32. 大和隆志、小田吉哉 創薬研究におけるケミカルスペースの開拓、タンパク質・核酸・酵素 50: 1063-1069, 2005.
33. Sato S, Kwon Y, Kamisuki S, et al. Polyproline-rod approach to isolating protein targets of bioactive small molecules: isolation of a new target of indomethacin. *J Am Chem Soc* 129: 873-880, 2007.
34. Takahashi TT, Austin RJ & Roberts RW. mRNA display: ligand discovery, interaction analysis and beyond. *Trends Biochem Sci* 28: 159-165, 2003.
35. Milne JC, Lambert PD, Schenk S. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* 450: 712-716, 2007.

Chemical Genetics using *Drosophila* for studying age and age-related neuronal diseases

Leo Tsuda

National Institute for Longevity Sciences

36-3 Gengo, Morioka-Cho, Obu, Aich 474-8522

A growing body of evidence suggests that oxidative stress is a common underlying mechanism in the pathogenesis of age-related neuronal diseases such as Alzheimer's and Parkinson's diseases, and also presbycusis (hearing impairment with age). The fruit fly *Drosophila melanogaster* is one of the principal model organisms used for studying the biology of oxidative stress as a life-span determinant. Flies are well suited for such studies for a number of reasons. Flies develop to adulthood quickly, have a relatively short life span, and are inexpensive to house. Most fly genes have obvious homologues in mammals. Here, I review a recent progress of oxidative stress analysis in the ageing process using *Drosophila* genetics and common mechanisms that influence oxidative stress and longevity in flies. While the majority of aging studies in flies have been using genetic analysis, especially forward genetics, the fly is emerging as a powerful model system for chemical biology to study ageing and age-related neuronal diseases. In this review, I also tried to provide our recent progress about ageing study using small chemical compounds as a start point.

Keywords: oxidative stress, anti-ageing, lifespan, chemical biology, fruit fly

【総 説】

カロリー制限による寿命延長・抗老化機構
—神経内分泌仮説に基づく代謝調節の重要性—

千葉 卓哉、山座 治義、下川 功
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・探索病理学

要約

実験動物に対するカロリー制限(calorie restriction, CR)は様々な老化病態の発症を遅延させ、寿命を延長させる最も確実な介入方法である。CRの抗老化効果は酵母などの下等生物から、齧歯類などの高等生物に至るまでよく再現され、現在進行中のアカゲザルなどの霊長類に対する研究からも、その効果が実証されつつある。CRの抗老化作用には、神経内分泌系因子の発現変化が重要であることが示唆されている。なかでもレプチンにより負の制御を受けるneuropeptide Y(NPY)はCRによって発現が上昇し、下流の神経細胞群の活性調節に中心的な役割を担っていることが示唆されている。すなわちNPYの発現上昇が限られたエネルギーの利用を効率化させ、全身の代謝調節を変化させることで抗老化作用をもたらすという仮説である。レプチンシグナルの欠損はNPY発現を亢進させるが、そのような動物に対するCRはNPY発現をさらに増強させる。このことは、肥満を促進するような遺伝子変異はCRに対してより適応力が高いことを示唆しているのかもしれない。

1. はじめに

カロリー制限(calorie restriction, CR)による寿命延長効果の発見は、今から70年以上前にMcCayらのラットをもちいた報告によってなされた。その後、飼育条件等をより厳密にした追試が数多くなされ、特に齧歯類をもちいた研究により、その再現性が確認されている。自由摂食(*ad libitum*, AL)群に対して30-40%カロリーを制限したCR群は寿命が延長し、様々な老化指標の改善が見られる[1]。CRによる寿命延長に関与する分子はまだ同定されていないが、神経内分泌系因子を介した全身の代謝調節が重要であることが示唆されている[2]。なかでも、インスリン/インスリン様成長因子-I(insulin-like growth factor I, IGF-I)、レプチンなどが重要な役割を果たしていることが示唆されている[3-6]。

進化論的立場からCRの抗老化効果は、食物不足に対して生物が神経内分泌系および代謝系を適応させ、生存の可能性を最大限に高めるシステムを獲得する形で進化してきたと考えられている[7]。食物が豊富にある状態では生物は過剰なエネルギーをトリグリセリド(triglyceride, TG)の形で脂肪組織に蓄え、後に食物不足

に陥り、外からエネルギーを摂取することができなくなった場合に備えている[8]。グルコースをグリコーゲンとして肝臓に蓄えることのできる量は限られているが、TGを脂肪組織に貯蓄しておく許容量は事実上、無制限である。儉約遺伝子(thrifty gene)に変異を持つと脂肪を蓄える能力が高く、食物不足に対する適応力が高い場合が多いが、一方、現代社会においては先進国におけるヒトでの肥満や糖尿病、メタボリックシンドロームの発症リスクの増加に関与している可能性が示唆されている[9-11]。儉約遺伝子としての候補遺伝子は多数報告されているが[12]、その中でもレプチンシグナルが最も重要視されている[13]。すなわちレプチンシグナルの低下はエネルギー消費を抑え、脂肪組織を増加させ、生体の代謝を儉約型(節約型)にシフトさせる。本稿ではレプチンシグナルを中心として、CRの抗老化作用における神経内分泌系の関与について、我々の最近の研究結果を基に論じる。

2. レプチン

脂肪細胞から分泌される抗肥満ホルモンであるレプチンは、視床下部弓状核に作用することで摂食を抑制し、エネルギー代謝を亢進させる[14]。またレプチンは脂肪組織に直接作用し、脂肪分解に重要な役割を果たしている[15]。これらのことから、レプチンシグナルが欠損した場合は、逆に摂食が亢進し、エネルギー消費を低下させ、体脂肪を増加させることで肥満をもたらす。すなわち、レプチン遺伝子を欠損した*ob/ob*マウス、およびレプチン受容体を欠損した*db/db*マウスは高度な肥満を示す。

連絡先: 〒852-8523

長崎市坂本1-12-4

長崎大学 大学院 医歯薬学総合研究科・探索病理学

Tel: 095-819-7050

FAX: 095-819-7052

E-mail: takuya@nagasaki-u.ac.jp

しかし、それらの変異をヘテロに持つ*ob/+*, *db/+*マウスは、正常対照群と比較して絶食に対してより強い耐性をもつ[16]。つまり、実験室における自由摂食条件下のような餌が豊富にある状況では、レプチンシグナルの低下は肥満を招くが、一方、野生における慢性的な食物不足に対する適応力は高いことが示唆される。従って、儉約遺伝子に変異をもつことは飢餓に対する耐性が増すことでHolidayの仮説[7]と合致し、CRの効果を増強することが示唆される。

レプチンは絶食等の短期的なシグナルとしても[17]、CR下におかれているような長期的なシグナルとしても[6]、全身のホルモンバランスを調節する因子として作用している。すなわち、絶食およびCRによって血中レプチン濃度は有意に低下する。レプチンには数種類の受容体が存在するが、その中でもlong form受容体(Ob-Rb)が重要な役割を担っていると考えられている[8]。Ob-Rbは摂食行動やエネルギー代謝に重要な視床下部において高発現している[14]。視床下部弓状核において、摂食やエネルギー代謝を拮抗的に制御している2つの神経細胞群の存在が示されている[17]。一つはneuropeptide Y (NPY)およびagouti-related peptide (AgRP)を産生している細胞群であり、もう一方はproopiomelanocortin (POMC)およびcocaine and amphetamine-regulated transcript (CART)を産生する細胞群である。血中レプチン濃度の低下によりNPY/AgRP神経細胞群は活性化され(抑制が解除され)、POMC/CART神経細胞群は活性が低下する。これらの神経細胞は視床下部の他の神経核

中にも軸索をのぼしている。NPYはgonadotropin(GnRH)神経細胞とthyrotropin-releasing hormone(TRH)神経細胞を抑制し、corticotropin-releasing hormone(CRH)神経細胞を活性化することが知られている[18]。またNPY/AgRP神経細胞群はレプチン以外にも、インスリンによる負の制御と、消化管由来ホルモンであるグレリンによる正の制御を受けていることがわかっている[4]。これらのことから、我々はCR下におけるレプチン濃度の低下が、生殖などを抑制して限られたエネルギーの消費を抑え、その結果、体細胞の維持にエネルギーを集中させることで寿命の延長、老化の抑制に重要な役割を果たしているのではないかとこの仮説を提唱した[6, 18, 19]、図1。

3. CR下における神経内分泌系の変化

前述の仮説の基づき、我々はラットの視床下部弓状核における遺伝子発現を解析した。その結果、ALラットと比較してCRラットでは血中レプチン濃度が低く、NPY/AgRPのレベルはPOMC/CARTに対して高いことが明らかとなった[20]。このことからCR下における神経内分泌系の変化にはレプチンシグナルの低下が重要であることが示唆された。次に、浸透圧ポンプをもちいてレプチンをCRラットの第三脳室内に投与し、神経内分泌系因子の発現変化を解析した。その結果、CRによって発現が増加したNPY/AgRPは、レプチン投与によりAL群の発現レベルにまで低下することを明らかにした[21]。このことから、CRによる血中レプチンレベルの

