

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K14899

研究課題名(和文) 線虫の加齢に伴うミトコンドリア代謝物変動の解析

研究課題名(英文) Analysis of age-related metabolic changes in mitochondria of *Caenorhabditis elegans*

研究代表者

田之倉 優 (TANOKURA, Masaru)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：60136786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアはTCA回路や電子伝達系によるエネルギー産生の場であると同時に、個体の寿命、加齢性難聴やサルコペニアなどの老化調節に関わる。本研究ではミトコンドリア代謝物の加齢変動を解析するとともに、寿命研究の代表的なモデル生物である線虫を用いて、加齢とともに低下する代謝物の摂取による寿命延長への影響を解析した。線虫からのミトコンドリア単離はマルチビーズショッカーと遠心分離によって確立した。一方、代謝物の加齢変動は超臨界抽出型LC-MS/MS分析による解析を検討した。最終的に既報のデータからプリンヌクレオチド代謝系に着目し、プリンヌクレオチド代謝物が線虫の寿命を延長する知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrion is an organelle for energy production by the TCA cycle and electron transfer system, and is also involved in the regulation of lifespan and organ aging such as age-related hearing loss and sarcopenia. In this study, we analyzed age-related changes in mitochondrial metabolites and the effect of metabolites that prolong the lifespan of *C. elegans* (nematode), which is a typical model organism of lifespan studies. Isolation of mitochondria from nematodes was established by the combination of multi-beads shocker and centrifugation. On the other hand, age-related changes of metabolites were examined by supercritical fluid extraction LC-MS/MS analysis. Finally, we focused on purine nucleotide metabolism based on previously reported data, and then obtained the results that purine nucleotides prolonged the life span of nematodes.

研究分野：食品生物構造学

キーワード：ミトコンドリア 代謝動態 線虫 老化 寿命

### 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、TCA 回路、脂肪酸のβ酸化、尿素回路など、生命活動の根幹をなす代謝物の中心的な反応場として機能する。これに加え、ヘムやステロイドホルモンの合成、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度などの恒常性維持に関わる多様な細胞内シグナル伝達の調節を担う。また、細胞のアポトーシスにおいても中心的な役割を果たしている。ミトコンドリアは独自のゲノム DNA (mtDNA) をもち、ミトコンドリアの ATP 合成装置である電子伝達系呼吸鎖複合体(I~V の5種類)の一部のサブユニットをコードしている。申請者はこれまでに、mtDNA の変異校正機能を失った *Polg* マウスの解析により、加齢に伴うミトコンドリアタンパク質の合成異常が筋肉細胞の減少、すなわちサルコペニア様の老化関連疾患症状を引き起こすことを示した。また、摂取カロリー制限による加齢性難聴の抑制が、ミトコンドリアに局在するサーチュインタンパク質 SIRT3 を介した細胞のアポトーシス抑制に起因することを明らかにした。これらの解析例を含む多くの研究結果により、ミトコンドリアが加齢により低下する個体の生理機能の調節、さらには線虫やマウスなどの個体寿命の調節に重要な役割を演じていることが示されている。一方、TCA 回路の中間体であるオキサロ酢酸 (OAA) や α-ケトグルタル酸 (αKG) が線虫の寿命延長効果を示すことが報告され、ミトコンドリア代謝物による寿命や老化関連疾患の調節機能がクローズアップされてきた。しかしながら、加齢に伴うミトコンドリア代謝物の変化とそれらの老化調節機能についてはまだ断片的な知見しか得られていない。

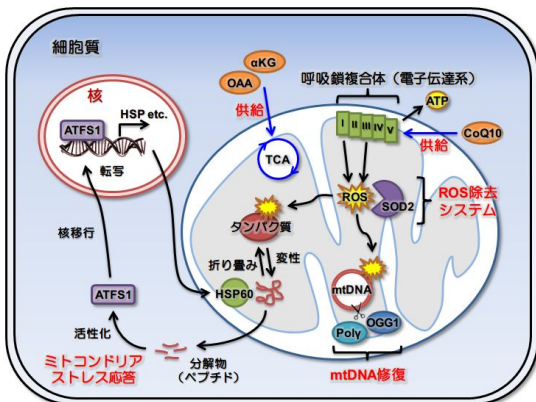


図 1 ミトコンドリアの機能維持とメンテナンス機構の模式図

### 2. 研究の目的

本研究では、寿命研究の代表的なモデル生物である線虫を用いて、生育の各段階においてミトコンドリアを抽出し、GC-MS や LC-TOF-MS により、ミトコンドリア代謝物の加齢に伴う動態を解析することを目的とした。また、得られるミトコンドリアの代謝

