

様 式 C - 1 9、F - 1 9、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 2 7 年 6 月 3 0 日現在

機関番号：33403

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2011～2014

課題番号：23617033

研究課題名（和文）代謝を介して寿命を支配する遺伝子の網羅的探索

研究課題名（英文）Comprehensive search of lifespan-regulating genes via metabolism

研究代表者

尼子 克己（AMAKO, Katsumi）

仁愛大学・人間生活学部・准教授

研究者番号：90275280

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,300,000 円

研究成果の概要（和文）：細胞質型スーパーオキシドディスムターゼ遺伝子の欠損は、酵母の増殖速度、酸化ストレス耐性および経時的寿命を減少させた。L-ガラクトースとD-アラビノースの培地への添加は、酵母細胞内にアスコルビン酸、エリスロアスコルビン酸を蓄積させ、スーパーオキシドディスムターゼ欠損による形質を部分的に回復した。その様式は培地に直接アスコルビン酸を添加した場合と異なることを示した。

研究成果の概要（英文）：Disruption of cytosolic superoxide dismutase in budding yeast leads decrease in growth rate, oxidative stress resistance, and chronological lifespan. L-Galactose and D-arabinose make budding yeast accumulate ascorbate and erythroascorbate, and they partially complemented the phenotypes in superoxide dismutase disruption mutant. In addition, the complementation by direct addition of ascorbate to yeast liquid culture was accomplished with different manner to L-galactose and D-arabinose.

研究分野：生化学

キーワード：寿命 活性酸素 遺伝子 アスコルビン酸

1. 研究開始当初の背景

日本の総人口1億2,700万人余(2010年時点)のうち、65歳以上の高齢者は既に20%を超えており、2050年には35.7%にまで膨れ上がると推計されている。我が国が世界主要国の中で先駆けて迎えるこの高齢化社会に対応するには、高齢者の健康と活力維持が、労働人口確保、医療保険制度維持といった側面からも、極めて重要である。

生物の寿命がいかんして決まるかについては、テロメア説、エラー蓄積説、酸化ストレス説といった種々の概念が提出されているが、現時点で確定的に語られるものはない。しかし近年になって、生物の寿命がいくつかの特定遺伝子産物の活性によって強く影響を受けることがわかってきた。寿命に影響を与える遺伝子として、*daf2*、*daf16*などのインスリンシグナル伝達系遺伝子が線虫で発見されていた。さらに、現時点で唯一エビデンスがある介入法ではないか、といわれているカロリー制限による寿命延長(ヒトに近いアカゲザルでもそれを支持する結果が示されている)に必須な遺伝子として、出芽酵母で*sir2* (Imai et al., 2000, Nature)が発見され、そのオーソログが広範な生物において寿命延長に、あるいは加齢性疾患である癌やアルツハイマーのモデルとなる現象に対して抑制的に働くことが報告されている。また栄養センサーとして機能すると同時に、細胞増殖を初めとする多彩なプロセスに関与する*tor1* (Kennedy et al., 2005, Science)が、酵母や線虫などのモデル生物においてカロリー制限による寿命延長に抑制的に作用していることが明らかになった。この他、高等動物では*klotho* 遺伝子の高発現が寿命を延長させること、その際にインスリンシグナル伝達系が抑制を受けること、およびスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)等の活性酸素消去系遺伝子の発現が亢進していることなどが示されている。

2. 研究の目的

前段で述べた寿命、寿命に関わる遺伝子の探索が網羅的に行われてきたわけではなく、またこれらがどのような環境因子と相互作用して寿命の長短に関わってくるのか、という部分については、十分に研究されているとはいいがたい。モデル生物においてすら、寿命の測定には相当の時間と労力が必要だからである。

本研究課題では、モデル真核生物である出芽酵母を用いて、液体培養法をベースにした複製的寿命関連遺伝子の半定量的な測定方法の開発を第一の目的とした。この方法の妥当性を示したのちに、出芽酵母の遺伝子破壊株コレクションによる、通常培養条件での網羅的スクリーニングを行い、酵母に含まれる寿命支配遺伝子を網羅的に抽出することを第二の目的とした。これにより得られた結果から、ヒトの老化抑制実現に向けた方法論を

提示することを目指すことにした。

ただし、第一の目的である新規の寿命測定法の確立が研究期間の前半で十分に行えなかった場合には、その善後策として、出芽酵母における旧来の寿命測定法を用いて、注目する遺伝子、環境因子特に食品由来成分に対象を絞った上(対象遺伝子:細胞質型SOD、食品由来成分:アスコルビン酸(AsA)およびそのC5アナログであるエリスロアスコルビン酸(eAsA))で、その遺伝子や食品因子が寿命に与える影響について検討し、寿命と遺伝子、環境因子との関係の一端でも明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1) 材料