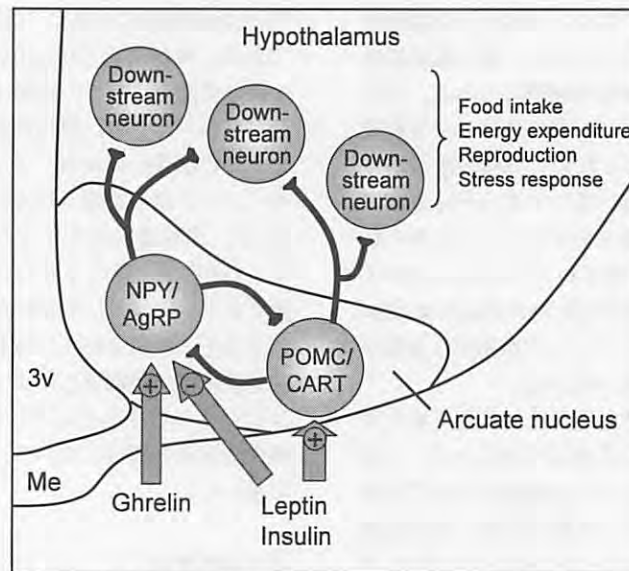


図1 視床下部神経細胞群の制御機構とカロリー制限(CR)による変化

視床下部弓状核に存在するNPY/AgRPおよびPOMC/CART神経細胞群は、互いに拮抗して活性を制御するとともに、下流の神経細胞群の活性に影響を与え、摂食行動、エネルギー消費、生殖、ストレス応答、グルコースホメオスタシスなど様々な生理的機能を調節している。レプチン、インスリンはNPY/AgRP神経細胞群の活性を抑制し、POMC/CART神経細胞群を活性化する。また、グレリンはNPY/AgRP神経細胞群を活性化する。一方、CR下では、血中レプチン、インスリン濃度が低下することでNPY/AgRP神経細胞群の抑制が低下し、同時にPOMC/CART神経細胞群の活性化を抑制する。さらにグレリン濃度が上昇することでNPY/AgRP神経細胞群を活性化する。これらの末梢由来ホルモンの変化により、CR下ではNPY/AgRP神経細胞群が強く活性化される。そのシグナルは視床下部の他の神経核に伝わり、摂食行動の亢進(ただしCR下では食餌は限られている)、エネルギー消費の抑制、生殖の抑制、ストレス応答の亢進がもたらされる。このような神経細胞群の活性変化が引き金となり、生存に有利な状況に代謝をシフトさせることが、CRによる抗老化作用に重要な役割を持つと示唆される。

3v: third ventricle, AgRP: agouti-related peptide, CART: cocaine and amphetamine-regulated transcript, Me: median eminence, NPY: neuropeptide Y, POMC: proopiomelanocortin, +: activation, -: suppression.

低下が、NPY/AgRP神経細胞を活性化し、寿命や老化抑制に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。実際、NPYトランスジェニックラットの寿命は対照群と比較して延長することが報告されている[22]。

CRは血中レプチンおよびインスリンレベルの低下とグレリンレベルの上昇をもたらす[21]。従ってレプチンシグナルのみが、NPY/AgRP神経細胞群の活性化に重要というわけではないと考えられる。そこで次に我々は、Ob-Rbに変異を持ち、レプチンシグナルを欠損し、インスリン抵抗性を伴う肥満モデルラットであるZuckerラット(*fa/fa*, obese; +/+, lean)をもちいて、レプチンおよびインスリン抵抗性下におけるCRの影響を解析した。その結果、興味深いことにCRは*fa/fa*ラットのインスリン抵抗性を改善しなかったにもかかわらず、視床下部弓状核におけるNPYの発現を増強させた(未発表)。このことは*fa/fa*ラットにおいてはレプチン非依存性のNPY発現制御機構が存在することを示唆している。また、視床下部弓状核におけるグレリン受容体の発現は、*fa/fa*ラットでは+/+ラット比較して有意に高く、グレリンシグナルの増強が、CRを行った*fa/fa*ラットのNPY発現制御に重要な役割を担っている可能性が示唆されたが、他の未知の因子が関与している可能性も否定できない。一方、+/+ラットにおいてはCRによるレプチン、インスリンレベルの低下がNPYの発現亢進に重要であることが示唆された。これらの結果は、レプチンおよびインスリン抵抗性下においてのみ、NPYの発現を制御する他の重要な因子が存在することを示唆している。

4. エネルギー代謝

末梢組織では肝臓が、生体の恒常性を維持するためのエネルギーバランスの制御に重要な役割を担っている。絶食により、肝臓では糖新生の活性化と脂肪酸のβ酸化を活性化させる。前者は低血糖を抑制するために重要であり、後者は糖の代替エネルギーであるケトン体を産生するための重要な反応を担っている。ケトン体は低血糖状態においては、脳や骨格筋に対する重要なエネルギー源である[23]。この炭水化物から脂質へのエネルギー利用のシフトはインスリンの低下とグルココルチコイドの増加によって制御されている[24]。我々のDNAアレイをもちいた研究から、CRは摂食後の肝臓における脂肪

酸合成を活性化し、摂食前においてはミトコンドリアβ酸化系酵素の遺伝子発現を活性化させることが示唆された[25]。さらに、この発現変化はperoxisome proliferator-activated receptor α(PPARα)による制御を受けていることが示唆された。

転写のコアクチベーターであるPPARγ coactivator-1α (PGC-1α)はPPARαの転写も活性化し、特に肝臓における代謝の調節に重要な役割を担っている[26]。CRはPGC-1αの発現を亢進させることから、CRによる抗老化作用やストレス耐性の増強に重要な役割を担っていることが示唆されている[27, 28]。我々の結果からはCRによるPGC-1αの発現上昇はインスリン非依存性(ただし*fa/fa*ラットはインスリンシグナルを完全に欠損しているわけではない)に見られることが示唆された。すなわち*fa/fa*ラットにおいてもCRによるPGC-1αの発現上昇、およびそれに伴う標的遺伝子の活性化が、+/+ラットと同様に見られた。さらに興味深いことに、CRによるPGC-1αの発現上昇は摂食後にも摂食前においても見られたが、PGC-1αの標的遺伝子の活性化は摂食後ではALラットと比較して発現に変化が見られないか、または減少傾向にあったが、摂食前においては活性化される傾向が示された(表1)。このことからCRの摂食後においては、PGC-1αの活性を抑制する因子が存在し、摂食前においてはこの抑制が解除され、PGC-1αの標的遺伝子の発現が亢進するものと考えられた。この抑制因子としてはsterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1)の関与が示唆されるが[25]、まだ不明な点が多い。PGC-1αはリン酸化、アセチル化などの翻訳後修飾を受けてその活性が制御されている。CRによるPGC-1αの活性制御機構を明らかにすることで、CRによる代謝調節、さらにストレス耐性との関連を今後詳しく検討していく必要があると考えられる。

5. アディポカインと白色脂肪組織

近年、白色脂肪組織はレプチンをはじめとする様々なホルモン様因子、アディポカインを分泌する内分泌器官として再認識されている[4, 24]。その中でもアディポネクチンは抗肥満、抗炎症性アディポカインと考えられ、現在最も注目されているアディポカインのひとつである[29]。我々は、ラットにおいてアディポネクチンが

表 1. 肝臓における代謝関連遺伝子のカロリー制限(CR)による発現変化とレプチン受容体欠損の影響

	(+/+)-CR		(fa/fa)-CR	
	摂食後	摂食前	摂食後	摂食前
糖新生	↓	↗	↓	↗
ミトコンドリア生合成	→	↗	→	↗
ミトコンドリアβ酸化	→	↑	→	↑

CRによってPGC-1αの発現が上昇したが、その標的遺伝子の発現は摂食後には抑制されるか、または変化が見られなかったが、摂食前には活性化される傾向が見られた。レプチン、およびインスリン抵抗性の*fa/fa*ラット(obese)においても+/+ラット(lean)と同様な発現変化が見られた。CR: caloric restriction; vs. (+/+)-AL-fed rats: significant up-regulation, ↑; moderate change, up-regulation or down-regulation, ↗ or ↓; no change, →.

GH/IGF-I系によって、その血中レベルが制御されており、CRおよびGH/IGF-I系の抑制により発現が上昇することを示した[30]。また我々は、CRによってインスリン非依存性のグルコース低下機構が存在する可能性を示しており[31, 32]、現在、そのグルコース制御機構におけるアディポネクチンの重要性を解析している。一方、レジスチンは肥満に伴うインスリン抵抗性に関与し、炎症性サイトカインに分類されるアディポカインとして認識されている[33]。我々はGH/IGF-I系の抑制により、レジスチン発現が有意に低下し、このことがCRにおけるレジスチンレベルの減少と関連があることを報告した[34]。これらのことからCRによるアディポカインの発現変化を含めた白色脂肪組織の質的、量的変化が中枢を含め、他の臓器における糖および脂質代謝を変化させ、寿命延長に対して有利に働いていることが示唆される。

NPYの受容体であるY1R, Y2R, Y5Rは中枢において発現しており、様々な実験的肥満モデルにおいて、これらのシグナルが亢進していることが知られている[35]。最近、NPY-NPY2R系のシグナル伝達系が中枢のみならず、末梢の白色脂肪組織においてもエネルギー代謝に重要な役割を担っており、ストレス下における肥満の発症に関与することが示唆されている[36]。我々は、特に*fafa*ラットにおいて、CRがNPY-NPY2Rシグナル系を活性化させることを見いだした(未発表)。しかし、*fafa*ラットはレプチンによる脂肪分解が欠損しているにも関わらず、CRの摂食前における血中遊離脂肪酸およびケトン体レベルが有意に上昇し、脳や骨格筋におけるエネルギー源として利用されていることが示唆された。これらの結果をまとめると、CRはレプチン、インスリンをはじめとするホルモンの低下によりNPY神経細胞群を活性化し、脂肪組織におけるNPY-NPY2R系を活性化し、TGとしてのエネルギー貯蔵を効率化させる。摂食前においてはTGを分解し、遊離脂肪酸あるいはケトン体として代替エネルギーを供給し、さらに糖新生を活性化させる。これらの一連の代謝ネットワークの制御機構がCRにおける寿命延長に重要な働きを持つと示唆される。レプチンシグナルを欠損した*ob/ob*マウス、およびZuckerラットに対する長期カロリー制限は、対照群と同程度の寿命延長を示す[37, 38]。我々の結果から、レプチンシグナルを欠損していても脂質由来エネルギーの利用(lipid mobilization)はCRによって活性化されることが示唆された。従って、節約遺伝子に変異をもつ動物は、糖尿病やその合併症の発症を抑制することが可能であれば、脂質由来エネルギーの利用効率が高いことから、野生型に対するCRと比較して、その適応力、および効果が強く現れることが推測される。

以上のように、CRによる寿命延長機構は少しずつ、その分子機構が明らかになりつつある。現在、我々はNPYノックアウトマウスをCR下で飼育し、ここで論じた仮説の検証をさらに進めている。しかし、生体におけるCRの作用点は本稿で述べたシグナル以外にも複数存在していることが考えられ、より多方面からアプローチし

