

## 生殖と個体生存のバランスを制御する分子メカニズムの解明

所属 大阪大学 高等共創研究院

中村 修平

多くの生物で生殖能力は個体の生存・寿命と負の相関を示すことが知られており、個体レベルで生殖と個体生存のバランスを制御する機構が存在すると考えられるが、その実体は不明である。寿命研究のモデル生物である線虫においてもこの負の相関が認められ、野生型の生殖細胞をレーザーで除去すると寿命が約 60%延長することが分かっている。興味深いことに、生殖細胞除去による寿命延長は、生殖細胞の周りの生殖腺体細胞も除去するとキャンセルされる。従って、不妊であることではなく、生殖細胞と周囲の生殖腺体細胞からの拮抗するシグナルが寿命を制御していると考えられる(germline longevity 経路と呼ぶ)。これら拮抗するシグナル自体は依然として不明であるが、最近の報告から、生殖細胞の無い個体では脂肪酸の不飽和化、脂肪分解、オートファジーが亢進しており、かつ、これらがそれぞれ寿命延長に必須であることが明らかにされている。中でも、オートファジー活性の亢進は他の進化的にも保存された寿命延長経路(インシュリン/IGF-1 シグナル抑制、TOR シグナル抑制、ミトコンドリア機能低下、カロリー制限など)でも共通して認められており、またこの活性がこれらのすべての経路を介した寿命延長に必須であることから特に注目されている。しかしながら、生殖細胞除去にตอบสนองしてどのようにオートファジーが活性化されるのかは不明な点が多く、また活性化したオートファジーがどう寿命延長に寄与しているのかも明らかではない。これまで germline longevity 経路において同定された因子の多くは他の寿命制御経路でも働くことが知られており、この経路で生殖細胞除去にตอบสนองしてオートファジーを活性化する機構を明らかにすることで、多くの寿命制御経路で共通したメカニズムを明らかにすることにつながると考えられる。事実、申請者は最近、germline longevity 経路で働く新規転写因子 **MML-1**(哺乳類の MondoA, ChREBP のホモログ)を同定し、これが生殖細胞除去により活性化され(発現、核移行の増加)、オートファジーを活性化し寿命延長に寄与すること、さらにこの因子が他の寿命制御経路でも働くことを明らかにした (Nakamura et al., *Nat. Commun.*, 2016)。しかしながら MML-1 の詳細な作用機序については不明な点が多く残る。そこで本研究では、生殖腺からのシグナルにตอบสนองして MML-1 がどのように活性化されるのか、また MML-1 がどのようにオートファジー活性化と寿命延長に寄与するのかについて明らかにし、生殖と個体生存のバランスを担う分子メカニズムの理解につなげることを目的とした。生殖腺からのシグナルにตอบสนองして MML-1 がどのようにオートファジー活性化と寿命延長に寄与するのかを明らかにするため、特に 1)MML-1 の活性化機構の解明、2)MML-1 組織特異的機能の解明、3)オートファジー活性化、寿命制御における MML-1 作用機序の解明を目指し研究を進めた。

一年間の研究の進捗状況として、1)についてはまずMML-1の発現をモニター可能なMML-1::FLAGノックイン線虫を作成した。これを用いて野生型と生殖細胞除去個体において免疫沈降を行い、MML-1インターラクトーム解析からMML-1に結合しうる因子を同定している。この候補因子ノックダウンの解析から、MML-1活性化ならび寿命制御に寄与しうる候補を同定し、現在機能解析を進めている。2)については生殖細胞除去個体において組織特異的ノックダウンを可能にするストレインを作成し、これを用いてどの組織のMML-1やオートファジーの役割が寿命制御に必須かを調べた。この解析から特定の組織のMML-1やオートファジーの機能が寿命制御に必須であることを見出し、その詳細について現在解析を進めている。3)についてMML-1がどのよ

