

解説**ストレスのない世界はない****細胞ストレス生物学入門その 5 -分子シャペロンと老化との関係-****大塚健三**

中部大学応用生物学部細胞ストレス生物学教室

第 4 章**はじめに**

前の章までは、熱ショックタンパク質(HSPs)(第 2 章)[1]や、分子シャペロン(第 3 章)[2]について詳しくみてきました。繰り返しになりますが、HSPs とは、細胞や生体に軽い熱ショック(正常な生育温度から数℃から 10℃ほど高い温度)を与えると、それまで眠っていた(転写されない状態の)遺伝子が活発に転写され、合成されてくるタンパク質のことです。HSPs 遺伝子の転写には、専用の転写因子(熱ショック転写因子, HSF1)が必要です。HSPs には分子質量の異なる多くの種類のタンパク質があります。たとえば HSP90(分子質量が約 90,000 ダルトン、つまり 90 キロダルトンの HSP という意味)、HSP70、HSP60、HSP40 などです。これらの HSPs は別の遺伝子から転写・合成されてくるので、アミノ酸配列や立体構造も全く違います。しかし機能としては分子シャペロンとして働いています。具体的には、新しく合成されてきたポリペプチドの折りたたみや、膜を介したタンパク質輸送、タンパク質複合体の会合・解離、など、ストレスのない状態でも細胞内のさまざまな機能をコントロールしています。また HSPs はストレスによるタンパク質変性を防護したり、部分的に変性したタンパク質の再折りたたみなどを促進していることから、細胞内防御因子としても働いています[3]。さらに、HSPs は細胞内に異常な構造をしたタンパク質が蓄積しないように品質管理を行うことでタンパク質の恒常性を維持(protein homeostasis, proteostasis)し、細胞の正常な機能を保ち、細胞の生存に寄与しています

[4, 5]。そういう意味で、HSPs とその転写因子 HSF1 は、細胞の生存を助ける生存促進因子でもあります。

この章では、分子シャペロンの最近の研究も含めて、分子シャペロンと特に老化との関わりを見ていきたいと思います。

4-1 シャペロンタンパク質量はどのくらいあるのか？

最初に、シャペロンタンパク質量が細胞内でどのくらいの割合で存在するのか見てみましょう。HSP90 や HSP70 などが分子シャペロンの主要なメンバーです。しかしそれぞれの HSP にはアミノ酸配列がよく似た(つまり別の遺伝子から合成されてきた)仲間のメンバーがおりファミリーを形成しています。たとえば HSP90 ファミリーとか HSP70 ファミリーなどです。それぞれのファミリーのメンバーの中にはストレスがなくても構成的に(恒常的に)合成されているメンバーも多く存在しています。この構成的に合成されている HSPs のメンバーは、先に述べたように、新規に合成されてきたタンパク質の折りたたみやタンパク質輸送などのハウスキーピング的な役割を持っています。

ハウスキーピングというのは、家庭の中で日常的に必ずしなければならない家事(炊事や洗濯、掃除など)によって、家庭生活を維持することです。細胞でのハウスキーピングというのは、すべての細胞に共通して必要な機能、たとえばエネルギー(ATP)生産や、細胞骨格による細胞構造の維持などです。これらの機能に必要なタンパク質はハウスキーピングタンパク質と呼ばれています。

これらのタンパク質は全ての細胞で恒常的に発現しているので、タンパク質量としてもかなりの割合になります。たとえばハウスキーピングタンパク質の代表例である細胞骨格のアクチンは細胞全タンパク質の 3~5%程度と見積もられています。

それでは、ストレスのない状態でも発現している分子シャペロン機能を持つタンパク質の量はどれくらいの割合になるのでしょうか。Finka らの推定では、ヒトの細胞では、全タンパク質のうち HSP90s は 2.8%, HSP70s は 2.7%, HSP60 と Hsp110 は合わせて 3.3%ほどと見積もられています。したがって分子シャペロン全体では細胞の全タンパク質の 10%近くを占めていることになります[6]。ここに熱ショックなどのストレスが加わると、ストレス誘導型の HSPs がさらに増えてくることになります。

4-2 シャペロームという考え方-2つの意味

最近、シャペローム(chaperome)という聞きなれない言葉が提唱されています。これは、シャペロン(chaperone)という言葉に接尾語の「-ome(=オーム)」が付いたものです。この接尾語の「-オーム」には2つの意味があります。1つめは、リボソームやプロテアソームなどのように、多くの種類のタンパク質が集まって大きな複合体を形成し、リボソームであれば mRNA からタンパク質を合成する装置、プロテアソームはユビキチン化されたタンパク質を分解する装置、を意味する言葉です。また、リソソームとかパーオキシソームなどのように細胞内小器官を表す場合もあります。

接尾語の「-オーム」にはもう1つの意味があります。つまり、ゲノム、プロテオーム、トランスクリプトーム、メタボローム、インタラクトーム、などのように、生体において特徴・性質や機能のよく似た組成や関連する成分の集合体を表す言葉です。

シャペロームという言葉も、最初はいくつかのシャペロンやコシャペロンが複合体を形成して働いていることを

意味するものとして、Wang らの報告で提唱されました[7]。その後、シャペロン機能をもつタンパク質と、それらと相互作用しながらそのシャペロン機能を手助けするシャペロン補助因子(co-chaperone, コシャペロン)、さらにはタンパク質の折りたたみを触媒する酵素など全てをまとめてシャペロームと呼ぶようになったのです[8]。これが2つ目の意味の「-オーム」です。

