

転写と代謝プロファイルから細胞老化を考える

向 由起夫 (長浜バイオ大)

【細胞の寿命と老化について】

ヒトから採取した初代培養細胞を継代し続けると、採取した臓器に固有の分裂回数で細胞は増殖を停止する。この「ヘイフリックの限界」と呼ばれる現象から、細胞は無限に増殖するのではなく、寿命をもつことが示された。また、高齢者あるいは早老症患者から採取した体細胞を継代培養したときの分裂回数は少なく、その原因は細胞レベルの老化であると考えられた。多細胞動物において個体の寿命を第一に議論することは当然であるが、個体の寿命が長い生物種ではその細胞の寿命も長いことが知られており、細胞の寿命を決定する仕組みを探ることには深い意義がある。単細胞の出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はヒト体細胞と同じように分裂寿命をもつ。出芽酵母の分裂寿命は、1 個の母細胞が死ぬまでに娘細胞を出芽する回数として決められ、野生型一倍体株では平均 20 ~ 25 世代である。出芽酵母では 1 個 1 個の細胞の分裂回数を測定できることから、細胞レベルの寿命研究モデルとして非常に有用である。

細胞の寿命は、細胞の老化速度により決められている。例えば、カロリー制限（出芽酵母では培地のグルコース濃度を 2% から 0.5% に減少させる）により老化速度が遅くなり、その結果として寿命が延びると考えられている。このように生物の寿命について考えるとき、その原因である細胞の老化について考えなければならない。動物細胞では、老化が進行すると、細胞の肥大化や扁平化、活性酸素の増加、細胞老化マーカーである β -ガラクトシダーゼ (SA- β -Gal) 活性の増強などが観察される。出芽酵母でも同様に、細胞の肥大化や変形、核小体の肥大化や断片化、ミトコンドリアの機能不全、接合能の消失、さらに、傷害タンパク質や ERCs (Extrachromosomal rDNA circles) などの老化物質の蓄積が観察される。出芽酵母の 20 世代前後の細胞について網羅的な遺伝子発現が調べられ、この老化細胞では解糖から糖新生への転換、リボソームやタンパク質合成関連遺伝子の発現低下が示された。しかし、細胞の老化がいつ始まり、それがどのような細胞機能の変化として表れるのかについては詳細に検討されていなかった。そこで、ほとんどの細胞がまだ死んでいない老化初期段階 (1、4、7、11 世代) の細胞について転写情報 (トランスクリプトーム) と代謝情報 (メタボローム) の解析を試みた。

【老化初期段階のトランスクリプトーム解析】

老化にともなう段階的な転写の変化を知るために、野生型 BY4742 株における 1 世代の若い細胞と 4、7、11 世代の老化初期段階の細胞から全 RNA を調製して DNA マイクロアレイ解析をおこなった。1 世代から 4 世代の間で約 2 割の遺伝子の転写が 2 倍以上に増加または減少していたが、4 世代から 7 世代の間では数の変化はみられなかった。興味深いことに、7 世代から 11 世代の間で、さらに約 1 割の遺伝子の転写が増減しており、細胞老化にともなう転写レベルの変化は 10 世代を超えてから顕著に表れた。この 11 世代は平均分裂寿命 (約 25 世代) のほぼ半分の時期に相当し、分裂寿命を測定するときに死細胞が観察され始める

時期である。

7 世代から 11 世代の間で変化した細胞機能や代謝経路を知るためにパスウェイ解析をおこなった。以前の 20 世代前後の老化細胞のトランスクリプトーム解析結果と同様に、糖代謝や TCA 回路にかかわる代謝経路が増強していた。また、以前の解析では知られていなかったアミノ酸代謝にかかわる代謝経路が多く変化しており、特に分岐鎖アミノ酸（バリン、ロイシン、イソロイシン）における合成経路が低下し、分解経路が増強していたことから、老化細胞ではこれら分岐鎖アミノ酸が減少していると予想した。

11 世代で転写量が大きく変化する個々の遺伝子に注目すると、*SNZ1*、*SNO1*、*SPG4* などの定常期に誘導される遺伝子、嫌気条件で誘導される *PAU* ファミリー遺伝子の転写が劇的に上昇していた。栄養の枯渇により定常期遺伝子の転写は誘導されるが、老化細胞の回収時に培地成分は十分に残っていた。また、老化細胞は好氣的に培養していた。従って、老化細胞では栄養シグナルや酸素に対する応答あるいは伝達にかかわる因子が劣化していると考えられた。

【老化初期段階のメタボローム解析】

トランスクリプトーム解析と同様に、1、4、7、11 世代における老化初期段階の細胞から細胞内代謝物を抽出し、ガスクロマトグラフィー質量分析により 37 種類の低分子量化合物（アミノ酸、有機酸、糖）を同定・定量化した。このメタボローム情報の概要を知るために、主成分分析をおこない、スコアプロットを作成すると、世代ごとのクラスターが形成され、それらのクラスターが第 2 主成分軸に沿って世代順に分離した。この結果は、老化の進行にともない細胞内代謝が変化することを示唆した。そこで、老化にともない変化する代謝物を知るために、第 2 主成分に対するローディングプロットを作成すると、ピルビン酸や TCA 回路中間代謝物（オキサロ酢酸、クエン酸、イソクエン酸）が老化と正の相関を示し、多くのアミノ酸が負の相関を示した。

メタボローム解析から得られた老化にともなう代謝物量の増減が、トランスクリプトーム解析で調べた代謝酵素遺伝子の転写量の増減で説明できるのかを検討した。TCA 回路中間代謝物の一つであるクエン酸は 11 世代で増加していたが、これはアセチル CoA からクエン酸を生成するクエン酸シターゼ *CIT1/CIT2/CIT3* 遺伝子の転写が 11 世代で上昇することと一致していた。また、老化の進行にともなう分岐鎖アミノ酸の減少は、分岐鎖アミノ酸合成経路を構成する一連の酵素遺伝子の転写が低下することで説明できた。このような老化の進行にともない変化する転写を制御する因子は興味深い。

【まとめ】

- 出芽酵母の細胞老化は 10 世代あたりから始まる。
- 老化の初期段階において糖代謝の亢進とアミノ酸合成の低下がみられる。
- 老化の進行にともなう代謝の変化は代謝酵素遺伝子の転写の変化が原因である。
- 細胞老化シグナル (?) により調節される転写制御因子の存在が考えられる。