

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390042

研究課題名(和文) カロリー制限によるミトコンドリアレトログレードシグナルを介した老化制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of the aging by calorie restriction: Implications of mitochondrial retrograde signals

研究代表者

下川 功 (Shimokawa, Isao)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：70187475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円、(間接経費) 4,230,000円

研究成果の概要(和文)：カロリー制限(CR)は、ミトコンドリア機能制御を通して抗老化効果を示すのかもしれない。我々は、CRがミトコンドリアタンパク質Cox6b1(cytochrome c oxidase(Cox)のサブユニット)を増加させることをすでに報告した。本研究は、Cox6b1の役割を明らかにするために、in vitro実験を行なった。結果は、Cox6b1がCoxを含むスーパーコンプレックスを形成することによって、ミトコンドリアの呼吸機能を増強すること、同時に発生する活性酸素は、Nrf2の活性化によって防御されることを示唆した。我々は、Cox6b1の発現にGSK-3の抑制が関与することも示した。

研究成果の概要(英文)：Calorie restriction (CR) may exert anti-aging effects by modulating mitochondrial functions. We previously reported that CR upregulated mitochondrial proteins, including Cox6b1, a subunit of cytochrome c oxidase (Cox). To investigate the functional roles of Cox6b1 in mitochondria, we conducted in vitro experiments using Cox6b1-overexpressing cells or knockdown cells. The findings suggest that Cox6b1 mediates some of the effects, e.g., stress resistance, of CR by enhancing mitochondrial respiration via the assembly of Cox supercomplexes. The simultaneous generation of ROS may be prevented by several mechanisms, including Nrf2 activation. We also found that inhibition of glycogen synthase kinase (GSK)-3b, a putative upstream signaling molecule for Cox6b1, increased Cox6b1 protein expression. Accordingly, we confirmed that CR increased phosphorylated GSK-3b, its inactive form, in the mouse liver. The present study supports the mitohormesis hypothesis of CR.

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：カロリー制限 老化 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

(1) 適度に摂食カロリーを制限すると多種類の生物の寿命が延長する。げっ歯類などの実験動物だけではなく、サルを用いた研究においても、健康寿命を延伸する可能性が示唆された。このことは、カロリー制限 (Caloric restriction, CR) の寿命延長機構が解明されれば、ヒトの老化や関連疾患の抑制や制御に応用できることを示している。

(2) 我々は、生体のエネルギーを産生し、同時に活性酸素を発生させるミトコンドリアの機能に着目した。我々の研究では、CR によって、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体 IV (Cox) のサブユニット 6b1 (Cox-6b1) の発現レベルが増加していることを明らかにした。Cox は核内遺伝子にコードされる 10 個のタンパク質とミトコンドリア DNA にコードされる 3 個のタンパク質からなる複合体である。Cox6b1 は、核 DNA のコードされミトコンドリアの膜間腔に突出するように存在している。ミトコンドリア機能制御における Cox6b1 の役割は、不明な点が多い。

2. 研究の目的

CR は、呼吸鎖複合体の構成を変化させることによって、ミトコンドリアの機能を制御している可能性がある。本研究は、Cox6b1 の過剰発現、発現抑制細胞を用いて、Cox6b1 の機能を検討した。

3. 研究の方法

マウス皮膚から得られた cDNA ライブラリーから、Cox6b1 cDNA を増幅し、pcDNA3.3-TOPO vector を用いて、NIH3T3 細胞に導入し、Cox6b1 発現細胞株を樹立した。Cox6b1 をノックダウンするために、特異的な siRNA を購入した。RT-PCR 法、Western blot 法にて特異的な mRNA、タンパク質の発現レベルを定量した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、特異タンパク質の細胞内局在を確認した。Cox の酵素活性、ATP の量、ROS の産生量、細胞の生存率などは、既に報告されている方法に従った。呼吸鎖複合体スーパーコンプレックス中の Cox や Cox6b1 の存在を解析するために、Blue native-polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) 法を用いた。統計解析は Student's t test、ANOVA など常法に従った。