4-2-1 タンパク質複合体としてのシャペローム

それでは、タンパク質複合体としてのシャペロームを最初に提唱した Wang らの論文を紹介したいと思います[7]。彼らは、遺伝性の疾患である嚢胞性線維症(cystic fibrosis)の原因タンパク質について調べていました。この疾患は常染色体劣性遺伝する難病の一つです。日本人ではまれな病気ですが(出生約 60 万人に 1 人)、ヨーロッパのある人種では出生約 3000 人に 1 人が発症すると言われています。その原因の主なものは、CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)というタンパク質が変異して 508 番目のアミノ酸であるフェニルアラニンが欠損していることです。その変異タンパク質は略して $\Delta F508$ CFTR と表されます(Δ は欠損を、F はフェニルアラニンを表す)。この CFTR は上皮細胞の頂端面(気管、血管、消化管などの内面や皮膚の表面をおおっている細胞が上皮細胞であり、外気や液体にさらされている面[表側]を頂端面といい、その反対側[裏側]が基底面である)の細胞膜に局在する膜タンパク質であり、cAMP によって制御される塩素イオンチャネルです。CFTR は細胞内の小胞体で合成されたのち、ゴルジ体を経由して細胞膜に輸送されます。ところが、 $\Delta F508$ CFTR 変異体は構造異常により細胞膜に輸送されず、小胞体内にとどまり、最終的には ERAD (ER-associated degradation, 小胞体関連分解)システムで分解されてしまいます。このように異常な構造をしたタンパク質は不良品とみなされて、廃棄処分されるこ

となります。これがタンパク質品質管理と呼ばれるシステムです。構造異常になった CFTR 変異体は分解されてしまうので、上皮細胞には正常な塩素イオンチャンネルがなくなり、その結果気管や鼻腔の粘液の粘度が高くなるなどさまざまな病的な症状が引き起こされることになります。

Wang らは、野生型または変異型 CFTR を発現する細胞で、CFTR と会合しているタンパク質を網羅的にプロテオミクス解析(関連するタンパク質を一つ一つ質量分析などで同定する方法)したところ、変異型 CFTR ($\Delta F508$) は小胞体膜のところで HSP90 や HSP70, HSP40 はじめ 30 個ほどの分子シャペロンおよびコシャペロン (co-chaperone, シャペロン補助因子) と複合体を形成していることがわかったのです。これは変異型 CFTR タンパク質がわずかに構造変化することで、小胞体膜上においてシャペロン複合体によってトラップされた状態になり細胞膜に輸送されなくなっていることを示しています。そこで著者らは、トラップされている変異型 CFTR タンパク質を、細胞内のシャペロン機能を増強させることで細胞膜に輸送できるのではないかと考えました。彼らは、コシャペロンのうち代表的な 3 つの因子 (p23, FKBP8, AHA1) をそれぞれ siRNA によってノックダウン(特定の mRNA を破壊することでそこから翻訳されるタンパク質を欠損させること)、または遺伝子導入で過剰発現させたときに変異型 CFTR タンパク質が細胞膜に輸送されるかどうかを検討しました。ところが驚くべきことに AHA1 (HSP90 のコシャペロンで、HSP90ATPase を活性化する) をノックダウンすると変異型 CFTR タンパク質でも細胞膜に輸送され、塩素イオンチャンネルの機能が回復したのです。常識的には分子シャペロンやコシャペロン分子を過剰発現させることで変異タンパク質でも構造が正常型になって機能を回復すると考えられています(3 章 3-10-7 の項参照)[2]。ところが今回の場合はコシャペロンの一つ(AHA1)をノックダウンすると変異型 CFTR タンパク質

でも正しく細胞膜に輸送されたことになります。たぶんこれは、シャペロン複合体によってトラップされていた変異型 CFTR タンパク質が、AHA1 をノックダウンすることでシャペロン複合体がバラバラになり、そのトラップから解放されて細胞膜に輸送されたと考えられます。見方を変えたと、細胞は変異タンパク質(不良品)を細胞膜に行かないようにシャペロン複合体にトラップして、タンパク質の品質管理をしているのかもしれない。

この実験でもう一つ不思議なことは、変異型 CFTR タンパク質であっても細胞膜に輸送されれば塩素イオンチャンネルとして機能することができるということです。フェニルアラニンが 1 個欠損していることで小胞体に留め置かれているけれども、この欠損は塩素イオンチャンネルの機能には影響しないということです。たぶんこのフェニルアラニンはイオンチャンネルの塩素イオンの通り道(ポア)に配置されるアミノ酸ではないのかもしれない。

これまで HSP90 や HSP70 などの分子シャペロンは数個のシャペロンやコシャペロンと共同して働いていることは知られていました。ここで紹介した Wang らの研究で示されたように、一つのタンパク質の折りたたみや輸送に 30 個以上の分子シャペロンやコシャペロンが複合体を形成して関与していることも特筆すべき点です。彼らはこの複合体のことを「シャペローム」と呼ぶことを提唱しました[7]。これが 1 つ目の意味のシャペロームです。

タンパク質複合体としてのシャペロームについては、最近がんと関わりで注目されていますが、それは項を改めて述べることにします。

4-2-2 シャペロン関連タンパク質の集合体としてのシャペローム

それでは次に、2 つ目の意味のシャペロームについて見ていきましょう。第 2 章の熱ショックタンパク質の紹介の最後に、1997 年に Oxford University Press から出版された「Guidebook to Molecular Chaperones and

Protein-Folding Catalysts」という本について述べました[9] (2章 2-2-6). この本にはその時点までにわかっていた HSPs や分子シャペロン機能を持つタンパク質, HSPs の補助因子(コシャペロン), さらにはタンパク質の折りたたみを触媒する酵素などを網羅していました. ちなみに私の発見した Hsp40 もこの本に収録されています. この本には大腸菌や酵母からヒトで見つかったさまざまなタンパク質が紹介されています.

