



食餌制限による寿命延長のメカニズム

1. はじめに

「腹八分目に医者いらず」という言葉がある。満腹になるまで食べずほどほどの食事を摂ることで、病気になりにくく長生きできるという諺である。近年、まさにこの諺のように、食餌制限を行うと様々な生物の寿命が延長されるということが実験的に示されてきた。また、食餌制限によりがんや糖尿病といった老化関連疾患の発症が抑制されることもげっ歯類を用いた実験によって示されている。最近では我々と同じ霊長類であるアカゲザル (*rhesus macaques*) において、摂取カロリーを制限すると老化による脳の委縮が改善し、寿命が延長するということが、20年以上にわたる研究の結果明らかにされた¹⁾。食餌制限の有用な効果が霊長類でも確認されたことで、その分子メカニズムにはますますの注目が集まっている。無脊椎モデル生物を用いた研究から食餌制限による寿命延長に関与する遺伝子群が徐々に明らかとなりつつあり、哺乳類におけるその役割が検討され始めている。本稿では食餌制限を行うと寿命が延長される分子メカニズムについて、これまでの研究の流れを概説し、最近の知見を加えて紹介する。

2. 寿命を制御するシグナル伝達経路

従来、老化は時間の経過と共に生体に損傷が蓄積したために起きる、不可逆的な生理機能の低下と考えられてきた。しかし、1980年代に線虫 (*C. elegans*) において、長寿表現型を示す変異体 (*age-1*) が初めて同定され、寿命を短縮するような機能を持つ遺伝子が存在する、つまり老化が積極的に制御された生命現象であるということが明らかとなった。*age-1* は PI3K (ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ) の線虫ホモログをコードしており、イン

スリン様シグナルを伝達している。インスリン様シグナルは転写因子 FoxO の線虫ホモログ DAF-16 の核内移行を阻害しており、インスリン様シグナルが低下することで DAF-16 が活性化し、老化を抑制するのに必要な遺伝子群を発現させる (図 1)。さらに、線虫だけでなく酵母、ショウジョウバエ、マウスでもインスリン様シグナルが寿命を制御しており、普遍的な寿命制御経路であることが分かってきた (図 1)²⁾。

線虫や酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は寿命が短く、遺伝学的解析が容易であるという利点により、これらのモデル生物を用いて寿命制御遺伝子の探索が行われた。その結果、代謝を制御する TOR (target of rapamycin) 経路³⁾、NAD (ニコチンアミドアデニンジスクレオチド)/Sir2 (silent information regulator 2) 経路が重要な寿命制御シグナル経路として浮かび上がってきた⁴⁾。これらのシグナル伝達経路による寿命制御という役割は哺乳類において保存されていることも分かっている。マウスは高脂肪食で飼育されると寿命が短縮するが、Sir2 を活性化するポリフェノール resveratrol を同時に投与すると、高脂肪食を摂取しても寿命の短縮は観察されない⁵⁾。また、最近になって TOR の阻害剤ラパマイシンの投与によるマウスの寿命延長や、TOR 下流の主要なエフェクターの一つである S6K1 (ribosomal protein S6 kinase 1) のノックアウトマウスにおける長寿が報告されている^{6,7)}。インスリン様シグナルはグルコースに、TOR シグナルはアミノ酸や ATP 濃度に、Sir2 は代謝のメディエーターである NAD によってそれぞれ制御されており、進化的に保存された寿命制御経路はエネルギー代謝と深く関連していることが分かる。

3. 食餌制限が寿命を延長するキュー

食餌制限を行うには様々な方法がある。げっ歯類では、①摂取カロリーを慢性的に制限するカロリー制限、②自由摂食と全く餌を与えない飢餓状態を繰り返す断続的飢餓、③特定の栄養素だけを制限する手法 (摂取カロリーは変化させずにタンパク質や炭水化物のみを制限する) などがあり、これらの手法はいずれもマウスの寿命を延長することができる⁸⁾。さらに、マウスを用いた実験で、断続的飢餓の場合は自由摂食の期間に反動で過剰に食餌をすることによって、トータルの摂取カロリーが減らなくても、抗老化作用が見られるという報告がなされており、実際には摂取カロリーを制限せずに、食餌制限による望ましい効果を得られる可能性が示されていた⁹⁾。そこで我々は線虫を用いて、断続的飢餓による寿命延長の分子機構を解析すること

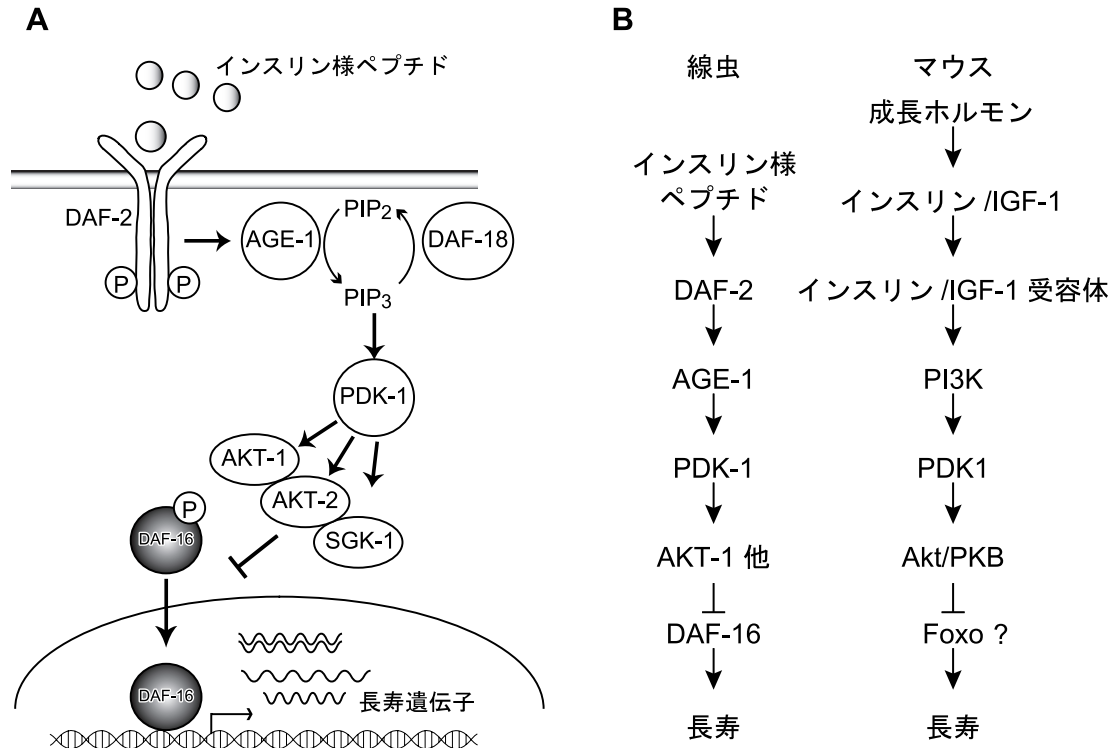


図1 インスリン様シグナル伝達経路の進化的保存性
 A. 線虫のインスリン様シグナル伝達経路の模式図. B. 線虫とマウスのインスリン様シグナル伝達経路構成遺伝子.

にした。

4. 線虫の食餌制限におけるRheb/TOR経路の二重の役割

線虫は寒天培地上で大腸菌を餌として飼育されている。これまでに線虫ではカロリー制限が20%程度寿命を延長することは知られていたが、断続的飢餓については報告がなかった。そこで我々はまず、線虫において断続的飢餓が寿命を延長するかどうかを検討した。我々は線虫の発生が完全に終了した後に自由摂食と飢餓を2日毎に繰り返し、断続的飢餓を行った。この手法はカロリー制限よりも顕著に(約60%)線虫の寿命を延長した(図2)。また断続的飢餓は寿命を延長するだけでなく、老化に伴う運動量の低下を抑制し、さらに熱ストレス、酸化ストレスに対する抵抗性も上昇させた。

驚いたことに、これまでにカロリー制限による寿命延長に必要なと報告されていた二つの転写因子、*skn-1* (Nrf2線虫ホモログ)と*pha-4* (FoxA線虫ホモログ)は断続的飢餓による寿命延長には必要ではなかった。つまり、これまで厳密には区別されてこなかったカロリー制限

という刺激と、断続的飢餓という刺激は異なるシグナルによって伝達されていることが示唆された。

次に我々はRheb/TOR経路に着目した。低分子量GTPase Rheb (Ras homologue enriched in brain)はアミノ酸やATPといった栄養素によって活性化され、下流のエフェクターTORを活性化する。Rheb/TOR経路はATPやアミノ酸によって活性化されるので、カロリー制限を行うとこの経路の活性は低下すると考えられる。そしてこれまでにTORの活性が低下するとカロリー制限状態を模倣して寿命が延長するということが様々な種で報告されている。Rhebについては報告がなかったので我々はまず、カロリー制限におけるRhebの役割を検討した。Rheb RNAiを行うと、過栄養状態では寿命が延長された。一方、寿命が20%延長するようなカロリー制限の条件下ではRheb RNAiによる更なる寿命延長は観察されなかった(図2D)。つまり、TORについてのこれまでの先行研究の結果と合致して、Rhebの活性の低下もカロリー制限による寿命延長を模倣するという結果が得られた(図2)。

次にこの経路の断続的飢餓における役割について検討し

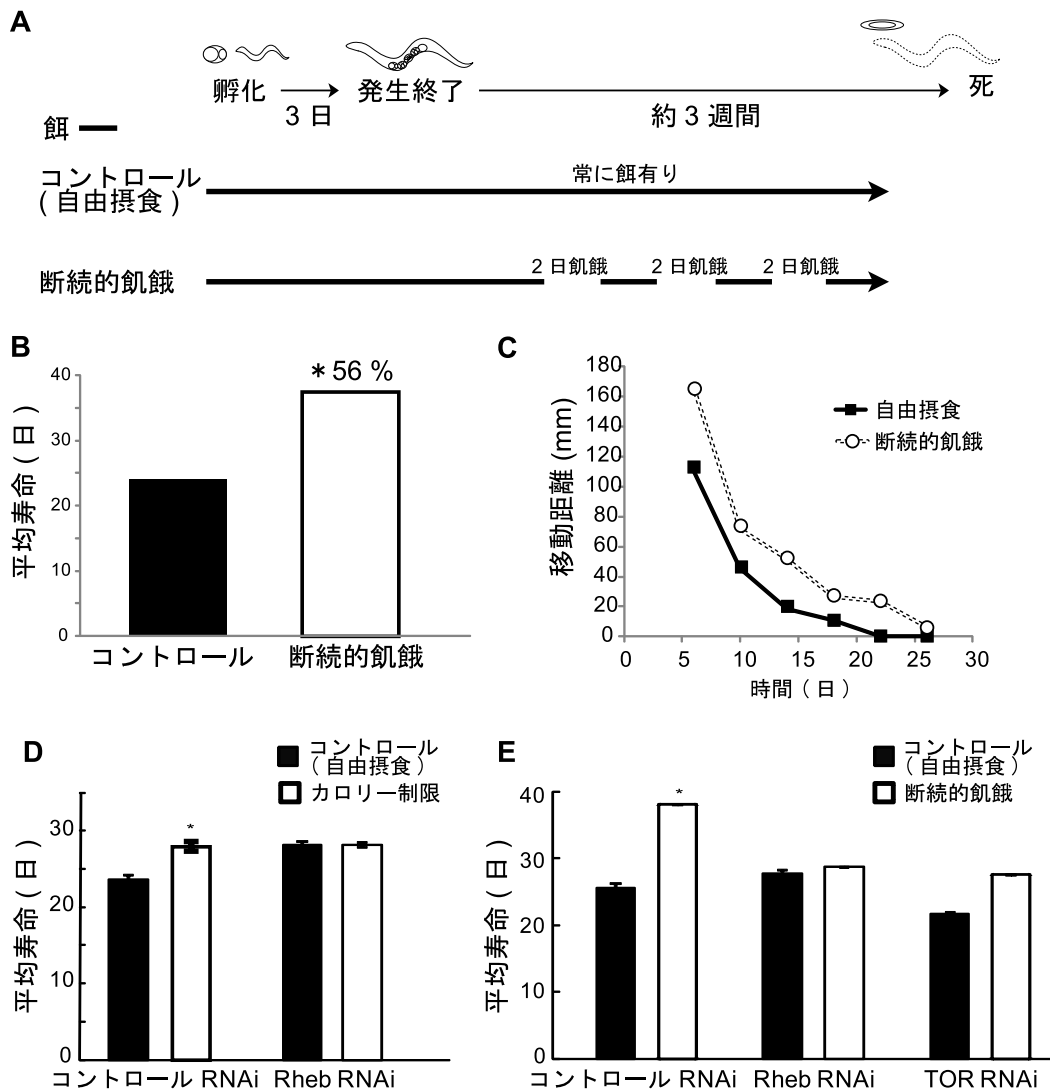


図2 断続的飢餓は老化を抑制し寿命を延長する

