

# カカオ由来プロシアニジンによる *C. elegans* の 寿命延長と感覚神経の寄与

井上 英史

東京薬科大学生命科学部教授

## 概要

私たちは、チョコレートやココアの原料となるカカオ抽出物由来プロシアニジン画分CLPrが、線虫 *Caenorhabditis elegans* の寿命を延ばすことを見出している。そのメカニズムを遺伝子のレベルで検討し、カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII (CaMKII) に依存すること、そして、神経にCaMKIIが発現していることがCLPrの寿命延長作用に必要なことを見出した。

## 背景

生命科学の研究には、目的に応じて様々なモデル生物が使われる。*C. elegans* と呼ばれる線虫はその一つで、多細胞生物としては下等な部類であるが、生命科学の広い領域において世界中でよく用いられているモデル生物である。老化研究においても、寿命に関連した遺伝子が最初に見つけられる等、先駆的な役割を果たしている。

*C. elegans* は土壌線虫の一種で、無害の下等無脊椎動物である。卵の孵化から4回の脱皮を経て3~4日で成虫となり、寿命は培養温度に依るが2~3週間程度である。これまでに多数の寿命関連遺伝子が同定されており、寿命決定に関わるものとして、いくつかのシグナル経路が知られている。*C. elegans* の寿命決定に関与する遺伝子やシグナル経路の多くは、ヒトにおいて健康に重要である。また、レスベラトロールやクルクミン等の *C. elegans* において寿命延長作用を示す化合物は、ヒトの健康に寄与するものとして注目されている。

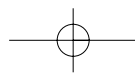
老化研究が遺伝子や分子のレベルで進むようになったのは、比較的最近のことである。老化については、これまでにいろいろな説が提唱されている。例えば、突然変異累積説、活性酸素・フリーラジカル説、ミトコンドリア説、拮抗的多面発現説、体細胞使い捨て説、テロメア説などである。これらは、それぞれに正しい一面があると考えられるものの、統一的な理解には至っていない。この研究では、CLPrの寿命延長作用に感覚神経が寄与していることに着目した。

## 実験と結果

### (1) CLPrによる *C. elegans* の寿命延長にCaMKIIが必要である

成長段階をそろえた *C. elegans* を寒天培地上で培養し、生存率を経日的に測定した。餌として大腸菌の生菌を与えているとき、*C. elegans* の成虫となった後の平均寿命は、25℃で約13日、20℃で約18日、15℃で約22日であった。この培養系に10 μg/mLのCLPrを添加したとき、25℃で+16%、20℃で+11%の寿命延長が見られた。しかし、15℃では寿命延長作用が見られず、CLPrによる寿命延長のメカニズムは、温度に依存することが示唆された。

*C. elegans* において、熱ストレスや酸化ストレスに対する抵抗性は、しばしば寿命と関連するこ



とが知られている。そこで、CLPrによる寿命延長のメカニズムがこのようなストレス抵抗性と関連しているかを検証した。*C. elegans*を一定時間37°Cの環境下に置いて熱ショックを与えると、その時間に応じて生存率の低下が見られる。しかし、10  $\mu$ g/mL CLPrの存在下で前培養した*C. elegans*は、CLPr非存在下で培養したものに比べて高い生存率を示した。従って、CLPrの投与は熱ストレスに対する抵抗性を高めると考えられる。同様に、過酸化水素の存在下で酸化ストレスを負荷すると、過酸化水素の濃度に応じて生存率の低下が見られ、CLPr存在下での前培養は生存率の低下を抑制した。このことから、CLPrの投与は、外的に加えられた過酸化水素による酸化ストレスを軽減すると考えられる。しかし、酸化ストレスが起こり易くなっているとされる*mev-1*変異体では、CLPrの寿命延長作用は見られなかった。また、酸化ストレスに対する防御機構に関与するとされる*skn-1*遺伝子の欠失変異体において、CLPrの寿命延長作用が見られた。すなわち、少なくともこれらの実験においては、内在的に発する酸化ストレスに対するCLPr投与の有効性を示唆する結果は得られなかった。CLPrによる寿命延長には、酸化ストレスに対する防御とは別の機構が関与している可能性が考えられる。

*C. elegans*の寿命に関連するシグナル経路として、インスリン様シグナル経路やサーチュインを介する経路などが知られている。そこで、これらの経路がCLPrの寿命延長作用に寄与しているかを、種々の遺伝子変異株を用いて検討した。その結果、インスリン様シグナル経路に関与する遺伝子や、JNK、サーチュイン等の遺伝子が欠損していても、CLPrの寿命延長作用は阻害されなかった。一方、*osr-1*遺伝子や、CaMKIIをコードする*unc-43*、MAPKKKをコードする*nsy-1*が欠損している変異株では、CLPrによる寿命延長が見られなかった。*C. elegans*においてOSR-1、UNC-43、NSY-1は、浸透圧ストレスに対する防御に関与するシグナル経路を構成しているとともに、クルクミン等による寿命延長作用に寄与していることが知られている（文献1）。従って、CLPrによる寿命延長は、クルクミンと同様にOSR-1/UNC-43/NSY-1経路を介していることが考えられる。しかし、クルクミンによる寿命延長がどのような遺伝子に依存しているかについては、CLPrとの相違も見られる。

## (2) CLPrによる*C. elegans*の寿命延長に感覚神経が必要である

OSR-1は下皮および消化管に発現しており、下皮などの末梢組織におけるOSR-1/UNC-43/NSY-1経路がCLPrによる寿命延長に寄与していると考えられる。一方、UNC-43やNSY-1は神経にも発現しており、例えば、嗅覚神経AWCの非対称分化にUNC-43およびその下流のNSY-1が寄与していることが知られている（文献2）。そこで、神経細胞に発現しているUNC-43がCLPrによる寿命延長に寄与している可能性を検証する目的で、*unc-43*遺伝子の発現を神経細胞特異的なRNAi法によりノックダウンした。

*C. elegans*では、標的とするmRNAと同等の配列をもつ二本鎖RNAを発現させた大腸菌を摂食させることにより、RNAiによるノックダウンを行うことができる。この摂食法によるRNAiには、*sid-1*遺伝子産物の寄与が必要である。神経細胞は、他の体細胞と異なり*sid-1*遺伝子が発現していないために、摂食法RNAiに対して非感受性であることが知られている。従って、*sid-1*遺伝子が欠失した変異体は全細胞が摂食法RNAiに非感受性であるが、*sid-1*欠失変異体の特定の細胞に野生型*sid-1*を発現させれば、その細胞だけをRNAiに感受性とすることができる（文献3）。そこで、神経特異的に*sid-1*遺伝子を発現させることにより神経細胞のみを摂食法RNAiに対して感受性とした株を用

いて、*unc-43*遺伝子をノックダウンした。その結果、*unc-43* RNAiにより *C. elegans*の寿命が延長することが見られたが、ここにCLPrを投与してもさらなる寿命延長は見られなかった。このことから、CLPrによる寿命延長作用は、神経に発現している*unc-43*の制御を介していることが考えられる。