パスウェイの情報に基づいて、加齢に伴って減少する代謝物に着目し、それを線虫に摂食させることにより線虫の寿命延長に及ぼす影響を評価することを目的とした。ミトコンドリアの代謝パスウェイが加齢に伴ってどのように変動するのかを理解できれば、加齢によるミトコンドリア機能低下の要因を代謝物の観点から推論することで、ミトコンドリアを介した新たな老化プロセスの解明とミトコンドリア代謝物の制御による新たな抗老化研究に役立つことが期待される。

### 3. 研究の方法

#### 1) 線虫のミトコンドリア単離・代謝物抽出の条件検討

線虫を OP50 添加の寒天培地を用いて培養し、タイミングを揃えて孵化させ、線虫の寿命曲線を確認した。孵化後 3 日を経た線虫を L4 adult として 0 日目とし、そこから 5 日後の線虫をサンプリングした。この線虫サンプルを用いて、マルチピースショッカーを用いた破碎条件を検討し、破碎した線虫からミトコンドリアを得るための遠心分離法を検討した。ミトコンドリアの分画単離の有無は、ミトコンドリアに特異的に発現する COX IV 抗体による Western blotting で解析することで、線虫からの適切なミトコンドリア抽出・分画の条件を探索した。

#### 2) 線虫のミトコンドリア代謝物の分析

線虫を OP50 添加の寒天培地を用いて培養し、L4 adult を 0 日目として、それからさらに 5 日、10 日でサンプリングした。サンプリングの個体数は 1 群約 100 匹として、1 で確立した方法で抽出・分画したミトコンドリアを用いた。また、当初計画の予定を変更し、超臨界抽出型 LC-MS/MS 分析装置を利用して代謝物の分析を検討した。超臨界抽出型 LC-MS/MS 分析装置はここ数年で一般に利用できるようになった装置である。この装置の特徴である超臨界抽出を用いることで、できるだけインタクトな状態で線虫から代謝物を抽出し検出できることが期待された。ミトコンドリアの抽出・分画の操作過程では、代謝物の変化が生じることが考えられた。

#### 3) 代謝パスウェイの加齢動態に基づく代謝物の寿命延長効果の評価

代謝パスウェイの加齢動態を考慮し、加齢に伴う変化が顕著な代謝物の中から、その量の減少によってミトコンドリア機能の低下を導く可能性の高い代謝物を選定した。これら代謝物の数種類について、線虫への摂食実験による寿命解析を実施した。各代謝物を μM から mM の濃度で培地に添加し、その条件下で 100 匹の線虫を培養した。これまでと同様に L4 adult を 0 日目として、2 日ごとに生存している線虫の数をカウントして、線虫の生存曲線から平均寿命を計測することで代謝物の供給による線虫の寿命延長効果

を評価した。また効果が認められた代謝物については実際に線虫における代謝物の量を定量して解析し、ミトコンドリア機能との関連については、MitoTracker Deep Redを用いて線虫のミトコンドリアを染色し、代謝物のミトコンドリア生合成への影響について解析した。

#### 4. 研究成果

##### 1) 線虫のミトコンドリア単離・代謝物抽出の条件検討

OP50 添加の寒天培地で 5 日目まで培養した線虫 (約 100 匹) を集めてリン酸緩衝液で洗浄した後、マルチビーズショッカーを用いて、低温 (4°C) 下での破碎条件を検討した。サンプル溶液にはプロテアーゼ阻害剤を添加して、破碎後にタンパク質分解が起こらないようにした。破碎容器と各種ビーズ、回転数、時間等を設定して破碎し、線虫の個体が残っているかどうかを顕微鏡下で観察して条件を評価し、最終的にジルコニアビーズを用いた破碎条件で確定した。

次に遠心分離によるミトコンドリア分画の条件を検討した。破碎後のサンプルにスクロースを添加した状態で、遠心分離の回転数と時間を設定し、最終的に 2 段階の遠心分離によりミトコンドリアを分画する条件を確定した。以上の一連の操作は、線虫を集めてから 30 分程度と比較的短時間で実行することができ、効率的な分画条件と考えられる。

