EPFs が共通の受容体に拮抗的に作用しているという「アゴニスト-アンタゴニスト」仮説が提唱される (図 2)。動物では血管新生において、相同性の高い 2 つの分子 angiopoietin (ANG) 1 と ANG2 が、受容体 Tie2 に拮抗的に結合して正反対の作用を起こすことが知られている⁽⁴⁾。共通の受容体に異なる細胞外シグナルが拮抗的に作用する例は、植物ではまだ見つかっておらず、stomagen と EPFs の 2 つのシグナル因子による気孔形成機構は、新たな制御系として植物の形態形成のモデルになるのではないかと考えている。

現在、遺伝子組換えやペプチド投与によって、植物の気孔密度を変化させることが可能となった。気孔密度を人為的に操作できると、作物育種に新しい展開をもたらす可能性がある。気孔数を増やすか減らすかによって、2 つの異なる方向性が考えられる。1 つは、気孔密度を高め光合成効率を上げることである。ダイズの様々な品種で気孔密度と気孔コンダクタンス (ガス交換のしやすさ) と光合成速度の関係が調べられ、気孔密度と気孔コンダクタンス、および気孔コンダクタンスと光合成速度がそれぞれ正に相関していることが判明している⁽⁵⁾。光合成速度は葉内 CO₂ の動きやルビスコの活性などの影響を考慮する必要があるが、気孔密度と光合成速度との

間に密接な関係があることが示唆される。2 つ目の方向性は、気孔密度を減らし水利用効率を改善することである。水利用効率とは同じ水分でどれだけ光合成できるかという指標であり、作物生産において重要な概念の一つである。人為的に気孔密度を低くした植物は、水利用効率が高くなり、より乾燥に適応できる可能性がある。

以上述べてきたように、気孔形成の制御に関わる役者がそろってきた。一方で、環境変化で気孔密度が変化するとき、これらの役者がどのように制御されているのかは不明である。植物はどこで CO₂ を感受しているのか？ CO₂ センサーは何なのか？ さらに、気孔密度を変化させたとき、植物体が生理的にどのように反応するのかもほとんどわかっていない。気孔密度の調節機構の理解とその応用はまだ始まったばかりである。

- 1) F. I. Woodward : *Nature*, **327**, 617 (1987).
- 2) J. A. Nadeau : *Curr. Opin. Plant Biol.*, **12**, 29 (2009).
- 3) S. S. Sugano, T. Shimada, Y. Imai, K. Okawa, A. Tamai, M. Mori & I. Hara-Nishimura : *Nature*, **463**, 241 (2010).
- 4) H. G. Augustin, G. Y. Koh, G. Thurston & K. Alitalo : *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 165 (2009).
- 5) Y. Tanaka, T. Shiraiwa, A. Nakajima, J. Sato & T. Nakazaki : *Crop Sci.*, **48**, 1925 (2008).

(嶋田知生, 菅野茂夫, 西村いくこ, 京都大学大学院理学研究科)

臓器老化モデルマウスを用いた抗老化食品の探索 食品投与による特定臓器の病態改善の有無を *in vivo* で調べることが可能に

何をどのように食べれば、健康に繋がるのか？ これは誰もが知りたい情報である。食品物質の効能の根拠ある科学的情報が容易に手に入れば安心して食品を摂取でき、健康増進に繋がると期待される。一方で、一般に普及している機能性食品やサプリメントの中には、科学的根拠が曖昧なまま効能や効果が過大に評価されて、販売されているものが少なくない。そのため、効果が認められないのに摂取を続けている現状があり、科学的評価の困難さが、正しい情報を国民に普及・還元することを遅らせている要因の一つとなっている。ここでは、食品物質を臓器老化モデルマウスに投与し、病態改善効果を指標にした研究成果の一部を紹介する。