た研究も必要であると思われる。

6. 謝辞

この総説は一部、日本学術振興会、科学研究費補助金若手研究B(17790269および20790306)、慢性疾患・リハビリテーション研究振興財団の助成による成果である。

引用文献

1. Weindruch R and Wolford RL. The retardation of aging and disease by dietary restriction. Springfield: Charles C Thomas Publisher. 1988.
2. Masoro EJ. Food restriction in rodents: an evaluation of its role in the study of aging. J Gerontol 43: B59-64, 1988.
3. Barzilai N and Gupta G. Revisiting the role of fat mass in the life extension induced by caloric restriction. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 54: B89-96; discussion B97-88, 1999.
4. Chiba T, Yamaza H, Higami Y and Shimokawa I. Anti-aging effects of caloric restriction: Involvement of neuroendocrine adaptation by peripheral signaling. Microsc Res Tech 59: 317-324, 2002.
5. Katic M and Kahn CR. The role of insulin and IGF-1 signaling in longevity. Cell Mol Life Sci 62: 320-343, 2005.
6. Shimokawa I and Higami Y. A role for leptin in the antiaging action of dietary restriction: a hypothesis. Aging (Milano) 11: 380-382, 1999.
7. Holliday R. Food, reproduction and longevity: is the extended lifespan of calorie-restricted animals an evolutionary adaptation? Bioessays 10: 125-127, 1989.
8. Friedman JM and Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature 395: 763-770, 1998.
9. Neel JV. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? Am J Hum Genet 14: 353-362, 1962.
10. Neel JV. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? 1962. Bull World Health Organ 77: 694-703; discussion 692-693, 1999.
11. Neel JV, Weder AB and Julius S. Type II diabetes, essential hypertension, and obesity as "syndromes of impaired genetic homeostasis": the "thrifty genotype" hypothesis enters the 21st century. Perspectives in biology and medicine 42: 44-74, 1998.
12. Damcott CM, Sack P and Shuldiner AR. The genetics of obesity. Endocrinology and metabolism clinics of North America 32:761-786, 2003.

13. Lazar MA. How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science* 307: 373-375, 2005.
14. Ahima RS and Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol* 62: 413-437, 2000.
15. Siegrist-Kaiser CA, Pauli V, Juge-Aubry CE, Boss O, Pernin A, Chin WW, Cusin I, Rohner-Jeanrenaud F, Burger AG, Zapf J and Meier CA. Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *J Clin Invest* 100: 2858-2864, 1997.
16. Coleman DL. Obesity genes: beneficial effects in heterozygous mice. *Science* 203: 663-665, 1979.
17. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ and Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404: 661-671, 2000.
18. Shimokawa I and Higami Y. Leptin and anti-aging action of caloric restriction. *J Nutr Health Aging* 5: 43-48, 2001.
19. Shimokawa I and Higami Y. Leptin signaling and aging: insight from caloric restriction. *Mech Ageing Dev* 122: 1511-1519, 2001.
20. Shimokawa I, Fukuyama T, Yanagihara-Outa K, Tomita M, Komatsu T, Higami Y, Tuchiya T, Chiba T and Yamaza Y. Effects of caloric restriction on gene expression in the arcuate nucleus. *Neurobiol Aging* 24: 117-123, 2003.
21. Komatsu T, Chiba T, Yamaza H, To K, Toyama H, Higami Y and Shimokawa I. Effect of leptin on hypothalamic gene expression in calorie-restricted rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61: 890-898, 2006.
22. Michalkiewicz M, Knestaut KM, Bytchkova EY and Michalkiewicz T. Hypotension and reduced catecholamines in neuropeptide Y transgenic rats. *Hypertension* 41: 1056-1062, 2003.
23. Finn PF and Dice JF. Proteolytic and lipolytic responses to starvation. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif) 22: 830-844, 2006.
24. Ahima RS and Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 11: 327-332, 2000.
25. Higami Y, Tsuchiya T, Chiba T, Yamaza H, Muraoka I, Hirose M, Komatsu T and Shimokawa I. Hepatic gene expression profile of lipid metabolism in rats: Impact of caloric restriction and growth hormone/insulin-like growth factor-1 suppression. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61: 1099-1110, 2006.
26. Puigserver P and Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 24: 78-90, 2003.
27. Anderson RM, Barger JL, Edwards MG, Braun KH, O'Connor CE, Prolla TA and Weindruch R. Dynamic regulation of PGC-1alpha localization and turnover implicates mitochondrial adaptation in calorie restriction and the stress response. *Aging cell* 7: 101-111, 2008.
28. Corton JC, Apte U, Anderson SP, Limaye P, Yoon L, Latendresse J, Dunn C, Everitt JI, Voss KA, Swanson C, Kimbrough C, Wong JS, Gill SS, Chandraratna RA, Kwak MK, Kensler TW, Stulnig TM, Steffensen KR, Gustafsson JA and Mehendale HM. Mimetics of caloric restriction include agonists of lipid-activated nuclear receptors. *J Biol Chem* 279: 46204-46212, 2004.
29. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P and Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 7: 941-946, 2001.
30. Yamaza H, Komatsu T, To K, Toyama H, Chiba T, Higami Y and Shimokawa I. Involvement of insulin-like growth factor-1 in the effect of caloric restriction: regulation of plasma adiponectin and leptin. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62: 27-33, 2007.
31. Park S, Komatsu T, Hayashi H, Yamaza H, Chiba T, Higami Y, Kuramoto K and Shimokawa I. Calorie restriction initiated at middle age improved glucose tolerance without affecting age-related impairments of insulin signaling in rat skeletal muscle. *Exp Gerontol* 41: 837-845, 2006.
32. Yamaza H, Komatsu T, Chiba T, Toyama H, To K, Higami Y and Shimokawa I. A transgenic dwarf rat model as a tool for the study of calorie restriction and aging. *Exp Gerontol* 39: 269-272, 2004.
33. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS and Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409: 307-312, 2001.
34. Chiba T, Yamaza H, Komatsu T, Nakayama M, Fujita S, Hayashi H, Higami Y and Shimokawa I. Pituitary growth hormone suppression

- reduces resistin expression and enhances insulin effectiveness: Relationship with caloric restriction. *Exp Gerontol* 43: 595-600, 2008.
35. Kalra SP and Kalra PS. NPY and cohorts in regulating appetite, obesity and metabolic syndrome: beneficial effects of gene therapy. *Neuropeptides* 38: 201-211, 2004.
 36. Kuo LE, Kitlinska JB, Tilan JU, Li L, Baker SB, Johnson MD, Lee EW, Burnett MS, Fricke ST, Kvetnansky R, Herzog H and Zukowska Z. Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nat Med* 13: 803-811, 2007.
 37. Harrison DE, Archer JR and Astle CM. Effects of food restriction on aging: separation of food intake and adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 1835-1838, 1984.
 38. Johnson PR, Stern JS, Horwitz BA, Harris RE, Jr. and Greene SF. Longevity in obese and lean male and female rats of the Zucker strain: prevention of hyperphagia. *Am J Clin Nutr* 66: 890-903, 1997.

Mechanisms of longevity and anti-aging effects of calorie restriction by neuroendocrine adaptation: a hypothesis.

Takuya Chiba, Haruyoshi Yamaza, Isao Shimokawa

Department of Investigative Pathology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Nagasaki 852-8523, Japan

Moderate restriction of food intake, though not malnutrition, reduces morbidity and mortality in laboratory animals compared to animals allowed free access to food. This effect, often called as the anti-aging effect of calorie restriction (CR) might be also preserved in higher organisms such as primates. From an evolutionary viewpoint, the effect of CR might be effective for thrifty genotype animals that are adaptive during periods of limited nutrient supply, although such animals are prone to obesity under *ad libitum* (AL) fed conditions. Our recent results suggest that hypothalamic arcuate nucleus have the key neurons which control CR mediated metabolic and physiological changes. Of note, neuropeptide Y (NPY) induction in the arcuate nucleus may play crucial roles for CR mediated beneficial effects. Our results also indicate that metabolic adaptation in response to CR could be induced even under leptin and insulin resistance conditions. These results raise the possibility that the effect of CR on thrifty genotype animals were potentially more efficient than on wild type ones. Further study, using NPY knockout and/or transgenic mice, will be needed to confirm this hypothesis.

Keywords: calorie restriction, neuroendocrine, thrifty genotype, energy metabolism.

【トピックス】

TCA回路を中心とした代謝調節と寿命制御

木下 善仁¹、津田 学^{1,2}、相垣 敏郎¹

¹首都大学東京大学院理工学研究科生命科学専攻 細胞遺伝学研究室

²バイオ産業情報化コンソーシアム

1. はじめに

生物の寿命と代謝速度には相関関係があり、その原因は代謝の過程における活性酸素の生成によると考えられてきた。代謝の上昇により活性酸素が増加し、種々の細胞損傷が誘発され、その結果、寿命が短縮するという仮説である。しかしながら、カロリー制限により寿命を延長した酵母やマウス個体では、代謝、および呼吸が上昇していることから、この考え方に疑問がもたれ始めている[1,2]。また、マウスでは、カロリー制限によりミトコンドリアの生合成が高まることから[2]、代謝速度、活性酸素生成、寿命の関連は、単純に成立するものではないと考えられる。カロリー制限による寿命の延長は代謝速度ではなく代謝の質的な変化に起因している可能性がある。カロリー制限を受けた個体や長寿変異体では、種々の代謝変化が起こっている。これらの代謝変化にはいくつかの共通点があり、特に糖と脂質代謝系が大きな影響を受けることが知られている。我々は、寿命制御における代謝変化の役割、意義を明らかにすることを目的とし、ショウジョウバエを用いた研究を行っている。糖、脂質、アミノ酸などの各代謝をつなぐ役割をもつTCA回路に着目し、この代謝系が担うであろう寿命制御機構を解析している。

2. 寿命遺伝子と代謝

寿命に関わるシグナル系として、インスリン/IGF-1シグナル伝達経路 (IIS) が知られている。最近、ショウジョウバエにおいて、このシグナル系と代謝調節の関連が明らかになりつつある。ショウジョウバエでは、インスリン受容体 (INR) やインスリン受容体基質 (CHICO) の遺伝子の変異により寿命が延長する[3,4]。これらショウジョウバエIIS関連変異体では脂肪が蓄積することが明らかになってきた [3,5]。また、ショウジョウバエでもカロリー制限は寿命延長効果をもたらすが、カロリー制限を受けた個体において脂質と糖質の蓄

