

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12752

研究課題名（和文）内因性物質による寿命制御の研究

研究課題名（英文）Studies on life span regulation by endogenous substances

研究代表者

有本 博一（Arimoto, Hirokazu）

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：60262789

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：老化を物体の風化のような避けえない不可逆なプロセスに例える見方は過去のものとなっている。また、若さの鍵を握る物質が生物個体のなかから次々に報告されている。本研究では、一酸化窒素に由来する内因性化合物に注目し、代表的モデル生物である*C. elegans*を用いて研究した。寿命延長効果は、*daf-16*、*skn-1*などに依存し*eat-2*などには依存しなかった。また、オートファジー関連遺伝子*atg-5*のノックダウンによって寿命延長効果が抑制されることがわかった。

研究成果の概要（英文）：Recently, several endogenous substances have been reported to suppress aging of animals. In this study, we focused on endogenous compounds derived from nitric oxide, and studied its effects on life span extensions using nematode *C. elegans*. The lifespan extension effect depended on *daf-16*, *skn-1* genes but not on *daf-2* and *eat-2* genes. The prolonged lifespan by the NO-derived compound was suppressed by knockdown of an autophagy-related gene *atg5*.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：寿命制御機構

1. 研究開始当初の背景

わが国を始めとする各国においては、今後さらなる高齢化社会の進行が予測されている。これ自体は、栄養状態の改善や高度な医療の整備など社会全体での努力の成果で大変喜ばしい一面を持っている。一方で、高齢化社会は加齢関連疾患とも呼ばれる癌や神経変性疾患などの増加をもたらす社会保障費の上昇など社会的に新たな課題を生んでいる。今後は、長い平均寿命と、健康に活動できる期間(健康寿命)との乖離を短縮することが重要な課題になるだろう。

加齢によって生物個体の機能が低下することは一般に老化と呼ばれ、従来は物質の風化に例えられることが多かった。老化は時間軸に沿って一方向に進むものであり、若返りなどは「お伽話」のなかに限られていたのである。ところが、1980年代にモデル生物 *Caenorhabditis elegans* において、寿命制御遺伝子が発見され、老化・寿命研究の新たな時代が始まった。

Friedman と Johnson らは、*C. elegans* の *age-1* 遺伝子を欠損させると、個体寿命が 1.5 倍に伸びるという衝撃的な結果を報告した(1988年)。生物個体で見られる多くの表現型と同様に、老化や寿命もまた遺伝子によって制御されていることを意味している。この発見の前は、寿命制御遺伝子の存在自体を疑う声が少なくなかった。仮に、少数の遺伝子が寿命の長さを決定づけるならば、長寿を示す突然変異体(例えば、超長寿のヒト)が存在するはずと考えられたからである。

2000年代になると、ゲノムが解読されているモデル生物と RNAi 技術を駆使して寿命関連遺伝子の網羅的探索が行われ、数百の遺伝子が同定された。現在では GenAge などのかたちでデータベース化されて情報提供されている。

これまでの研究例は、長寿に関係する遺伝子が、おおきく 3 つの経路に分類されることを示唆している。まず、インスリン様シグナル経路、つぎにカロリー摂取制限にかかわる経路、そしてミトコンドリアにおける代謝抑制にかかわる経路である。これらの長寿遺伝子の大半は *C. elegans* など比較的下等の生物で発見されたが、ほ乳類においても同様の寿命延長効果が確認されるに至って、寿命研究に大きな注目が集まっている。

これら遺伝子レベルでの研究とは別に、タンパク質や低分子化合物などの内因性物質と寿命との関係も明らかになっている。代表的研究例として、老若 2 匹のマウスの血管を互いに結合させる実験がある。この場合、年老いたマウスの各組織に明確な若返りが見られる。このことは、血管内を流れる広義の物質が「若返り物質」として働くことを示している。

このような背景のなか、Nudler らは *C. elegans* を用いた実験から、一酸化窒素 NO が寿命延長に関わることを報告した(Nudler

et al., Cell, 2013)。NO はノーベル生理医学賞の対象ともなった重要シグナル分子である。*C. elegans* はゲノム上に NO 合成酵素(NOS)の配列を持たないため、NO を主に食餌から得ていると考えられた。*C. elegans* の餌を NOS の有無に基づいて使い分けたとこ、NOS を持つ枯草菌を与えた場合に線虫の寿命が延長することがわかった。NO 以外の内因性物質として、 α -ケトグルタル酸やポリアミンなども寿命延長効果を示すことが報告されている。

これまでに紹介した研究例は、いずれも個体全体のレベルで寿命を研究している。これに対して最近では、組織や細胞レベルでの老化の不均一性に注目した研究も多くなされるようになった。例えば、ヒトではストレス条件下におかれた細胞は細胞分裂を停止し老化細胞となる。分裂しないことは、がん化の抑制につながり、個体レベルでは細胞老化が防御機構として働いている。一方、この防御機構には負の側面も明らかになっており、老化細胞が分泌する SASP 因子などによって、周囲に炎症が惹起されることが知られている。このため、マウスにおいて老化細胞を選択的に殺傷除去する薬剤が開発され、実際に若返りが見られるという驚くべき報告も登場している。

以上に記述したように、遺伝子、生体内分子、細胞、組織、個体の各レベルで老化研究が行われている。しかし、各知見は未だ断片的であって、老化の全容の理解には多くの課題が残っている。健康長寿社会の構築にはこの分野の研究をさらに推し進める必要がある。

2. 研究の目的

人では加齢とともに体内の NO 産生量が低下することが知られている。Nudler らの成果を考え合わせると、将来的には NO 関連物質を補う老化抑制法、疾患予防法の開発がヒトについても検討できるだろう。

NO は化学反応性に富んだラジカル性分子であり、生体内での寿命は著しく短い。酸化により NO は NO⁺に変化し、タンパク質中のシステイン残基と反応して、S-ニトロシル化修飾となる。このように NO の下流で二次的な作用が多く知られている。このためモデル生物 *C. elegans* への NO 投与による寿命延長効果も、NO 自身の直接的な効果に基づくか、それとも NO から生じる代謝産物の二次的作用であるか区別が難しい。NO に由来する、より安定な代謝産物の作用ではないかというのが本提案の出発点である。NO は生体内分解が速いため、通常は一過性の効果をもたらすのに、論文では、短期間の処理によって一生涯の寿命を制御できたと報告していることに疑問が残る。

研究代表者らは NO から派生する安定な有機化合物群の研究を続けてきた。このなかで *C. elegans* の平均寿命延長効果(約 15%)を

示す化合物 A を見出している。

本研究では、以下の3つの目標を立てた。

(1) 寿命延長作用の機構を解明する

寿命制御に関わる主な遺伝子群と本化合物による寿命延長作用の関係を解明する。

(2) 老化指標の改善効果

寿命自体が伸びても、健康や運動機能も保たれなくては意義が低い。まず、運動機能の状態を多面的に評価する。続いて、老化関連疾患に対する抑制効果を調べる。

(3) 化合物の効果とオートファジーとの関係解明

ほ乳類、線虫を含む多くの生物種において、食事制限が長寿に貢献することが知られている。その背景にオートファジー活性化があると予想されている。本化合物についても、オートファジーとの関連を調べることが望ましい。

3. 研究の方法

以下の6つの理由で *C. elegans* を用いて実験を行った。

(1) 寿命が約3週間と短いため、研究期間内で繰り返し寿命測定実験ができる。

(2) 短い期間で世代交代するので、遺伝子改変株の作成に必要な時間も短縮される。

(3) 個体サイズが小さいため投与量が少なく済む。高価な化合物・試薬が低減できる。

(4) 寿命研究におけるスタンダードとなっているので、他の主要研究との比較が可能。特に NO の寿命延長効果 (Nudler et al., Cell, 2013, 152, 818) でも線虫が使用された。NO 合成酵素を持たない珍しい生物で、NO (と代謝物) は全て外界から摂取する。NO 関連化合物の評価では、解析結果が明確になる。

(5) 線虫で得られた結果の大半が、より大型のモデル生物でも再現した実績がある。

(6) 種々の遺伝子欠損株が米国ミネソタ大学 CDC に収集され、頒布されている。類似研究身体が透明であるため、生きたままで各部位での表現型を観察可能である。

寿命測定実験は、化合物を含む NGM 培地の上に餌となる大腸菌 (NOS をもたない株) をのせて線虫を飼育した。*C. elegans* には雌雄同体と雄の2つの性があるが、本研究には雌雄同体のみを用いた。測定に用いる集団は、繁殖期の個体を一定時間飼育し、この時間帯に産み落とされた卵から孵化した個体 (> 100 個体) を用いた (timed egg-laying 法)。寿命測定実験開始後に、新たに生まれた個体が混入して結果に影響することを避けるため、2-3 日に一度、培地上のすべての線虫個体を別の培地に移動させた。

研究に必要な新規遺伝子欠損株の作成には CRISPR/Cas9 法を用いた。この技術は、従来法の 1/100 のコストで効率的にゲノムを書き換えることを可能とした遺伝学的アプローチ

