

老化研究のモデル動物としての線虫, *Caenorhabditis elegans* (総説)

Nematode, *Caenorhabditis elegans* as a model animal for ageing research (Review)

石井 直明

東海大学先進生命科学研究所・高機能性食品研究部門

Naoaki Ishii

Division of High Functional Food Sciences

Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

線虫、*Caenorhabditis elegans* は体長 1mm あまりの自由生活する小さな虫で、動物に必要な最小限な体制をもち、遺伝学的解析技術が確立されていることから、老化研究の実験動物モデルとして注目されるようになってきた。*C. elegans* の長寿の形質を持つ突然変異体の解析から、老化に insulin/IGF-1 シグナル伝達を始め、さまざまなシグナル伝達経路が関わっていることが明らかにされ、さらにエネルギー代謝を含む代謝とその副産物である活性酸素が関わっていることが明らかになってきた。

[Abstract]

The nematode, *Caenorhabditis elegans* is a small free-living animal (about 1 mm body length) and now is paid attention as a model animal for aging research because they have simple organisms and genetic analysis technologies have been established. *C. elegans* can easily grow in petri plates on a simple diet of *Escherichia coli* and the embryonic development is rapid, taking only 13 h at 20°C. They reproduce with a rapid life cycle of approximately 3.5 days and have a short maximum lifespan of approximately 30 days. From the analysis of the long-lived mutants of *C. elegans*, it was found that ageing is affected by various signal transmission pathways including insulin/IGF-1 signal transmission, and then it became clear that the metabolism including energy metabolism and reactive oxygen species as the by-product of the metabolism are concerned with the aging process.

[Key Words]

Ageing, *Caenorhabditis elegans*, Gerontogenes, Signal transduction, Oxidative stress

1. 線虫とは

線虫は回虫と同じ線形動物門に属する動物で、地球のあらゆるところに生息している。その種類や数において他の生物を圧倒しているところから、生態系や地球環境に大きな影響を及ぼしている。線虫の中でも *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) は非寄生性であり、細菌を餌にして地中で自活している。*C. elegans* は世界中で存在が確認されているが、主にイギリスで発見された Bristol (別名 N2) が標準株として、実験に使われている。体長 1 mm あまりの虫であるが、表皮、神経、筋肉、消化器官、生殖器官という動物に必要な最小限の

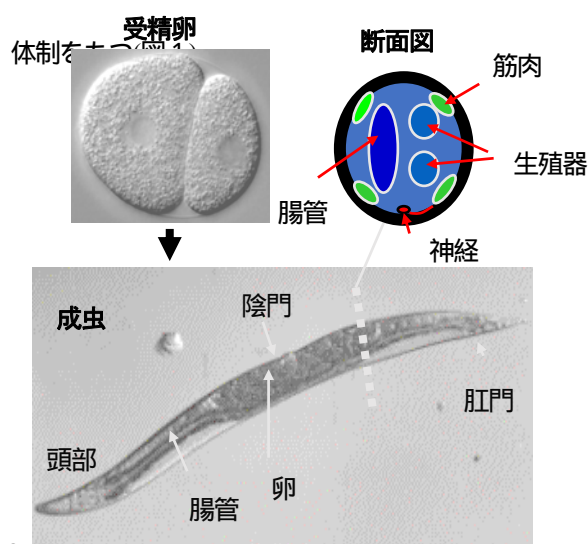


図1 線虫、*C. elegans* の形態

受精卵から成虫まで体が透明なので、生きたまま観察が可能

元々は S. Brenner 博士が遺伝子のレベルで行動のメカニズムを解明するために開発したモデル動物であり、博士はさまざまな突然変異体を分離し、1975年に遺伝学的手法を確立した。*C. elegans* の成虫は、たった 959 個の体細胞から成り立っており、J. Sulston 博士は、受精から成虫に至るまでのすべての細胞の分裂様式や運命を記述した細胞系統樹を完成させた。これは他の動物と比べて細胞数が少ない *C. elegans* でのみ可能な偉業である。線虫の発生分化の段階でプログラムされた細胞死が現れるが、B. Horvitz 博士はそのメカニズムを遺伝子のレベルで解明し、ヒトを含むさまざまなアポトーシスのメカニズムの解明に先駆者的な役割を果たした。この3人の博士はこれらの業績により 2002 年のノーベル医学生理学賞を受賞している。

C. elegans は 1 匹の虫が卵巣と精巣をもつ雌雄同体が基本であり、自家受精により次世代が生まれる。そのため遺伝的背景が均一で、ヒトのように遺伝的な多様性がないことから、遺伝子の特定が容易である。他にも、ホモ接合体を容易に得ることが可能なことや、神経や筋肉の変異のため生殖行動に異常を生じても交配が可能なのが雌雄同体の利点としてあげられる。雄が染色体不分離により約 800 匹に 1 匹の割合で出現し、雌雄同体との交配が可能である。標準の飼育温度は 20 度で、受精後約 13 時間で孵化する。孵化直後の幼虫を L1 と呼び、その後、3 回の脱皮により L2 から L4 を経て、孵化から 3 日半後には成虫になる。成熟後は数日かけて約 300 個の受精卵を産む。

C. elegans を用いて多細胞動物で初めてゲノムの全塩基配列（約 1 億塩基対）が決定されたことが弾みとなり、ヒトを含めた分子遺伝学的な研究が飛躍的に進歩することになった。最近では 2 本鎖 RNA が遺伝子の発現機能を阻害することが *C. elegans* から発見され (RNAi: RNA interference)、この現象はすべての生物に共通な現象であることが確認されるようになった。この業績により 2006 年に A. Fire 博士と G. Mello 博士がノーベル賞を受賞している。すでに、*C. elegans* がもつすべての遺伝子に対する二本鎖 RNA を発現させる大腸菌のセットがイギリスから市販されており、この大

腸菌を餌として与えるだけで、目的の遺伝子の発現を阻害することが可能となっている。

C. elegans の研究支援体制は世界的なレベルで整備されており、遺伝センターに登録されている突然変異体や遺伝子情報などをインターネットを通じて手に入れることが可能である (<http://cbs.umn.edu/cgc/home>)。

2. *C. elegans* の老化

20 度の寒天培地上で飼育すると、平均寿命は 20 日程度で、最長寿命が 30 日ほどである。成虫になってから 10 日目まではほぼ 100% 生存し、その後シグモイド曲線を描くように死んでいく。10 日目を過ぎると徐々に動きが鈍くなり、最後にはほとんど動かなくなり、頭部を突くと頭を動かさず程度である。加齢に伴って老化の指標である過酸化脂質や酸化タンパク質が蓄積してくる。生殖細胞以外の体細胞は、成虫後には分裂を行わないので、この指標はかなり有効である。虫の多くは筋肉、消化器官系が自己融解を起こし、最後は神経系が障害をうけ死ぬ。

幼虫期に餌の不足や虫の飼育環境の密度が高くなると、耐性幼虫 (dauer larvae) という特殊な形態に変化し、環境が改善されると正常な発生に戻る。正常状態での寿命が 1 ヶ月なのに対して、耐性幼虫は餌なしで 3 ヶ月以上もの生存能力をもつことが知られている。この 3 ヶ月の間に餌を与えると正常な成長過程に復帰するが、復帰後の成虫の寿命は耐性幼虫の状態が存在した期間に依存せず 1 ヶ月と一定であった。このことから耐性幼虫の期間を「老化しないステージ (non-aging stage)」と呼んでいる。後述するように、この耐性幼虫の突然変異体 (*daf*) の研究が老化研究の新たな扉を開くことになった。

3. 寿命遺伝子の発見

これまで、老化や寿命が 1 つの遺伝子に支配されるようなことはない信じられてきた。もしヒトでそのような遺伝子が存在するならば、その遺伝子の変異が、ヒトの最長寿命と考えられている 120 歳代を越えた人を作りだしてきたはずである。しかし、そのような人が現れたという正式な記録がないことから、老化や寿命を制御する遺伝子の存在を否定する根拠になっていた。しかしそれに挑戦し、長寿突然変異体の分離を試みたのが、M.R. Klass である。Klass は *C. elegans* を使い、寿命の長い突然変異体を 8 種類分離した。しかしこれらの突然変異体の長寿の形質は、耐性幼虫に変化

するか、あるいは喉頭に異常を持つために餌を十分に摂取できないことが原因であったと報告している。後者は最近注目されているカロリー制限（腹八分目）による長寿命効果を示したものであるが、Klassはこの研究から長寿遺伝子は発見されなかったと結論づけている。しかし、T.E. Johnsonは、この咽頭に異常をもつ突然変異体を譲り受け、咽頭の異常を正常に戻したときの長寿の形質を観察した。驚くことに長寿の形質は失われず、咽頭の異常が長寿を引き起こしたわけではないことを発見した。この突然変異体は成熟期までの期間を遅らせることなく、加齢による死亡率(Gompertz関数)を低下させ、最長寿命を野生体の約2.2倍、平均寿命でも1.7倍延長させる。老化の速度が遅くなったことから、*age-1*と名づけられ、世界で初めての長寿遺伝子として認められた[1]。この遺伝子の発見がきっかけとなり、線虫で寿命に関わる突然変異体が、現在までに多数分離されるようになった。

長寿を示す突然変異体に *daf-2* がある。*daf-2* は耐性幼虫の形成に必要な遺伝子群 (*daf*) の1つで、それらの遺伝子変異は耐性幼虫の形成に異常を示す。*daf-2* 突然変異体は、平均寿命が約2倍であるが、寿命が野生株よりも若干短い突然変異体 *daf-16* との二重突然変異体を作成すると、*daf-2* がもつ長寿の形質が失われた[2]。また *daf-12* といわれる突然変異体と *daf-2* の二重突然変異体は野生株の4倍の長寿の形質を示した[2]。

daf-2 と *age-1* の原因遺伝子はそれぞれ、インスリンに似たりガンドに応答するレセプターと、その下流で働く脂質リン酸化酵素（ホスファチジルイノシトール3キナーゼ：PI3K）であり、両者とも哺乳類で見られるインスリンあるいはIGF-1に応答するシグナル伝達経路に参与していた。この経路のシグナルの減少は耐性幼虫の形成や寿命延長を導くが、野生体ではDAF-2の咽頭の周りに存在する数個の神経細胞にのみ発現していることが明らかとなった。DAF-2の下流にあるPI3Kが細胞膜上にある脂質をリン酸化し、そのシグナルが直接、あるいは *daf-18* の遺伝子産物であるPTEN（哺乳類腫瘍抑制遺伝子のホモログ）やPDK-1（イノシトールリン酸依存性キナーゼ）を介して、AKT-1とAKT-2（セリン/スレオニンキナーゼ）に働きかける。このシグナルを受けるのがフォークヘッド型の転写因子として知られているDAF-16である。リン酸化されたDAF-16は細胞質に留まっているが、脱リン酸化を受けると核に移行し、標的細胞に存在する寿命、耐性幼虫形成、生殖に係る遺伝子発現を調節すると考