Open Biosystems 社の出芽酵母遺伝子ノックアウトライブラリーを酵母細胞の材料として用いた。細胞表面のタンパク質修飾(ビオチン化)にはPierce社のSulfo-NHS-LC-Biotinを用いた。細胞内のアスコルビン酸およびアスコルビン酸アナログの測定にはHPLC-電気化学検出法を用いた。定量的リアルタイムPCRにはロシュ社のLightCycler 1.5(ST300)を用いた。その他の方法は常法に従った。

(2) 液体培養ベースの複製的寿命測定

野生型株、および野生型株よりも短寿命な形質を示す*sir2* 遺伝子破壊株、および長寿命な形質を示す*tor1* 遺伝子破壊株を、菌体量が等しくなるように混合し、細胞表面をビオチン化した後二時間培養した。これにストレスとアビジンコート化マグネットビーズを混合し、試験管表面に磁石を近づけることで非ビオチン化細胞(娘細胞)のみを回収した。この分裂を経験していない娘細胞(A細胞)をビオチン化したのち液体培地に移し、増殖させた。8時間および1日(数回、および10回程程度の分裂が起こる)後にマグネットビーズを加えてA細胞のみを集めたあと再度液体培地に移し、さらに2~4時間培養した後、今度はA細胞から新規に分裂した細胞(B細胞)のみを回収した。B細胞から抽出したDNAを鋳型として、野生型、*sir2* 遺伝子破壊株特異的、および*tor1* 遺伝子破壊株特異的プライマーを用いて定量的PCRを行い、B細胞における3種の株の存在比率を見積もった。

(3) SOD 遺伝子破壊株の解析

細胞質型SOD(*sod1*)遺伝子破壊株と野生型株について、培地にアスコルビン酸、L-ガラクトース(L-Gal)、およびD-アラビノース(D-Ara)を加えて培養を行い、これらの増殖速度、酸化ストレス耐性、および経時的寿命の測定を行った。L-GalおよびD-Araは細胞内に取り込まれたあと、NAD依存D-アラビノース脱水素酵素(ARA2, Amako et al. 2006)およびD-アラビノラクトン酸化酵素によ

って AsA、eAsA にそれぞれ変換され、細胞内に蓄積する。

4. 研究成果

(1) 新規寿命測定法の検討

野生型株、sir2 遺伝子破壊株、および tor1 遺伝子破壊株を混合培養したときの、母細胞から新たに分裂してできる娘細胞での三者の存在比率は、A 細胞の培養時間が長くなるにつれて変化した。その比率は一定しなかった。Sir2 遺伝子破壊株の存在割合は多くの場合低下したが、野生型株と tor1 遺伝子破壊株の比率は決まった傾向を示さなかった。B 細胞を回収するとき、直前の培養時間を 2~4 時間の間で変化させたものの、安定した結果を得ることはできなかった。さらに A 細胞の培養を始めた時点でマグネットビーズを加え、シャーレに薄く広げて培養するなど、材料調製に関する部分でいくつかの検討を行った（概要を図 1 に示す）が、実験結果の再現性を改善することができなかった。このことは、遺伝的背景が異なる時点でそれぞれの増殖速度がかなり異なっていること、および、増殖速度事態が細胞の老化（A 細胞の母細胞としての分裂の繰り返し）によって増殖速度の低下が起こり、その程度が大きく変化する ということを示唆しており、異なる遺伝的背景を持つ株を混合培養した状態では、これらの寿命の長短を網羅的・相対的に評価することは困難だと判断した。

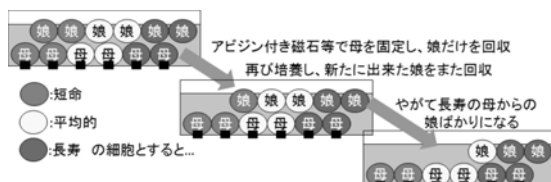


図 1：改変した寿命測定法の概要

それぞれの株を個別に培養し、くりかえし母細胞のみを回収することで増殖速度や分裂能を経時的に評価することは十分可能であると予想されるが、それを本研究課題で目標としていた、寿命を指標とするハイスループットなスクリーニング法の開発に直結させられるかという点、極めて難しい。これらの状況から、止むを得ず当初の研究計画を、申請書の範囲内ではあるが変更するのが適当であろうと判断した。

一方、本研究で試行した液体培養ベースの複製的寿命測定は、今後の寿命研究において重要な視座を与えるのではないかと期待する。最近になって、モデル生物における長寿・短命とその遺伝的背景は、ヒトにおける幸福度の高い長寿、すなわち健康寿命の延長を反映したものではないのではないかという指摘が出始めており、線虫における遺伝子破壊・あるいは増強によって寿命が延長した

株が、特に一生の後期では細胞のアクティビティを反映するいくつかの指標がいずれも野生型株よりも低値を示すことが報告された。したがって寿命の質、すなわちヒトにおける健康寿命の長短を反映するような測定系を再考することが極めて重要であるが、例えば本研究でもちいた系による、老化した細胞における増殖速度の測定は、それを反映する有力な候補のひとつになろう。