4. 研究成果

(1) Cox6b1 過剰発現 NIH3T3 (Cox6b1-3T3) 細胞において過剰発現された Cox6b1 タンパク質がミトコンドリアに局在することを共焦点レーザー顕微鏡にて確認した。

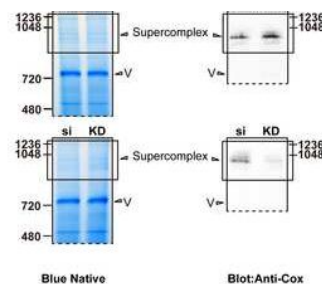
(2) Cox6b1-3T3 細胞において、対照細胞と比較すると、細胞の増殖能が 20% 程度増加し、ミトコンドリアの Cox の酵素活性、ATP の産生量とも増加していた。また、過酸化水素添加による酸化ストレスに対して、耐性が増強

していた。しかし、一方では、ミトコンドリア由来 ROS も増加していた。

(3) ROS の発生量は増加していたが、酸化ストレス耐性が増強していた原因を明らかにするために、酸化ストレス耐性に関連する転写因子 Nrf2 の活性化を検討した。Cox6b1-3T3 細胞では、Nrf2 の活性化と酸化ストレス防御に関連するタンパク質の発現が増加していた。よって、Cox6b1 の発現上昇は、ミトコンドリアの機能を増強し、ROS は増加するが、その防御能も誘導されることによって、細胞のストレス耐性が生じていると予測された。

(4) (3) の結果は、ミトコンドリアホルメシスという概念 (弱い毒性は、防御機構を増強し、その後続く、強い毒性に対して抵抗性を誘導する) に一致する。同じ生理学的環境が心臓において虚血プレコンディショニングによって誘導される。このとき、Cox6b1 の発現に Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3b) の関与が指摘されている。我々は、GSK-3b 阻害剤が Cox6b1 の発現を誘導すること、カロリー制限マウス肝臓でもリン酸化型 (不活性型) GSK-3b の増加を確認した。

(5) Cox6b1 の過剰発現によって、ミトコンドリアの酸化的リン酸化機能が上昇する機序を推測するために、BN-PAGE を行なった。Cox6b1 の過剰発現、GSK-3b の阻害剤とも Cox が他の呼吸鎖複合体 I, III と結合したスーパーコンプレックスが増加していることが示された (図 1)。Cox6b1 の発現上昇は、スーパーコンプレックスを形成することによって、ミトコンドリア機能を増強していることを示唆した。



c

図 1、Cox6b1 過剰発現細胞では、スーパーコンプレックス部分 (四角で囲んだ領域) に Cox が多く同定できる。

本研究は、呼吸鎖複合体 IV のサブユニットの一つである Cox6b1 の発現制御が、ミトコンドリアの呼吸機能制御に関与していることを示唆した。特に、酸化的リン酸化機能の増強、ROS の発生に対して、防御機構の増強を示したことは、ミトコンドリアホルメシス仮説に一致していた。Cox6b1 の発現に GSK-3b シグナルが関与していることも明らかにした。また、Cox6b1 は、呼吸鎖複合体からなるスーパーコンプレックスを形成することによってミトコンドリア機能を増強していることを示唆した。一連の結果は、CR が呼吸鎖複合体およびスーパーコンプレ

ックスの形成を制御していること、それが、ミトコンドリアホルミシスを誘導していることを示唆した。これは、CRの抗老化メカニズムの一端を明らかにしている。

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12件)

Hayashi H, Iseki M, Kawabata M, Nonoshita M, Yamamoto H, Shimokawa I, Primary hepatic gastrointestinal stromal tumor showing remarkable myxoid change and hemangiopericytoma-like pattern, *Acta Medica Nagasakiensia*, 査読有、Vol.58、2013、19-24

Hayashi H, Ohtani H, Yamaguchi J, Shimokawa I, A case of intracystic apocrine papillary tumor: Diagnostic pitfalls for malignancy, *Pathol Res Pract*, 査読有、Vol.209、2013、808-811