これまでの寿命制御遺伝子改変マウスを用いた寿命制御の分子機構解明の研究過程で、寿命制御メカニズムの一端にレドックス制御という共通するメカニズムを明ら

かにしてきた^(1,2)。また、「老化のフリーラジカル仮説」を検証する研究で、抗酸化酵素欠損マウスを用いた解析から、マウスレベルでは過剰な酸化ストレス負荷が様々な組織に老年病 (加齢性疾患) 様の病態を発症させることを明らかにしてきた⁽³⁾。細胞内での活性酸素種の発生は、ミトコンドリア呼吸の副産物として産生されるスーパーオキシド (O₂⁻) を起点とする系と、細胞質の酵素反応で産生される O₂⁻ を起点とする系の 2 つに大別される。Mn-SOD (スーパーオキシドジスムターゼ) (*Sod2*) はミトコンドリア内で O₂⁻ を処理する主要な酵素であり、一方 CuZn-SOD (*Sod1*) は細胞質や核に分布して細胞質で発生する O₂⁻ を処理する主要な酵素である。2 系統の SOD 欠損マウスの解析結果から、ミトコンドリア O₂⁻ が処理できない Mn-SOD 欠損マウスは、生後すぐに死亡するが、組織特異的 Mn-SOD 欠損マウスは、大量の酸

図1 ■ 骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスの作製と走行能力

(A) Mn-SOD flox ホモマウス (Mn-SOD 染色体遺伝子の両端に loxp 配列が組み込まれたノックインマウス) と HSA (human skeletal actin)-Cre マウス (骨格筋特異的に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウス) を交配する。さらに生まれたマウスから Mn-SOD flox ヘテロマウスと HSA-Cre ヘテロマウスを選別し、Mn-SOD flox ホモマウスと交配する。最終的に Mn-SOD flox ホモかつ HSA-Cre をもつ骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスを選別する。骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスは骨格筋だけで Mn-SOD が欠損している。(B) 対照マウスが 120 分以上持続的に走行できる 15 m/分の速度で強制走行させると、骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスは 10 分以内に走行不能になった。(C) 抗酸化剤 EUK-8 を骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスの腹腔内に単回注射して強制走行時間を 12 m/分の速度で調べたところ、注射後 24 時間で有意に走行時間が延長し、投与後 96 時間までその効果は持続した。文献 6 から引用改変

素を消費する心臓、骨格筋、脳などに傷害が認められた^(4~7)。一方、細胞質 O_2^- が処理できない CuZn-SOD 欠損マウスは肝臓、感覚器、皮膚、骨などで老年病様病態が認められた^(8~10)。これらのモデルマウスの解析から、内因性の細胞内 O_2^- バランスの適切な調節は臓器を正常に機能させるためには必須であり、過剰な O_2^- を起点とした活性酸素障害が臓器障害 (臓器老化) を引き起こすことが示された。さらにヒトにおいても、アルツハイマー病患者脳で CuZn-SOD の有意な減少を発見し、老年病発症過程での SOD の防御的役割を再認識した。また、変形性関節症の関節で Mn-SOD の発現低下や、骨粗鬆症患者血漿で SOD 活性が低下していることが明らかとなっている。このように、抗酸化酵素の減少が病的老化の発症要因の一因になると考えられることから、筆者らは SOD 欠損マウスを臓器老化モデルマウスと位置付

け、個体レベルでの評価系とし、機能性食品の抗老化作用を調べた。

骨格筋の臓器老化モデルとして、Cre-loxp システムを用いた骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスを作製した (図 1-A)⁽⁶⁾。本欠損マウスは正常に発育し、体重などの形態学的な異常は認められなかった。骨格筋ミトコンドリア呼吸酵素活性を調べたところ、呼吸酵素複合体 II 活性が著しく低下していた。運動機能を調べた結果、トレッドミルによる強制走行能力が著しく低下していた (図 1-B)。また、その低下は著しい血中乳酸値の増加と骨格筋内 ATP 量の低下を伴い、ミトコンドリア機能不全を示唆した。さらに骨格筋中の DNA 酸化マーカー 8-oxodG (8-hydroxydeoxyguanosine) は有意に高値を示した。本マウスは、高齢者に認められるミトコンドリア機能不全に伴う筋力低下を一部再現したモデルと考えられ、走

行時間を指標に化合物の抗酸化力や病態改善作用を評価できることが示唆された。そこで、抗酸化剤による運動機能レスキューを試みるために、抗酸化剤 EUK-8 を 30 mg/kg で腹腔内単回投与したところ、24 時間後に強制走行時間が著しく延長し、96 時間まで持続した (図 1-C)。また EUK-8 投与により、骨格筋内 ATP 量は野生型マウスと同レベルに回復していた。以上の結果から、骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスは骨格筋内 ATP 量が枯渇することで強制走行能力が低下し、抗酸化剤投与により ATP 量が回復し、走行能力が延長することが明らかとなった⁽⁶⁾。