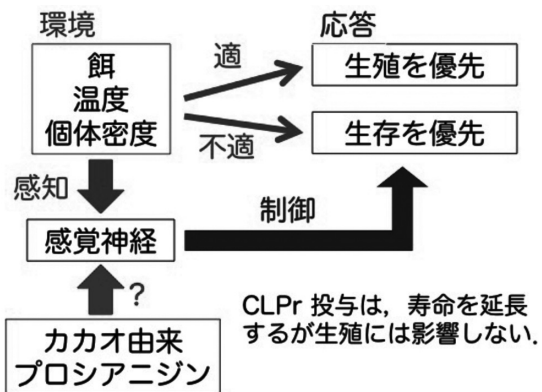
*odr-1*、*odr-3*、および*tax-4*は感覚神経に発現しており、嗅覚神経AWC等の機能に寄与している。これらの遺伝子のいずれかを欠失した変異株では、CLPrによる寿命延長が見られなかった。また、*odr-3*を神経特異的にノックダウンした場合も、*unc-43*の場合と同様にCLPrによる寿命延長が見られなかった。これらのことは、CLPrが感覚神経を介して寿命を延長している可能性を示唆する。現時点ではCLPrの作用にいずれの神経細胞が寄与しているかは明確でないが、ノックアウトやノックダウンによりCLPrの寿命延長作用を阻害した遺伝子がいずれもAWC神経の機能に必要であることから、可能性の一つとして、嗅覚神経AWCが寄与をしていることが考えられる。

### (3) 寿命延長作用の有効成分について

*C. elegans*の餌として生きた大腸菌を与えたときには、四量体以上のプロシアニジンを含む画分に寿命延長作用が見られたが、三量体以下を主とする画分ではその作用が見られなかった。しかし、熱により殺処理した大腸菌を餌としたときには、単量体、二量体、三量体、四量体以上のいずれによっても寿命延長が見られた。このことは、三量体以下のプロシアニジンは大腸菌による代謝を受けて寿命延長活性を失うが、四量体以上は代謝による失活に時間がかかると考えることで説明が可能である。しかしながら、四量体以上のプロシアニジンが細胞内に取り込まれることは考えにくい。また、嗅覚神経 AWCは体表に露出しておらず、揮発性ではないプロシアニジンが直接的にAWC神経を刺激することは考えにくい。CLPrによる寿命延長作用に神経がどのように関与しているかの詳細を明らかにすること、また、多量体のプロシアニジンがどのような機序で寿命延長作用を示しているかを明らかにすることが今後の課題である。

### (4) 考察と展望

CLPrによる寿命延長作用には末梢組織のCaMKIIと神経細胞のCaMKIIの両方が必要であることが示唆された。感覚神経は、外界の環境変動（餌、集団密度、温度など）を感知することにより、生殖にエネルギーを注ぐことを優先するのか、あるいは生存を優先するのかといった調節を行っていることが考えられる。一つの可能性として、CLPrが感覚神経による外部環境の感知、あるいは神経を介して生存戦略の決定に影響することにより、寿命延長を引き起こす応答が生じていることが考えられる(図)。ただし、CLPr投与は*C. elegans*の生殖、すなわち成熟速度や産卵速度、総産卵数には影響を与えていない。CLPrによる老化遅延・寿命延長に感覚神経がどのように関わっているかについては、もう少し解析が必要である。



ここで紹介した私たちの研究は、ヒトとは生物学的に離れた*C. elegans*を用いたものであり、結果をそのままヒトに外挿することはできない。しかし、「感覚神経と老化の関連」は基礎生物学的に一般化する課題である。また多量体プロシアニジンの作用が神経を介していることが示唆されたが、どのようにして神経に作用するのか、その作用機構を明らかにすることは、ヒトにおけるプロシアニジンの作用を知る上での一助となる。カカオ由来プロシアニジンの*C. elegans*における寿命延長作用のメカニズム解析を端緒にして、プロシアニジンの生物学的作用やアンチエイジングの効果について、さらに詳細を明らかにして行きたい。

#### 参考文献

1. Liao VH, Yu CW, Chu YJ, Li WH, Hsieh YC, Wang TT (2011) Curcumin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. *Mech. Ageing Dev.* 132, 480-487.
2. Troemel ER, Sagasti A, Bargmann CI (1999) Lateral signaling mediated by axon contact and calcium entry regulates asymmetric odorant receptor expression in *C. elegans*. *Cell* 99, 387-398.
3. Calixto A, Chelur D, Topalidou I, Chen X, Chalfie M (2010) Enhanced neuronal RNAi in *C. elegans* using SID-1. *Nat. Methods* 7, 554-559.