##### 2) 線虫のミトコンドリア代謝物の分析

当初計画では GC-MS または LC-TOF-MS での代謝物分析を検討していたが、実施前に GC-MS を用いた線虫の代謝物の加齢動態に関する研究が報告されたため、本研究では線虫の前処理を必要とせず、よりインタクティブな状態で代謝物を測定できることを特徴としている超臨界抽出型 LC-MS/MS 分析装置を用いて、0 日、5 日、10 日の線虫の代謝物を分析した。ミトコンドリアで利用される代謝物の中で、これまで加齢に伴って減少することが知られている CoQ10 (CoQ10) を選択し、超臨界抽出型 LC-MS/MS 分析によって線虫のミトコンドリア代謝物の加齢変化を追跡できるかを評価した。この分析では CoQ10 の還元型と酸化型をそれぞれ検出することができ、さらに超臨界抽出により還元型 CoQ10 が酸化型に変化することなく検出できることが期待された。測定の結果、本研究で実施可能な範囲では、還元型と酸化型の CoQ10 を区別して検出することはできず、線虫の加齢変化についても再現性が得られなかった。還元型 CoQ10 はミトコンドリアの電子伝達系において、複合体 I, II と複合体 III の間の電子の受け渡しに機能しており、ミトコンドリア機能を評価する指標となることから、今後さらに、超臨界抽出の条件を検討し、ミトコンドリア代謝物の加齢動態の検出につなげていきたい。

##### 3) 代謝パスウェイの加齢動態に基づく代謝物の寿命延長効果の評価

既報の GC-MS 分析結果に基づいて、線虫の加齢に伴い減少する代謝物を検討した。その結果、AMP やヒポキサンチンなどの一連のプリンヌクレオチド代謝物が加齢に伴って減少していることに着目した。AMP は AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性を調節する物質であり、AMP の低下は AMPK の活性を抑制する可能性が示唆された。また、AMPK は mTOR や FOXO といった現在最もよく解析されている寿命調節の主要な分子経路と分子レベルでつながっており、ミトコンドリア新生を制御する PGC1 $\alpha$  を直接リン酸化して活性化する因子でもある。

本研究では、上記の知見からプリンヌクレオチド代謝経路に着目し、AMP と他の 1 種類のプリンヌクレオチド代謝物、さらにプリンヌクレオチド代謝経路の阻害剤を選択した。これらを線虫に摂食させて寿命測定を行った結果、いずれの代謝物と阻害剤においても線虫の寿命を延長する効果が示された。統計的に寿命曲線を解析したところ、AMP 以外の 2 種類では 10% 最大値寿命の延長効果が示され、AMP の直接的な投与よりも寿命延長に対して効果があることが示唆された。

一方、AMP 等を摂食させることで、実際に線虫体内でプリン代謝物の蓄積が生じているかを SUPELCOSIL LC-18-T カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。その結果、実験に供したプリンヌクレオチド代謝物の摂食によって、線虫体内で AMP 等のプリンヌクレオチドが総じて増加していることが観測された。また、線虫における AMPK オルソログ AAK-2 のドミナントネガティブ変異型の線虫 (*aak-2*) でも同様の寿命測定を行ったところ、プリンヌクレオチド代謝物を摂食させても、*aak-2* では有意な寿命延長が認められなかった。以上の結果より、プリンヌクレオチド代謝物による線虫の寿命延長には AMPK の活性化を介した機構が示唆された。

次に AMPK の活性化はミトコンドリア新生を誘導することが報告されているため、線虫のミトコンドリア量を観測した。その結果、プリンヌクレオチド代謝物の投与群と対照群のどちらにおいても加齢に伴いミトコンドリア量が減少していた。しかしながら、対照群に比べて投与群の減少量が相対的に低いことから、ミトコンドリアの恒常性がより維持されている可能性が示唆された。

本研究で得られた知見は、プリンヌクレオチド代謝系の加齢動態を制御することによって、個体寿命の延長やミトコンドリア機能低下の抑制につながる可能性を示唆している。また、本研究で線虫に摂食させたプリンヌクレオチドは食餌として日常的に摂食できるものであり、阻害剤は既に市販されている薬剤の一つである。こうした点から、今後さらにマウス等のモデル動物における摂食

実験で効果を検証することも可能であり、加齢関連疾患等への関連についての新たな知見が得られるものと期待している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

田之倉 優 (TANOKURA, Masaru)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・  
教授

研究者番号：60136786