

寿命延長に伴う解糖系代謝経路への転換と分子機構の解析

ヤス ヒコ

寺田 泰比古

早稲田大学理工学術院・先進理工学部・化学・生命化学科 教授

緒言

人の老化の仕組みを知ることは健康的な一生を送る上で大切なことである。現在、老化機構には、プログラム説とエラー (傷害蓄積) 説の二つの有力な説が知られている¹⁾。プログラム説とは、成長、老化などの人の一生の老化が遺伝的にプログラムされて、遺伝子が生物種としての寿命を決定しているという考え方である。細胞は分裂寿命を持ち、テロメア領域のDNAの短縮が分裂回数をカウントする分裂時計として機能している。テロメアが短縮しテロメア領域の構造が維持できなくなると、チェックポイント・システムが作動し、p53と、これによって転写が活性化されるp21によって、CDK(サイクリン依存性キナーゼ)の活性化が抑制され、増殖因子を加えても老化細胞はDNA合成期(S期)へ進行することができなくなる。しかし、多くの生物種では、体細胞でもテロメア領域を伸長するテロメラーゼが活性化されており、テロメア短縮がなく老化が起きることが知られており、テロメア短縮だけでは老化の仕組みを理解することはできない。一方、エラー説とは、身体の構成成分に劣化が起これるその蓄積が老化を誘導するという考え方である。劣化や傷害の最も大きな因子は活性酸素(reactive oxygen species: ROS)である。活性酸素は呼吸の際に発生するので酸素消費量と寿命とは密接に関係しており、単位体重当たりの一日の酸素消費量が多い動物ほど寿命は短い。また、線虫やマウスを酸素濃度の高い条件で育てると寿命が短くなることもよく知られている。

以上の研究から、老化機構はプログラム説もエラー説もどちらも正しく、同じ人でも生活環境の違いで寿命が違ってくことから遺伝的素因と生活習慣から来る酸化ストレスの両方が老化に関係している。食習慣と老化の問題は、カロリー制限による寿命延長の研究から明らかになってきた²⁾。カロリー制限がマウスの寿命延長に関係していることを示す80年以上前の報告から今日に至るまでの研究で、平均的な摂取カロリーの70%程度の

制限で、平均寿命を30~50%程度、酵母からヒトに至るまで延長できることが明らかになっている。最近になって、カロリー制限はSirt1遺伝子産物を酵素的に活性化して、寿命の延長をもたらすことが明らかになってきた。Sirt1が活性化されるとフォークヘッド遺伝子のFOXO1が活性化され、ラジカスカベンジャーのMn-SOD(スーパーオキシド・ディスムターゼ)遺伝子等が転写活性化され酸化ストレスを減少させる機構が明らかになった。一方、ES細胞やがん細胞では解糖系代謝が亢進し、逆にミトコンドリアでの酸化的リン酸化経路はほとんど利用されていない³⁾。酸化的リン酸化経路を利用できるようにがん細胞のエネルギー代謝経路を強制的に変換させると、酸化ストレスが生じ細胞寿命が短縮化され細胞死が誘発されることが報告されている。ミトコンドリアの酸化的リン酸化経路は酸化ストレスの発生源であることから、ES細胞やがん細胞の不死化細胞では、老化を促進する酸化ストレスを発生させないように解糖系代謝経路へ転換させていることを示唆しているが、これらの分子機構は余りよくわかっていない。解糖系代謝経路への転換や、細胞を酸化ストレス抵抗性にするメカニズムを明らかにする目的で私たちは発現クローニングという手法を用いて本研究を遂行した。

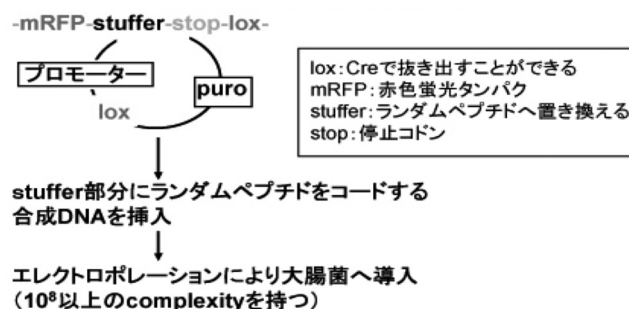


図1 Random peptide libraryの合成法

結果

1. 遺伝子ライブラリーの作製

a) ランダムペプチド・ライブラリー (RPL) の作製

図1に示すように、18個のランダムペプチドをコードする54個の塩基を合成し、CSII-lentivirusベクターのmRFPの下流のstuffer領域に挿入し、エレクトロポレーション法にて 10^8 以上のcomplexityを持つラン

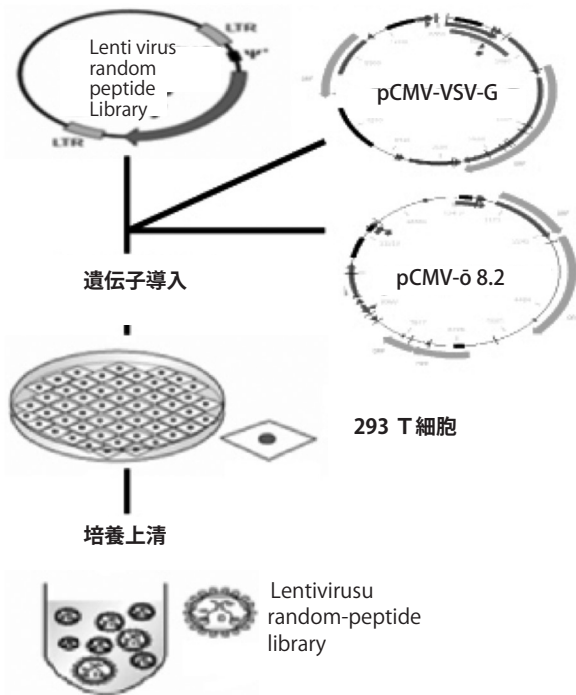


図2 Lentivirus library への変換

ダムペプチド・ライブラリー (RPL) を作製した。図2では、RPLをヘルパーベクターと293T細胞に導入してlentivirusに変換した。このウイルスライブラリーをMEF(マウス胎児細胞株)に感染させると、mRFPの融合蛋白質としてランダムペプチドは安定的に保持されるようになる(図3)。一方、スクリーニングの疑陽性の問題は、Adenovirus-Creを感染させlox-P領域で挟まれたmRFPの融合蛋白質を除去し表現型の回復をチェックすることで解決できた(図4)。

b) マウス ES 細胞由来 cDNA ライブラリーの作製

マウス ES 細胞は、フィーダー細胞である MEF から

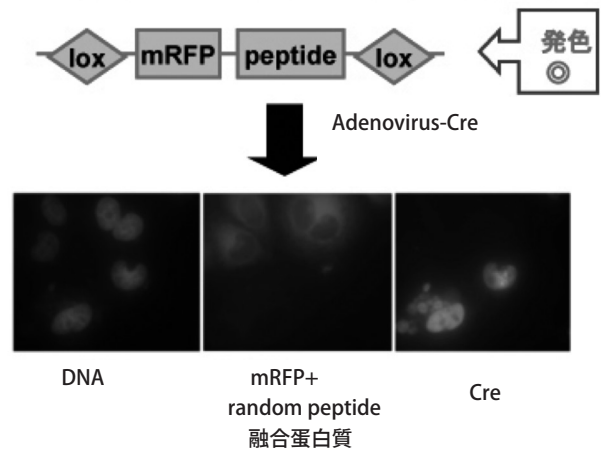


図4 Cre-loxシステムによる疑陽性の確認

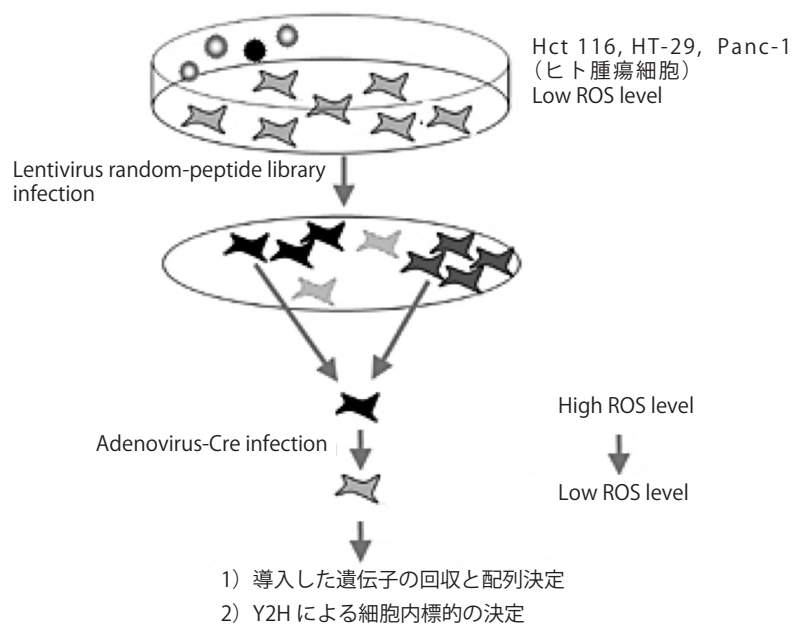


図3 エネルギー代謝を変換させる Peptide をコードする遺伝子のスクリーニングと細胞内標的の同定

分離した後、細胞を集め、RNA を回収した。

Total RNA 50ng と primer I (12uM) をアニーリングした後、primer II (12uM) を加え、逆転写酵素による伸長反応を 42℃、90 分の条件で行った。

primer I :CGGGGTACGATGAGACACCATTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTTVN

primer II:AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGGGGG

次に、以下の primer III と IV を 12uM ずつ加え、上記の反応液から 2ul を 100ul の反応液に加え、95℃、15 秒、65℃ 30 秒、68℃、6 分の条件で 20 回のサイクルで PCR 反応を行った。

primer III:CGGGGTACGATGAGACACCA

primer IV:AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT

PCR 反応液を CHROMA SPIN 1000 にて精製後、エタノール沈殿を行い、in-Fusion smart 法 (Clontech) にて、PCR で増幅した cDNA をレトロウイルスベクターである pMX に挿入した。エレクトロポレーション法にて 10^7 以上の complexity を持つ cDNA ライブラリーを作製した。マウス ES 細胞由来 cDNA ライブラリーをウイルス産生細胞である PLAT-E 細胞に遺伝子導入し、ウイルスライブラリーを作製した。このウイルスベクターも lox-P サイトを予め挿入してあるため、Adenovirus-Cre を感染させ lox-P 領域で挟まれ cDNA 領域を除去し表現型の回復をチェックできるように設計した。

2. MEF の細胞寿命を延長する遺伝子スクリーニング

a) RPL を用いたスクリーニング

MEF は極めて酸化ストレス感受性が強く、継代数 10-15 回で細胞寿命をむかえることが知られているが、培養条件を 20%酸素分圧から 1~3%程度に低下させ

たり、エネルギー代謝経路を解糖系に転換すると細胞寿命が大幅に延長されることが知られている。そこで、MEF の寿命延長を誘導する活性を持つペプチドをスクリーニングする目的で、 10^7 個の細胞に RPL を感染させ、薬剤耐性マーカーのピューロマイシンを培養液に加えランダムペプチド遺伝子を発現した細胞を選択した。約 2 週間後、ほとんどの細胞では細胞老化が起き増殖を停止したが、68 個の細胞株が増殖を停止せずクローン化できた。

さらに、Adenovirus-Cre を感染させ、mRFP とペプチドの融合遺伝子を欠落させると、19 株の細胞で細胞老化や細胞死が誘導された。これらの細胞からゲノム DNA を回収し、これを鋳型として PCR 法にて mRFP とペプチド領域の増幅を行った。さらに、回収した遺伝子を元のベクターに挿入し、MEF に導入したところ、19 個のうち、12 個に寿命延長の活性化が見られた。この中から、最も活性の強い A-23 を導入した MEF では、活性酸素の検出化合物である H2DCFDA を用いて細胞内の活性酸素量を測定したところ、親株に比べて明らかに低下していた (図 5)。このことから、A-23 ペプチドは、ミトコンドリアの酸化的リン酸化経路を低下させエネルギー代謝経路の転換を行っているか、あるいは、活性酸素のスキャベンジャーである Mn-SOD やカタラーゼを活性化させ活性酸素量を低減させていることが示唆された。

次に、これらのペプチドの細胞側の結合蛋白質を明らかにする目的で、この中から、A-23 クローン由来ペプチドの結合蛋白質を酵母 two-hybrid 法にてスクリーニングしたところ、転写因子の p53 の C 末領域の四量体形成ドメインに結合することが明らかになった。A-23 ペプチドを発現した細胞では DNA 損傷に対して p21 遺伝子の発現が親株に比べ低下していたことから、A-23

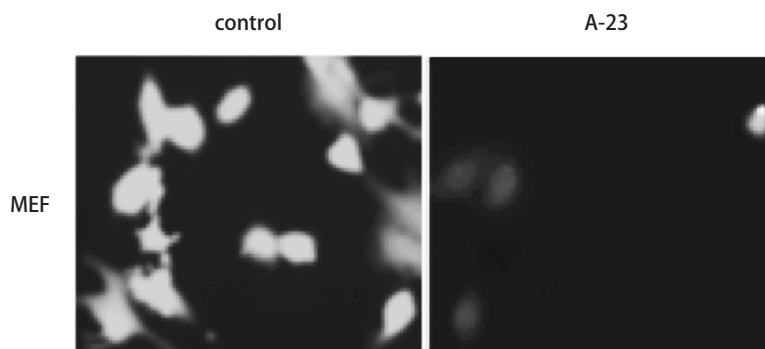


図 5 ペプチド導入による活性酸素レベルの低下

ペプチドは p53 の転写活性を抑制していることが示唆された。他のペプチド遺伝子に関しても同様の解析を行い、細胞内標的蛋白質を同定している。

b) マウス ES 細胞由来 cDNA ライブラリーを用いたスクリーニング

マウス ES 細胞由来 cDNA ライブラリーを同様に MEF に感染させ、 5×10^6 スケールのスクリーニングを行った。疑陽性株を Adenovirus-Cre を感染させ排除したところ、8 個の cDNA が MEF に対して寿命延長の活性を持つことが明らかになった。現在、これらの cDNA の塩基配列決定を行っている。

3. Sirt1 遺伝子と Mn-SOD 遺伝子の発現を誘導する遺伝子スクリーニング法の確立

Sirt1 遺伝子の転写を誘導する遺伝子や、また、Sirt1 経路を活性化し Mn-SOD 遺伝子の転写を亢進させる遺伝子をスクリーニングする目的で、これらの遺伝子のプロモーター領域をヒト線維芽細胞の Tig3 のゲノムから増幅した。

SIRT1 promoter: -1593 ~ -1bp

SIRT1 (F): aattattaatACTTCAGGTGATCTGTCCGC

SIRT1 (R): aattgctagcCTTCCAACCTGCCTCTCTGGC

Mn-SOD promoter : -3340 ~ +71bp

Mn-SOD (F) primer: attaatGGATCCTTACAATGGAGATAGTGGGGCCAG

Mn-SOD (R) primer tctagaGCTAGTGCTGGTGTACCGCTGATGCCGCC

Sirt1 プロモーター遺伝子は、p-EGFPC1 ベクターの CMV 領域を除去し、この部位に Ase1-Nhe1 の制限酵素を用いて挿入した。また、Mn-SOD プロモーター遺伝子も同様に、p-EGFPC1 ベクター挿入した。これらの遺伝子を、HeLa 細胞と不死可した Tig3 細胞に導入し、G418 にて薬剤選択を行い、発現株を単離した。HeLa 細胞では、Sirt1 と Mn-SOD のプロモーター活性は恒常的に上昇しているために、レポーターである EGFP の蛍光強度は強いが、Tig3 細胞株では、HeLa 細胞に比べて 1/5 ~ 1/10 レベルで、Sirt1 の経路がほとんど活性化されていないことが示唆された。そこで、Tig3 細胞の発現株に Sirt1 蛋白質をコードする遺伝子と、FOXO1 遺伝子を導入したところ、いずれも EGFP の蛍光強度が

3 ~ 6 倍程度に亢進した。Sirt1 は、自分自身のプロモーター活性をポジティブフィードバック経路で活性化することが知られているため、導入したプロモーターが上流のシグナルに応答していることが明らかになった。これらの細胞株は、Sirt1 経路の活性化を誘導する遺伝子や化合物などのスクリーニングに利用できることが確認できた。

考 察

MEF の細胞寿命を延長する A-23 ペプチドは、酵母 Two-hybrid 法にて細胞内の p53 に結合していることが明らかになった。この結合領域は P53 の C 末端部位にある 4 量体形成に必須の領域であることから、A-23 ペプチドは細胞内の p53 機能を抑制することによって MEF 細胞の寿命を延長していることが示唆された。最近になって、P53 は SCO2 (synthesis of cytochrome C oxidase2) の転写制御を行っていることが報告されている。ミトコンドリア内膜にある COX 複合体のサブユニットである。

COXII の銅と結合部位に SCO2 は必要で、SCO2 の機能が欠損するとミトコンドリアでの酸化的リン酸化経路が遮断される⁴⁾。従って、p53 機能の低下が起きると、エネルギー代謝経路は酸化的リン酸化経路から解糖経路へ転換が起きる。また、Sirt1 遺伝子の発現を p53 は負に調節していることから、p53 機能の低下は Mn-SOD の発現を亢進させ、活性酸素レベルが低下させる。以上の結果から、A-23 ペプチドは p53 機能の低下を介して、エネルギー代謝経路の転換と Sirt1 の遺伝子発現の亢進を誘導することで細胞内の活性酸素レベルを低下させていることが示唆された。今後、単離した他の遺伝子解析を進め解糖系へのエネルギー代謝経路の転換を誘導するメカニズムの解明を行っていく。さらに、Sirt1 プロモーター遺伝子や Mn-SOD プロモーター遺伝子の活性化を誘導する遺伝子や化合物のスクリーニング系も確立できたので、これらの細胞株を用いてスクリーニングをスタートする。

要 約

活性酸素 (reactive oxygen species : ROS) は、細胞障害の大きな因子として知られている。細胞の寿命を延長させる最も効果的な方法は、細胞内の活性酸素量を低下させることである。実際に、不死可した細胞では、エネルギー代謝経路を解糖系に転換することで、ミトコンド

リアの酸化的リン酸化経路から発生する活性酸素量を抑制している。また、最近の研究から、カロリー制限による寿命延長は Sirt1 の活性化によってもたらされ、Sirt1 のターゲットの一つが Mn-SOD の転写活性化であることも明らかになった。Sirt1 が活性化されると、Mn-SOD の発現が亢進し、細胞内の活性酸素量は低下する。私たちは、細胞内の活性酸素量の低下をもたらす解糖系へのエネルギー代謝経路の転換や、Sirt1 経路の活性化経路を明らかにする目的で、発現クローニングという手法を用いて遺伝子スクリーニングを行ったところ、ランダムペプチド・ライブラリー (RPL) では 12 個、マウス ES 細胞由来 cDNA ライブラリーでは、8 個の cDNA を単離した。得られたペプチドの中には、p53 を抑制することによってエネルギー代謝経路を解糖系に転換していると考えられるものが得られた。

また、Sirt1 や Mn-SOD の発現を調節する遺伝子や化合物のスクリーニング系も確立し、今後、エネルギー代謝経路の転換のみならず、Sirt1 経路の活性化に関与す

る遺伝子や化合物の探索が可能になった。

謝 辞

本研究は、公益財団法人三島海雲記念財団の研究資金によってなされたものである。本研究は、私たちの従来の研究とは異なる新しい取り組みであり、新しい研究のセットアップのために貴財団の研究費を役立てることができ、ここに感謝の意を表します。今後、Sirt1 経路を活性化させる物質を探索し、食と抗老化という新しい観点から研究を展開させていきたいと考えております。

文 献

- 1) Neumann AA, Reddel RR.: *Nat Rev Cancer*. 2:879-84, 2002
- 2) Bordone L, Guarente L.: *Nat Rev Mol Cell Biol*. :6:298-305, 2005
- 3) Vander Heiden MG et.al.: *Science*:324:1029-33, 2009
- 4) Matoba S, et.al.: *Science*. 312:1650-3, 200