の革命的な手法である。まず、ノックアウトしたい遺伝子に対して guide RNA を設計した。続いて、かわりにノックインする配列 (通常は蛍光タンパク質) の donor DNA を設計した。一方、DNA 切断に関わる Cas9 酵素を発現、精製した。これら sgRNA と Cas9 酵素を線虫の生殖腺にマイクロインジェクションし、生まれた線虫を (導入した蛍光タンパク質発現を指標に) 選抜し、継代して目的変異株の樹立を試みた。

4. 研究成果

(1) 寿命関連遺伝子群との関係

これまでに発見された長寿遺伝子は、おもに3つの主要経路に関係している。まず第一にインスリン様シグナル経路に関わる daf-2 遺伝子と daf-16 遺伝子に注目した。daf-2 はインスリン/インスリン様成長因子の受容体であり、daf-2 欠損株は野生型の2倍の寿命を持つ。daf-16 は daf-2 の下流で働く遺伝子では乳類における FOXO と同様の機能を持つ転写因子である。これら遺伝子の欠損株に化合物を投与して寿命測定を行った。

その結果、本化合物の寿命延長効果は daf-2 欠損による寿命延長効果と相加性を示さず、むしろ部分的に寿命を短縮することがわかった。一方で、野生型株への投与で見られる本化合物の寿命延長効果は、daf-16 株では観察されなかった。これらの結果は、化合物の作用がインスリン様シグナル経路の単純な阻害に基づくものでないことを示している。

ミトコンドリア代謝に関わるクロック1遺伝子 (clk-1) は老化遺伝子であり、その欠損は、代謝速度や活性酸素量の低下などを介して寿命延長を示す。本化合物を clk-1 欠損株に投与して寿命を測定したところ、両者には相加性がみられ、さらに10%以上の平均寿命延長が観察された。このことは、化合物の作用が clk-1 とは無関係の機構に基づいて寿命を延長することを示している。

このほかにも、eat-2, hsf-1, skn-1 遺伝子などと、本化合物の寿命延長作用の関係を調査した。これらの結果は、3つの主要な長寿遺伝子群との関係が単純ではないことを示している。

(2) 老化指標の改善効果

続いて、本化合物が寿命以外の老化指標に与える効果を調べた。線虫が体を折り曲げる頻度を指標にして運動能力を評価したところ、投与群はコントロール群に比べて高い運動能力を維持することができた。また、凝集性のタンパク質であるポリグルタミンの蓄積を評価したところ、投与群では加齢による凝集体の蓄積速度が抑制された。これらのことから、化合物投与が寿命延長だけでなく、健康寿命の延長にも貢献することが示唆された。

(3) 化合物の効果とオートファジーの関係解明

本化合物の投与が線虫個体においてオートファジーを誘導するか調べた。C. elegans におけるオートファジーのマーカーとして一般的な LGG-1 タンパク質を蛍光標識し、seam 細胞における LGG-1 輝点の数で評価をおこなった。本化合物の投与により、起点の数が増加し、オートファジー誘導が示唆された。上の(2)の検討でポリグルタミン凝集体の蓄積抑制が見られたことを考え合わせると、オートファジーが本化合物の老化抑制作用に関与した可能性がある。

そこで寿命測定実験において、同時にオートファジー関連遺伝子の RNAi をおこなったところ、本化合物による寿命延長幅が短縮した。寿命延長とオートファジーとの関係をさらに支持する結果と言える。なお、オートファジーの代表的誘導剤であるラパマイシンも C. elegans 平均寿命を延長するが、その効果は daf-16 遺伝子の欠損と独立であることが知られている。この点は、本化合物の寿命延長効果が daf-16 遺伝子に依存するという結果とは対照的であり、さらなる検討が必要である。

C. elegans を使うオートファジー研究では、RNAi 法とともにオートファジー関連遺伝子の変異株が汎用される。これらの多くは、CRISPR/Cas9 法の登場以前に樹立されたものであり点変異株が多い。今回取り上げた化合物とオートファジーの関係性が示唆されたので、ゲノム編集によるオートファジー関連遺伝子の欠損株作成を開始した。すると論文報告されている既存の点変異株と異なる表現型を示す完全欠損株が見出されてきた。研究課題設定期間中に詳細な解析を実施できなかったが、今後はこれらの新規変異株を使用して、線虫の個体寿命とオートファジーの関係についてさらに検討を継続する計画である。

(4) 結果のまとめ

NO に由来する化合物について、モデル生物 C. elegans を用いて寿命延長効果とその機構を研究した。長寿遺伝子群に対する延長効果の依存性は、Nudler らが NO 自体の効果として報告した結果と重なる点が多い。このことから、寿命延長効果の少なくとも一部は、NO の直接的作用ではなく、代謝物を介していることが示唆される。

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)

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 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有本 博一 (ARIMOTO, Hirokazu)
東北大学・大学院生命科学研究所・教授
研究者番号：60262789

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()