Park S, Mori R, Shimokawa I, Do sirtuins promote mammalian longevity? A critical review on its relevance to the longevity effect induced by calorie restriction, *Mol Cells*, 査読有、Vol.35、2013、474-480

Chiba T, Dong K, Nishizono S, Shimokawa I, Mechanisms of lifespan extension and preventive effects of calorie restriction on tumor development: Possible link between central neuroendocrine system and peripheral metabolic adaptation, *J Phys Fitness Sports Med*, 査読有、Vol.2、2013、259-266

Matsuo T, Miyata Y, Sagara Y, Higami Y, Tobu S, Matsuo M, Noguchi M, Shimokawa I, Kanetake H, Sakai H, Renoprotective effects of telmisartan after unilateral renal ablation in rats, *Int J Nephrol Renovasc*, 査読有、Vol.6、2013、207-214

Chujo Y, Fujii N, Okita N, Konishi T, Yamada A, Haruyama Y, Tashiro K, Chiba T, Shimokawa I, Higami Y, Caloric restriction-associated remodeling of rat white adipose tissue: effects on the growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis, sterol regulatory element binding protein-1, and macrophage infiltration, *Age(Dordr)*, 査読有、Vol.35、2013、1143-1156

安井 万里子、坂本 光、新宮 啓太、平 光寿、高藤 康、徳満 純一、鳥山 愛生、永田 祐貴、難波 夏実、道辻 徹、高木 理博、石田 正之、有吉 紅也、林 洋子、下川 功、M5総合病理 CPC 記録：慢性呼吸不全により死亡した31歳男性、長崎医学会雑誌、査読有、87巻、2012、80-86

下川 功、カロリー制限とホルミシス、日本抗加齢医学会雑誌、査読有、Vol.8、2012、87-91

林 洋子、井関 充及、川崎 辰彦、下川 功、Microcystic adnexal carcinoma の一例、診断病理、査読有、Vol.029、2012、150-154
① Otabe S, Wada N, Hahinaga T, Yuan X, Shimokawa I, Fukutani T, Tanaka K, Ohki T, Kakino S, Kurita Y, Nakayama H, Tajiri Y, Yamada K Hyperadiponectinemia protects against premature death in metabolic syndrome model mice by inhibiting AKT signaling and chronic inflammation, *J Endocrinol*, 査読有、Vol.213、2012、67-76

Chiba T, Tsuchiya T, Mori R, Shimokawa I, Protein reporter bioassay systems for the phenotypic screening of candidate drugs: a mouse platform for anti-aging drug screening Sensors(Basel), 査読有、Vol.12、2012、1648-1656

② Fang P, Tagliaro ML, Shimokawa I, Rodent Models to Study the Roles of the GH-IGF-1 Axis in the Aging and Anti-Aging Effects of Calorie Restriction, *Open Endocrinol J*, 査読有、Vol.6、2012、42-48

[学会発表](計21件)

Shimokawa I, Longevity genes; an update, The 4th Busan-Nagasaki Joint Symposium on Aging Research、21 February、2014、Busan

Shimokawa I, A key role for neuropeptide Y in lifespan extension and cancer suppression via dietary restriction, Asian Association of Aging Research-2013 Seoul Symposium、8~9 November、2013、Seoul

Shimokawa I, Differential regulation of cancer and lifespan by dietary restriction via FoxO1 and FoxO3, Asian Aging 2013: Japan-Korea Joint Conference on Genes, Metabolism, and Neurodegeneration、31 October ~ 2 November、2013、Kyoto

Shimokawa I, Differential regulation of cancer and lifespan by dietary restriction via FoxO1 and FoxO3, 2013 Mini-Symposium on Mitochondria and Aging、19 October、2013、Taipei

Shimokawa I, Differential regulation of cancer and lifespan by dietary restriction via FoxO1 and FoxO3, Cold Spring Harbor Conferences Asia、9~13 September、2013、China

下川 功、カロリスにおけるニューロペプチドYの役割、第13回日本抗加齢医学会総会、2013年6月28日~30日、横浜

Shimokawa I, A novel role of

neuropeptide Y in mammalian aging: Linking calorie restriction to longevity, The 20th World Congress of Gerontology and Geriatrics, 23~27 June, 2013, Seoul