A. 断続的飢餓の模式図。B. 野生型 N2 株に対して断続的飢餓を行った時の平均寿命。* ; $p < 0.01$, T 検定。C. 加齢に伴う自発運動量の推移。一個体の線虫が1時間に移動した距離の平均。D. カロリー制限を行った時の野生型 N2 株の平均寿命。カロリーの制限は餌である大腸菌の濃度を変化させて行った。黒のコントロールは大腸菌濃度が 5.0×10^{10} 個/ml, 白のカロリーの制限は 5.0×10^8 個/ml。* ; $p < 0.01$, T 検定。E. 断続的飢餓を行った時の野生型 N2 株の平均寿命。黒のコントロールは 5.0×10^9 個/ml の大腸菌を餌として常時餌のある環境で飼育し, 白の断続的飢餓は2日毎に餌のある環境と餌のない環境で飼育した。* ; $p < 0.01$, T 検定。全ての実験は 20°C で行った。

たところ, Rheb が断続的飢餓による寿命延長に必須であることを見出した (図 2E)。また, TOR も, 部分的に必要であった。Rheb/TOR 経路が寿命の延長に必要なという結果は, これまでのカロリー制限に関する先行研究と, 寿命制御の方向が全く逆である意外な結果であった (図 2)。これらの結果は Rheb/TOR 経路が過栄養状態においては寿命を短縮する一方, 断続的飢餓においては寿命を

延長するのに必要であるという, 二重の役割を担っていることを示している。

5. Rheb/TOR 経路とインスリン様シグナル

インスリン様シグナルは進化的に保存された寿命制御経路であり, インスリン受容体の線虫ホモログ *daf-2* の機能低下変異体は野生型の約2倍長生きする (図 3A)。我々は

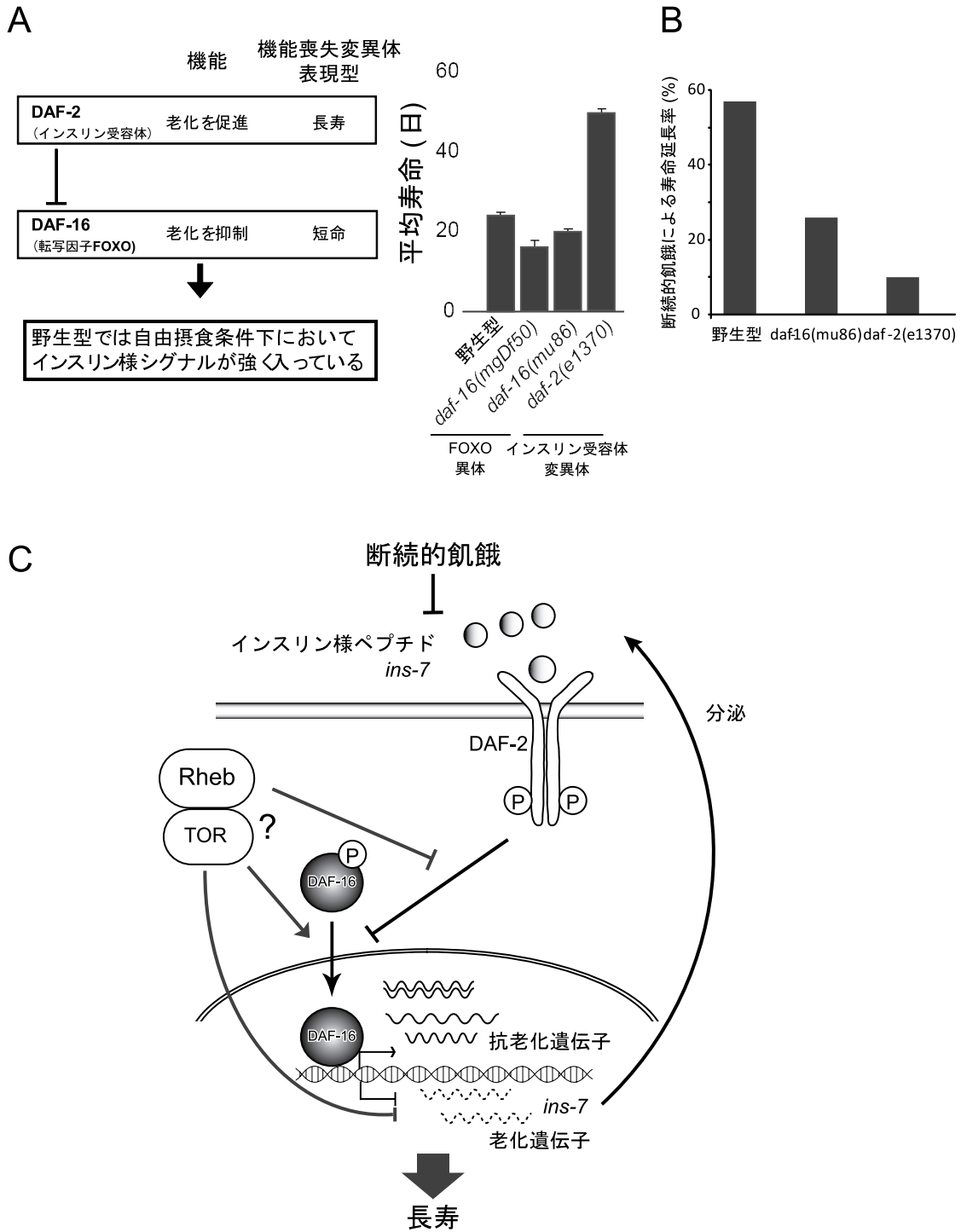


図3 断続的飢餓から寿命延長に至るシグナル伝達
 A. インスリン様シグナルの低下は寿命を延長する。各変異体の自由摂食条件下における平均寿命 (右)。B. 断続的飢餓による寿命延長はインスリン様シグナルの抑制によって寿命を延長する。各変異体における断続的飢餓による寿命の延長率。C. インスリン様シグナルと Rheb/TOR 経路のクロストークの模式図。

断続的飢餓が野生型の寿命を顕著に延長するのに対し、*daf-2* の長寿変異体では断続的飢餓による寿命延長の程度が小さいことを見出した (図 3B)。また、インスリン様シグナルが低下すると、下流のエフェクターである転写因子 *daf-16* が活性化して長寿になることが分かっているが、*daf-16* の機能喪失変異体でも断続的飢餓による寿命延長が部分的に抑制されていた (図 3B)。これらの結果は、断続的飢餓はインスリン様シグナルを低下させることで老化を抑制しているということを示している。

また我々は、Rheb/TOR 経路を阻害すると、線虫のインスリン様ペプチドの一つ、*ins-7* の発現が上昇することを見出した。*ins-7* はインスリン様シグナルアゴニストであり、DAF-16 の核内移行を阻害することで寿命を短縮する。野生型では飢餓によって *ins-7* の発現が低下し、DAF-16 は核内移行するが、Rheb RNAi を行うと、飢餓状態においても定常状態と同等の *ins-7* の発現が見られ、DAF-16 の核内移行は観察されなかった¹⁰⁾。これらの結果は断続的飢餓がインスリン様シグナルの抑制によって寿命を延長し、また Rheb/TOR 経路は、飢餓によるインスリン様シグナルの抑制に必要であることを示している (図 3C)。また、線虫においてカロリー制限はインスリン受容体を介さずに伝達されることが報告されており¹¹⁾、カロリー制限と断続的飢餓が異なるシグナルによって伝達されていることも明らかとなった。

6. 終わりに

我々は低栄養条件では活性が低いと考えられる Rheb/TOR 経路が、断続的飢餓による寿命延長に積極的な役割を果たしているという意外な結果を報告した。その意外性を説明する二つの仮説がある。一つは低栄養条件下でも Rheb/TOR 経路の活性はゼロではなく、その低い活性が重要であるという可能性である。二つ目は断続的飢餓の場合は、Rheb/TOR 経路は実際に生体内の ATP やアミノ酸が減少する前に機能しているという可能性である。近年、ショウジョウバエや線虫では「餌の匂い」が寿命を縮めることが報告され^{12,13)}、食餌制限における神経系の重要性が示された。神経系で餌の欠乏を感知して、体内に蓄積した栄養が枯渇する前に、来るべき食物の不足に備えるというのは理に適った応答である。おそらく、線虫はまず①神経系で飢餓を感知し、実際に体内のエネルギー貯蓄が枯渇し始める前に内分泌系を介して食物の不足に備え、次に②実際に細胞内 ATP 濃度が下がったり、NAD が増したりするとそれに対する適応応答が開始される、という複数の機構

を備えているのではないだろうか。カロリー制限や断続的飢餓は複数のシグナル伝達経路によりこれらの寿命延長につながる応答を引き起こし、かつ、それらは相互に関連し合っているのではないかと考えられる。Rheb/TOR 経路とインスリン様シグナルのクロストークの分子の実体を明らかにすることで、食餌制限から寿命延長に至る複雑なシグナル伝達ネットワークの核心が明らかになると期待される。

- Colman, R.J., Anderson, R.M., Johnson, S.C., Kastman, E.K., Kosmatka, K.J., Beasley, T.M., Allison, D.B., Cruzen, C., Simons, H.A., Kemnitz, J.W., & Weindruch, R. (2009) *Science*, 325, 201–204.
- Tatar, M., Bartke, A., & Antebi, A. (2003) *Science*, 299, 1346–1351.
- Vellai, T., Takacs-Vellai, K., Zhang, Y., Kovacs, A.L., Orosz, L., & Muller, F. (2003) *Nature*, 426, 620.
- Bordone, L., & Guarente, L. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 298–305.
- Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P.J., Poesala, S., Becker, K.G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K.W., Spencer, R.G., Lakatta, E.G., Le Couteur, D., Shaw, R.J., Navas, P., Puigserver, P., Ingram, D.K., de Cabo, R., & Sinclair, D.A. (2006) *Nature*, 444, 337–342.
- Harrison, D.E., Strong, R., Sharp, Z.D., Nelson, J.F., Astle, C. M., Flurkey, K., Nadon, N.L., Wilkinson, J.E., Frenkel, K., Carter, C.S., Pahor, M., Javors, M.A., Fernandez, E., & Miller, R.A. (2009) *Nature*, 460, 392–395.
- Selman, C., Tullet, J.M., Wieser, D., Irvine, E., Lingard, S.J., Choudhury, A.I., Claret, M., Al-Qassab, H., Carmignac, D., Ramadani, F., Woods, A., Robinson, I.C., Schuster, E., Batterham, R.L., Kozma, S.C., Thomas, G., Carling, D., Okkenhaug, K., Thornton, J.M., Partridge, L., Gems, D., & Withers, D.J. (2009) *Science*, 326, 140–144.
- Masoro, E.J. (2005) *Mech. Ageing Dev.*, 126, 913–922.
- Anson, R.M., Jones, B., & de Cabo, R. (2005) *AGE*, 27, 17–25.
- Honjoh, S., Yamamoto, T., Uno, M., & Nishida, E. (2009) *Nature*, 457, 726–730.
- Greer, E.L., Dowlathshahi, D., Banko, M.R., Villen, J., Hoang, K., Blanchard, D., Gygi, S.P., & Brunet, A. (2007) *Curr. Biol.*, 17, 1646–1656.
- Libert, S., Zwiener, J., Chu, X., Vanvoorhies, W., Roman, G., & Pletcher, S.D. (2007) *Science*, 315, 1133–1137.
- Smith, E.D., Kaeberlein, T.L., Lydum, B.T., Sager, J., Welton, K.L., Kennedy, B.K., & Kaeberlein, M. (2008) *BMC Dev. Biol.*, 8, 49.

本城 咲季子, 西田 栄介

(京都大学大学院生命科学研究科シグナル伝達学分野)

The mechanisms underlying dietary restriction-induced longevity

Sakiko Honjoh and Eisuke Nishida (Department of Cell and Developmental Biology, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kitashirakawaoiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan)

エピジェネティックな遺伝子発現制御のための DNAメチル化酵素の創製

1. はじめに

セントラルドグマの提唱以来、遺伝子情報と生体機能の制御にまつわる生体分子およびその修飾が注目されてきた。エピジェネティクス分野における研究では、翻訳後のタンパク質修飾(リン酸化, メチル化, アセチル化など), RNAによる転写調節などと併せて遺伝子のメチル化が重要な研究対象である。哺乳類細胞ではシトシンの5'位がメチル化を受け、ヒト細胞内では実に7割のCpG配列がメチル化を受けていることが明らかにされている。遺伝子でのメチル化の役割は遺伝子情報の読み出しの制御が主なものである。メチル化を受けているCpG配列にはメチル化シトシン結合タンパク質が結合し、さらにタンパク質複合体が形成され、クロマチンの脱アセチル化が促進される。脱アセチル化を受けた部位ではクロマチン構造が密な状態となり遺伝子の転写がオフの状態になる。DNAメチル化はゲノムDNAの機能制御において重要な役割を果たしており、胚発生時に行われるゲノムインプリンティングは細胞の運命を司るコードとしてその解明が急速に進んでいる。がん細胞においてメチル化パターンの異常がみられることから、DNAメチル化は細胞のがん化に密接に関わるとされている。また、最近ではメチル化パターンと細胞のリプログラミングの関連が注目されている。このようにDNAメチル化はDNA機能の一端を担っていることから、人為的にメチル化を制御することの重要性が認識されている。本稿ではエピジェネティクス分野においてDNAメチル化に関連した最近の研究の動向、特に人工的なメチル化制御に関して解説する。

2. 研究の背景

メチル化されたシトシン塩基はメチル化シトシン結合タンパク質(MeCP2)によって認識され、MeCP2が他のタンパク質との会合体を形成し、ヒストンの脱アセチル化を行う。これによりヒストンの構造変化が誘起された部分のゲノム遺伝子では転写反応が抑制を受ける。シトシン塩基のメチル化は細胞分裂後も保存されるので、永久的にこの転写抑制が保存される。遺伝子の転写抑制はRNAiや転写抑制ドメインを用いる方法などで一時的な制御は可能であるが、細胞分裂後も保存される永久的な抑制を可能にするのがシトシンのメチル化であると考えられる¹⁾。シトシンのメチル化はがん細胞中の特定の配列で高頻度に観察される(図1A, B)²⁾。このため、メチル化反応を人工的に制御することは有効な疾病治療の選択肢になると考えられている。このような遺伝子に対する人工的な制御を行うためには任意の標的とするDNA配列に結合するタンパク質が必要である。この役割に最適なタンパク質としてZnフィンガータンパク質に対する注目が高まっている。

Znフィンガータンパク質はその発見から四半世紀を経て、遺伝子を標的とした医療への応用が現実味を帯びてきている。Znフィンガードメインは約30アミノ酸で構成されββα構造のαヘリックス中のアミノ酸側鎖がDNAの3塩基を認識する。このモジュール構造がタンデムに連結されることから非対称かつ長鎖のDNA配列の認識が可能になる³⁾。これまでにファージディスプレイ法や酵母ツーハイブリッド法などを用いて大規模なライブラリー中から各コドン配列に対応するドメインが選択され、それらを組み合わせることで標的とする遺伝子配列に対して特異的に結合するDNA結合ドメインを構築することが可能となっている⁴⁾。こうした任意の標的DNA配列に結合するように“プログラム”できるという特徴を持つDNA結合ドメインはZnフィンガーのみであり、DNAを修飾する酵素に融合することで酵素の働きを制御することができるということが示されている。応用例としてDNAに働く酵素ドメインとの融合タンパク質がこれまでに数種類報告されている。DNA切断酵素、DNA組換え酵素、そしてDNAメチル化酵素がそれらの例であり、メチル化酵素については1997年にSssIとの融合体を用いたDNAメチル化に関する報告がなされた⁵⁾。他の2種類の酵素との大きな違いとしてDNAメチル化酵素はDNA結合機能と酵素活性機能がリンクしているという点がある。すなわち、同じ構造中に二つの機能に関与するアミノ酸残基が含まれている。