それではたとえばヒトではどのくらいの数の分子シャペロンおよび関連タンパク質があるのでしょうか? この問いに最初に取り組んだのが 2011 年報告の Finka らの論文です[8]. 彼らはそれまで報告されていた文献や NCBI の遺伝子やタンパク質のデータベースを調べ, ヒトのタンパク質をコードする遺伝子 23,438 個の中から, 168 個の遺伝子をシャペロームメンバーとして同定しました. この中には, HSP90s, HSP70s, HSP60s, HSP110s, HSP40s (DNAJ タンパク質とも呼ばれる), HSP27s, HSP10s, ならびにこれらのシャペロンと相互作用するコシャペロン, さらにタンパク質の折りたたみに関与する酵素が含まれています.

その後 2014 年の Brehme らの解析では, シャペロームのメンバー数は 332 個まで拡大されました[10, 11]. その中には HSP90 や HSP70 の C 末端にある EEVD 配列 (Glu-Glu-Val-Asp) と相互作用する TPR (tetratricopeptide repeat) ドメインを持つタンパク質 114 個も追加されています. 332 個のうち, シャペロン機能を持つのが 88 個, コシャペロンが 244 個です. シャペロン機能を持つ 88 個の中で, ATP 依存性 (ATP のエネルギーを用いてシャペロン活性を営む) が 50 個, ATP 非依存性が 38 個です. TPR ドメインを持つタンパク質 114 個と HSP40s の 49 個はすべてコシャペロンです.

なお, TPR ドメインというのは, ゆるく保存された 34 個のアミノ酸から構成されるドメインで, それが 3~16 回の反復配列としてさまざまなタンパク質に存在しています.

たとえば HSP90 と HSP70 のコシャペロンである CHIP (C-terminal of HSP70-interacting protein) はその N 末端に 3 個の TPR ドメインを持ち, おなじくコシャペロンである HOP (HSP-organizing protein) は 9 個の TPR ドメインを持っています[12].

4-3 HSPs と老化

加齢というのは, 生命誕生からの物理的な時間経過が長くなっていくことを意味する言葉です. 生殖期間をすぎたから加齢にともなう, 生体のさまざまな機能が徐々に衰えていくことが老化です. したがって, 加齢と老化はときに同じ意味で使われることもありますが, 違う意味です. ヒトの場合も 20 代後半から特に女性では肌年齢が少しずつ変化していくと言われています. 老化がはつきりと自覚できるようになるのは自分の経験からも, 40 代後半から 50 代にかけて視力が衰えてくることではないでしょうか. じつは, HSPs の合成能力も加齢とともに徐々に低下することが知られています.

4-3-1 加齢にともなう熱ショック応答の低下

最初の報告は 1990 年の Fargnoli らの論文です[13]. 彼らは, 5 ヶ月齢と 24 ヶ月齢のラット肺と皮膚から採取して培養した線維芽細胞を用いて 42.5°C で 90 分の熱ショックのあと 37°C で 2 時間培養し, HSP70 の mRNA とタンパク質の発現を見ました. いずれの細胞でも老齢ラットの細胞で HSP70 の mRNA とタンパク質は減少していました. 次に, Heydari らは, やはり若齢ラット (4-7 ヶ月齢) と老齢ラット (22-28 ヶ月齢) から得られた肝細胞で, 老齢ラットの細胞では熱ショックによる HSP70 の mRNA の発現が減少していることを示しました[14]. 彼らはさらに, カロリー制限による食餌で飼育した老齢ラット (22-28 ヶ月齢) では, 驚くべきことに熱ショックによる HSP70 発現が若齢ラット (4-7 ヶ月齢) とほぼ同じ程度に誘導されたのです. これは熱ショック応答の能力がカロリー制限によって若

い状態で維持された、つまり老化が遅延したことになります。Heydari らはその後、HP70 の転写因子である HSF1 の DNA (熱ショックエレメントを含む塩基配列) への結合活性が、加齢とともに減少することを示しました[15]。そしてこの加齢による HSF1 の DNA への結合活性の減少が、やはりカロリー制限によって回避されたのです。

HSPs は分子シャペロンとして細胞内のタンパク質の品質管理を行うことで細胞の恒常性を維持しています。したがって加齢にともなって熱ショック応答が低下して HSPs が減少することは、細胞がさまざまなストレスに対して脆弱になることであり、また 細胞内のタンパク質恒常性を維持できなくなることを意味しています。つまり、HSPs の減少によるタンパク質恒常性維持の破綻が老化の原因の一つではないかと考えられるようになったのです[16, 17]。

それでは、どうして加齢にともなって HSPs の合成が減少するのでしょうか？この問いに明快に答えたのが Westerheide らの報告です[18]。この著者らは HSPs の転写因子である HSF1 が熱ストレスなどによって活性化されて DNA に結合して HSP 遺伝子の転写を促進しますが、HSF1 はまもなく 80 番目のリジン残基がアセチル化されて DNA への結合活性が低下することを見出しました。このアセチル基を長寿遺伝子である SIRT1 によって外す(脱アセチル化)すると、HSF1 の活性がより長く維持されて HSPs も多く合成されます。ところが老化した細胞では SIRT1 が減少するので、アセチル化された不活性型の HSF1 が多くなって熱ショック応答が低下するというのです[18]。しかし、なぜ老化した細胞で SIRT1 が減少するのかは依然として不明です。SIRT1 についてはカロリー制限による老化遅延効果の項でも述べます。

なお、最近加齢によって発現が低下する分子シャペロンを網羅的に解析した結果が報告されています。シャペロームのところ(4-2-2)で紹介した Brehme らは、平均 36 歳と 73 歳のヒト脳のサンプルで 332 個のシャペロンおよ

びコシャペロンの遺伝子発現を調べたところ、老齢の脳で発現が増加するグループと低下するグループに分けられました[10]。加齢によって発現が増加するのはおもに TRP ドメインを持つコシャペロンでした。一方、低下するのは HSP90, HSP70, HSP60 や HSP40 などのメンバーでした。同様の発現の傾向性は神経変性疾患(アルツハイマー病, パーキンソン病, ハンチントン病)の患者でも見られました。くり返しになりますが、このようなことから、加齢にともなって主要な分子シャペロンの多くが発現低下し、タンパク質恒常性を維持することができなくなると考えられています[16, 17]。

4-3-2 HSPs と寿命

HSPs は分子シャペロンとして細胞内に異常なタンパク質が蓄積しないようにうまく処理しています。これが品質管理機構と呼ばれているものです。したがって、HSPs が適度に多く存在するとその細胞は長持ちして、ひいては個体としての寿命が伸びるのではないかと誰も考えるのではないのでしょうか？車にたとえるなら、壊れた部品をこまめに交換して維持管理をしっかりとっておけば長持ちするのと同じです。ここでは線虫やショウジョウバエについての HSPs と寿命との関連について述べます。

まず、線虫ではミトコンドリアの HSP70 (モータリンともいう) を過剰発現させると寿命が伸びることが報告されている[19]。また同じく線虫では、転写因子の HSF1 をノックアウトすると極端に寿命が短くなり、反対に HSF1 を余分に発現させると明確に寿命が長くなることが観察されています[20]。

ショウジョウバエでは、軽い熱ストレスを与えておくことと死亡率が低下(寿命が延長)することが示されており[21]、これは HSP70 の発現によると考えられています。またショウジョウバエにおいて、小分子 HSP である HSP22 の mRNA レベルを高発現させると寿命が延長することが報告されています[22]。別のグループは、HSP22 をショウ

ジョウバエの運動神経特異的に発現させると寿命が30%も延長するという結果を得ています[23]。ただ、これらのモデル生物での HSP70 や HSP90 の発現による寿命への効果はまだ調べられていません。また、哺乳類などの高等動物での検討は行われていません。たぶん、哺乳類などでは HSPs の高発現によって寿命が延長したというはっきりした結果がなかなか得られないのかもしれないかもしれません。

4-4 老化研究最前線

人は誰しも健康で長生きしたいと願っています。不老長寿は、古来人類永遠の願望であり見果てぬ夢です。ただ、生物学的に見ると、有性生殖をする生物(特に動物)は子孫を残したあとはその親個体は老化して最終的には死ぬことが運命づけられています。そのようにして世代交代しながら生物は命をつないでています。ストレスの多い地球上で一つの生物個体が数百年も生き延びることはありえません。生物の体も、さまざまな防御機構のおかげで子孫を残し子育てが終わる頃までは正常に働くようになっていきます。そのあとは体のさまざまな機能が衰えていきます。したがって、抗老化(anti-aging)というのはありえないというのが生物学の常識です。それでもなんとか老化を遅らせ、あわよくば健康で寿命延長はできないものかと考えるのが人間の性かもしれません。この項では、HSPs や分子シャペロンの話題から少し離れて、老化研究の背景と最近のトピックスについて紹介します。

4-4-1 カロリー制限と老化

老化・寿命の科学的研究は、1935 年の MaCay マウスを用いたカロリー制限による老化遅延および寿命延長の報告が最初とされています[24]。20 世紀後半になって、酵母、線虫、ショウジョウバエ、またマウスなどのモデル動物が利用できるようになり、また分子遺伝学的手法が開発されて利用できるようになったおかげで、カロリー制限による老化や寿命の制御にかかわる、進化的に保存

されたシグナル伝達系や因子が徐々に明らかになってきました。たとえば、インスリン/IGF シグナル伝達系、mTOR シグナル伝達系、長寿遺伝子群(サーチュインファミリー)などです。

カロリー制限による老化や寿命の研究はヒトではできませんが、霊長類(アカゲザル)を用いた研究でも実証されています。Colman らの 20 年以上にわたる長期的な観察によると、通常量のエサを与えたサルが 50%生存している時点で、カロリー制限した個体の生存率は約 80%でした[25]。また、カロリー制限したサルでは加齢にともなう糖尿病やがん、循環器疾患、脳の萎縮の程度なども発生率が減少していました。同じアカゲザルを用いた別の研究グループの報告でも、糖尿病やがん、および心臓疾患などはカロリー制限したグループで有意に低い結果が得られていますが、ただ、寿命延長は見られませんでした[26]。したがって、カロリー制限は加齢にともなうさまざまな病的な症状を軽減し、老化を遅らせる効果はありそうです。日本では昔から、「腹八部目、医者知らず」と言われてきましたが、真実かと思います。

カロリー制限の分子レベルでの作用機構については徐々に解明されてきていますが、その一つが AMP キナーゼ(adenosine monophosphate-dependent kinase)の活性化です。AMP キナーゼは代謝センサーとも呼ばれている重要なリン酸化酵素です。もう一つが長寿遺伝子である SIRT1(サートワン、サーチュイン遺伝子群の一つ)の誘導と活性化です。(図1)。カロリー制限によって細胞内は飢餓状態になるので、ATP が消費されて相対的に AMP/ATP 比が高くなります。そして AMP (adenosine monophosphate)に依存したキナーゼ、AMP キナーゼ、が活性化されます。その結果 NAD/NADH 比が上昇し、SIRT1 を活性化することが判明したのです[27]。SIRT1 は後でも詳しく述べるように、NAD を基質として、さまざまな重要な転写因子(HSF1 も含まれる)などに結合しているアセチル基を外す(脱アセチル化)ことで細胞の恒

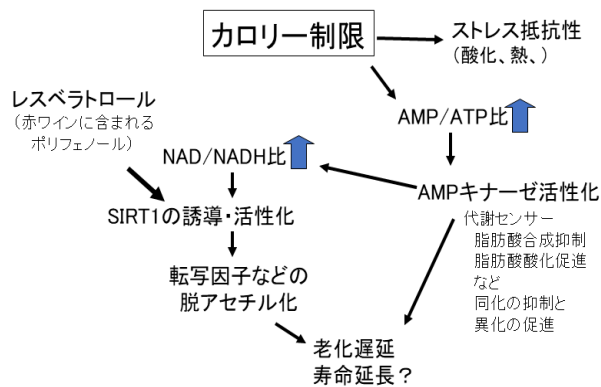


図1 カロリー制限による老化遅延、寿命への効果のメカニズム

カロリー制限によって AMP キナーゼが活性化され、NAD/NADH 比が上昇することで長寿遺伝子である SIRT1 が活性化される。SIRT1 は重要な転写因子 (HSF1 や p53 など) を脱アセチル化する。SIRT1 は赤ワインに含まれるポリフェノールであるレスベラトロールでも活性化される。(引用文献 27 から作図)

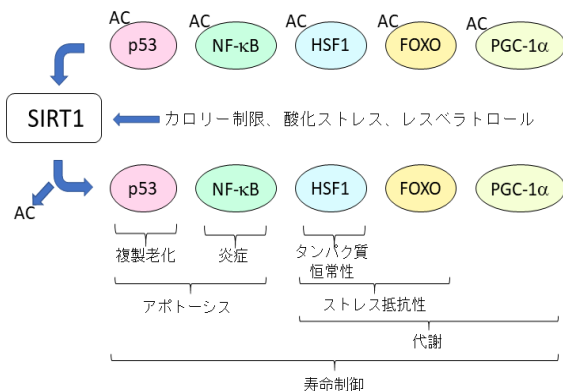


図2 SIRT1 による各転写因子の脱アセチル化

SIRT1 はアセチル化されて不活性な状態にあるいくつかの重要な転写因子 (p53, NF-κB, HSF1, FOXO, PGC-1α, など) を脱アセチル化し、活性化状態に維持してさまざまな細胞機能を促進することで寿命延長などに影響を与える。AC:アセチル基。(引用文献 28 より改変)

常性を維持して老化の抑制に寄与しています(図 2) [28]. なお、SIRT1 は赤ワインに含まれるレスベラトロールでも活性化されることが知られています。したがって、HSF1 はカロリー制限によって活性化状態を維持して、老化した細胞でも HSPs を多く合成することができ、タンパク質恒常性を保つことで老化遅延に貢献しているとい

うことができます。

なお、図 2 には、SIRT1 が HSF1 以外に、細胞内で働くいくつかの重要な転写因子、たとえば p53, NF-κB, FOXO, PGC1α などのアセチル基を外すことが示されています。そのことによりこれらの転写因子が活性化され、細胞内のさまざまな機能が亢進して寿命制御に関わっていると考えられています[28].

4-4-2 老化研究における最近のトピックス

最近話題となっているのが、上で述べた長寿遺伝子産物であるサーチュインタンパク質(以下サーチュインと略)を、生体にもともとある化合物(NMN)によって活性化することによる老化遅延の効果です。少し専門的になりますが、まず NMN(nicotinamide mononucleotide)について説明します。

NMN というのは、酸化還元反応を触媒する酵素の補酵素としてよく知られている NAD(nicotinamide adenine dinucleotide)の前駆体です。図 3 に NAD の生合成経路を示してあります。NMN は NAM(nicotinamide, ニコチンアミド)から、NAMPT(nicotinamide phosphoribosyltransferase)という酵素により合成されます。NMN はさらに NMNAT (nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase)の働きにより NAD に変換されます。NAM は NA(nicotinic acid, ニコチン酸)のカルボキシル基がアミド型になった化合物です[29]。NA は水溶性のビタミンであり、ナイアシン/ビタミン B3 と呼ばれ、動物性の食物や野菜などにも多く含まれています。NA は体内でトリプトファンからも合成されますが、何らかの原因でナイアシンが欠乏するとペラグラという特有の皮膚病が発症します。

生体内で NAD を利用する酵素反応は、エネルギー代謝における酸化還元反応のほか、サーチュインによる脱アセチル化反応や、さまざまなポリアデニル化反応にも利用されています。通常の酸化還元反応では、

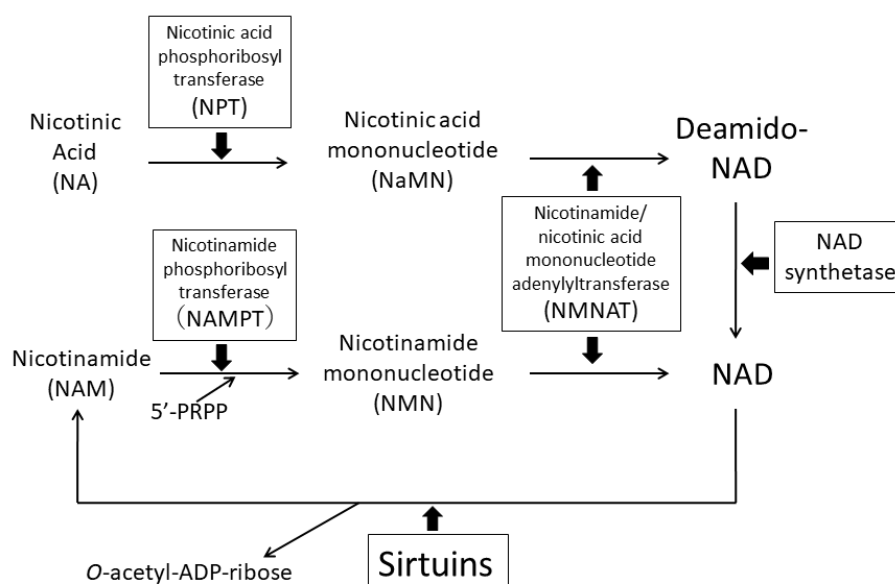


図3 哺乳類におけるNADの生合成経路

ニコチン酸 (NA) はナイアシンといい、ビタミン B3 と呼ばれる。哺乳類では、ニコチン酸 (NA) よりもニコチンアミド (NAM) がおもな NAD 前駆体である。NAMPT の触媒によりニコチンアミド (NAM) と 5'-PRPP が縮合して NMN が生成する。そのあと NMNAT により NAD が合成される。サーチュインは NAD と一緒に標的タンパク質のアセチル基に作用し、そのアセチル基と NAD の ADP-リボース部分が結合して *O*-アセチル ADP リボースとなり (標的タンパク質は脱アセチル化される)、ニコチンアミドが解離する。酵素は四角の線で囲ってある。5'-PRPP: 5'-phosphoribosyl-1-pyrophosphate. (引用文献 29 より改変)

NAD のニコチンアミド基にプロトン (水素イオン) が結合したり解離するだけです。しかし、脱アセチル化反応やポリアデニル化反応では、NAD がニコチンアミドと ADP リボース部分に分解されます。たとえば、サーチュインによる脱アセチル化反応では、標的タンパク質のリジン残基に結合したアセチル基が NAD と反応して 2'-*O*-アセチル ADP リボースとなり、残りのニコチンアミド部分が解離します。このニコチンアミドはまた NAMPT により NMN となり、ついで NMNAT により NAD に変換されます (図 4 参照)。この NAMPT は NAD 合成経路の律速酵素とされています。

哺乳類では 7 種類の サーチュイン (SIRT1～SIRT7) が知られており、すべて NAD 依存性の脱アセチル化酵素としての活性を持っています [30, 31]。サーチュインが、酵母や線虫、ショウジョウバエなどのモデル動物で老化遅延・寿命延長の効果を持っているので、以前からその活性を促進する因子の探索が進められてきました。その

代表的なものが、先に述べたブドウに含まれるポリフェノールの一種であるレスベラトロールです。また人工的に合成された小分子化合物などもいくつかサーチュインを活性化することが知られています [32]。その他、NAD の濃度が上昇するとサーチュインが活性化されることか

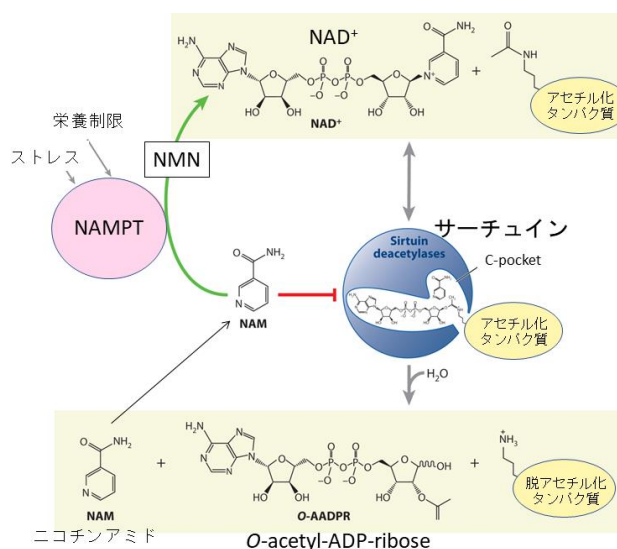


図4 サーチュインによる脱アセチル化反応

詳しくは本文参照。(引用文献 31 より改変)

ら、NAD の前駆体である NMN に注目が集まるようになりました。その理由として、NAD は分子質量が大きすぎて、細胞の外から加えても細胞内には取り込まれませんが、NMN はすみやかに細胞に取り込まれて NAD に変換され、サーチュインを活性化するからです。また他のサーチュイン活性化化合物と異なり、NMN は生体内にもとからある化合物であること、さらに NMN が 7 種類すべてのサーチュインを活性化することができるからです。

NMN の有益な効果を精力的に研究しているのが、アメリカミズーリ州セントルイス市にあるワシントン大学の今井眞一郎教授のグループです。2011 年の論文では、高脂肪食を与えた場合と、加齢にともなって発症した 2 型糖尿病マウスに NMN を腹腔投与すると、その症状が劇的に改善することを報告しています[33]。まず、マウスに高脂肪食を 6~8 ヶ月与えると肝臓や白色脂肪組織において NAD レベルが大幅に低下しますが、その理由は NAM から NMN への変換を触媒する酵素 NAMPT の発現レベルが低下していたことによることが判明しました。先にも述べましたが、NAMPT は NAD 合成経路の律速酵素です。したがって NAMPT の発現レベルが低下しているということは NMN レベルも低下していることになります。そこで、そのマウスに NMN を 7 日間毎日腹腔投与すると NAD 濃度が正常レベルに回復することを確かめました。次に、高脂肪食によって 2 型糖尿病になったマウスに NMN を投与したところ、グルコース負荷後の血糖値とインスリンレベルがほぼ正常レベルに戻ったのです。また、SIRT1 の脱アセチル化活性は高脂肪食で低下していましたが NMN 投与によって活性が回復しました。このようなことから、NMN による 2 型糖尿病の症状の改善が部分的には SIRT1 の活性化によることが示唆されたのです。さらに、この著者らは、加齢にともなって発症した 2 型糖尿病マウスに対しても NMN が有効であることを示しました[33]。

次いで今井氏らは、飲料水に NMN を混ぜて長期間にわたってマウスに飲ませると、加齢にともなって増加する体重が減少、インスリン感受性が改善、血漿中のコレステロールなどの脂肪成分が改善、筋肉のミトコンドリア呼吸能の促進、目の機能や骨密度の改善、などさまざまな若返り効果を報告しています[34]。このようなことから、現在ではサプリメントとしての NMN がネット販売などで流通しています(「NMN サプリ」で検索すると出てくる)。ただし、かなり高価です。なおこの論文では、NMN が多く含まれる食材として、枝豆、ブロッコリ、キュウリ、キャベツ、アボカド、トマト、などが紹介されています。サプリメントの NMN はかなり高価になるので、現実問題としては日常の食材から摂取するのがいいのかもしれませんが。

