

加齢指標タンパク質 SMP30/GNL ノックアウトマウスを用いた抗老化研究

石神 昭人

Anti-aging Research Using SMP30/GNL Knockout Mice

Akihito ISHIGAMI

*Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toho University,
2-2-1 Miyama, Funabashi, Chiba 274-8510, Japan*

(Received August 5, 2009)

Senescence Marker Protein-30 (SMP30) was originally identified as a novel protein in the rat liver, the expression of which decreases with aging. Recently, we identified SMP30 as the lactone-hydrolyzing enzyme gluconolactonases (GNL) of animal species. GNL was a key enzyme which involved in vitamin C biosynthesis, and the essential role of SMP30 in this synthetic process was verified by a nutritional study. SMP30 knockout mice developed symptoms of scurvy when fed a vitamin C-deficient diet, verifying the pivotal role of SMP30 in vitamin C biosynthesis. Moreover, SMP30 knockout mice were shorter in life span than the wild type when fed autoclaved mouse chow contained ~55 mg/kg of vitamin C, which we now know contains too little vitamin C to maintain normal levels of vitamin C in tissues. These results demonstrate that vitamin C deficiency shortens longevity, that is, vitamin C deficiency accelerates aging.

Key words—aging; ascorbic acid; gluconolactonase; vitamin C

1. はじめに

ヒトは性成熟期以降、加齢に伴い細胞や組織の機能が低下し、やがて死に至る。混同しやすい言葉だが、日本語での「加齢」と「老化」の意味は全く異なる。「加齢」とはヒトが生まれてから死ぬまでの時間経過、すなわち暦年齢を示す。一方、「老化」とは成長期（性成熟期）以降、すべてのヒトに起こる加齢に伴う生理機能の低下である。すなわち、ヒトでは「加齢」の間に「老化」が進行する。ヒトの場合、「老化」は概ね20歳以降に起こり、それ以前は発生・成長と捉えるべきである。また、老化は決して病気ではない。

本稿では、老化と密接な関係にある活性酸素種 (ROS) を効率的に消去するビタミンCが体内で長期的に不足すると寿命が短くなる結論に至った経緯を概説する。

2. 加齢指標タンパク質 SMP30

われわれは1991年に若いラットと老齢ラットの

肝臓のタンパク質を比較するプロテオーム解析により、加齢に伴い減少する分子量約34 kDaのタンパク質 SMP30 (日本名：加齢指標タンパク質30) を発見した (Fig. 1)。¹⁻³⁾ 当時、プロテオーム解析により加齢で増減するタンパク質が多くみつかった。しかし、そのほとんどはホルモンによる影響を受けており、雌雄で異なる増減傾向を示した。例えば、雄では加齢で減少又は増加するが、雌では変わらない。又はその逆である。SMP30はホルモンによる影響を受けないため、雌雄ともに加齢で減少するのが特徴である。

3. SMP30 遺伝子破壊マウス

SMP30は加齢に伴い減少するが、体の中での役割・機能は長い間はつきりしなかった。そこでわれわれはSMP30を合成できないマウスを遺伝子操作により開発できれば、その役割・機能がわかると考えた。実際にSMP30を持たない遺伝子破壊マウスを開発したところ、このマウスは正常に生まれ、外見上は野生型マウスとなんら変わりがなかった (Fig. 2)。⁴⁻⁶⁾ しかし、約6ヵ月で半数 (50%) のマウスが死亡した (Fig. 3)。死亡時の病理所見は、がんや疾患などは一切認められず、臓器全体が萎縮するヒトの老衰に似た症状そのものであった。一

東邦大学薬学部生化学 (〒274-8510 千葉県船橋市三山 2-2-1)

e-mail: ishigami@phar.toho-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第129年会シンポジウム S10 で発表したものを中心に記述したものである。

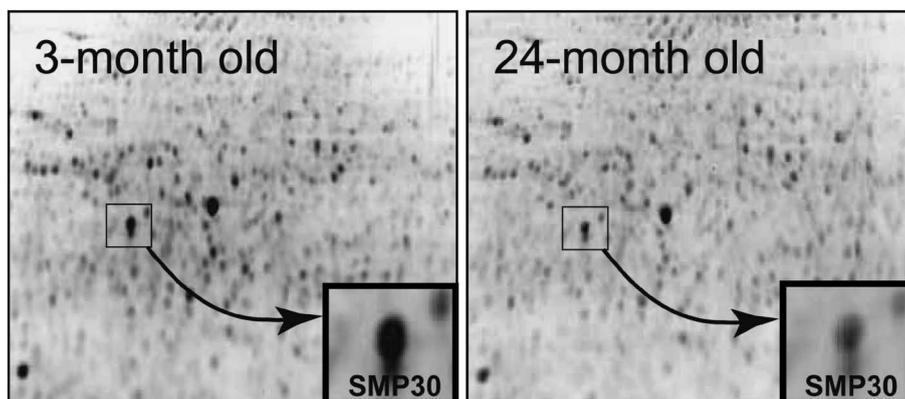


Fig. 1. Proteomic Profile of SMP30 in the Liver Soluble Proteins from 3-month- and 24-month Old Rats
SMP30 is identified as a molecule mass of 34 kDa. Amounts of this protein decrease with aging in an androgen-independent manner.