積が観察される[7]。これらのことはショウジョウバエ長寿個体で、なんらかの代謝変化が起こっていることを強く示唆する。

IISの下流で機能する転写因子として、FOXOが知られている。FOXOはIISの抑制時に活性化され、核内移行し、様々な遺伝子の転写を調節する。ショウジョウバエにおいてFOXO を脂肪体特異的に過剰発現させると寿命延長がみられ、その際、脂肪や糖の蓄積がみられる[6,8,9]。FOXOは翻訳抑制に関わる遺伝子4E-BPの発現を正に調節している[10]。変異体の解析から4E-BPは飢餓状態における脂肪の蓄積を促す働きがあることが明らかになった[11]。一方、糖新生に必須なホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPCK)の遺伝子発現もIISの支配下に置かれていることが示唆されている [10]。哺乳類の研究から、肝臓においてFoxO1がPEPCKの発現を促進し、糖新生を上昇させていることが知られている[12]。ショウジョウバエにおいてもインスリンの投与により、PEPCKは遺伝子発現が減少することから、FOXOの標的遺伝子になっている可能性が高い[10]。以上のことから、ショウジョウバエでは、糖と脂質の合成は、寿命制御において重要な意味をもっていると考えられる。

このような代謝遺伝子の発現変化は寿命関連遺伝子であるSir2ファミリー (Sirtuin) によっても調節される。ショウジョウバエ Sir2 は、過剰発現によって寿命延長効果を示すが[13]、現在までのところ、その過剰発現体での脂肪や糖の蓄積などの代謝変化については調べられていない。しかし、哺乳類の肝臓においてSirtuinの1つであるSIRT1はPGC-1 α を脱アセチル化し、糖新生に関与するPEPCKやグルコース-6-ホスファターゼ (G6Pase) の遺伝子発現を促進する [14]。さらに、SIRT1はFoxO1を脱アセチル化し、活性化することから[15]、FOXOやSirtuinなどの寿命関連因子は糖や脂質の代謝変化を導いていることが分かる。しかし、これらの代謝変化が生物の生存にどのような影響を与えるかということは、まだ明らかになっていない。

3. TCA回路と寿命

これまで述べたようにIIS、カロリー制限、およびSirtuinは糖代謝や脂肪代謝を制御していると考えられる。この二つの代謝経路はTCA回路の中で統合される。TCA回路の代謝産物であるクエン酸はミトコンドリアから細胞質に運び出され、アセチル-CoAに変換される。

連絡先：〒192-0397

東京都八王子市南大沢1-1

首都大学東京大学院 理工学研究科 生命科学専攻
細胞遺伝学研究室

Tel: 042-677-2560

FAX: 042-677-2559

E-mail: kishita-yoshihito@ed.tmu.ac.jp

このアセチル-CoAは細胞質において脂肪酸合成に利用される。反対に、脂肪酸の一部は β -酸化によりアセチル-CoAに分解され、再びTCA回路に流入する。一方、糖も解糖系によってアセチル-CoAに変換されTCA回路に入る。また、TCA回路の代謝産物であるオキサロ酢酸、あるいはリンゴ酸は糖新生経路で糖に変換される。このように脂質代謝と糖代謝はTCA回路を基点とし、合成と分解が制御されていることから、TCA回路は寿命制御における代謝調節の要となっていることが示唆される。我々は、TCA回路に関わる遺伝子群の変異体やその過剰発現体を用いることにより、個体の代謝を変化させ、カロリー制限や長寿変異体などの代謝変化を模倣することができると考えている。実際に酵母ではTCA回路に関わるリンゴ酸脱水素酵素の過剰発現体で、寿命の延長がみられる[16]。また、ピルビン酸をアセチル-CoAに変換しTCA回路へ分子を提供するピルビン酸脱水素酵素も、遺伝子の過剰発現によって寿命延長効果をもたらす[17]。これらの例は、TCA回路の代謝変化が寿命を制御していることを示している。現在、ピルビン酸脱水素酵素と α -ケトグルタル酸脱水素酵素の酵素活性に必須であるリポ酸転移酵素に着目し、寿命との関連を検討している。

4. TCA回路の代謝モニター

TCA回路の代謝変化は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用い、代謝産物を定量することでモニターできる。我々は、ショウジョウバエ個体抽出液から、少なくとも5つのTCA回路代謝中間体を一度に定量する方法を確立した。HPLCのサンプルを調製する際には栄養状態を一定にするため、16時間の絶食を行った後、再度エサを与え、その後3時間経過したところでハエを採取している。採取したハエはTE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0) 中でホモジナイズし、凍結融解を行った後、フェノール/クロロホルム抽出によりタンパク質を除いたものをサンプルとして用いた。精製した抽出液成分をイオン排除クロマトグラフィーにて分離し電気伝導度検出器で検出を行うと、 α -ケトグルタル酸、クエン酸、ピルビン酸、リンゴ酸、コハク酸などの波長データを得ることができる。同時に複数の分子を測定することが可能であるため、TCA回路全体の動態を明らかにできる。このように変異体の代謝変化をモニターすることにより、それら個体で生じている様々な代謝流動の実態を明らかにできると考えられる。

5. おわりに

TCA回路に注目し寿命研究を行っている例は、今のところわずかしかない。TCA回路は、糖、脂質、アミノ酸など栄養物質の代謝において中心的役割を担っているだけでなく、呼吸鎖の代謝回転にも影響を及ぼす。TCA回路の改変は、脂質や糖の代謝に大きな影響を与え、寿命を変化させるであろう。我々は脂質や糖代謝を変化させる変異体を利用して、寿命制御に関わる重要な代謝変化を見出すことを目指している。メタボリックシンドロームの発生機序の解明や治療に役立つ情報が得られる

ものと期待している。鍵となる代謝変化を特定できれば、薬剤や化合物を投与することで同様の代謝変化を誘発できる可能性があり、それによってヒトでも寿命を制御できるようになるかもしれない。

参考文献

1. Lin SJ, Kaeberlein M, Andalis AA, Sturtz LA, Defossez PA, Culotta VC, Fink GR, Guarante L. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 418: 344-8, 2002.
2. Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bra-ciale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* 310: 314-7, 2005.
3. Tatar M, Kopelman A, Epstein D, Tu MP, Yin CM, Garofalo RS. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science* 292: 107-10, 2001.
4. Clancy DJ, Gems D, Harshman LG, Oldham S, Stocker H, Hafen E, Leivers SJ, Partridge L. Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science* 292: 104-6, 2001.
5. Böhni R, Riesgo-Escovar J, Oldham S, Brogiolo W, Stocker H, Andruss BF, Beckingham K, Hafen E. Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell* 97: 865-75, 1999.
6. Hwangbo DS, Gershman B, Tu MP, Palmer M, Tatar M. *Drosophila* dFOXO controls life-span and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* 429: 562-6, 2004.
7. Bradley TJ, Simmons FH. An analysis of resource allocation in response to dietary yeast in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* 43: 779-788, 1997.
8. Giannakou ME, Goss M, Jünger MA, Hafen E, Leivers SJ, Partridge L. Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body. *Science* 305: 361, 2004.
9. Luong N, Davies CR, Wessells RJ, Graham SM, King MT, Veech R, Bodmer R, Oldham SM. Activated FOXO-mediated insulin resistance is blocked by reduction of TOR activity. *Cell Metab* 4: 133-42 2006.
10. Jünger MA, Rintelen F, Stocker H, Wasserman JD, Végh M, Radimerski T, Greenberg ME, Hafen E. The *Drosophila* forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction

- in cell number associated with reduced insulin signaling. *J Biol* 2: 20, 2003.
11. Teleman AA, Chen YW, Cohen SM. 4E-BP functions as a metabolic brake used under stress conditions but not during normal growth. *Genes Dev* 19: 1844-8, 2005.
 12. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* 423: 550-5, 2003.
 13. Rogina B, Helfand SL. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 15998-6003, 2004.
 14. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434: 113-8, 2005.
 15. Frescas D, Valenti L, Accili D. Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J Biol Chem* 280: 20589-95, 2005.
 16. Easlson E, Tsang F, Skinner C, Wang C, Lin SJ. The malate-aspartate NADH shuttle components are novel metabolic longevity regulators required for calorie restriction-mediated life span extension in yeast. *Genes Dev* 22: 931-44, 2008.
 17. Easlson E, Tsang F, Dilova I, Wang C, Lu SP, Skinner C, Lin SJ. The dihydrolipoamide acetyltransferase is a novel metabolic longevity factor and is required for calorie restriction-mediated life span extension. *J Biol Chem* 282: 6161-71, 2007.

