

カカオ由来プロシアニジン画分による モデル生物*C.elegans*の寿命延長

井上 英史

東京薬科大学 生命科学部 教授

不老長寿は古来より人々の関心事である。信頼できる記録の範囲では、現在までもっとも長く生きた人は122歳である。医学の進歩や衛生・栄養環境が良くなったおかげで平均寿命は随分と長くなっており、我が国でも100歳を超える人口は増加の一途である。しかし、長寿記録となると1986年に亡くなった泉重千代氏の119歳が最長で、その記録は破られていない。このようなことから、ヒトや動物の最大寿命には限界があると考えられている。最大寿命に限界値が存在するとしたら、それはどういう要因によるのだろうか。老化はどのように進行し、死に至る本質的な要因は何か。長く健康を保つためには、どのようなことが有効なのかに関心がもたれる。

近年、老化の研究が遺伝子や分子のレベルで進むようになった。老化については、これまでにいろいろな説が提唱されている。例えば、突然変異累積説、活性酸素・フリーラジカル説、ミトコンドリア説、拮抗的多面発現説、体細胞使い捨て説、テロメア説などである。これらは、それぞれに正しい一面があると考えられるものの、統一的な理解には至っていない。

老化の分子機構に関する研究にはモデル生物が用いられる。中でも*Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) は先駆的な役割を果たしている^{1, 2)}。*C.elegans*は土壌線虫の一種で、無害の二等無脊椎動物である。全長は成虫で1mm程度で、体細胞数は1000個前後である。*C. elegans*は生物学研究において代表的な実験モデル生物であり、老化や寿命研究においても関連遺伝子が最初に同定されるなど、先駆的な役割を果たしている。これまでにたくさんの寿命関連遺伝子が同定されており、いくつかのシグナル経路やメカニズムが重要であることが知られている。*C.elegans*で寿命に関連することが知られている経路やメカニズムの多くは、ヒトにおいても健康や老化に重要である。*C.elegans*に対する効果を指標とすることにより老化抑制作用をもつ物質を探索し、さらに種々の寿命関連遺伝子が変異した株に対する効果を比較することにより、その化合物の作用機構を解析することが可能である。そして、ヒトとの共通性のある仕組みに作用する化合物であれば、ヒトの健康に寄与する可能性が期待できる。

この課題では、カカオ由来プロシアニジン画分が*C.elegans*の老化を遅延し寿命を延長する作用をもつことを見出した。その作用には、ヒトにも保存されているシグナル伝達系が関与している。

実験と結果

(1) カカオ由来プロシアニジン (CLPr) は*C.elegans*の寿命を延長する

成長段階をそろえた*C.elegans*を、カカオ由来プロシアニジン (Cacao Liquor Procyanidin : CLPr) を含まない寒天培地とCLPrを含む寒天培地とを用いて培養し、生存率を経日的に測定した。餌は、大腸菌OP50株の生菌または熱処理した死菌を、寒天培地に塗布することにより与えた。比較として、長寿命化作用が知られているレスベラトロールを用いた。

*C.elegans*の平均寿命は、餌として大腸菌OP50株の生菌を十分に与えたとき、25℃で2週間程度、20℃ではそれより約20% 長い。いずれの温度においてもカカオ由来プロシアニジン画分 (CLPr) を投与すると平均寿命が13~20% 長くなった。図1に25℃における生存曲線の一例を示す。CLPr 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ は、レスベラトロール23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (100 μM) に近い寿命延長作用を示した。CLPrの投与量を100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に増やしても寿命延長効果は10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と変わらなかった。

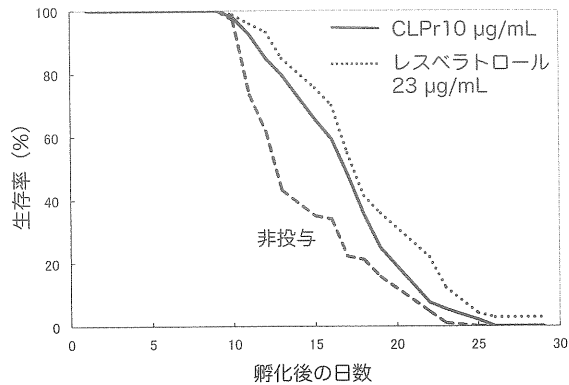


図1 25℃における*C.elegans*の生存曲線

*C.elegans*は土壤に生息し細菌を餌としているが、自然環境でどのような細菌を食しているかは不明である。実験室では通常、大腸菌OP50株が用いられるが、OP50株を熱処理により殺菌してから与えると生菌を与えた場合よりも寿命が長くなる。これはOP50株による毒性と考えられている。死菌を餌として培養したときのCLPrの効果を試験したところ、やはり寿命延長作用が認められた。従って、CLPrの作用は大腸菌OP50の毒性を抑えることによるものではないと考えられる。

CLPrは、様々な重合度のプロシアニジンの混合物である。HPLCによってこれを単量体~三量体を主に含む低分子画分と四量体以上を含む高分子画分に分離し、*C.elegans*に対する寿命延長作用を比較した。その結果、餌としてOP50生菌を用いたときは高分子画分がCLPrと同程度に寿命を延長したのに対し、低分子画分による寿命延長作用は弱かった。一方、OP50死菌を餌としたときには、低分子画分がCLPrと同程度に寿命を延長し、高分子画分の作用はこれよりも弱かった。このことから、OP50生菌を用いたときには、CLPrの成分が大腸菌による代謝を受けている可能性が考えられる。死菌を用いたときに低分子画分が寿命延長作用を示すことから、活性成分が単量体~三量体に含まれることが考えられる。生菌を餌としているときに低分子画分の寿命延長作用が弱い理由として、含まれている活性成分が大腸菌により代謝されるためと推測される。一方、高分子画分を投与した場合には、四量体以上の成分が徐々に代謝されることにより活性成分が生じて寿命延長作用が見られた可能性が考えられる。