Fig. 2. SMP30 Knockout and Wild Type Mice
The SMP30 knockout mouse is born normal and is unchanged in any obvious way from the wild type mouse.

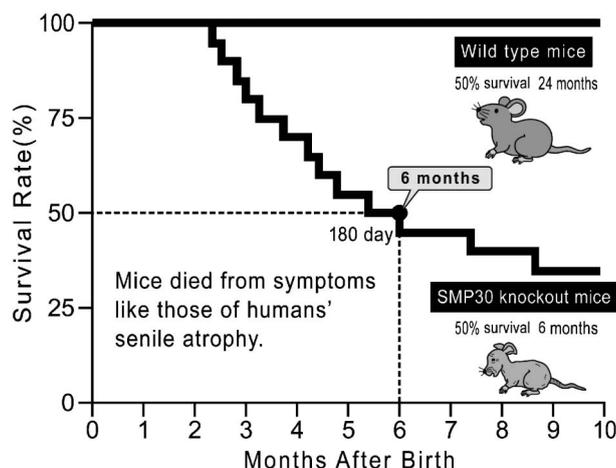


Fig. 3. Shortened Life Span of SMP30 Knockout Mice
Twenty male SMP30 knockout and 20 male wild type mice were used. SMP30 knockout mice displayed an increased mortality rate starting at about 3 months of age compared to the cumulative survival rates for both strains.

方、野生型マウスは約 24 ヶ月で半数のマウスが死亡した。このように SMP30 遺伝子破壊マウスは、野生型マウスに比べて寿命が 1/4 に短くなっていった。⁵⁾

4. SMP30 はビタミン C 合成系の酵素

生物の遺伝子解読を目指すゲノムプロジェクトが進行し、多種多様な生物の遺伝子が明らかになってきた。われわれは、米国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) の遺伝子データベースを用いた検索から、SMP30 が藍藻 (藍色細菌とも呼ばれる細菌の一種) にある酵素、グルコノラクトナーゼ (GNL) と非常によく似ていることを発見した。⁷⁾ 哺乳類において、GNL はビタミン C 合成経路の最後から 2 番目に位置する酵素であり、L-グルン酸を L-グルノ- γ -ラクトンへとラクトン化する。生成物は、次に酸化されビタミン C へと変換される (Fig. 4)。

われわれは SMP30 が GNL そのものではないかと考えて、GNL 活性を持つか検討した。⁷⁾ ラット肝臓から SMP30 を精製し、GNL 活性を測定した。その結果、 Mn^{2+} 又は Zn^{2+} 存在下で SMP30 濃度依存的に活性が認められた。また、GNL 活性を指標にしてラット肝臓から精製したタンパク質のアミノ酸配列は SMP30 と同一であった。さらに、大腸菌で発現させた SMP30 組換えタンパク質も、確かに GNL 活性を持っていた。SMP30 は、D-, L-グルコノ- δ -ラクトン、D-, L-グルノ- γ -ラクトン、D-, L-ガラクトノ- γ -ラクトンなどのアルドノラクトン (糖由来のラクトン化合物) に基質特異性を示した。このように SMP30 は間違いなく GNL であること

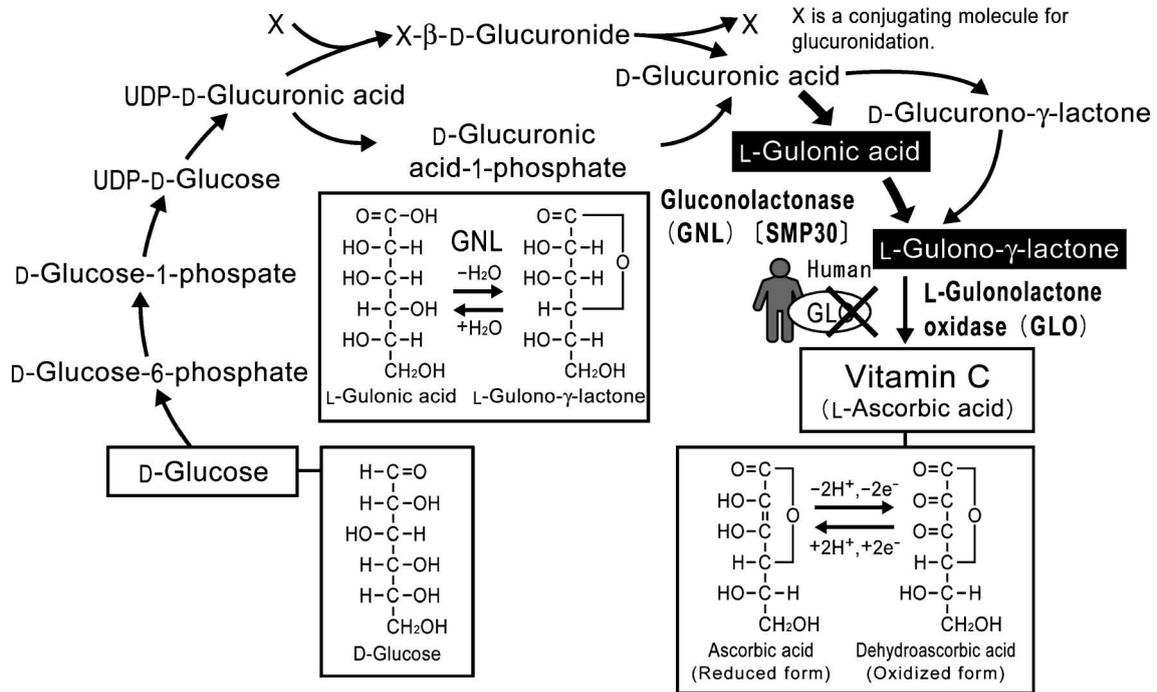


Fig. 4. Vitamin C Biosynthesis Pathway

The pathway from D-glucose to L-gulonic acid is shared with that of early steps in the uronic acid cycle. X is a conjugating molecule for glucuronidation. SMP30 is a gluconolactonase (GNL), which catalyzes from L-gulonic acid to L-gulonolactone. In humans, L-gulonolactone oxidase (GLO) is absent because of mutation.

が証明された。

5. SMP30/GNL 遺伝子破壊マウスはビタミン C 合成不全マウス

ヒト、サル、モルモットはビタミン C 合成の最後に位置する酵素 (GLO: L-グルノ- γ -ラクトン酸化酵素) に遺伝子変異があるため、体内でビタミン C を合成できない (Fig. 4)。しかし、マウスは GLO に変異がないため、体内でビタミン C を合成できる。SMP30/GNL は GLO の 1 つ手前に位置する酵素である。したがって、SMP30/GNL 遺伝子破壊マウスはビタミン C を合成できないはずである。そこで、ビタミン C を全く含まない餌で飼育したところ、SMP30/GNL 遺伝子破壊マウスは体重が減少し、コラーゲン繊維の構築不全による骨密度の低下、大腿骨の骨折、壊血病性念珠 (肋軟骨形成異常) などの典型的な壊血病 (ビタミン C 欠乏症) の症状を認めた (Fig. 5)。また、SMP30/GNL 遺伝子破壊マウスは餌を与えてから 136 日目までにすべて死亡した。死亡時の SMP30/GNL 遺伝子破壊マウスの肝臓、腎臓、血液中のビタミン C 含量は野生型マウスの 1.6% 以下と著しく低下していた。これらの結果から、SMP30/GNL はビタミン C 合

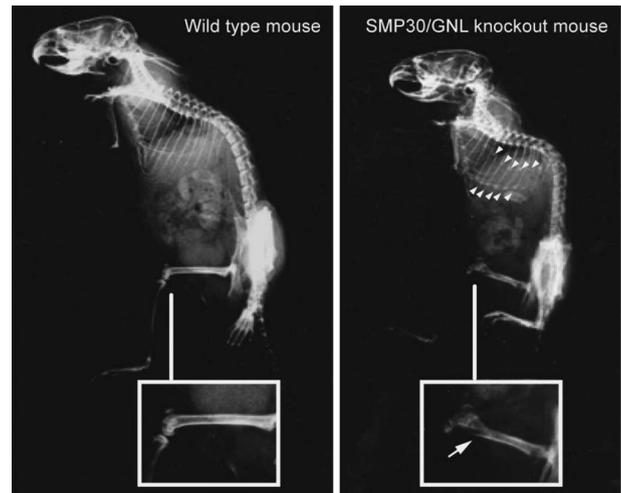


Fig. 5. Osteogenic Disorder of SMP30/GNL Knockout Mice

X-ray images show the skeletal structures of SMP30/GNL knockout and wild type mice. Insets: enlargements of the femoral region in which an arrow points to the distal femur fracture of an SMP30/GNL knockout mouse. Arrowheads indicate a rachitic rosary at the junction of costae and costal cartilage.

成において必須の酵素であることが明らかになった。

6. ビタミン C の長期的な不足は寿命を短くする

壊血病で死んだからといって、ビタミン C 不足

が老化を促進したとは言えない。われわれは SMP30 が GNL であることを明らかにする以前から、前述のように遺伝子破壊マウスの寿命が 1/4 に短くなっていることを明らかにしていた (Fig. 3)。しかし、この時には餌の中にごく少量のビタミン C が含まれていたため、壊血病にはならなかった。概算で、マウスが 1 日に必要とするビタミン C 量のわずかに約 2.5% が餌から取れていた計算になる。SMP30/GNL 遺伝子破壊マウスはビタミン C 不足状態が長く続いたため、寿命が 1/4 に短くなったのだと言える。以前からビタミン C には「抗老化作用」があると言われてきた。しかし、それを裏付ける科学的根拠はなかった。SMP30/GNL 遺伝子破壊マウスを用いたこれら研究成果がビタミン C の「抗老化作用」を科学的に裏付ける初めての報告である。

7. おわりに

SMP30 の発見以来、18 年の歳月を経て、やっと 1 つの確かな生理機能が解明された。すなわち、SMP30 はビタミン C 合成に必須の酵素 GNL である。

ヒトは体内でビタミン C を合成できない。したがって、ビタミン C を合成できない SMP30/GNL 遺伝子破壊マウスはヒトに極めて近いモデル動物であると言える。このマウスを用いた研究からビタミン C が長期的に不足すると寿命が短くなることがわかった。ビタミン C 不足による寿命の短縮は、生体内での ROS の過剰な生成やその蓄積が原因かは明らかではない。しかし、ビタミン C 欠乏により脳で ROS の 1 つであるスーパーオキシドアニオンラジカル (O_2^-) が増加することが明らかになっている。^{8,9)} また、ビタミン C と疾患に関する研究でもビタミン C 不足が喫煙による慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 発症リスクを高めることが明らかになっている。¹⁰⁾ COPD は高齢者に多い肺の生活習慣病であり、発症機構は未解明、そのため治療薬は全くない。十分なビタミン C の摂取が喫煙による COPD 発症リスクを下げられるかは大変興味深い。

しかし、依然としてヒトにおける SMP30 の生理機能は謎である。近い将来にその全容が解明される日が来ることを期待したい。

本総説に記載の動物実験は、「動物実験等の実施に関する基本指針」及び「動物愛護管理法」遵守の下、東邦大学実験動物委員会の承認を受けて行われた。

REFERENCES

- 1) Fujita T., Uchida K., Maruyama N., *Biochim. Biophys. Acta*, **1116**, 122–128 (1992).
- 2) Fujita T., Shirasawa T., Uchida K., Maruyama N., *Biochim. Biophys. Acta*, **1132**, 297–305 (1992).
- 3) Ishigami A., Maruyama N., *Geriatr. Gerontol. Int.*, **7**, 316–325 (2007).
- 4) Ishigami A., Fujita T., Handa S., Shirasawa T., Koseki H., Kitamura T., Enomoto N., Sato N., Shimosawa T., Maruyama N., *Am. J. Pathol.*, **161**, 1273–1281 (2002).
- 5) Ishigami A., Kondo Y., Nanba R., Ohsawa T., Handa S., Kubo S., Akita M., Maruyama N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **315**, 575–580 (2004).
- 6) Maruyama N., Ishigami A., Kuramoto M., Handa S., Kubo S., Imasawa T., Seyama K., Shimosawa T., Kasahara Y., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1019**, 383–387 (2004).
- 7) Kondo Y., Inai Y., Sato Y., Handa S., Kubo S., Shimokado K., Goto S., Nishikimi M., Maruyama N., Ishigami A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 5723–5728 (2006).
- 8) Kondo Y., Sasaki T., Sato Y., Amano A., Aizawa S., Iwama M., Handa S., Shimada N., Fukuda M., Akita M., Lee J., Jeong K.-S., Maruyama N., Ishigami A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **377**, 291–296 (2008).
- 9) Sato Y., Kajiyama S., Amano A., Kondo Y., Sasaki T., Handa S., Takahashi R., Fukui M., Hasegawa G., Nakamura N., Fujinawa H., Mori T., Ohta M., Obayashi H., Maruyama N., Ishigami A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **375**, 346–350 (2008).
- 10) Sato T., Seyama K., Sato Y., Mori H., Souma S., Akiyoshi T., Kodama Y., Mori T., Goto S., Takahashi K., Fukuchi Y., Maruyama N., Ishigami A., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **174**, 530–537 (2006).