【トピックス】

アミロイドβ(Aβ42)の毒性コンホメーションの提唱

村上一馬^{1,2)}、清水孝彦¹⁾、白澤卓二³⁾、入江一浩²⁾

¹⁾東京都老人総合研究所老化ゲノムバイオマーカー、²⁾京都大学大学院農学研究科食品生物科学、
³⁾順天堂大学大学院医学研究科加齢制御医学

要約

42残基のアミロイドβ(Aβ42)は、凝集することで神経細胞毒性を示す。Aβ42は合成難度が高く、精製も困難であることから、Aβ42に関する化学的な研究はあまり行われていなかった。本研究は、Aβ42の凝集および神経細胞毒性発現機構を分子レベルで明らかにすることを目的とした。まず家族性アルツハイマー病に見られるAβ42変異体を高純度で合成し、凝集能と細胞毒性を調べた結果、22、23番目でのターンを特徴とする毒性コンホメーションを提唱するに至った。続いて、各種Aβ42変異体を用いた電子スピン共鳴実験より、10番目のチロシン残基のフェノキシラジカルが22、23番目でのターンを介して35番目のメチオニン残基に接近し、側鎖の硫黄原子をラジカル化することを支持する結果を得た。生成した硫黄ラジカルはC末端のカルボキシルアニオンにより安定化され、凝集体形成を引き起こし、持続的に毒性を示すものと考えられる。

1. はじめに

アルツハイマー病は、神経変性疾患の一種であり、類似の疾患としてパーキンソン病やプリオン病などが知られている。現時点で有効な治療法はほとんどなく、本疾患の発症機構の解明および根本的な治療法と予防法の確立が社会的に強く望まれている。アルツハイマー病の原因物質であるアミロイドβ(Aβ)は、アミロイド前駆体タンパク質の一部が2種の酵素によって切断されることにより産生され、C末端の切断部位の相違により、主として40残基および42残基からなるAβ40、Aβ42が存在する(図1) [1]。これまでのAβの凝集機構に関する研究のほとんどは*in vitro*合成の容易なAβ40に関するものであった。しかしながら、Aβ40の凝集能および神経細胞毒性はAβ42と比べてはるかに低いこと、また遺伝性の家族性アルツハイマー病(FAD)においてAβ42の過剰産生が認められることから、Aβ42が本疾患の発症において重要な役割を果たしているものと考えられる。最近、最終的な凝集体(アミロイド線維)よりも凝集中間体のオリゴマーが神経細胞毒性を示す本体である可能性が指摘され、Aβ42の方がAβ40よりオリゴマー形成能も高いことが報告されている [2]。本稿では、Aβ42がAβ40に比べて高い凝集能および神経細胞毒性を示す分子メカニズムについて説明する [3,4]。

2. Aβ42の高純度合成法の確立

Aβ42の凝集機構が未解明である主な理由として、Aβ42がC末端側にかさ高い疎水性アミノ酸を連続して有するためペプチド合成難度が高く、また中性および弱酸性条件下において容易に凝集することから精製が困難であるため、実験用の高純度Aβ42が大量に得られない点が挙げられる。近年、本研究グループの入江は、福田宏之氏(現セラバリュース)と協同で、親水性のスペーサーを有するポリエチレングリコール-ポリスチレン(PEG-PS)樹脂を固相担体とし、Carpinoによって開発された強力な活性化剤であるHATUを用いたFmoc法を連続フロー型合成機において行うことにより、長鎖ペプチドの高純度合成法を確立した [5]。筆者らは、本法と塩基性条件下での精製法を組み合わせることによって、Aβ42を高純度(>98%)かつ高収率(2~24%)で得ることに成功した [6,7]。

3. 22位付近のターン構造を特徴とするAβ42の毒性コンホメーション

FADには、Aβの中央部位の配列が変異した5つの例(A21G、E22Q、E22K、E22G、D23N、図1)が知られ

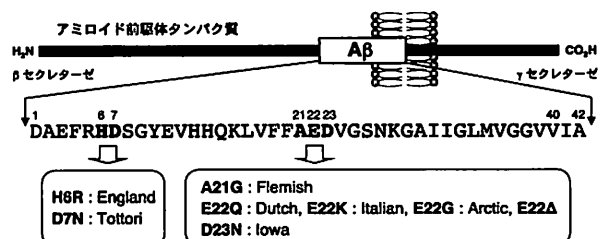


図1 Aβ42のアミノ酸配列と各種変異型

連絡先: 〒173-0015

東京都板橋区栄町35-2

東京都老人総合研究所 老化ゲノムバイオマーカー

Tel: 03-3964-3241 (内線3022)

FAX: 03-3579-4776

E-mail: murakami@tmig.or.jp

ている [1]。本変異がA β 42の凝集能に及ぼす影響を明らかにする目的で、これらのA β 42変異体5種を、対応するA β 40変異体とともに合成し、凝集能を遠沈法およびチオフラビン蛍光法を用いて測定した。その結果、A21G型を除くすべてのA β 42およびA β 40変異体が、対応する野生型と同等以上の凝集能を示した。特に、E22Q (Dutch) 型およびE22K (Italian) 型のA β 変異体の凝集能が高かった。これらの結果は、両家系患者に共通して認められる脳血管へのアミロイド沈着による激しい脳内出血という臨床所見を想起させることから興味深い。次に、これらの神経細胞毒性をラット副腎髄質褐色腫由来PC12細胞を用いたMTT法で調べたところ、A21G (Flemish) 型を除いたA β 変異体の細胞毒性はいずれも野生型よりも増大した。特に、A β 42変異体の毒性はそれぞれ対応するA β 40変異体に比べて50~200倍高かった [8]。最近、N末端領域に新しい変異型 [H6R (England) [9], D7N (Tottori) [10]]ならびに22位のグルタミン酸残基 (Glu-22) が欠損した変異型 (E22A) [11]が発見された。特に、E22A型A β 42のオリゴマー形成能が、野生型A β 42に比べて顕著に増大していたことは興味深い。

A β 42変異体の22, 23番目のアミノ酸配列 [Gln-Asp (Dutch), Lys-Asp (Italian), Gly-Asp (Arctic), Glu-Asn (Iowa)] は、ターン構造に高頻度に見られる配列である [12]。そこで、Glu-22をターンをとりやすいプロリン残基とターンをとりにくいバリン残基で別々に置換したA β 42変異体2種を合成し、凝集能および神経細胞毒性を調べた。その結果、E22P-A β 42は、野生型に比べてはるかに高い凝集能および細胞毒性を示したのに対して、E22V-A β 42はほとんど凝集せず、毒性も示さなかった。これより、A β 42の凝集および細胞毒性の発現には22, 23番目でのターン形成が重要であることが示唆された [8]。さらにA β 42の系統的なプロリン置換体の凝集能および神経細胞毒性を調べることによって、A β 42は22位付近のターンを含む3か所のターン構造と4か所の β シート構造を有していることが明らかになった (図2a) [13]。一方、同時期にWilliamsらは同様の手法でA β 40の凝集体モデル (図2b) [14]を報告しており、これらのモデルにおいて22位付近のターン構造は共通に存在している。両モデルの違いは、A β 42のみC末端に β シートを有することであり、これがA β 42の高い凝集能と細胞毒性の原因になっているものと推定される。この β シート構造は

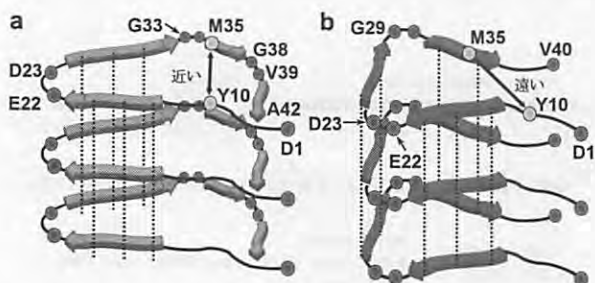


図2 筆者らによるA β 42(a)とWilliamsらによるA β 40(b)の凝集体モデル (点線: 分子間 β シートによる水素結合)

分子間と分子内の両方の可能性が考えられるが、A β 42とA β 40の凝集能と細胞毒性の顕著な相違を考えると分子内 β シートである可能性が高い。

4. ラジカル化を介したA β 42の神経細胞毒性発現機構

A β の神経細胞毒性発現機構の一つとして、ラジカル産生による酸化ストレスが指摘されている [15]。ラジカル産生には、35番目のメチオニン残基 (Met-35) の硫黄原子のラジカル化が特に重要と考えられているが、その生成機構は不明であった。筆者らのグループのA β 42の凝集体モデル (図2a) では、22, 23番目でのターン形成によって、10番目のチロシン残基 (Tyr-10) がMet-35に空間的に近づくことから、金属存在下で生成しやすいTyr-10のフェノキシラジカルが、Met-35側鎖の硫黄原子を酸化し、その結果、硫黄ラジカルが効率的に産生するものと推定された (図5)。そこで、本仮説を検証する目的で、ニトロキシドラジカルを有するスピララベル剤 (MTSSL) を用いた電子スピン共鳴 (ESR) 法によって、A β 42およびA β 40の10番目と35番目の側鎖間の距離をそれぞれ推定した。スピララベル剤は、ラベルしたいアミノ酸残基をシステインに置換し、ジスルフィド形成による特異的反応によって導入した。ESR測定は、原英之氏 (ブルカーバイオスピン) にご協力いただいた。

まず、5~20Åの距離測定が可能な連続波を用いて10,35-MTSSL-A β 42のESRを測定したところ、ニトロキシドラジカルを示す3重線に加えて、2つの電子スピン間の双極子相互作用を示す特徴的なピーク (図3a矢印) が観測された。対照として、10番目あるいは35番目のみをスピララベルしたA β 42 (10-MTSSL-A β 42, 35-MTSSL-A β 42) の測定ではこのようなピークは観測されなかった。これらの結果より、検出された双極子相互作用は、分子内の2つの電子スピンによるものであり、モデル化合物を用いた報告から、これらは9~14Åの距離に存在していることが示唆された。一方、10,35-MTSSL-A β 40について同様に連続波ESRを測定したところ、上述の双極子相互作用はまったく検出されなかった (図3b)。そこで、より長距離測定 (20~60Å) が可能なパルス波を用いて10,35-MTSSL-A β 40のESRを測定したところ、約30Å

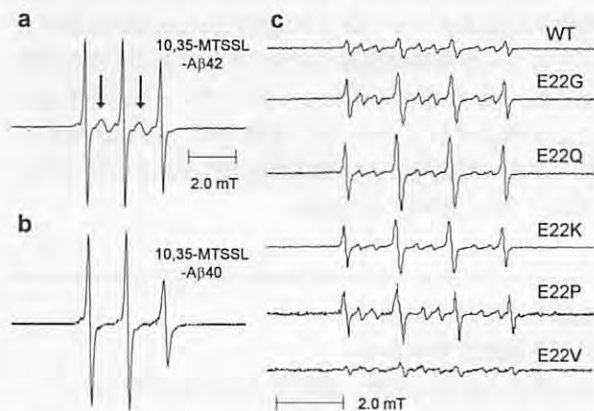


図3 (a, b)スピララベルしたA β のESRスペクトル、(c)スピントラップ剤(PBN)を用いた各種A β 42変異体のESRスペクトル

であることを示唆するデータを得た。10,35-MTSSL-Aβ42についても同様に測定したところ、両電子スピンの距離は20Å以下であり、連続波を用いた実験結果とよく一致していた。以上の結果より、溶液中のAβ42における10番目および35番目のアミノ酸残基の側鎖は接近していること、またその距離はAβ40より有意に小さいことから、Aβ42の方が両残基は相互作用しやすいことが明らかになった [16]。

次に、Tyr-10およびMet-35のラジカル産生能と神経細胞毒性発現への寄与を調べる目的で、Tyr-10をフェノール性水酸基をもたないフェニルアラニンに、またMet-35の硫黄原子を除去したノルバリン (nV) にそれぞれ置換したAβ42変異体 (Y10F-Aβ42, M35nV-Aβ42) と、両方を置換したY10F, M35nV-Aβ42をそれぞれ合成し、それらのラジカル産生能および細胞毒性を調べた。ラジカル産生能は、スピントラップ剤 (PBN) を用いたESR法で評価した。その結果、いずれの変異体もラジカル産生能および細胞毒性が野生型に比べて低下した (図4a,b)。また22、23番目でのターン形成がラジカル産生能に及ぼす影響を調べる目的で、ターン形成に有利な各種Aβ42変異体 (E22G, E22Q, E22K, E22P) のESR測定を行ったところ、いずれの信号強度も野生型より顕著に増大した (図3c)。以上の結果より、Aβ42では22、23番目でのターン形成が、Tyr-10のフェノキシラジカルとMet-35の側鎖との相互作用を誘起することによって、Met-35の硫黄ラジカルが効率よく産生しているものと

考えられる。

ところで硫黄ラジカルの寿命は一般に短く、細胞毒性を示すためには何らかの安定化機構が必要である。図2aに示したAβ42のC末端側のβシートは、図5に示したようにC末端カルボキシルアニオンによる硫黄ラジカルの安定化に寄与している可能性が考えられた。そこで、C末端をアミド型にしたAβ42変異体を合成し、そのラジカル産生能および細胞毒性を調べたところ、いずれも野生型に比べて顕著に低下した (図4c,d)。またC末端でのターン形成を促進するG38P-Aβ42のラジカル産生能は野生型に比べて増大したのに対して、βシートを形成できないA42P-Aβ42では野生型を大きく下回った。さらに、1残基長いAβ43のラジカル産生能および細胞毒性は野生型に比べて低かった (図4c,d)。ごく最近、筆者らのグループは、竹腰清乃理教授 (京大院理) と協同で、Aβ42の22、23番目でのターン構造の存在とともに、C末端領域において分子内βシートが形成されていることを固体NMR法によって確認している [17-19]。以上の結果より、生成した硫黄ラジカルは、38、39番目でのターンを介した分子内βシート形成によって、C末端のカルボキシルアニオンと共有結合して安定化されるとともに、Aβ42はそれを核 (コア) として凝集し、一部解離したカルボキシルラジカルが持続的に細胞毒性を示すという新しい神経細胞毒性発現機構を提唱した (図5)。本機構は、Aβ42とAβ40との間で著しく異なる凝集能および細胞毒性の差を明快に説明できる初めてのモデルである [20]。

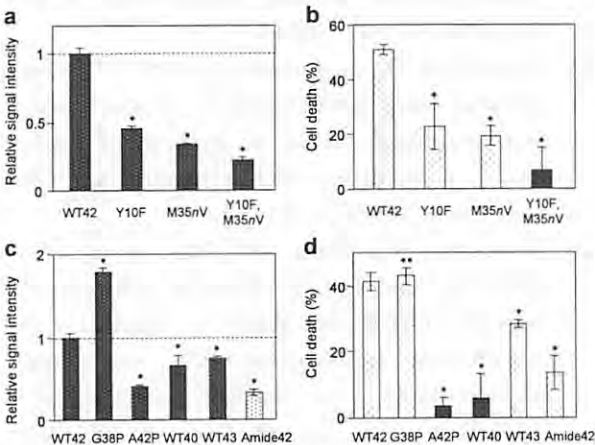


図4 (a, c)各種Aβ変異体のESRシグナル強度[WT42 (野生型)を1とする], (b, d)PC12細胞を用いた細胞毒性試験*, p<0.01;**p<0.05 vs. WT42

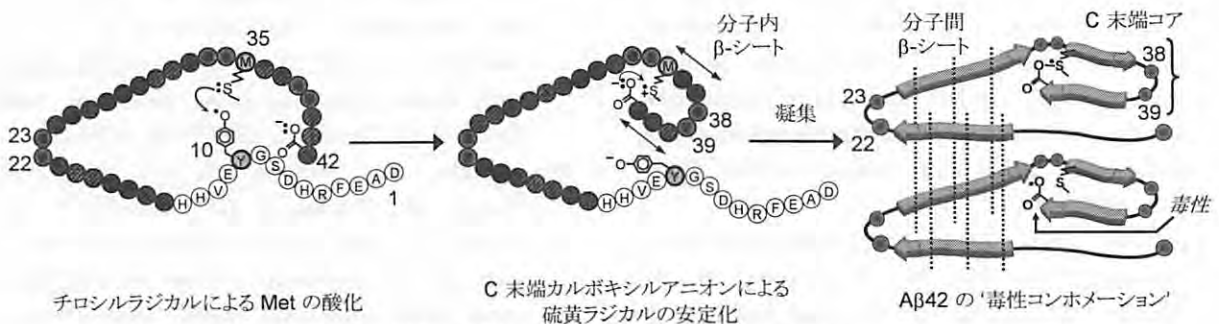


図5 Aβ42の新しい神経細胞毒性発現機構

5. おわりに

本研究で明らかにされたAβ42の'毒性コンホメーション' (図5) は、Aβ42の毒性本体と考えられることから、本構造を特異的に認識する抗体やRNAアプタマーは副作用の少ないアルツハイマー病治療薬になるものと期待される。またこれらを用いることによって、アルツハイマー病患者脳における毒性コンホメーションの存在が確認できれば、早期診断薬への応用も可能である。

[引用文献]

- Haass, C. and Selkoe, D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 101-112, 2007.
- Bitan, G., Kirkitadze, M. D., Lomakin, A., Vol-

- lers, S. S., Benedek, G. B., and Teplow, D. B. Amyloid β -protein (A β) assembly: A β 40 and A β 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 330-335, 2003.
3. Irie, K., Murakami, K., Masuda, Y., Morimoto, A., Ohigashi, H., Ohashi, R., Takegoshi, K., Nagao, M., Shimizu, T., and Shirasawa, T. Structure of β -amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biosci Bioeng* 99, 437-447, 2005.
 4. Irie, K., Murakami, K., Masuda, Y., Morimoto, A., Ohigashi, H., Hara, H., Ohashi, R., Takegoshi, K., Fukuda, H., Nagao, M., Shimizu, T., and Shirasawa, T. The toxic conformation of the 42-residue amyloid β peptide and its relevance to oxidative stress in Alzheimer's disease. *Mini Rev Med Chem* 7, 1001-1008, 2007.
 5. Irie, K., Oie, K., Nakahara, A., Yanai, Y., Ohigashi, H., Wender, P. A., Fukuda, H., Konishi, H., and Kikkawa, U. Molecular basis for protein kinase C isozyme-selective binding: the synthesis, folding, and phorbol ester binding of the cysteine-rich domains of all protein kinase C isozymes. *J Am Chem Soc* 120, 9159-9167, 1998.
 6. Murakami, K., Irie, K., Morimoto, A., Ohigashi, H., Shindo, M., Nagao, M., Shimizu, T., and Shirasawa, T. Synthesis, aggregation, neurotoxicity, and secondary structure of various A β 1-42 mutants of familial Alzheimer's disease at positions 21-23. *Biochem Biophys Res Commun* 294, 5-10, 2002.
 7. Morimoto, A., Irie, K., Murakami, K., Ohigashi, H., Shindo, M., Nagao, M., Shimizu, T., and Shirasawa, T. Aggregation and neurotoxicity of mutant amyloid β (A β) peptides with proline replacement: importance of turn formation at positions 22 and 23. *Biochem Biophys Res Commun* 295, 306-311, 2002.
 8. Murakami, K., Irie, K., Morimoto, A., Ohigashi, H., Shindo, M., Nagao, M., Shimizu, T., and Shirasawa, T. Neurotoxicity and physicochemical properties of A β mutant peptides from cerebral amyloid angiopathy: implication for the pathogenesis of cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 278, 46179-46187, 2003.
 9. Janssen, J. C., Beck, J. A., Campbell, T. A., Dickinson, A., Fox, N. C., Harvey, R. J., Houlden, H., Rossor, M. N., and Collinge, J. Early onset familial Alzheimer's disease: Mutation frequency in 31 families. *Neurology* 60, 235-239, 2003.
 10. Wakutani, Y., Watanabe, K., Adachi, Y., Wada-Isobe, K., Urakami, K., Ninomiya, H., Saido, T. C., Hashimoto, T., Iwatsubo, T., and Nakashima, K. Novel amyloid precursor protein gene missense mutation (D678N) in probable familial Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75, 1039-1042, 2004.
 11. Tomiyama, T., Nagata, T., Shimada, H., Teraoka, R., Fukushima, A., Kanemitsu, H., Takuma, H., Kuwano, R., Imagawa, M., Ataka, S., Wada, Y., Yoshioka, E., Nishizaki, T., Watanabe, Y., and Mori, H. A new amyloid β variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Ann Neurol* 63, 377-387, 2008.
 12. Chou, P. Y. and Fasman, G. D. β -Turns in proteins. *J Mol Biol* 115, 135-175, 1977.
 13. Morimoto, A., Irie, K., Murakami, K., Masuda, Y., Ohigashi, H., Nagao, M., Fukuda, H., Shimizu, T., and Shirasawa, T. Analysis of the secondary structure of β -amyloid (A β 42) fibrils by systematic proline replacement. *J Biol Chem* 279, 52781-52788, 2004.
 14. Williams, A. D., Portelius, E., Kheterpal, I., Guo, J. T., Cook, K. D., Xu, Y., and Wetzel, R. Mapping A β amyloid fibril secondary structure using scanning proline mutagenesis. *J Mol Biol* 335, 833-842, 2004.
 15. Butterfield, D. A. Amyloid β -peptide [1-42]-associated free radical-induced oxidative stress and neurodegeneration in Alzheimer's disease brain: mechanisms and consequences. *Curr Med Chem* 10, 2651-2659, 2003.
 16. Murakami, K., Hara, H., Masuda, Y., Ohigashi, H., and Irie, K. Distance measurement between Tyr10 and Met35 in amyloid β by site-directed spin-labeling ESR spectroscopy: implications for the stronger neurotoxicity of A β 42 than A β 40. *ChemBioChem* 8, 2308-2314, 2007.
 17. Masuda, Y., Irie, K., Murakami, K., Ohigashi, H., Ohashi, R., Takegoshi, K., Shimizu, T., and Shirasawa, T. Verification of the turn at positions 22 and 23 of the β -amyloid fibrils with Italian mutation using solid-state NMR. *Bioorg Med Chem* 13, 6803-6809, 2005.
 18. Masuda, Y., Uemura, S., Nakanishi, A., Ohashi, R., Takegoshi, K., Shimizu, T., Shirasawa, T., and Irie, K. Verification of the C-terminal intramolecular β -sheet in A β 42 aggregates using solid-state NMR: implications for potent neurotoxicity through the formation of