次に、本マウスの強制運動能力を指標にして、100 種類の食品物質の運動機能改善作用を評価した結果、6 種類の陽性物質を同定した。同定できた陽性物質は抗酸化作用を介して、筋中 ATP 量を増加させ、運動能力を回復させた可能性が示唆された。

一方、CuZn-SOD 欠損マウスは骨芽細胞と破骨細胞のいずれも減少した低代謝型骨量減少を示し、加齢時に顕著な背骨の湾曲が認められた (図 2)。そこで、DEXA 法による骨密度を指標にして 50 種類の食品物質の病態改善作用を調べ、17 種類の陽性候補物質を同定し、さらなる追試験で 2 種類の陽性物質を確定した。このうちビタミン C は、骨量に加えて、コラーゲン形成異常に伴う皮膚萎縮を顕著に改善することも併せて明らかにした⁽¹⁰⁾。さらに、初代繊維芽細胞における内因性活性酸素の発生

を有意に抑制することも確認している。

以上、筆者らが開発した臓器老化モデルマウスに食品物質を投与して表現型を解析することで、特定臓器の病態改善効果の有無を *in vivo* で調べるのが可能となった。本評価系は物質がもつ生理作用のすべてを明らかにすることはできないが、抗酸化作用の切り口から、老化様病態の改善メカニズムを解析できる点が特徴である。また、2 系統のモデルマウスを用いることで、機能性食品物質の作用点を細胞質またはミトコンドリアに特定して調べることも可能である。さらに、本マウス臓器から個別に初代培養細胞を単離することで、細胞レベルでのより詳しい作用解析を進めることができる。タモキシフェンによる誘導型 Cre マウスやベクターを利用することで、Mn-SOD 欠損の時間的人為的操作も可能である。

現在、組織特異的 Mn-SOD 欠損マウスに関しては、骨格筋に加え心臓や脳、また CuZn-SOD 欠損マウスに関しては、骨に加えて眼や皮膚で表現型解析と食品による病態改善作用を調べている。内因性活性酸素による酸化傷害を減ずる食品物質の探索は、疾患予防 (抗老化) 食材の開発に繋がることが期待される。ここで紹介したモデル系を含めた様々な疾患病態モデルを用いることで、食品物質の機能性がより詳細に解明されることを期待したい。

図 2 ■ CuZn-SOD 欠損マウスは顕著な脊柱後弯を示す
70 週齢の雌マウスのレントゲン写真。CuZn-SOD 欠損マウス (上段) と対照マウス (下段)

- 1) D. Nakai, T. Shimizu, H. Nojiri, S. Uchiyama, H. Koike, M. Takahashi, K. Hirokawa & T. Shirasawa: *Aging Cell*, **3**, 273 (2004).
- 2) T. Baba, T. Shimizu, Y. Suzuki, M. Ogawara, K. Isono, H. Koseki, H. Kurosawa & T. Shirasawa: *J. Biol. Chem.*, **280**, 16417 (2005).
- 3) T. Shimizu & T. Shirasawa: *Yakugaku Zasshi*, **130**, 19 (2010).
- 4) H. Nojiri *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **281**, 33789 (2006).
- 5) S. Kawakami *et al.*: *Circ. J.*, **73**, 2125 (2009).
- 6) H. Kuwahara *et al.*: *Free Radic. Biol. Med.*, **48**, 1252 (2010).
- 7) T. Shimizu, H. Nojiri, S. Kawakami, S. Uchiyama & T. Shirasawa: *Geriatr. Gerontol. Int.*, **10**, S70 (2010).
- 8) S. Uchiyama, T. Shimizu & T. Shirasawa: *J. Biol. Chem.*, **281**, 31713 (2006).
- 9) Y. Imamura, S. Noda, K. Hashizume, K. Shinoda, M. Yamaguchi, S. Uchiyama, T. Shimizu, Y. Mizushima, T. Shirasawa & K. Tsubota: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 11282 (2006).
- 10) K. Murakami, J. Inagaki, M. Saito, Y. Ikeda, C. Tsuda, Y. Noda, S. Kawakami, T. Shirasawa & T. Shimizu: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **382**, 457 (2009).

(清水孝彦, 東京都健康長寿医療センター研究所)