Shimokawa I, A contrast between roles for FoxO1 and FoxO3 in cancer suppression and lifespan extension by dietary restriction in mice, The 4th East Asia-West Pacific Region Workshop on Aging Society and Elderly Care, 22 June, 2013, Tokyo

下川 功, カロリー制限の寿命延長、腫瘍抑制効果における Neuropeptide Y の役割、第 102 回日本病理学会総会、2013 年 6 月 6 日~8 日、札幌

森 亮一, 次世代シーケンサーを用いたカロリー制限及び肥満マウス血漿中に存在する microRNA の網羅的同定、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日~14 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県)

Shimokawa I, Necessity of Neuropeptide Y for the Effect of Dietary Restriction in Mice, The 65th Annual Meeting of Gerontological Society of America, 14~18 November, 2012, San Diego

Ryoichi Mori, Identification of Argonute2-circulating microRNA complexes in blood plasma of calorie-restricted and high fat diet-induced obese mice, The 4th EMBO meeting, 22~25 September, 2012, Nice (France)

Shimokawa I, The necessity of neuropeptide Y in the effect of dietary restriction in mice, Keystone Symposia, Aging and Diseases of Aging, 22~27 October, 2012, Tokyo

森 亮一, Identification of Argonute2-circulating microRNA complexes in blood plasma of calorie-restricted and high fat diet-induced obese mice, 第 4 回日本 RNAi 研究会、2012 年 8 月 30 日~9 月 1 日、グランドプリンスホテル広島(広島県)

Shimokawa I, Differential regulation of cancer and lifespan by dietary restriction through FoxO1 and FoxO3, International Symposium of Asian Association of Aging Research 2012 in Fukuoka-Biology of Aging and Disorders-, 24~26 August, 2012, Fukuoka

Ryoichi Mori, Identification of Argonute2-circulating microRNA complexes in blood plasma of calorie-restricted and high fat diet-induced obese mice, International Symposium of Asian Association of Aging Research 2012 in Fukuoka - Biology of Aging and Disorders-, 24~26 August, 2012, Tsukushi

Kaikan (Fukuoka)

下川 功, Dbf4 は ATM/ATR によって直接制御されるチェックポイントタンパクとして機能している、第 35 回日本基礎老化学会、2012 年 7 月 26 日~27 日、千葉

下川 功, 「FoxO とカロリー制限」 in シンポジウム「中庸の徳~インスリンシグナルと寿命、疾患」、第 12 回日本抗加齢医学会総会、2012 年 6 月 22 日~24 日、横浜

Shimokawa I, A potential role for COX6B1, a subunit of mitochondrial respiratory complex IV, in the effect of dietary restriction, 2012 Spring Conference of the Korean Society for Gerontology and the 11th Korea-Japan Gerontologist Joint Meeting, 14~15 June, 2012, Osong

Shimokawa I, A potential role for COX6B1, a subunit of mitochondrial respiratory complex IV, in the effect of dietary restriction, The 4th Hallym-Nagasaki-Exetended Joint Meeting, Aging, Re-generation and Re-construction, 28 February, 2012, Seoul

② Shimokawa I, Modulators of neuropeptide Y; potential dietary restriction mimetics, The 2nd Pusan-Nagasaki joint Seminar on Aging Research, 17 February, 2012, Pusan

〔図書〕(計 2 件)

(1) 千葉 卓哉、下川 功、羊土社、老化寿命のサイエンス 第 5 章 カロリー制限模倣物、2013、pp.182-189

(2) 下川 功、千葉 卓哉、森 亮一、シーエムシー出版、レスベラトロールの基礎と応用 第 7 章 サーチュインと老化、寿命、2012、pp.66-75

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下川 功 (SHIMOKAWA, Isao)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：7 0 1 8 7 4 7 5

(2) 研究分担者

森 亮一 (MORI, Ryoichi)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号：3 0 5 0 9 3 1 0

(3) 連携研究者

()

研究者番号：