(2) SOD 遺伝子による寿命短縮と、アスコルビン酸・アスコルビン酸アナログによるその相補

(1) において十分な実験結果が得られなかったため、申請時の実験計画に従い、SOD1 遺伝子破壊株における形質と、AsA、eAsA による形質への影響について検討することにした。

sod1 遺伝子破壊株は野生型株に比べて好氣的培養時の増殖速度（倍化時間の逆数）、定常期における細胞密度が低下したが、培地への AsA (5 mM) の添加によっていずれも野生型株とほぼ同等にまで回復した。これに対して AsA の前駆体である L-Gal (5 mM) および eAsA の前駆体である D-Ara (5 mM) の添加によって増殖速度は部分的に、定常期における細胞密度は野生型株とほぼ同等にまで回復した。

次に増殖速度の改善に対する添加物の濃度依存性について検討した。培地への AsA の添加は試験した範囲 (0~5 mM) で、増殖速度は添加物の濃度に対してほぼ直線的に増加した。これに対して、L-Gal および D-Ara の添加では増殖速度は飽和型の曲線を示した。このときの細胞内に蓄積した AsA および eAsA の濃度を見積もったところ、これらも飽和型の曲線を示し、増殖速度の改善が細胞内における AsA、eAsA の蓄積と極めてよく対応することが示された（図 2）。一方培地へ AsA を添加したとき、酵母細胞内には還元型のみならず酸化型の AsA も検出できなかった。

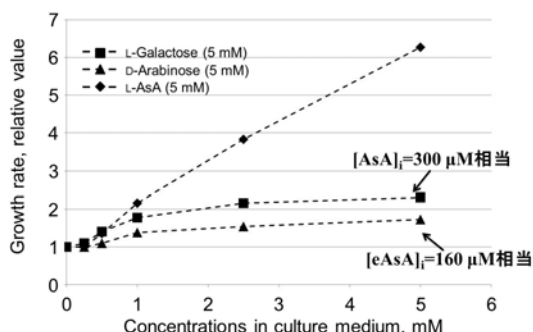


図 2 sod1 遺伝子破壊株における AsA 関連物質が増殖速度に与える効果

sod1 欠損株および野生型株は、メナジオンに暴露することによって生存率が低下し、その程度は sod1 欠損株においてより顕著であった。この実験を、メナジオン処理の前に

L-Gal または D-Ara を含む培地で全培養した酵母を用いて行ったところ、野生型株においては特に変化は見られなかったのに対し、sod1 欠損株では細胞生存率が部分的に回復した。これに対し、過酸化水素で細胞を処理した場合は sod1 欠損株と野生型株で細胞生存率に顕著な差は見られず、また L-Gal、D-Ara の添加も生存率の改善にはほとんど寄与しなかった。SOD は細胞内でスーパーオキシドを過酸化水素と酸素に不均化する反応を触媒すること、AsA はスーパーオキシドを非酵素的に比較的すみやかに消去することができるが in vitro の実験で明らかになっており、これらの結果から、細胞内の AsA の蓄積は sod1 の機能的な相補を通じて sod1 欠損株における細胞増殖速度や酸化ストレス耐性の回復に寄与することが明らかになった。また、細胞内の eAsA も AsA と同様にスーパーオキシドの消去を行っている可能性が高いと考えられる。

最後に sod1 遺伝子破壊株における経時的寿命（定常期に達した後、蒸留水に移したのちに細胞が死滅するまでの時間）について検討した。Sod1 遺伝子破壊株は野生型株に比べて経時的寿命が短縮したが、培地への L-Gal および D-Ara 添加で部分的に解消された。唯一の炭素源として L-Gal や D-Ara を加えても野生型株酵母は増殖することができないこと、L-Gal の方が D-Ara よりも同じ濃度での寿命回復への程度が大ききことから、これらの添加による効果は細胞内に蓄積した AsA や eAsA の濃度を反映しているものと考えられた。

以上のことから、AsA や eAsA が酵母細胞内でスーパーオキシドの消去に機能することで、細胞内酸化ストレス状態を緩和し、sod1 遺伝子破壊株における酵母の寿命低下を緩和することが示された。同時に、もともと低濃度ではあるものの酵母の内在化合物である eAsA によっても同様の効果が認められたことは、eAsA の生理的な役割を表す新規な結果である。また、培地内への AsA の添加は sod1 遺伝子破壊株における各種の機能欠損を効率的に相補していたが、それが細胞内への AsA の蓄積を伴わないものであったことが明らかになったことは、極めて興味深い。細胞外の AsA が細胞内の酸化ストレス環境の緩和にいかに関与するのかについて、今後も検討する必要がある。

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 1 件）

① 河野 菜美、尼子 克己

細胞質 CuZn-SOD 欠損株における酸化ストレス耐性および経時的寿命の低下と、

それらのアスコルビン酸・エリスロアスコルビン酸による回復
ビタミン C 研究委員会 2015 年 3 月, 東京

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尼子 克己 (AMAKO, Katsumi)
仁愛大学・人間生活学部・准教授
研究者番号：90275280

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし