

食品由来成分のもつ抗老化作用とカロリー制限との接点

松浦 彰

千葉大学大学院融合科学研究科 教授

緒言

急速な高齢化社会を迎えた我が国では、加齢に伴う老年病の発症とそれともなう QOL の低下に対する対策が急務である。このため、安全でかつ普遍性のある老化抑制戦略を考案することが喫緊の課題となっている。

長い間、科学的に証明された老化抑制法は摂取するカロリーを通常の六割程度に減らす、いわゆる「カロリー制限」のみであった。カロリー制限による寿命延長効果は下等な単細胞生物から哺乳類まで広く認められているが、カロリー制限を人間にそのまま応用することは現実的ではないと考えられる。これは、摂取カロリーの制限により、活動能力の低下等の副作用が生じることが考えられ、寿命は伸びるものの高齢者の QOL の向上には結びつかない可能性が高いためである。より現実的な手段として考えられている戦略は、カロリー制限の効果を模倣する薬剤により、通常のカロリー摂取をしながらも老化を遅延させ、QOL の向上を目指すというものである。このような薬剤の開発にはカロリー制限の効果を仲介する細胞内経路の解明が不可欠であるが、現在までのところその全容は明らかになっていない。

食品由来成分はさまざまな生理活性を有しているが、

その一つとして細胞・個体レベルの老化進行を抑制する活性が知られている。そのような「抗老化活性」をもつ物質として赤ワイン由来のポリフェノールであるレスベラトロール (図 1A) が有名である。レスベラトロールは、細胞内で進化的に保存された脱アセチル酵素 Sir2 (sirtuin) ファミリータンパク質に作用し、その活性を正に制御することで、老化遅延を引き起こすとされている¹⁾。しかしながら、試験管中で観察される活性化作用が、細胞内の作用を反映していないのではないという議論があり、まだその作用機序についての最終的な結論は得られていない。また近年細胞内のエネルギー利用に關与するシグナル経路の中心的キナーゼ Tor の活性を抑制するラパマイシンが、様々な生物種において抗老化作用をもつことが示され、注目されている。ラパマイシンはカロリー制限を模倣する性質があると考えられているが、寿命制御における Tor の活性の生理機能がすべて明らかになっているとは言いがたい。

酵母は、生活環において単細胞性を示す時期をもつ真菌類の総称である。分子遺伝学や細胞生物学において研究材料として用いられている出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は、その名の通り、出芽という特殊な様式で細胞分裂を行う。出芽は大きな母細胞から小さな娘細胞

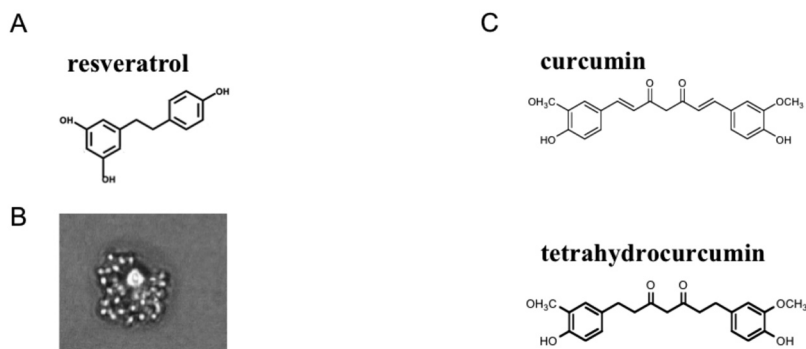


図 1 A: レスベラトロールの構造 B: K6001 株を使用した分裂寿命の測定 C: クルクミンとテトラクルクミンの構造

胞が生じるという非対称な細胞分裂様式である。娘細胞は、細胞サイズが拡大したのち自身が母細胞となって分裂を行い、再び娘細胞（最初の母細胞から見ると孫細胞）を生み出す。母細胞は通常 20~30 回分裂した後に細胞分裂を停止する。このような、酵母の母細胞の有限の分裂回数は遺伝的に決まっており、この過程は分裂老化と呼ばれて、老化のモデルとしてさまざまな解析が進んでいる。

本研究では、進化的に保存された寿命制御の分子機構を明らかにするために、出芽酵母を用いたスクリーニングを行い、寿命延長活性をもつ新たな食品由来化合物テトラヒドロクルクミンを同定した。本研究ではさらに、レスベラトロールを始めとした化合物による抗老化経路と、カロリー制限時の生理応答に関わる経路の類似性について、分子レベルでの解析を行った。

結 果

寿命延長活性のある化合物のスクリーニング

抗酸化活性のある食品由来化合物ライブラリーから、出芽酵母 K6001 株²⁾ に対して寿命延長活性をもつ化合物をスクリーンした。通常、酵母の分裂寿命は、顕微鏡下で母細胞から生じた娘細胞をマニピュレーションにより分離し、その個数を測定することにより行われる。そのような手法は、ライブラリーのスクリーニングには適さない。このために遺伝的細工を施された株が K6001 株である。K6001 株では、必須遺伝子 *CDC6* を母細胞特異的に発現する *HO* 遺伝子のプロモーターにより発現するように作られており、このためグルコース培養条件では、母細胞は分裂を続ける一方、生み出された娘細胞

は分裂を停止する。このため、グルコース培地上で形成されるマイクロコロニー中の細胞数を測定することで分裂回数を求めることができる（図 1B）。

K6001 を用いたスクリーニング系により、酵母の分裂寿命を延長させる複数の化合物が単離された。そのうち、最も高い活性を示すものはテトラヒドロクルクミンであった（図 2）。テトラヒドロクルクミンはウコンに由来する化合物であり、生体内でクルクミンが代謝されて生じる物質である（図 1C）。クルクミン、テトラヒドロクルクミンともに抗酸化活性をもつことが知られているが、寿命延長活性を有するのはテトラヒドロクルクミンのみであった。このことは、寿命延長活性は単に抗酸化活性が原因となっている訳ではないことを示唆している。また、スクリーニングで用いた K6001 株の他に、酵母の野生型株 BY4741 の分裂寿命への効果を常法により測定した結果、テトラヒドロクルクミンは BY4741 株の分裂寿命も延長させることを見いだした。

テトラヒドロクルクミンは *UTH1* を介して分裂寿命を延長させる

マイクロアレーを用いてテトラヒドロクルクミンの生理作用の転写レベルでの影響を検討した。その結果、酵母の寿命関連遺伝子として単離されている *UTH1* の発現が低下していた。*UTH1* は分裂寿命が延長する突然変異の原因遺伝子として単離されており、その産物が酸化ストレス耐性およびミトコンドリアの生理に関係していることが示されている³⁾。

まず、定量的 PCR により、マイクロアレーのデータを追試した。その結果、テトラヒドロクルクミン添加により *UTH1* の発現が 50% 程度低下することが確認され

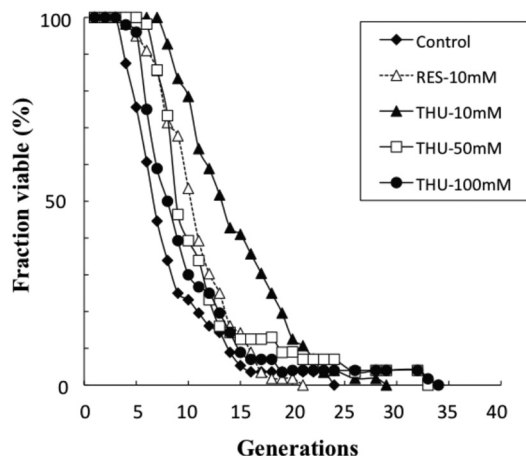


図2 テトラヒドロクルクミン (THU) とレスベラトロール (RES) の分裂寿命への影響
株は K6001 を用いている。

た (図 3)。これまでに *uth1* の遺伝子破壊が、野生型の分裂寿命を延長させることが観察されており、我々の手でもこのことは確認された。しかし、*uth1* 株にテトラヒドロクルクミンを添加した場合は、更なる寿命延長はおこらなかった (図 4)。このことから、テトラヒドロクルクミンによる寿命延長が、*UTH1* の発現低下を介していることが示唆された。

UTH1 の発現制御機構

UTH1 の開始コドンから上流 700 bp までの領域をプロモーターとして *lacZ* 遺伝子の 5' 側に組み込み、細胞に導入後テトラヒドロクルクミン処理後の β -galactosidase 活性を測定した。その結果、薬剤添加によりその活性が低下することが確認された。

UTH1 の上流領域には、Skn7 と Mot3 という、酸化ストレス応答に關与する転写因子の結合配列が予測されている⁴⁾。*UTH1p-lacZ* 融合遺伝子をもつプラスミドを *skn7* 変異株、*mot3* 変異株に導入し、テトラヒドロクルクミン添加によるプロモーター活性の変化を調べた。その結果、*mot3* 変異株では野生型株と同様の活性が観察されたが、*skn7* 変異株ではテトラヒドロクルクミンを添加する以前から活性が低下しており、テトラヒドロクルクミンによるさらなる活性低下は観察されなかった。このことから、テトラヒドロクルクミン添加による *UTH1* の発現抑制に、*SKN7* が關与している可能性が考えられる。実際、*skn7* の遺伝子破壊株ではテトラヒドロクルクミンによる寿命延長が観察されず、このモデルが支持された。

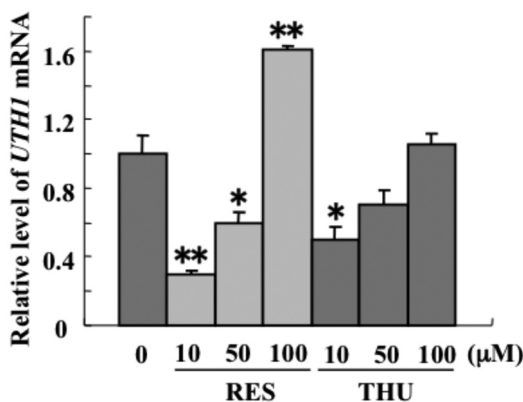


図3 テトラヒドロクルクミンおよびレスベラトロールによる *UTH1* 遺伝子の発現抑制
アスタリスクはコントロールとの有意差を示す。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

テトラヒドロクルクミン添加とカロリー制限との類似性

マイクロアレー解析の結果は、テトラヒドロクルクミン添加により翻訳活性が低下し、細胞壁の組成が変化していることを示唆している。そのような変化とカロリー制限時の変化との間に類似点があるかについて、検討を行った。

まず、定量的 PCR により、カロリー制限 (グルコース濃度 0.05%) の際に *UTH1* の発現が低下していることが明らかとなった。この際の *SKN7* の關与については、現在検討を行っている。また、カロリー制限は、*uth1* 破壊株の分裂寿命を延長させないことが明らかとなった。このことは、テトラヒドロクルクミンが關与する寿命延長経路が、カロリー制限による寿命延長を引き起こす経路と類似していることを強く示唆している。

考 察

本研究において、酵母の寿命延長をもたらす食品由来成分としてテトラヒドロクルクミンが同定された。この化合物が作用する経路として Skn7-Uth1 が關わる新規経路が見いだされた。Skn7 の上流には細胞膜上ではたらく二成分因子 Sln1-Ypd1 が存在している。これらの因子は細胞外の環境変化を細胞内に伝える機能を有しており⁵⁾、これらのはたらきがテトラヒドロクルクミンのもつ抗老化活性とどのようにつながるのかは興味深い。Uth1 は真菌類で保存されたタンパク質であり、糖分解酵素のモチーフをもっているが、その機能は明らかでない。*UTH1* の発現が寿命を短くする方向にはたらく理由はまだ不明であり、今後の解析が待たれる。共同研究

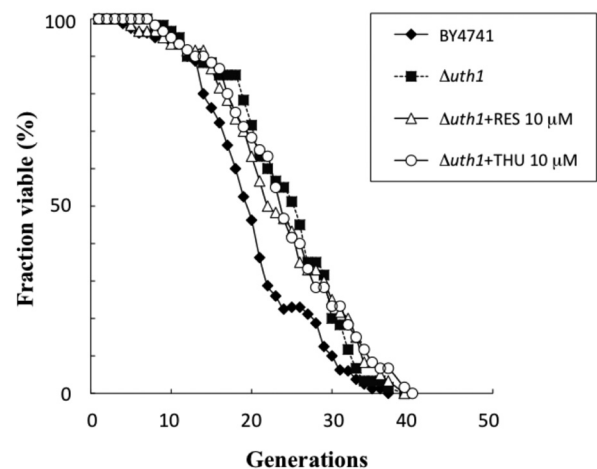


図4 テトラヒドロクルクミンによる寿命延長に対する *UTH1* 要求性
BY4741 株およびそれ由来する Δ *uth1* 株を用いて分裂寿命測定を行った。

により、テトラヒドロクルクミンがショウジョウバエの寿命を延長することを見いだしている。また、マウスでこの物質が寿命を延ばしたという報告⁶⁾もある。このことから、テトラヒドロクルクミンが作用する経路は進化的に保存されていることが考えられる。

本研究の結果から、抗老化活性をもつ化合物が、カロリー制限を模倣することで寿命延長を行っている可能性が示唆された。その詳細な分子機序の解明により、寿命を決定する遺伝的要因を明らかにしていきたいと考えている。

要 約

酵母の分裂寿命を延長する物質として、ウコン由来のテトラヒドロクルクミンを新たに見いだした。テトラヒドロクルクミンおよびカロリー制限による寿命延長に

UTH1 が関与していることが示唆された。

謝 辞

本研究を行うにあたり、研究助成を賜りました財団法人三島海雲記念財団に深く感謝申し上げます。また、研究にご協力いただいた、向蘭博士、石原聡博士、石原綾氏、大井麻紗子氏に感謝いたします。

文 献

- 1) S. Imai and L. P. Guarente: *Molecular Biology of Aging* (L. P. Guarente et al., ed.), pp. 39-72, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008.
- 2) S. Jarolim et al.: *FEMS Yeast Res.*, **5**, 169-177, 2004.
- 3) N. I. Camougrand et al.: *FEMS Yeast Res.*, **5**, 133-140, 2004.
- 4) L. C. Lai, et al.: *Eukaryot. Cell*, **5**, 1468-1489, 2006.
- 5) S. Li, et al.: *EMBO J.* **17**, 6952-6962, 1998.
- 6) T. Kitani, et al.: *Biogerontology*, **8**, 567-573, 2007.