

平成21年6月10日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18590224  
 研究課題名（和文） 老化促進モデルマウスP8系の離乳期からの加齢速度促進機構の解明に向けた研究  
 研究課題名（英文） INVESTIGATION OF THE MECHANISMS OF ACCELERATED AGING AFTER WEANING IN SENESCENCE ACCELELATED MOUSE P8 STRAIN  
 研究代表者  
 高橋 良哉（TAKAHASHI RYOYA）  
 東邦大学・薬学部・教授  
 研究者番号：40197190

研究成果の概要：老化促進モデルマウス（SAM）P8系の離乳期にはじまる促進老化現象の原因を探るため行った組織タンパク質の解析から肝臓型脂肪酸結合タンパク質のアミノ酸配列に促進老化型P8系と正常老化型R1系マウスに違いがあること見出した。最終的にSAMP8の促進老化の原因の特定には至らなかったが、促進老化型P8系マウスは高脂肪餌に対する感受性が高い系統であり、老化や老化関連疾患の基礎研究に重要なモデル動物となり得る可能性が高いことが明らかになった。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,100,000	0	1,100,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	600,000	3,700,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学(含体力医学・栄養生理学)

キーワード：発達・成長・老化

## 1. 研究開始当初の背景

老化促進モデルマウス(SAM)は、アミロイドーシスや学習記憶障害などの老化兆候を早期に示すマウスの一群である。これらのマウスはそれぞれの特性からP1系～P11系に分類されているが、いずれも寿命は正常老化を示すR1系マウスの約1/2の約1～1年半である。しかし、P系マウスがどのような原因で短命となっているかは明らかでない。

これまでに申請者は、SAMのP系マウスの加齢特性を明らかにするために、短命なP8系と長命なR1系マウスの脳や肝臓における

構成的遺伝子発現(cyclophilin, hsc70 mRNAなど)や組織特異的遺伝子発現(major urinary protein mRNAなど)の加齢変化を生後1日から生涯に渡り調べてきた。その結果、調べたすべての遺伝子において、生後1日～20日齢まではP8系とR1系の遺伝子発現変化パターンに差がなかったが、離乳期を過ぎたところから(20～30日齢)P8系の遺伝子発現の加齢変化が長命なR1系マウスと比べ相対的に速まっていた。その加齢変化パターンはR1系マウスのものを寿命の差と同じ割合で縮小したものであった。すなわち、P8系マウ

すは、単に特定の病気が原因で短命となっているのではなく、離乳期を境に加齢速度を加速させる変化を起こした動物であることが示唆された。

P8 系マウスの離乳期を境に起こる加齢に伴う遺伝子発現変化の促進現象には幾つかの原因が考えられる。例えば、離乳期における母乳から固形飼料への食餌変化により発現が開始あるいは終了すべき遺伝子（群）の発現量調節に何らかの異常があり加齢速度が変化している可能性や加齢速度に直接あるいは間接的に影響を与える遺伝子に変異があり加齢速度が変化している可能性などである。

## 2. 研究の目的

本研究では、P8 系マウスにおける遺伝子発現の促進メカニズムを明らかにする研究の一環として、R1 系マウスを比較対照としながら P8 系マウスで離乳期前後に①発現量が増える遺伝子あるいは②タンパク質の量的変化を伴う遺伝子変異が存在するか否かを調べ、得られた遺伝子情報から更に加齢速度に影響を与える遺伝子の探索を行う。すなわち、P8 系マウスで遺伝子発現量 (mRNA 量) が変化している遺伝子は、比較的短時間で多くの遺伝子について調べることができるディファレンシャルディスプレイ法により実施する。しかし、このようなスクリーニングでは塩基置換などによりミッセンス変異などを起こした変異遺伝子は見逃してしまう。そこで、このような遺伝子については、タンパク質側からの解析を進めることにする。すなわち、P8 系と R1 系の組織（あるいは細胞小器官）のタンパク質を蛍光標識二次元ディファレンス電気泳動 (2D-DIGE) で解析し、P8 系マウスで特有の動きを示すものを探す。P8 系マウスに特有なものが存在する場合は、さらに、質量分析器 (TOF-MASS) で同定を行った後、そのタンパク質の遺伝子をクローニングし構造解析を行う。どちらのスクリーニング方法も長所と短所が存在するが、互いにそれぞれの方法の短所を補いながら網羅的な探索を行う。

## 3. 研究の方法

P8 系マウスの遺伝子発現の加齢変化の促進現象が離乳期 (20~30 日齢) を過ぎたところからはじまる。そこで、本実験では、P8 系および R1 系マウスを 21 日齢で離乳させ、その前後で mRNA 発現量やタンパク質の量的や質的变化を両系統間で比較する。実験に使用する動物は、離乳前の動物として餌の摂取がはじまっていない 10 日齢、離乳時の 21 日齢、離乳後の動物として 35 日齢の 3 グループを用いる。