えられている。このインスリン・シグナル伝達経路は線虫のみならず、酵母、ショウジョウバエ、マウスでも老化に関与することが報告されている。

4. ミトコンドリア由来の活性酸素と老化

我々は、電子伝達系の複合体IIのサブユニットの1つであるシトクローム *b* の遺伝子に変異を持つ *mev-1* 突然変異体が短命であり、その原因がミトコンドリアから活性酸素が過剰に産生されたためであることを明らかにした[3,4]。ミトコンドリアから活性酸素の過剰産生を引き起こしている *mev-1* は、大気中でも野生株に比べて短命で、酸素濃度に依存して寿命の短縮がみられ、さらにミトコンドリアの形態異常、老化のマーカーとして知られるリポフスチン（老人班）や酸化タンパク質の早期蓄積などの早老症の兆候を示すようになった。また、*mev-1* は突然変異頻度が高い。さらに、胚では正常な発生・分化とは無関係な野生株には見られない細胞死も多数生じた。*C. elegans* ではある細胞が胚発生期にアポトーシス（線虫では「プログラムされた細胞死」と定義）を起こし、それが個体の発生・分化に重要な役割を担っていることが知られている。アポトーシスには実行因子である *ced-3*（カスパー3）が必要となり、これが欠損するとアポトーシスは起こらなくなる。*mev-1* と *ced-3* の二重突然変異体では、*ced-3* と同様に細胞死がまったく見られなくなることから、*mev-1* 突然変異体に生じた過剰な細胞死は、線虫がもつプログラムされた細胞死の経路を介していることになる。*mev-1*; *ced-3* 二重変異体の平均寿命は *mev-1* 単独の寿命より長く、野生株よりも短くなった。これにより、細胞死が寿命短縮に少なからずとも寄与していることが明らかになった。

インスリン・シグナル伝達経路やミトコンドリアの電子伝達系を含むエネルギー代謝は、その副産物として細胞毒性を示す活性酸素を産生する。この活性酸素が生体内の分子を攻撃し、細胞の機能低下やアポトーシスによる老化が、さらに遺伝子突然変異によるガンが生じる[5]。そのために抗酸化がヒトの長寿実現の鍵になると考える。実際、インスリン様のシグナル伝達経路も酸化ストレスが関与しており、*daf-2* 突然変異体では抗酸化酵素である銅・亜鉛SODとカタラーゼの活性が上昇しており、この経路の下流に存在する転写因子のDAF-16はミトコンドリアに存在する抗酸化酵素のMn-SODの遺伝子発現を制御している。また線虫の *daf-2* 突然変異体が酸化ストレスに耐性になり、酸化ス

トレス下での寿命短縮が抑制されることが知られている。

SIR2の過剰発現が*C. elegans*に長寿をもたらすと報告されている。SIR2は染色体を構成しているタンパク質であるヒストンのアセチル基を取り除く脱アセチル化酵素である。この酵素は、ヒストンを脱アセチル化する際に、細胞のエネルギーを運ぶ役割をしているNAD⁺の補助が必要となる。NAD⁺は細胞が取り込んだ栄養分からエネルギーを作り出すことに関わっているが、SIR2はその調節に関与していると考えられている。

5. 老化シグナル

*C. elegans*の研究から、老化にinsulin/IGF-1シグナル伝達経路が関わっていることが明らかにされたが [6]、老化制御にはinsulin/IGF-1の他に、TOR, MAPK, AMPK, PKC, NF-κB, TGF-β, Notch そしてWNTと、シグナル伝達系に関わる多数の分子が関与していることが明らかとなってきた。

シグナル伝達経路は独立して働いているわけではなく、お互いに制御し合う関係にある(図2)。例えば、インスリン/IGF-1シグナル伝達経路の中間に存在するAKTはFOXOファミリー遺伝子を制御すると同時にAMPKも制御している。AMPK自身もFOXOを制御している。AMPKはRaptorのリン酸化に関わることでmTORを制御し、一方でmTORの下流に存在するS6KがAMPKのリン酸化を制御しており、AMPKとmTORが正負の逆の関係で下流の遺伝子を制御していることが明らかになってきた [7]。sirtuinは染色体を構成しているタンパク質であるヒストンのアセチル基を取り除く脱アセチル化酵素であるが、その一つであるSirT1はFOXOのアセチル化にも関わっている。

インスリンや成長ホルモン、さらにブドウなどに多く含まれるポリフェノールの一種であるresveratrolのような食品、また免疫抑制剤であるrapamycinなど、多数の細胞外の環境因子がシグナル伝達系を通して下流の遺伝子を制御しており、老化に関わる遺伝子と環境因子が切り離せない関係にあることが明らかになってきた [8]。過剰なカロリー摂取や代謝に必須なビタミン・ミネラルの過不足は糖代謝やアミノ酸代謝、脂質代謝、エネルギー代謝などの一連の代謝の働きのバランスを崩し、老化の促進や老年性疾患を引き起こす。

前述したように、老化の一因として活性酸素が考えられており、insulin/IGF-1などのシグナル伝達系が酸化・抗酸化に関わる遺伝子も制御していることが明らかになっ

てきた。主にエネルギー代謝の副産物として生じた活性酸素が細胞構成成分に傷害を与えることで、遺伝子発現の障害や機能を失った代謝産物の蓄積が起こり、細胞機能が低下することで老化が促進する。これに対抗するように生物は抗酸化やオートファジーなどの防御機構を進化させ、個々の寿命は傷害と防御のバランスにより決まると考えられる。このバランスが短命、長命のどちらに傾くかは、栄養などの環境因子に大きく影響される。

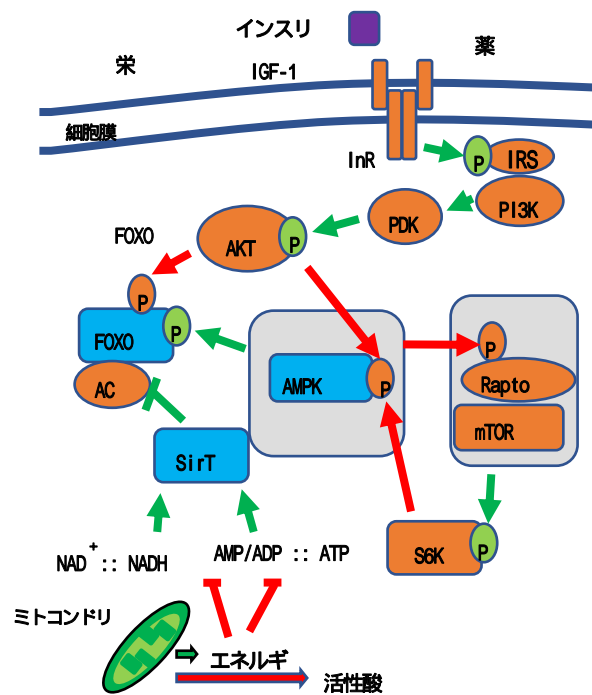


図2 老化を制御するシグナル伝達経路

P: リン酸 (緑が活性化修飾、オレンジが阻害修飾)、オレンジの楕円形: 長寿因子、青の四角形: 抗長寿因子、緑線: ターゲットを活性化、赤線: ターゲットを阻害 文献7の図2を簡素化

6. 今後の展望

老化は遺伝子のみならず、栄養などの外部環境が影響を受けることが分かってきた。線虫の寿命が短く、またさまざまな解析方法が開発されていることから、線虫の寿命を指標として機能性食品の開発にも大きく貢献できる可能性がある。実際、我々の研究室では線虫の寿命を簡単に測ることができるシステムを開発し、漢方薬として知られている大黄が*C. elegans*の寿命を延長させることを明らかにした [9]。また、栄養補助食品として知られているcoenzyme Q10が*C. elegans*の寿命を延長させ、ミトコンドリアから発生する活性酸素の産生を抑制することを

明らかにするなど [10]、このシステムが高機能性食品の開発・研究に貢献できると期待される。

7. 引用文献

- [1] T.E. Johnson, *Science*, **249**, 908 (1990)
- [2] P.L. Larsen *et al.*, *Genetics*, **139**, 1567 (1995).
- [3] N. Ishii *et al.*, *Nature*, **394**, 694 (1998)
- [4] N. Seno-Matsuda *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **276**, 41553 (2001)
- [5] T. Ishii *et al.*, *Cancer Res*, **65**, 203 (2005)
- [6] C. Kenyon, *Nature* **464**, 504 (2010)
- [7] K. Burkewitz *et al.*, *Cell Metabolism*, **20**, 10 (2014)
- [8] A. Moskalev *et al.*, *Cell Cycle*, **13**, 1063 (2014)
- [9] T. Yamaguchi *et al.*, *AATEX*, **13**, 1, (2008)
- [10] N. Ishii *et al.*, *Mech. Ageing Develop.*, **125**, 41 (2004)

7. 業績

【論文発表】

- 1) T. Moro, S. Nakao, H. Sumiyoshi, T. Ishii, Miyazawa, N. Ishii, T. Sato, Y. Iida, Y. Okada, M. Tanaka, H. Hayashi, S. Ueha, K. Matsushima, Y. Inagaki, A combination of mitochondrial oxidative stress and excess fat/calorie intake accelerates steatohepatitis by enhancing hepatic CC chemokine production in mice, *PLOS ONE*, DOI: 10.1371/journal.pone.0146592 (2016)
- 2) T. Ishii, K. Yasuda, M. Miyazawa, J. Mitsushita, T.E. Johnson, P/S. Hartman, N. Ishii, *Mech. Ageing Develop.*, **155**, 22-35 (2016)
- 3) M. Arai, Y. Nakada, K. Kajiwarra, M. Kimura, N. Ishii, Preparation of clinically useful sennoside-reduced Rhubarb, *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, **41**, 24-29 (2016)
- 4) C. Yamada, N. Kishimoto, N. Yukumatsu, A. Takeda, T. Ogata, E. Kikuchi, M. Motegi, N. Ishii, Y. Nishizaki, *Health Evaluation Promotion*, **43**, 511-517 (2016)
- 5) T. Ishii, Y. Takanashi, K. Sugita, M. Miyazawa, R. Yanagihara, K. Yasuda, H. Onouchi, N. Kawabe, M. Nakata, Y. Yamamoto, P.S. Hartman, N. Ishii, Endogenous reactive oxygen species cause astrocyte defects and neuronal dysfunctions in the hippocampus: a new model for aging brain, *Aging Cell*, pp1-13 (2016)
- 6) 石井直明、老化・老年性疾患に関わる遺伝子トピックス, *New Diet Therapy*, **31** (4), 25-31 (2016)

【学会等発表】

- 1) 石井直明、老化の Science, 第 41 回日本脳卒中学会 特別企画 I、2016.4、札幌

- 2) 高橋航大、安田佳代、石井恭正、石井直明、酸化ストレス下における転写因子 MXL-3 の機能、第 39 回日本基礎老化学会大会、2016.4、伊勢原
- 3) T. Ishii, K. Sugita, S. Asai, K. Yasuda, Y.J. Yamamoto, P.S. Hartman, N. Ishii, Lipid peroxide-induced innate immune responses in premature aging gene SDHC-mutated paraganglioma's model mice, Mechanisms of Aging, 2016.9, New York.
- 4) S. Yanase, H. Suda, N. Ishii, Impaired p53/CEP-1 induces lifespan an extension via an adaptive metabolic transition *Caenorhabditis elegans*, Mechanisms of Aging, 2016.9, New York.
- 5) K. Yasuda, K. Takahashi, T. Ishii, N. Sasagawa, P.S. Hartman, N. Ishii, Oxidative stress response of the transcription factor MXL-3 in the nematode *C. elegans*, Mechanisms of Aging, 2016.9, New York.
- 6) 石井直明、高橋航大、安田佳代、石井恭正、笹川昇、線虫 *C. elegans* の MXL-3 転写因子の酸化ストレス応答、ワークショップ：モデル生物「線虫」を用いたストレス応答研究の展開、日本放射線影響学会第 59 回大会、2016.10、広島

8. 謝辞

東海大学における線虫研究を支えてくれた共同研究者である、伊勢原研究推進部・生命科学統合支援センターの安田佳代さん、医学部基礎医学系分子生命科学領域の石井恭正講師に感謝します。