さらにごく最近の論文では、NMN の投与ではなく、NAM から NMN に変換する酵素(NAMPT)を高発現させることで、老化の逆戻り効果とともに寿命の延長も見られることを報告しています[35]。NAMPT は細胞内で働くもの(iNAMPT, intracellular NAMPT)と、エクソームという小胞に入って細胞外に放出されるもの(eNAMPT, extracellular NAMPT)があります。eNAMPT は血液中循環し各組織に運ばれて再び細胞内に取り込まれて NAM を NMN に変換し、結果として NAD が合成されます。6 ヶ月齢と 18 ヶ月齢のマウスで比較したところ、eNAMPT はオスでは 33%、メスでは 74%も高齢マウスで減少していました。ヒトについても 30 代から 80 代の男性の血液中の eNAMPT を測定したところ、やはり加齢にともなって減少していました。そこで、遺伝子操作でマウスの脂肪細胞に NAMPT を高発現させると、血液中にエクソームが分泌されて eNAMPT が高いレベルで維持され、高齢になっても身体活動が若いまま保たれ、1 年ほど若い状態になったそうです。ヒトでいえば 50 代が 20 代に若返ったようなものだといえます。さらに 4~6 ヶ月齢の若いマウスの血液から eNAMPT を含むエクソソー

ムを取り出して、26か月齢のマウスに3ヶ月間投与すると、毛並みもよくなり運動能力も維持されて寿命も16%も延長したそうです。これをもしヒトに応用するとすれば、シャーレで培養した細胞からもeNAMPTが分泌されるので、自分の脂肪細胞をとってきて培養し、それにヒトのeNAMPT遺伝子を導入し、培養液からエクソソームを精製して自分に注射すればいいかもしれません。ただ、臨床試験が必要なのとコストの面で、実際の臨床応用はまだ先になると思います。

なお、若い個体にNMNやeNAMPTを投与することで、さらに運動機能などが向上するかどうかは検討していません。また生殖機能についても若返り効果があるのかどうかは検討していません。これらはマウスでの実験方法が確立していないのかもしれませんが[36]。

先にSIRT1がHSF1のアセチル基を脱アセチル化して活性状態を保持することを述べましたが(4-3-1の項)、今井らのグループでは、NMNやNAMPTによって熱ショック応答が促進されているのかどうかはチェックしていません。

4-4-3 老化についての考察

日本は現在、世界でも例を見ない高齢化社会に向かいつつあります。2020年3月末で、いわゆる「団塊の世代」(1947-49年度生まれ)がすべて70歳以上の高齢者になり、ますます小中高齢化が進んでいます。そして日本人の平均寿命は未だに少しずつ延びており、2017年のデータでは、男性は80歳を超えて81.09歳、女性は87.26歳です。しかし、日本人の健康寿命(健康上の問題がなく介護を必要とせず自立した生活ができる生存期間)は、男性が72.14歳、女性が74.79歳です(2016年)。つまり男性は約9年、女性は13年近くも不健康な状態(何らかの病気を抱えたり、要介護状態)で生きていることになります。長寿はもちろんめでたいことではありますが、しかし、国の財政的な観点からは、年金の支出が増

えることになるし、平均寿命と健康寿命の差が大きければ大きいほど、医療費や介護費用がかさむことになります。

上で紹介した今井氏の研究のように、動物を使った老化・寿命の研究では、老化を遅らせ、寿命延長は可能かもしれませんが、ヒトでは寿命延長よりは健康寿命を長くする方が現実的であり、より重要だと思います。それだけでも医療費や介護費用の低減につながります。最近では人生100年時代と言われていますが、健康寿命を長くすることで、働く意欲のある人はなるべく長く働くことができるような社会の仕組みを構築していくことが求められていると思います。

生物学的観点からみると、人と同じ体重の哺乳類の野生状態での寿命は約26年と推定されています[37]。また最近では、遺伝的にはヒトの寿命は50～55歳ほどではないかと言われています。それに比べると現代人の寿命は異常に長いことになります。進化論的には、生物は子孫を残すことが最大の目的なので、人はせいぜい30歳か40歳頃まで、つまり孫が無事に産まれるころまでは、生体の防御機構がうまくはたらいって個体の生存を維持するように進化してきたと考えられています。ところが人間社会では、衛生環境や栄養状態の改善、薬や医療技術の発達によって現代人の平均寿命は延びてきています。しかし加齢にともなうさまざまな病気、たとえば、心臓肥大、アルツハイマーなどの神経変性疾患、2型糖尿病、がん、高血圧などに対する防御機構は進化してこなかった。というより、その必要がなかったと思われます。加齢にともなって体のさまざまな機能は衰えてきます。ここで紹介したNMNも、加齢にともなって減少しますが、これらの現象は生物学的に意味のあることだと思われます。

長い長い年月をかけて進化してきた生物の体は、さまざま不都合なところもありますが、驚異的な存在であり、それ自体がすばらしいかけがえのない存在です。その生体に対して、NMNやeNAMPTはあくまでも病的な状

況(神経変性疾患, 2 型糖尿病, 高血圧, など)の改善には用いてもいいと思いますが, いくら生体内にある化合物や酵素だからといって健常人に対して人為的に介入するのは好ましくはないと考えられます. 生体内の代謝経路は複雑につながっており, 一つの間代謝産物を投与することで一時的に有益な効果が見られたとしても, 長期的にみて副作用などがないかどうか, など慎重に見極めることが必要かと思います. またもし, NMN や eNAMPT を健常人のアスリートに投与することによる若返り効果で運動能力が向上するようになれば, ドーピングとの関連で倫理的な問題を引き起こすことになるかもしれません.

願わくば, 健康寿命をできるだけ長くして, いわゆる「ピンピンコロリ」で寿命を終えたいものです.