実験に使用する組織は、すでに遺伝子発現

の加齢変化の促進現象を認めている脳各区域 (大脳, 脳幹, 小脳) と肝臓の他に離乳期において遺伝子発現の急激な変化が予想される消化器系などを加える。実験で解析に用いる組織の優先順位は大脳, 脳幹, 小脳, 肝臓, 小腸 (3 区域), 腎臓, 血漿などの順番とする。

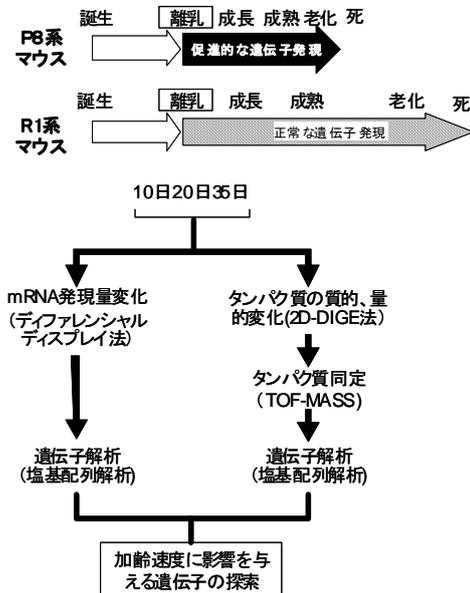


図1 老化促進モデルマウス P8 系の離乳期からの加齢速度促進機構の解明に向けた研究

(1) P8 系マウスに特異的に発現量が増えている遺伝子のスクリーニング：ディファレンシャルディスプレイ法

P8 系と R1 系の各日齢グループの組織から精製した poly(A)+mRNA を用いて定法に従い、ディファレンシャルディスプレイ法により mRNA 発現量の異なる遺伝子のスクリーニングを行う。方法の概略は以下の通りである。

RNA サンプルをオリゴ dT12 の 3' 末端に 2 mer 付加したプライマーで逆転写反応を行い、合成された cDNA を鋳型として、10 mer の任意の配列を持ったプライマー (AP プライマー) と逆転写反応に用いたプライマーで PCR を行う。この条件で増幅される様々な産物をシーケンスゲルに泳動して分離することにより、発現量の違いを捉える。発現量に差が認められる DNA 断片は、ゲルから抽出しプローブとして、Northern blot 法や RT-PCR 法で差があることを確認する。発現量の差が確認できた場合は、シーケンスを決定し、データベースで既知か未知かを調べる。未知である場合は、cDNA の全長をクローニングして、cDNA 配列やアミノ酸配列の

ホモロジー検索を行い、機能推定を行う。  
 (2) タンパク質の質的变化を引き起こす変異遺伝子のスクリーニング：蛍光標識二次元ディファレンス電気泳動 (2D-DIGE) 解析  
 前述の(1)ディファレンシャルディスプレイ解析では捉えられないようなミッセンズ変異などを起こしタンパク質の質を変化させるような遺伝子のスクリーニングを行うために蛍光標識二次元ディファレンス電気泳動 (2D-DIGE) 解析を行い、タンパク質側からの変化からの遺伝子のスクリーニングを行う。方法の概略は次の通りである。  
 P8系とR1系の各組織タンパク質あるいは細胞小器官タンパク質をそれぞれ蛍光色素 (Cy2, Cy3 または Cy5) で標識し、2次元電気泳動を行う。泳動後のゲル解析は現有の Ettan DIGE システムを用いて行う。発現量あるいは挙動の異なるタンパク質は、ゲルごとスポットを切り出し、トリプシンなどによりインゲル消化を行い、生じるペプチド質量を質量分析装置 (TOF-MASS) で解析する。得られたペプチドフラグメントの質量から、既存であるか未知であるかをデータベースで検索を行う (ペプチドフラグメント法)。タンパク質が既存の場合は、cDNA データをもとに P8 系および R1 系の組織から全長 cDNA をクローニングし、シーケンスを行い、塩基配列をもとに翻訳したタンパク質と 2D-DIGE で得られた等電点や分子量の系統差について検証する。両系統の cDNA からのタンパク質の一次構造に差が認められなかった場合は、翻訳後修飾の違いが予想されるので、TOF-MASS や抗体による翻訳後修飾の解析を行い、その修飾に関わる酵素に系統差が見られないかを更に調べる。タンパク質が未知の場合は、MS/MS 法などにより部分アミノ酸配列を決定し、全長 cDNA クローニングとシーケンスを行う。得られた cDNA 塩基配列やアミノ酸配列をもとにホモロジー検索を行い、タンパク質機能を推定する。

#### 4. 研究成果

老化促進モデルマウス (SAM) P8 系の加齢促進に関わる因子の解析は、タンパク質の変化が捉えられる蛍光標識二次元ディファレンス電気泳動 (2D-DIGE) 解析から実施した。その結果、肝臓に両系統で等電点の異なる分子量約 14kDa のタンパク質が存在することを見出した。これらは同定の結果、肝臓型脂肪酸結合タンパク質 (L-FABP) であることがわかった。さらに、L-FABP 等電点の系統差は cDNA 塩基配列から 1 塩基多型に基づく 1 アミノ酸残基の違いによること、その位置が L-FABP の脂肪酸結合能部位に隣接することが明らかになった。そこで次に、L-FABP 遺伝子多型が脂肪酸結合能に与える影響を調べるために、両系統のマウス肝臓から