(2) カカオ由来プロシアニジン (CLPr) は*C.elegans*の老化を遅延する

*C.elegans*は20~25℃の条件で、孵化から3~4日で成虫となる。CLPrを投与しても*C.elegans*の成熟速度には変化は見られない。また、成虫になった後の体長の変化も、CLPr投与と非投与の間で有意差が見られなかった。従って、CLPrの寿命延長作用は成長遅延によるものではないと考えられる。

*C.elegans*は加齢とともに腸細胞内にリポフスチンが蓄積する。リポフスチンの蓄積を蛍光強度の変化により測定したところ、孵化後12日目の成虫において、CLPr存在下で培養した個体のリポフスチン蓄積量が有意に低かった。

また、*C.elegans*は咽頭のポンピング運動により餌を摂取しているが、時間当たりのポンピング数が増加により減少することが知られている。CLPrを投与した個体では、ポンピング数の減少が遅れることが観察された(図2)。差が顕著に見られるのは孵化後6日目であるが、これは致死個体が現れ始める時期でもある。

これらのことから、CLPrは老化を遅延し寿命を延長すると考えられる。

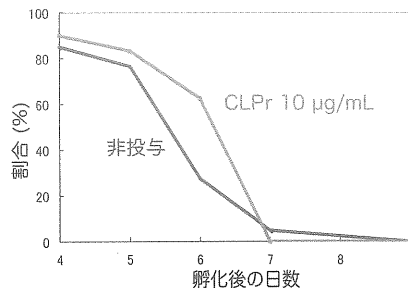


図2 CLPrによる加齢現象(ポンピング回数)の遅延
活発にポンピングする個体(≥240回/分)の割合(25°C)

(3) カカオ由来プロシアニジン (CLPr) は *C.elegans* のストレス耐性を亢進する

*C.elegans*の長寿命化変異体、あるいは寿命延長作用をもつ化合物を投与した*C.elegans*は、熱ストレスや酸化ストレスに対して耐性が高くなることが多い。そこでOP50生菌を餌として用いて、35°Cで7時間処理あるいは、0.8mM過酸化水素により8時間処理することにより熱ストレスまたは酸化ストレスを与えて、その後の生存率を測定した。その結果、いずれの場合もCLPr投与あるいは高分子画分投与により生存率が有意に高くなった。

(4) カカオ由来プロシアニジン (CLPr) の作用機構

以上のように、CLPrは*C.elegans*の熱ストレスや酸化ストレスに対する耐性を亢進し、老化を遅延し、寿命を延長させる作用をもつ。*C.elegans*においてストレス抵抗性や寿命延長に関連するメカニズムとしては、インスリン様受容体経路やカロリー制限などが知られている^{1,2)}。そこで、寿命関連遺伝子の変異体を用いて、どの遺伝子を欠損したときにCLPrの作用が見られなくなるかを検討した。

インスリン受容体DAF-2、PI3キナーゼAGE-1、Ser/ThrキナーゼAKT-1および下流の転写因子DAF-16/FOXO、DAF-12が欠損した株にCLPrを投与したところ、いずれにおいても寿命延長作用が見られた。また、EAT-2が欠損すると摂食行動が低下しカロリー制限のメカニズムにより寿命が延長される。この変異体にCLPrを投与した場合も寿命延長作用を示した。サーチュインSIR-2.1の欠失変異株に対してもCLPrは寿命延長作用を示した。従って、CLPrの寿命延長作用に、インスリン様経路やカロリー制限、サーチュインとは異なる因子が寄与していることが考えられる。

NHR-8はシトクロムP450などの薬物代謝酵素の発現に関与する転写調節因子であるが、CLPrはNHR-8欠失変異体の寿命を大きく延ばす。このことからNHR-8はCLPrの活性に抑制的に働いている可能性が考えられる。また、MEV-1変異体では酸化ストレスが亢進しているが、この変異体の寿命をCLPrはほとんど延長しなかった。CLPrはMEV-1における酸化ストレスを抑えないと考えられる。

一方、UNC-43/CaMKIIやOSR-1、あるいは、その下流で機能しているp38MAPキナーゼ経路の因子SEK-1/MAPKKが欠損している株では、CLPrの寿命延長が見られなかった。このことから、CaMKII/p38 MAPキナーゼ経路がCLPrの作用発現に関与していることが考えられる。

結論と展望

カカオ由来プロシアニジンCLPrは、*C.elegans*のストレス抵抗性を亢進し、老化を遅延し、寿命を延長する。少なくとも寿命延長に関しては、CaMKIIおよびp38MAPキナーゼ経路が関与している。CLPrの直接の標的はCaMKIIの上流にあることが想定されるが、具体的にどの分子であるかは不明である。今後は標的分子を明らかにすることを通して、ヒトにおけるCLPrの作用にアプローチする。

文献

1. Kenyon, C. J. (2010) Nature 464, 504-512. The genetics of ageing.
2. Zhou, K.I., Pincus, Z., and Slack, F.J. (2011) Aging (Albany NY) 3, 733-753. Longevity and stress in *Caenorhabditis elegans*.