引用文献

1. 大塚健三. ストレスのない世界はない-細胞ストレス生物学入門-その 3, 中部大学生物機能開発研究所紀要, 18: 37-61, 2017.
2. 大塚健三. ストレスのない世界はない-細胞ストレス生物学入門-その 4, 中部大学生物機能開発研究所紀要, 19: 53-81, 2018.
3. Balchin D, Hayer-Hartl M, Hartl FU. In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science* 353: aac4354, 2016.
4. Taipale M, Tucker G, Peng J., et. al. A quantitative chaperone interaction network reveals the architecture of cellular protein homeostasis pathways. *Cell* 158: 434-48, 2014.
5. Li J, Labbadia J, Morimoto RI. Rethinking HSF1 in stress, development, and organismal health. *Trends Cell Biol* 27: 895-905, 2017.
6. Finka A, Goloubinoff P. Proteomic data from human cell cultures refine mechanisms of chaperone-mediated protein homeostasis. *Cell Stress Chaperones* 18: 591-605, 2013.
7. Wang X, Venable J, LaPointe P, et. al. Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. *Cell* 127: 803-815, 2006.
8. Finka A, Mattoo RU, Goloubinoff P. Meta-analysis of heat- and chemically upregulated chaperone genes in plant and human cells. *Cell Stress Chaperones* 16: 15-31, 2011.
9. Gething M-J. Edt. *Guidebook to Molecular Chaperones and Protein-Folding Catalysts*. Oxford University Press, 1997.
10. Brehme M, Voisine C, Rolland T., et. al. A chaperome subnetwork safeguards proteostasis in aging and neurodegenerative disease. *Cell Rep* 9: 1135-1150, 2014.
11. Brehme M, Sverchkova A, Voisine C. Proteostasis network deregulation signatures as biomarkers for pharmacological disease intervention. *Curr Opin Systems Biol* 15: 74-81, 2019.
12. Allan RK, Ratajczak T. Versatile TPR domains accommodate different modes of target protein recognition and function. *Cell Stress Chaperones* 16: 353-367, 2011.
13. Fargnoli J, Kunisada T, Fornace A J., et. al. Decreased expression of heat shock protein 70 mRNA and protein after heat treatment in cells of aged rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 846-850, 1990.
14. Heydari AR, Wu B, Takahashi, R., et. al. Expression of heat shock protein 70 is altered by age and diet at the level of transcription. *Mol Cell Biol* 13: 2909-2918, 1993.
15. Heydari AR, You S, Takahashi R., et. al. Effect of caloric restriction on the expression of heat shock protein 70 and the activation of heat shock transcription factor 1. *Dev Genet* 18: 114-124, 1996.
16. Labbadia J, Morimoto RI. The biology of proteostasis in aging and disease. *Ann Rev Biochem* 84: 435-464, 2015.
17. Klaips CL, Jayaraj GG, Hartl FU. Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *J Cell Biol* 217: 51-63, 2018.

18. Westerheide SD, Anckar J, Stevens SM Jr., et. al. Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* 323: 1063-1066, 2009.
19. Yokoyama K, Fukumoto K, Murakami T., et. al. Extended longevity of *Caenorhabditis elegans* by knocking in extra copies of hsp70F, a homolog of mot-2 (mortalin)/mthsp70/Grp75. *FEBS Lett* 516: 53-57, 2002.
20. Hsu AL, Murphy CT, Kenyon C. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* 300: 1142-1145, 2003.
21. Tatar M, Khazaeli AA, Curtsinger JW. Chaperoning extended life. *Nature* 390: 30, 1997.
22. Kurapati R, Passananti HB, Rose MR., et. al. Increased hsp22 RNA levels in *Drosophila* lines genetically selected for increased longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55: B552-559, 2000.
23. Morrow G, Samso, M, Michaud S., et. al. Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends *Drosophila* life span and increases resistance to oxidative stress. *FASEB J* 18: 598-599, 2004.
24. McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *J Nutr* 10: 63-79, 1935.
25. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC., et. al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325: 201-204, 2009.
26. Mattison JA, Roth GS, Beasley TM., et. al. Impact of caloric restriction on health and survival in Rhesus Monkeys from the NIA study. *Nature* 489: 318-321, 2012.
27. Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN., et. al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458: 1056-1060, 2009.
28. Saunders LR. and Verdin E. Stress response and aging. *Science* 323: 1021-1022, 2009.
29. Imai S. A possibility of nutraceuticals as an anti-aging intervention: Activation of sirtuins by promoting mammalian NAD biosynthesis. *Pharmacol Res* 62: 42-47, 2010.
30. Sauve AA, Wolberger C, Schramm VL., et al. The biochemistry of sirtuins. *Annu Rev Biochem* 75: 435-465, 2006.
31. Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol* 5: 253-295, 2010.
32. Sinclair DA, Guarente L. Small-molecule allosteric activators of sirtuins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 54: 363-380, 2014.
33. Yoshino J, Mills KF, Yoon MJ., et al. Nicotinamide mononucleotide, a key NAD⁺ intermediate, treat the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab* 14: 528-536, 2011.
34. Mills KF, Yoshida S, Stein LR., et. al. Long-term administration of nicotinamide mononucleotide mitigates age-associated physiological decline in mice. *Cell Metab* 24: 795-806, 2016.
35. Yoshida M, Satoh A, Lin JB., et. al. Extracellular vesicle-contained eNAMPT delays aging and extends lifespan in mice. *Cell Metab* 30: 329-342, 2019.
36. Yoshino J, Baur JA, Imai S. NAD⁺ intermediates: The biology and therapeutic potential of NMN and NR. *Cell Metab* 27: 513-528, 2018.
37. Calder WA. Size, Function, and Life History. Harvard University Press. 1984.

Title : There is no world without stress. Introduction to Cell Stress Biology No. 5

Molecular chaperones and aging

Author : Kenzo Ohtsuka

Address: Laboratory of Cell and Stress Biology, College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University