L-FABP をゲルろ過カラムクロマトグラフィー等で精製し脂肪酸結合能を比較した。精製した (>90%) L-FABP の [14C]-パルミチン酸 (PA) の結合能は、R1 系マウスに比べ P8 系でやや高い傾向にあったが統計的に有意でなかった。しかし、パルミチン酸以外のステアリン酸、オレイン酸、リノール酸などの脂肪酸結合能や脂肪酸の細胞内への取り込みに L-FABP の遺伝子多型が影響している可能性がある。

次に、L-FABP 遺伝子多型による構造の系統差が老化促進や加齢に伴う肥満などに何らかの影響を与えているものと考え、高脂肪食が両系統の成長や脂肪蓄積に及ぼす影響などを調べた。本実験には、促進老化型 (SAMP8)、正常老化型 (SAMR1)、糖尿病モデル (KKAy) および野生型 (C57BL/6J, DBA2) の 5 系統のマウスを用いた。15%ラードをコントロール餌 (CRF1) に添加した高脂肪食を約 12 週間与え、体重および各組織重量、血清パラメータなどを調べた。その結果、高脂肪食による成長に系統差が認められ、SAMP8 が最も高い体重増加を示した。

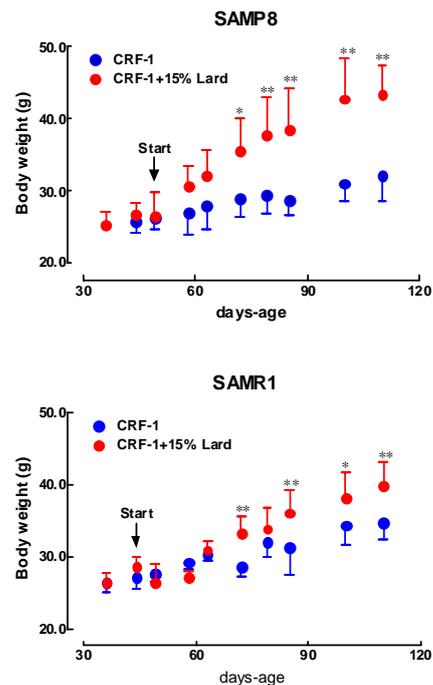


図2 老化促進モデルマウスSAMP8とSAMR1の通常餌と高脂肪含有餌飼育における体重変化

血糖値は SAMP8 で高脂肪食摂食により著しく上昇したが、血清インスリンレベルは KKAy とは異なり相対的に低い状態であった。また、脂肪蓄積に関しては、SAMP8 は皮下脂肪が、SAMR1 は内臓脂肪が多い傾向にあった。さらに、SAMP8 では顕著な肝重量増加を伴った肝

脂肪蓄積が認められた。以上のように、本研究により老化促進型 SAMP8 系マウスは高脂肪餌に対する感受性が高い系統であり、老化や老化関連疾患の基礎研究に重要なモデル動物となり得る可能性が高いことが示された。

なお、ディファレンシャルディスプレイ法による P8 系マウスに特異的に発現量に変化している遺伝子のスクリーニングにおいては十分な成果を得ることができなかった。

## 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 1 件)

- ① Sataro Goto, Ryoya Takahashi, Zsolt Radak, Ramesh Sharma, Beneficial biochemical outcomes of late-onset dietary restriction in rodents. Annals of the New York Academy of Sciences, 1100, 431-441 (2007), 査読無

[学会発表] (計 3 件)

- ① 田中 (福井) ゆか、高脂肪食の生体への影響、SAM と KKAY マウスの比較、第 52 回日本薬学会関東支部会、2008 年 10 月 4 日、野田  
④ 高橋良哉、老化促進モデルマウス SAM を用いた抗老化研究、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 26 日、京都
- ② 高橋良哉、離乳期 SAMP8 小脳におけるミエリン塩基性タンパク遺伝子発現異常、第 23 回老化促進モデルマウス (SAM) 研究協議会研究発表会、2008 年 7 月 17 日、京都
- ③ 高橋良哉、Altered expression of myelin basic protein gene in the cerebellum of SAMP8 mice、第 31 回日本基礎老化学会、2008 年 6 月 13 日、松本

[図書] (計 1 件)

- ① 高橋良哉、アドスリー、老化・老年病研究のための動物実験ガイドブック (2008)、41-44

[その他]

ホームページ

<http://www.mnc.toho-u.ac.jp/v-lab/antia-aging/index.html>

<http://www.phar.toho-u.ac.jp/labo/seika.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 良哉 (TAKAHASHI RYOYA)

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号：40197190

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし