＜平成 22 年度助成＞

食品に含まれるカロリー制限シグナル因子評価法の構築と利用

岩　崎　　崇
（鳥取大学農学部）

1. 研究目的

カロリー制限は多くの生物種において寿命を延長し、老化関連疾患の進行を遅らせることがよく知られている。モデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* も同様に、様々なストレスに曝されることで寿命延長を誘導することが知られている。この現象は、種々のストレス認識により転写調節因子である DAF-16（哺乳動物では FOXO）が核内に移行し、転写調節を行うことに起因している[1)]。飢餓ストレスであるカロリー制限も DAF-16 核内移行を誘導し、線虫の寿命延長を誘導することが報告されている。一方で、カロリー制限は細胞内の NAD 濃度を上昇させ、結果として NAD 依存的脱アセチル化酵素である SIR2.1 を活性化し、これが寿命延長に繋がるとも考えられている[2)]。上記二つの寿命延長機構は別々のものであると考えられてきたが、近年になってカロリー制限による寿命延長は DAF-16 と SIR2.1 の複合体形成によって誘導されることが明らかとなった[3)]。

本研究では DAF-16::GFP を恒常的に発現している変異株「TJ356」[4)] に対して、*Sir2.1::mRFP* 遺伝子を導入することで、DAF-16::GFP および SIR2.1::mRFP を恒常的に発現する新たな変異株を作製する。このような遺伝子組換え線虫では、カロリー制限シグナルによって DAF-16::GFP と SIR2.1::mRFP が複合体を形成することが期待される。その際に GFP（Donor）と mRFP（Acceptor）の間で FRET 現象が発生すると予想される。我々は、この FRET 現象を指標とすることで、寿命延長を誘導するカロリー制限シグナルを検出することができると考えた（**図 1**）。本研究では、カロリー制限によって誘導される SIR2.1 と DAF-16 の複合体形成を指標とした、新しいカロリー制限シグナル因子の評価・探索系の構築を目指す。

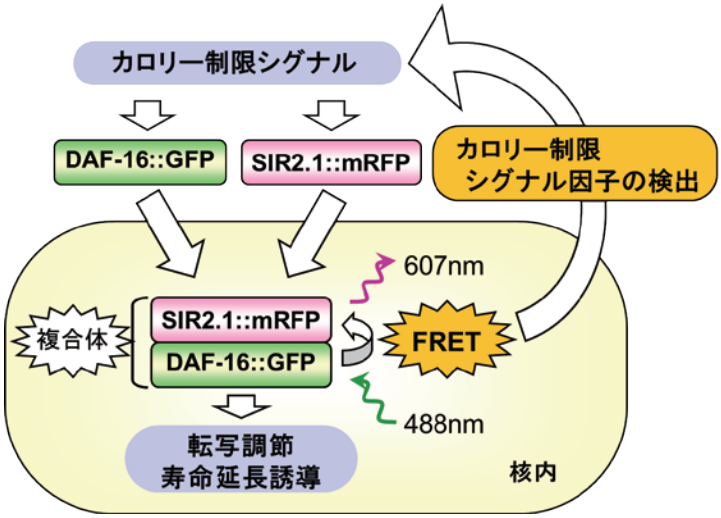

図 1　本研究の戦略

2. 研究手法

2.1. 遺伝子組み換え線虫の作製

線虫からゲノムDNAの調製を行い、ゲノムDNAを鋳型としたGenomic PCRにより*Sir2.1*遺伝子のクローニングを行った。まず、線虫からのゲノムDNAの調製には、Wizard SV Genomic DNA Purification System（Promega社）を使用した。得られたゲノムDNAを鋳型とし、以下のprimerを用いてGenomic PCRを行うことで、*Sir2.1*遺伝子を調製した。

SIR2.1 primer

SIR2.1-FW [5'-TATGTCGACGACTAGTCCTTGATTTAGTGCC-3']

制限酵素による切断を可能にするために、5'末端にSalI配列を付加した。

SIR2.1-RV [5'-AATCCCGGGGATACGCATTTCTTCACAC-3']

制限酵素による切断を可能にするために、5'末端にSmaI配列を付加した。

Genomic PCRには、サーマルサイクラーとしてApplied Biosystems 2720サーマルサイクラー（Applied Biosystems社）、酵素としてKOD-polymerase（TOYOBO社）を使用した。得られたPCR産物の末端をそれぞれ制限酵素SalI、SmaIで処理し、同様に制限酵素処理を施したpHKmRFPベクター（**図2**）に導入した。ライゲーション反応にはLigation high ver.2（TOYOBO社）を使用した。これにより、SIR2.1のC末端に赤色蛍光タンパク質mRFPを融合した『SIR2.1::mRFP』を発現するプラスミドを構築した。得られた発現プラスミドを、大腸菌DH5αCompetent cell（TaKaRa社）に導入し、LBA寒天培地（NaCl 10.0g, Bacto tryptone 10.0g, Yeast extract 5.0g, Agar 15g, Ampicillin 50mg, D.W. 1L）に塗布することで発現プラスミドを有する大腸菌のコロニーを得た。その後、前述のSIR2.1 primerとHybriPol DNA polymerase（BIOLINE

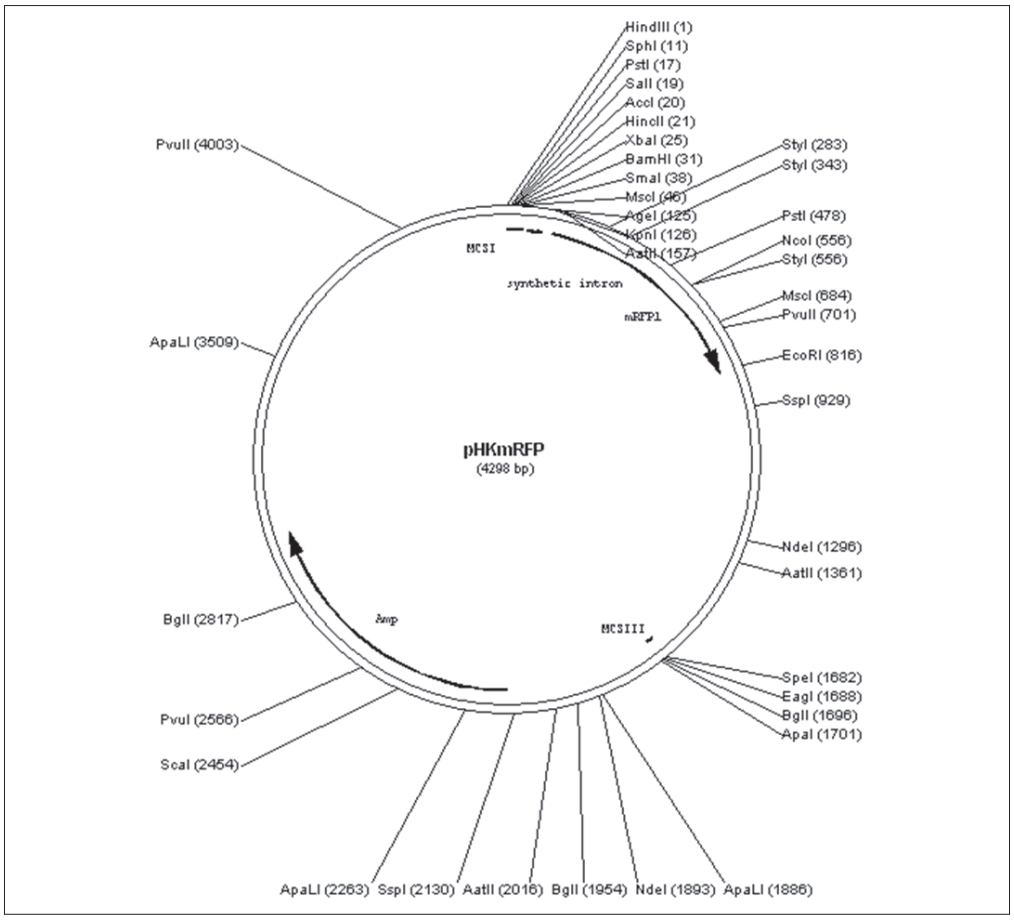

図2　pHKmRFPベクター

社）を用いてコロニーPCRを行い、挿入DNA断片（*Sir2.1*遺伝子）の確認を行った。次いで、High pure plasmid Isolation kit（Roche社）を用いたプラスミド調製を行い、Didoxy法を用いて挿入DNA断片（*Sir2.1*遺伝子）の塩基配列分析を行った。塩基配列分析には、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied biosystems 社）を用い、Applied Biosystems 3130*xl* ジェネティクスアナライザ（Applied Biosystems社）を用いて分析を行った。得られたデータをGENETIX-SV/RCを用いて解析した。塩基配列確認後、精製された発現プラスミドをマイクロインジェクション法により、変異株線虫「TJ356」（『DAF-16::GFP』を恒常的に発現している線虫株）の生殖巣に注入することにより、『SIR2.1::mRFP』および『DAF-16::GFP』を共発現する遺伝子組み換え線虫「TJ356::SIR2.1::mRFP」の作製を行った。

2.2. 遺伝子組み換え線虫由来初代培養細胞の作製

先行研究により報告されている手法に従い、遺伝子組み換え線虫「TJ356::SIR2.1::mRFP」の卵から、初代培養細胞の調製を行った[5)]。大量培養した遺伝子組み換え線虫「TJ356::SIR2.1::mRFP」を、M9培地（NaCl 5.0 g, KH_2PO_4 3.0 g, Na_2HPO_4 6.0 g, D.W. 1L）中で遠心回収し、得られた線虫にM9培地とアルカリブリーチ溶液（0.5N KOH, 10％ 漂白剤の混合液）を等量加え、室温にて10分間処理することで、線虫の外皮を溶解させた。次いで、23Gの注射針で吸引・吐出を繰り返し、線虫の体を破砕した。破砕液を50 μm孔径のナイロンメッシュ（セミテック社）で濾過し、卵を回収した。得られた卵に5～10倍量のChitinase 溶液（Chitinase 42.0 mg, NaCl 0.69 g, KCl 0.36 g, $MgSO_4$ 0.04 g, $CaCl_2$ 0.03 g, HEPES buffer 100 ml）を加え、室温で40～60分間処理することで卵殻を溶解させ、細胞を分散させた。分散した細胞を、細胞培地（150 mM Sucrose 3.5 ml, Fatal Calf Serum 3.5 ml, 200 mg/ml Streptomycin 8.75 μl, 1,000,000 U/ml Penicillin 17.5 μl, L-15 medium 35.0 ml）中で遠心洗浄を行い、5.0 μm孔径のPVDF filterで濾過し、細胞以外の夾雑物を除いた。50％ Peanut lectin（Sigma-Aldrich社）でコーティングしたマルチウェルガラスボトムディッシュ（MATSUNAMI社）に、得られた細胞を2.0×10^5 cells/cm^2になるように播種し、20℃で培養した。

2.3. 遺伝子組み換え線虫および初代培養細胞における蛍光挙動の観察

遺伝子組み換え線虫および初代培養細胞の観察には、微分干渉蛍光顕微鏡OLYMPUS IX-71（OLYMPUS社）および共焦点レーザー走査型顕微鏡OLYMPUS FLUOVIEW FV10i（OLYMPUS社）を用いた。『SIR2.1::mRFP』および『DAF-16::GFP』の複合体形成、即ちカロリー制限シグナルを観察するために、既知の寿命延長因子であり、カロリー制限シグナルを誘導するレスベラトロールを用いて、初代培養細胞を処理した。マルチウェルガラスボトムディッシュに播種後、24時間培養した初代培養細胞に対して、終濃度100 μMとなるようにレスベラトロール（1％ DMSO溶解）を添加し、20℃で24時間培養した。その後、『SIR2.1::mRFP』および『DAF-16::GFP』が複合体を形成しているかを調べるために、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、mRFPとGFP間におけるFRET現象の有無を調べた。具体的な方法としては、まず『DAF-16::GFP』の蛍光強度を測定し、その後GFPに対する励起レーザー強度を最小限まで落とし、反対にmRFPに対する励起レーザー強度を最大限まで上げ、初代培養細胞を20分間照射することで、細胞中のmRFPを褪色させた。次いで、mRFPとGFPの励起レーザー強度を初期値に戻し、再び『DAF-16::GFP』の蛍光強度を測定した。

『SIR2.1::mRFP』と『DAF-16::GFP』が複合体を形成している場合、励起されたGFPのエネルギーは近傍のmRFPに転移し、mRFP由来の赤

色蛍光として検出される。しかし、mRFP を褪色させることで、励起された GFP のエネルギーは mRFP には転移しなくなり、GFP 由来の緑色蛍光として検出される。この現象を利用し、mRFP の褪色前と褪色後で、GFP 由来の緑色蛍光強度が増強したか否かを調べることで、『SIR2.1::mRFP』と『DAF-16::GFP』間で FRET 現象が発生していたか、即ち両者が複合体を形成していたかを調べることができる（Acceptor bleaching 法）。

3. 研究結果

3.1. 遺伝子組み換え線虫における DAF-16、SIR2.1 の挙動

前述の手法により作製された遺伝子組み換え線虫「TJ356::SIR2.1::mRFP」の 4 齢幼虫を用いて、線虫体内における『SIR2.1::mRFP』および『DAF-16::GFP』の発現部位を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。『SIR2.1::mRFP』は、頭部においては咽頭付近に強い発現が認められ、尾部では腸管に沿って点在して発現していることが確認された。一方で、『DAF-16::GFP』は頭部・尾部ともにユビキタスに発現しており、細胞内では細胞質（核外）に局在していることが確認された。『SIR2.1::mRFP』と『DAF-16::GFP』の共局在を観察すると、咽頭から腸管にかけて一部の同一細胞内において、細胞質に共局在していることが確認された。これらの結果から、同一細胞内における『SIR2.1::mRFP』と『DAF-16::GFP』の複合体形成を検出できる可能性が示唆された（**図 3**）。そこで、遺伝子組み換え線虫「TJ356::SIR2.1::mRFP」を、既知の寿命延長因子であるレスベラトロールによって処理し、『SIR2.1::mRFP』と『DAF-16::GFP』の複合体形成を、FRET 現象（GFP 励起時における mRFP の赤色蛍光強度の増強）の検出によって明らかにしようと試みた。しかし、100 μM レスベラトロール（1％ DMSO 溶解）で 24 時間処理した遺伝子組み換え線虫体内において、明確な FRET 現象を検出することはできなかった。その理由として、『SIR2.1::mRFP』と『DAF-16::GFP』が複合体を形成した際に、mRFP と GFP の間の

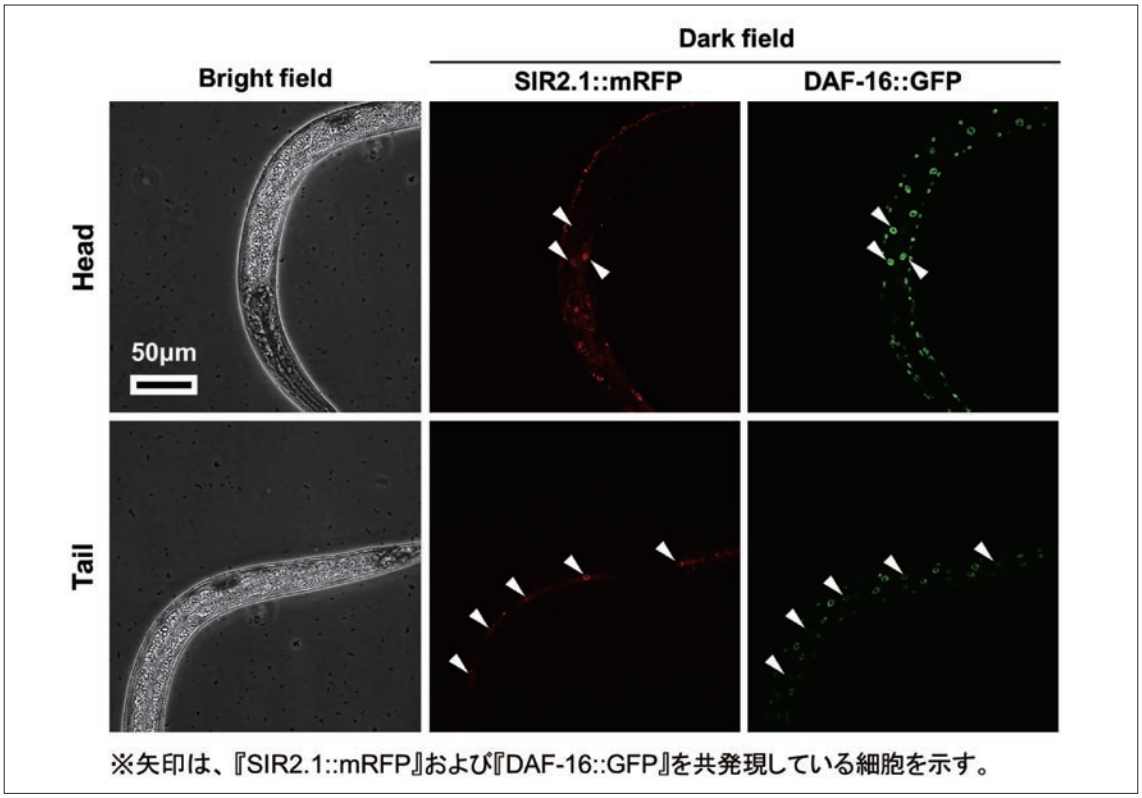

図 3　遺伝子組み換え線虫における『SIR2.1::mRFP』および『DAF-16::GFP』の局在分布

距離が離れすぎていたため、弱いFRET現象しか発生しなかった可能性が考えられた。そこで、微弱なFRET現象も検出することができるAcceptor bleaching法を用いて、遺伝子組み換え線虫体内においてFRET現象を観察しようと試みた。Acceptor bleaching法は、標的部位に高いレーザー強度で励起光を長時間照射し、FRET現象におけるエネルギーの受け手の蛍光タンパク質（Acceptor）を褪色させて、FRET現象によるエネルギー転移を強制的に阻害する手法である。しかし、生きた線虫は動くため、狙った標的部位に長時間励起光を照射することは困難であった。そこで、遺伝子組み換え線虫から初代培養細胞を単離・調製し、『SIR2.1::mRFP』と『DAF-16::GFP』を共発現した細胞に対してAcceptor bleaching法を用いることで、『SIR2.1::mRFP』と『DAF-16::GFP』の複合体形成を検出することを試みた。

3.2.　遺伝子組み換え線虫由来初代培養細胞におけるDAF-16、SIR2.1の挙動

前述の手法により調製した遺伝子組み換え線虫由来初代培養細胞に対して、Acceptor bleaching法を用いることで、『SIR2.1::mRFP』と『DAF-16::GFP』の複合体形成を検出することを試みた。まず、コントロールとして1% DMSOで24時間処理した初代培養細胞に対して、高いレーザー強度のmRFP励起光を20分間照射し、mRFPを褪色させた。次いで、mRFP褪色前のGFP蛍光強度とmRFP褪色後のGFP蛍光強度を比較して、GFP蛍光強度の変化を調べた。その結果、mRFP褪色後のGFP蛍光強度の増強（FRET現象の検出）は認められなかった（**図4**）。一方で、既知の寿命延長因子であるレスベラトロール（終濃度

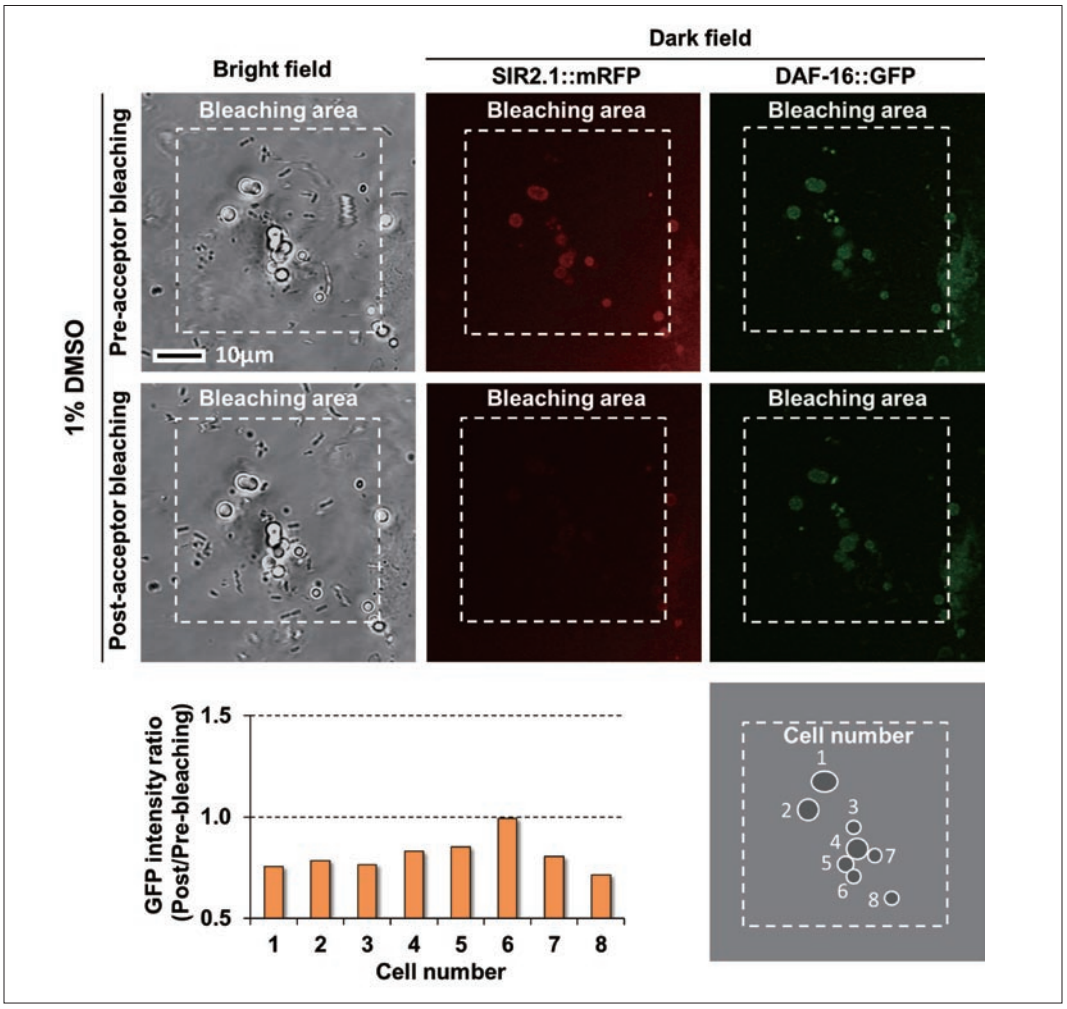

図4　『SIR2.1::mRFP』『DAF-16::GFP』間におけるFRET現象（コントロール）

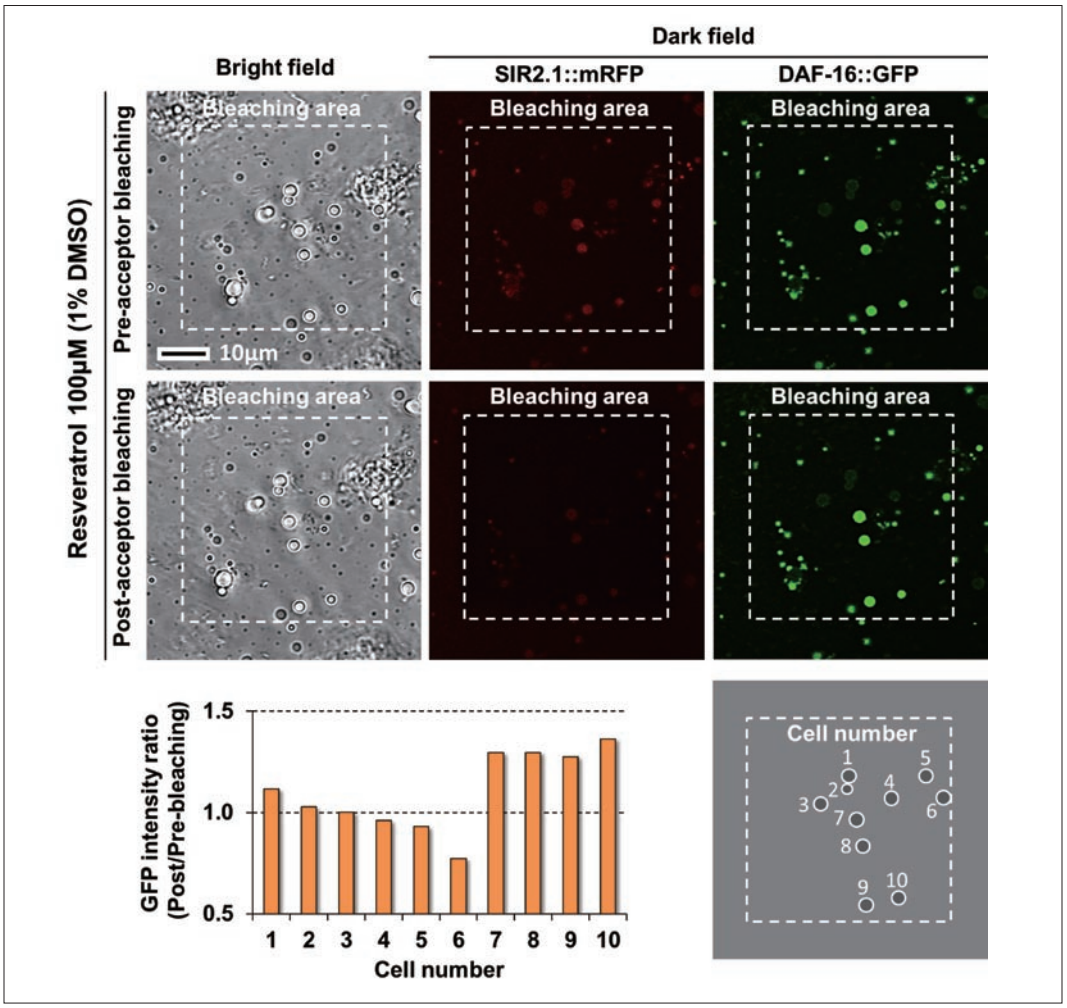

図５　『SIR2.1::mRFP』『DAF-16::GFP』間における FRET 現象（Resveratrol 処理）

100 μM、1％ DMSO 溶解）によって 24 時間処理した初代培養細胞に対して、Acceptor bleaching 法を行った結果、一部の細胞において、mRFP褪色前と比較して mRFP褪色後の GFP 蛍光強度が約 1.3 倍増強していることが確認された（**図５**）。このことから、レスベラトロール処理によって『SIR2.1::mRFP』と『DAF-16::GFP』の複合体形成が誘導され、これによって FRET 現象が発生した可能性が示唆された。また、レスベラトロールが『SIR2.1::mRFP』と『DAF-16::GFP』の挙動に与える影響を、Acceptor bleaching 法を用いることで、微弱ではあるが検出可能であることが示された。

4. 考察と今後の展開

本研究において、『SIR2.1::mRFP』と『DAF-16::GFP』を発現する遺伝子組み換え線虫由来初代培養細胞に対して、Acceptor bleaching 法を用いることで、レスベラトロールによって誘導されるカロリー制限シグナル（SIR2.1 と DAF-16 の複合体形成）を FRET 現象として検出することができた。このことは、本研究においてカロリー制限シグナルを検出する技術基盤が構築されたことを意味している。

しかし、本研究で構築された評価系にはいくつかの問題点も残されている。その中でも大きな問題点は、①本研究で用いた初代培養細胞は一週間ほどで細胞寿命を迎えてしまうため、実験の度に用時調製する必要があるという点、そして②『SIR2.1::mRFP』と『DAF-16::GFP』を共発現している細胞数が少ないという点である。この二点を克服するために、今後は『SIR2.1::mRFP』

と『DAF-16::GFP』を共発現する線虫細胞株の樹立を計画している。具体的な方法としては、mRFPおよびGFPの二重蛍光を指標として、セルソーターにより両蛍光タンパク質を強く発現している細胞を選択的に回収する。次いで、それらの初代培養細胞に対して、不死化遺伝子（例えばテロメラーゼ遺伝子）の導入や、増殖異常を示す変異株線虫由来の細胞と細胞融合を行うことで、無限増殖能を有した線虫細胞株を樹立することを予定している。これにより、より簡便なカロリー制限シグナル検出系を構築することができると考えている。

また、上記以外の問題点として、遺伝子組み換え線虫体内の細胞と初代培養細胞における『SIR2.1::mRFP』および『DAF-16::GFP』の細胞内局在が異なっているという点が挙げられる。線虫体内の細胞では『SIR2.1::mRFP』および『DAF-16::GFP』は細胞質に局在していたのに対して（**図3**）、初代培養細胞では『SIR2.1::mRFP』および『DAF-16::GFP』は核を含む細胞全体に分布が認められた（**図4**）。この理由として、生体外に細胞を摘出したことにより、物理的なストレスが初代培養細胞に加わり、これによって両タンパク質の細胞内局在が変わってしまった可能性も考えられる。本研究では、細胞の生存率を優先するため、線虫体内から初代培養細胞を摘出して24時間培養を行った後に、試薬処理・顕微鏡観察を行った。しかし、細胞調製時の物理的ストレスの影響を完全に排除するためには、細胞調製後の培養時間をより長く設定する必要があるかもしれない。この点についても、今後の要検討事項であると考えている。

本研究において開発されたカロリー制限シグナル検出系が抱える問題点は決して少なくない。しかし、これら問題点を改善することで、より正確で安定したカロリー制限シグナル検出系を構築していきたいと考えている。

謝　辞

本研究課題に対し、多大なる御支援を賜りました浦上食品・食文化振興財団に心より御礼申し上げますとともに、貴財団の益々の御発展を祈念申し上げます。

文　献

1) Lin K, Hsin H, Libina N, Kenyon C. (2001) Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat Genet*. **28**: 139-145.

2) Viswanathan M, Kim SK, Berdichevsky A, Guarente L. (2005) A role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining *C. elegans* life span. *Dev Cell*. **9**: 605-615.

3) Berdichevsky A, Viswanathan M, Horvitz HR, Guarente L. (2006) *C. elegans* SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span. *Cell*. **125**: 1165-1177.

4) Henderson ST, Johnson TE. (2001) daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*. **11**:1975-1980.

5) Christensen M, Estevez A, Yin X, Fox R, Morrison R, McDonnell M, Gleason C. (2002) A primary culture system for functional analysis of *C. elegans* neurons and muscle cells. *Neuron*. **33**: 503-514.

Development of novel detecting system for caloric restriction signal factor

Takashi Iwasaki
Faculty of Agriculture, Tottori University

Caenorhabditis elegans is known to extend-lifespan by exposing various external stresses, for example physiological stress, heat stress and starvation stress. The caloric restriction, a kind of starvation stress, also evokes the extended-lifespan of *C. elegans* by inducing protein complex formation between DAF-16 and SIR2.1 in the nematode cell. Here, we aimed to develop novel detecting system for extended-lifespan factor (i.e., caloric restriction signal factor), and we focused on the interaction between DAF-16 and SIR2.1 as an intracellular indexical event to detect the caloric restriction signal.

In this study, we created transgenic nematode co-expressing DAF-16::GFP (green fluorescent protein) and SIR2.1::mRFP (red fluorescent protein) in whole body, and used primary culture derived from the transgenic nematode to observed the intracellular interaction of DAF-16::GFP and SIR2.1::mRFP. The protein complex formation between DAF-16::GFP and SIR2.1::mRFP was evaluated by detecting GFP-mRFP FRET (fluorescence resonance energy transfer) with acceptor bleaching method. Confocal laser scanning microscopic analysis showed that the primary culture treated with 1% DMSO (dimethyl sulfoxide) exhibited no FRET after acceptor bleaching. On the other hand, weak FRET (1.3-fold increase of GFP fluorescent intensity after acceptor bleaching) was observed in the primary culture treated with 100 μM resveratrol; well-known chemical compound induces extended-lifespan of *C. elegans* by working as caloric restriction signal, dissolved in 1% DMSO. These results suggest that DAF-16::GFP and SIR2.1::mRFP form the protein complex in the nematode primary culture treated with the resveratrol; typical caloric restriction factor. Our study also implies the primary culture derived from the transgenic nematode co-expressing DAF-16::GFP and SIR2.1::mRFP is useful detecting system for screening of caloric restriction factor, namely extended-lifespan factor. We will improve this detecting system to carry out screening for novel extended-lifespan factors in the future.

This work was supported by Research Grant from the Urakami Foundation for Food and Food Culture Promotion, Tokyo, Japan.