- radicals. *Bioorg Med Chem Lett* 18, 3206-3210, 2008.
19. 入江一浩, 増田裕一: β アミロイドの毒性コンホメーション. *化学と生物* 46, 431-434, 2008.
20. Murakami, K., Irie, K., Ohigashi, H., Hara, H., Nagao, M., Shimizu, T., and Shirasawa, T. Formation and stabilization model of the 42-mer $A\beta$ radical: implications for the long-lasting oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Am Chem Soc* 127, 15168-15174, 2005.

Toxic conformation of 42-mer amyloid β peptide ($A\beta_{42}$) in Alzheimer's disease

Kazuma Murakami^{1,2}, Takahiko Shimizu¹, Takuji Shirasawa³, and Kazuhiro Irie²

¹Research Team for Molecular Biomarker, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology,
Tokyo 173-0015, Japan

²Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture,
Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

³Department of Aging Control Medicine, Juntendo University Graduate School of Medicine,
Tokyo 113-0033, Japan

The 42-mer β -amyloid peptide ($A\beta_{42}$) plays a pivotal role in Alzheimer's disease since $A\beta_{42}$ shows potent neurotoxicity and aggregative ability. We examined the aggregative ability and neurotoxicity of the mutants related to familial Alzheimer's disease and the 34 proline-substituted mutants of $A\beta_{42}$ to clarify the mechanism of aggregation and neurotoxicity of $A\beta_{42}$. The results indicated that the turn structure at positions 22 and 23 along with the intermolecular β -sheets at positions 15-21 and 24-32, and the intramolecular β -sheets at the C-terminus (at positions 35-37 and 40-42) could be indispensable to its aggregation and neurotoxicity. The biophysical study on several $A\beta_{42}$ mutants using electron spin resonance (ESR) spectrometry suggested that the S-oxidized radical cation of the methionine residue at position 35 could be generated by the phenoxy radical of the tyrosine residue at position 10 through the turn structure at positions 22 and 23, and stabilized by a C-terminal carboxyl anion through the intramolecular β -sheets to form a C-terminal core that would lead to aggregation. The resultant oligomer would be the ultimate toxic species which is ascribable to the long-lasting oxidative stress. Our new model gives unique opportunities to design inhibitors and antibodies that are specific to the toxic conformation of $A\beta_{42}$.

Keywords: β -amyloid · Alzheimer's disease · aggregation · β -sheet · turn · oxidative stress · ESR

【随 筆】

老化研究事始め——老化と寿命の起源、進化は？

三井 洋司

徳島文理大学 香川薬学部

はじめに

先に述べたように、ホルモンやサプリメントあるいは代替医療で、ある程度の健康寿命を延ばす事は出来るでしょう。でも真のアンチエイジングや最大寿命の延長は出来ません。最大寿命は、老化のメカニズムと深くつながりを持ち、遺伝子に規制されていると考えられています。それを延長するには、寿命や老化の原理をもっと良く理解して、其れに合わせて対処する必要がある筈です。

従って今回は、生物の老化や寿命というものが一体どうして生じてきたか、その起源を先ず考えてみます。そして次に、その寿命が進化とともに延長してきた理由も、考察しましょう。

第7話 身体(ソーマ)は、生殖細胞のキャリアにすぎず、

誰もが、人間は「老化して」「死ぬ」運命と思っているでしょう。しかし、生物によっては老化するとは限りません。昆虫の蟬や魚のサケ等は青春の真っ最中に死ぬわけですが。またヒトでも鉄器時代初期での平均年齢は十八歳で、大部分は老化するずっと前に死んでいたのです。今の日本人のように多くが老化を経験するのはごく最近の事です。

動物園に捕獲、育種された動物では、精一杯のケアをされますから、老化を経て死ぬことが出来ます。野生動物の大部分は老化を経験せずに死ぬのです。つまり自然界では老化は、選択圧がかかる対象にならなかったわけですから、直接に老化を制御する遺伝子が発達して来なかったと考えられます。

では、寿命はどうでしょう。天寿に相当する生物の最大寿命は進化上、確実に延びています(ヒトでは今後十万年は変化しそうにありませんが)。しかし、寿命の前に死ぬのが野生生物の現実だった環境で、寿命を延ばすための遺伝子が進化してくる筈がありません。ソーマの寿命を延ばすことに特定の遺伝子が働いたとして、寿命延長がその遺伝子の増幅、子孫への伝達に有利に働かないとすれば、そんなエネルギーを浪費せずに済みます(死んでしまう)方が有利だったと思われれます。

つまり、寿命が延びたのは、別の用途の遺伝子が進化—後述—してきた結果なのであろうと考えられます。老化も寿命も、実は結果にすぎないというのが、最新の見解です。

寿命を決める遺伝子が働く例外もあります。昆虫のセミは七年間幼虫として地中で暮らし、羽化後は四、五日で成虫となり、産卵後の青春真っ最中に死んでしまいます。魚のサケも産卵直後あるいは精子放出後、間もなく

死んでいきます。それは、人間でもストレス時に放出されるステロイドが死のホルモンとして大量に分泌されるからです。つまり死のプログラムが既に組まれていたのです。カマキリの雄ともなれば交尾後メスに食べられ、受精卵の栄養資源にまわされるとのこと。こうした死のプログラムは例外的です。

それでも、利己的な遺伝子(つまり自己の複製が最優先で生き残る)の視点にたち、生物の繁殖戦略からみれば、「次世代が生まれ、一人前に育つめどさえ立てば親は無用となる」のは、どの生物にとっても普遍的な事実でしょう。

われわれの身体、つまり、生殖細胞以外の体細胞群について、男性のsomaはしよせん精子細胞をつくり、卵へ送り込むための器。女性では卵細胞をつくり、受精卵を育てる器です。死ぬべき身体とは、生殖細胞を永遠につなぐための一代限りのキャリアー(運び屋)にすぎないのです。

虚無的な、そんな運命に誰がした?と憤慨するかもしれない。でもお待ちください。生物の進化上、本来、寿命は無限でした。それがあある時期から老化も起り、寿命も有限とされたのです。そんなことは許せないと思うあなた、それが性の発生と交換だったとしたら、どうでしょう。

第8話 線状DNAと性の獲得に伴う、ソーマの寿命

生命体は「自己と同じものを複製して増える」を基本に発達しました。それを担う遺伝子は正確に複製され、環境の許す限り増えます。現存生物では環状DNAを持つ細菌が始まりです。でも今は途方もない種類の生物が存在します。なぜか。それは「遺伝子変異と適者生存」のおかげなのです(進化の中立説もありますが)。

実は、遺伝子が正確に複製されるとは限りません。複製ミスが鋳型に再コピーされたり、有害化学物質によって変えられた暗号配列がコピーされたりして変異が子孫に伝わります。変異の大半は死につながります。ところが、環境の激変で生物が絶滅危機に陥った時に、思わぬ変異体が生き延びることがあります。変異体は特定機能を高度化し、生物として進化します。

つまり遺伝子が正確に複製される機構と、適度に変異、またはDNA鎖が組み替わる機構との両方が生物界の継続(DNAの自己増殖)と生物進化に必須だったのです。それに関わる三つの革命的な変化をお話しましょう。

まずは、DNAの構造に変化が生じました。原始の生命体である細菌は環状のDNAなので端というものがある

りません。だからこそ、全く同じDNAを複製して同一生物を作ることが出来たのです（無性生殖といい、寿命がありません）。しかし、複製すべき情報は大量です。環状では支えきれず、やがて、糸状の直線DNAへと構造変化し、それが幾重にも折り畳まれた染色体という構造物をいくつも備えるようになりました。

もう一つは、DNAの二倍体化。同じ働きの遺伝子を細胞が二セット持つという進化です。それにより、DNAの一部に変異が起きてても、正常な片方を働かせて変異による傷害を避けると同時に、複製コピーでその変異も次代に伝えることができます。これを「変異情報の確保と傷害の回避」といいます。

この上大きな変化が、この二セットを異なる細胞から片方ずつ受け取る仕組みを持つ、性の発生です。二セットを持つ細胞から分裂して、どの染色体についてもどちらかの一つを受け取って、一セットの染色体群を得る過程を減数分裂と呼びます。これが人間でいう生殖細胞（配偶子）の発生です。減数分裂の仕組みと、異なる配偶子間の合体（受精や接合）とによって有性生殖が誕生しました。遺伝子群の組み合わせに多様性が生じ、世代毎に必ず遺伝子群組成の異なる生物が誕生するのです。

ところで、線状DNAができて初めてDNAに両端ができたわけですが、DNA複製機構からして、DNA末端（テロメア）だけがコピーされない事態となりました。これをDNAの「末端複製問題」といいます。そこで、細胞分裂ごとにテロメアの端が複製されない、つまりテロメアが短縮される羽目となりました。このままでは、生物の遺伝情報はどんどん失われてしまいます。どのように解決したのでしょうか？それが、体細胞と生殖細胞への分化や、生物の有限寿命に関係するのです。

第9話 テロメアと幹細胞の枯渇

DNAの線状化と二倍体化そして性の発生を基に、体細胞のDNAが短縮し、寿命が生じたというところでもない話をしました。しかし、命が続くにはDNAが正確に子孫に伝わらなくてはならないはず。その役目は生殖細胞に託されました。

生殖細胞は細胞分裂ごとに短縮するDNAの端「テロメア」が再び修復延長されるような仕組みを活用しているのです。テロメラーゼという特別な酵素を使います。テロメラーゼは通常の順序と逆にRNAからDNAを作ります（逆転写）。テロメアの塩基配列と対になるRNAをテンプレートとして保持しており、テロメアDNA単位が逆転写されることによって、切れた端のテロメアが再延長するのです。これによって生殖細胞は死から逃れることに成功しました。発生初期に卵割している細胞は、全能細胞とよばれる未分化な細胞です。

培養系に取り出せば、ES細胞(胚性幹細胞)として、個体まで発生も可能です。此の細胞もテロメラーゼを充分

持ち、不死細胞なのです。

しかし、幹細胞といっても、我々の身体の組織にある未分化な幹細胞（組織幹細胞とか成人幹細胞と言う）は、テロメラーゼを発現していますが、活性は充分では有りません。その為、骨髄幹細胞も枯渇してくるのです。

実は体細胞も当然テロメラーゼの遺伝子をゲノム上に持っています。しかし、ほとんど使うことはありません。その結果DNAが短縮し細胞の寿命が生じます。どうして使わないのでしょうか。体細胞はしよせん生殖細胞の「運び屋」にすぎない運命である上に、DNAが短縮しても構わないように、工夫されたからです。

テロメア部分のDNAは、六文字単位の同一ブロック、塩基で言えばTTAGGGが数千回反復して並ぶようになりました。六文字に意義はありませんが、役目は重要です。分裂時にDNAが数十個単位ずつ短縮するようにし、本体の重要な遺伝子領域まで失われるのを防ぎます。

過剰に分裂すると重要領域まで短縮し、異常な体細胞になってしまう。そこで一定回数、分裂すると、分裂を停止させるようになりました。分裂終了細胞群の出現です。ブロックは「回数券」にたとえられます。体細胞は回数券を分裂ごとに使い、回数券が尽きる前に分裂停止する。なんと見事な対処でしょう。これを「細胞老化(分裂加齢)」と言い、「分裂時計」が働いて、細胞の老化度がわかるのです。此のテロメア領域の先端は、切れっぱなしではなく、ループを作って保護をしている事が分かっています。それをシェルトリン、つまり、シェルター構造物とよんでいます。別の染色体に有るテロメア末端と互いに融合したりしないように保護しているのです。

一方、テロメラーゼを体細胞で復活させた細胞がいます。がん細胞です。実は生物が体細胞でテロメラーゼを使わずに回数券を選んだのは、がん化の危険性を避けるためと考えられています。

回数券が十分ある間はなんら差し支えありません。しかし、野生動物を動物園で養育したり、人間生活を医療で向上させたりして生物が延命するようになると、回数券の不足が目立ち始めます。一方、酸化ストレスを始め多くの有害な環境因子はDNAを傷害します。特に塩基のGが傷を負うので、テロメア構造が破壊される事に成りますから、分裂停止か細胞死が起こるのです。そして、幹細胞が不足し、細胞の再生も出来にくくなり、あちこちの臓器に障害が頭われるようになった。これが生物の老化です。

どうでしたか。生物の寿命の起源は性の発生（運び屋の用済み）、老化の起源は体細胞DNA末端の短縮（回数券の不足）、破壊だという見解。両者は視点を変えた言い方にすぎないのかもしれない。

では、寿命と老化を変更させるには生殖戦略の発達や、テロメア末端の保護を考えればいいのか？その通り！また次回に。

【研究室紹介】

東京理科大学薬学部生命創薬科学科分子病理・薬物代謝研究室

樋上 賀一

東京理科大学薬学部、生命創薬科学科、分子病理・薬物代謝学研究室・教授

東京理科大学は、明治14年（1881年）に創設され、今年で創立127年の歴史を有する8学部33学科からなる理工系総合大学です。昭和24年に東京理科大学と改称されるまで、東京物理学校と呼ばれていました。夏目漱石の小説『坊ちゃん』の主人公が本学出身という設定であるため、坊ちゃんマークが大学のシンボルとなっています（図1）。大学発祥の地であり本部がある神楽坂に加え、千葉県野田、埼玉県久喜、それに北海道長万部と4つのキャンパスから構成されています。昭和35年に設置された薬学部は、理学部に次ぎ、長い歴史を有しており、平成15年には神楽坂キャンパスから野田キャンパスへ移転しました。野田キャンパスは都心から電車で1時間弱の距離にあり、利根運河に沿った約50万㎡の広大な敷地の中に、薬学部、理工学部、基礎工学部さらに生命科学研究所やゲノム創薬研究センター、ドラッグデリバリーシステム（DDS）研究センターなどが点在し、リサーチパークを形成しています（図2）。その中でも薬学部は最も奥で、最寄りの東武野田線『運河駅』から徒歩で約15分の距離にあります。ちなみに、3つの斬新なデザインの校舎を中心とした薬学部キャンパスは、平成18年度

千葉県建築文化賞を受賞しています（図3）。研究室から外を眺めると、送電線が目立つものの大きな建造物は少なく、広大な関東平野を実感できます。また近くには国立がんセンター東病院や東京大学柏の葉キャンパス、科学警察研究所などがあり、研究するには絶好の環境です。しかし、言い換えると、学食以外は食堂も近くなく、少々寂しくもあります。

薬学部6年制のスタートにともない、当薬学部も、平成18年4月に、従来の薬学科と製薬学科から、6年制の薬学科（学生定員80名）と4年制の生命創薬科学科（学生定員100名）の2学科に再編成されました。全国の私立大学の中では唯一と思われませんが、4年制の学生数が6年制の学生数より多いのが特徴です。また薬学部では珍しく、講座制ではなく研究室制をとっており、分子病理・薬物代謝学研究室は、私が昨年4月に着任して開設されました。現在、沖田直之助教と大学院生2名、8名の大学4年生が在籍し（図4）、さらに来年度には院生は10人近くになる予定で、やっと研究室らしい体制が整いつつあります。研究室の主要研究テーマは、『(1) カロリー制限による脂肪組織リモデリングの分子メカニズムの解明』、



図1 大学のシンボル“坊ちゃん”



図2 野田キャンパス全体図

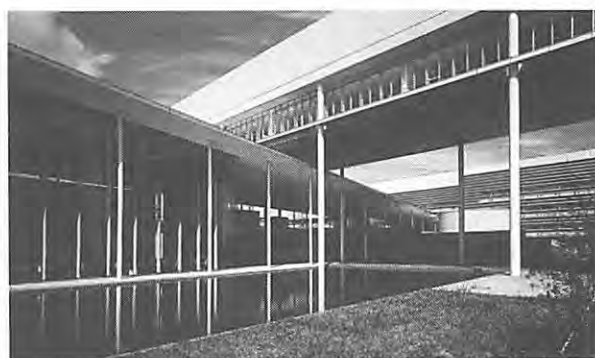


図3 薬学部キャンパス
(手前左：厚生棟、手前右：講義棟、奥：研究棟)



図4 研究室の面々

『(2) カロリー制限模倣体代謝改善薬物の開発』、『(3) 細胞周期チェックポイントにおけるアポトーシス制御機構の解明』が三本柱です。(1)、(2) に関しては、私が長崎大学医学部探索病理学講座時代より、下川 功先生らとともに長らく研究を行ってきた『カロリー制限による抗老化・寿命延長作用の分子メカニズムの解明』というテーマが土台となっています。その中で、カロリー制限動物の白色脂肪組織では、脂肪細胞が小型化し、レプチン分泌に比べアディポネクチン分泌が盛んないわゆる善玉脂肪細胞が増加し、DNAチップを用いた解析でも、遺伝子発現がドラスティックに変化している事を明らかにしました。また、最近カロリー制限模倣体薬物として植物性ポリフェノールの1種であるレスベラトロールや解糖系阻害剤である2-deoxy-D-glucoseが目されるようになってきました。このような脂肪組織でのリモデリング機構やカロリー制限模倣体薬物による培養脂肪細胞株での作用機序を網羅的に解析し、新規肥満症治療薬や代謝改善薬を創薬するためのターゲット分子を探索しています。(3) に関して、沖田助教らは、アポトーシス誘導時に細胞周期制御因子Chk1キナーゼが限定分解され、死の基質タンパクである事を明らかにしました。Chk1キナーゼ限定分解の生理的意義の解明を突破口として、細胞周期チェックポイントからアポトーシスへのスイッ

チング制御機構の解明を目指し、研究が進行しています。このような研究テーマを推進するため、基礎老化学会関連では、東京都老人研究所の丸山直記先生や戸田年総先生らにご協力を頂いており、また同じ千葉県にある薬学部ということで東邦大学高橋良哉先生の教室との交流が深まればと考えているところです。

大学ホームページでは、薬学部は理工学部応用生物科学科や基礎工学部生物工学科、生命科学研究所、ゲノム創薬研究センター、DDS研究センターと連携し、ファーマコインフォマティクスの大拠点として、生まれ変わったとあります。ファーマコインフォマティクスやゲノム創薬といった今流行の言葉はよく耳にしましたが、医学部に在籍していた当時には今ひとつ実感を得ることはできませんでした。本学でも、実情はその端緒にようやくたどり着いたといったところだと思いますが、創薬というキーワードを実感できる環境である事は間違いないように思います。また、長崎大学では大学院生不足に苦しんでいましたが、本学ではその悩みは無用と思われれます。一方、その分、研究費の獲得が至上命題です。今後は、小さな研究室ではありますが、このような恵まれた環境の中、独創的な研究を展開しつつ、老化研究に興味を持つような若手研究者を研究室から輩出し、基礎老化学会の発展に少しでも貢献できればと願っています。

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32巻 第3号

平成20年(2008)9月16日

発行者 日本基礎老化学会
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2
東京都老人総合研究所内
電話 03-3964-3241

編集 編集委員会

印刷所 三陽工業株式会社