うにオートファジーを活性化するかを明らかにするため、いくつかのオートファジー因子の発現解析を進めた。その結果、オートファジーの負の制御因子Rubiconが生殖細胞の無い、寿命が伸びる線虫個体で野生型と比べて低下していることを見出した。今日まで多くのオートファジー関連遺伝子 (Autophagy Related Genes, ATG)が同定されているが、その多くが正の制御因子、すなわちその機能を抑制するとオートファジーが低下してしまう因子である。一方、Rubiconは数少ないオートファジーの負の制御因子として同定され、Rubiconを抑制するとオートファジーが活性化することが知られている非常にユニークな因子である。詳細なメカニズムは未だ不明であるが、Rubiconは別のオートファジー制御因子であるBeclin1を含むクラスIII PI3キナーゼ複合体の一部として働きオートファゴソームとリソソームの融合を阻害していると思われる。上述の発現解析の結果をもとに、Rubiconと老化との関連を線虫、ショウジョウバエ、マウスを用いて調べることとした。興味深いことに、さらに詳細な遺伝子発現解析の結果から線虫、ショウジョウバエ、マウスの腎臓、肝臓などで加齢に伴いRubiconが増加することを見出した。多くの生物で加齢に伴いオートファジー活性は低下することが報告されているが、そのメカニズムはよくわかっていない。我々の観察結果から、オートファジーの負の制御因子であるRubiconの増減と寿命や老化との関連が示唆され、Rubicon増加が加齢によるオートファジー低下の要因なのではないかという仮説に至った。そこでこの仮説を検証するため、Rubiconを抑制するとオートファジーや老化の表現系がどうなるかを調べてみた。RNAiを用いたノックダウンによりRubiconを抑制した線虫のオートファジー活性を調べてみるとGFP::LGG-1でラベルされるオートファゴソームの数がコントロールと比べて増加しており、哺乳類同様にオートファジーが活性化していることがわかった。さらに興味深いことにRubiconをノックダウンした個体の寿命が伸びることが明らかとなった。同様にショウジョウバエにおいても特に雌ではRubicon抑制によってオートファジーの活性化とともに50%生存期間 (Median lifespan)の延長がみられた。線虫においてRubiconと同時にオートファジーに必須の因子であるbec-1 (哺乳類Beclin1ホモログ)などをノックダウンすると寿命延長がキャンセルされることから、Rubicon抑制による寿命延長がオートファジーの活性化に依存していることが示された。さらにトラッキングの解析からRubiconを抑制した線虫では加齢に伴い低下することが知られている運動機能が改善していること、さらにこの改善はオートファジーの活性に依存的していることがわかった。また、Rubiconを抑制した線虫では、老化に伴い増加し神経変性疾患の原因となる易凝集性タンパク質の蓄積も軽減していた。Rubiconは基本的にほぼ全ての組織で発現しているが、組織特異的ノックダウンの結果、興味深いことに神経系でRubiconを抑制した際に最も効果的な寿命延長効果が得られることがわかった。ほぼ同様の結果がショウジョウバエでも得られており、二つの種で保存された機構があることが示唆されている。神経系でのRubicon抑制やオートファジー活性化がなぜ寿命延長につながるのかについては今後調べてゆくべき課題である。次に、Rubicon抑制が哺乳類でも老化関連の表現系に影響を与えるかを調べた。加齢に伴い増加することが知られている腎臓の線維化を調べたところ、Rubiconノックアウトマウスではコントロールと比較してコラーゲンの蓄積が軽減しており線維化の有意な軽減が見られた。また、 $\alpha$ シヌクレインタンパク質が凝集・伝播していくことがパーキンソン病の原因の一つと考えられるが、これについてもRubiconノックアウトマウスで低下しており、Rubicon抑制がこの病態の抑制に寄与していることが示された。これらのことから、Rubicon抑制によるオートファジー活性化、抗老化メカニズムが種を超えて保存されている可能性が示唆され、またRubiconの増加が加齢によるオートファジー低下の要因の一つであることが我々の解析から初めて示された (Nakamura et al., Nat Commun, 2019)。