

平成12年度厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

老化による熱産生機能低下の原因解明と

予防に関する基礎的研究

(H12-長寿-012)

研 究 報 告 書

主任研究者 山下 均

平成13年3月

## 目次

I. 総括研究報告	
老化による熱産生機能低下の原因解明と予防に関する基礎的研究	----- 1
山下 均	
II. 分担研究報告	
1. 熱産生蛋白質欠損マウスを用いた老化過程における熱産生機能低下の メカニズムの解明	----- 7
山下 均	
2. 熱産生に対する栄養条件の影響に関する分子遺伝学的解析	----- 11
堀尾 文彦	
3. 免疫系細胞における熱産生誘導機構と細胞老化に関する研究	----- 15
西尾 康二	
4. 骨格筋におけるエネルギー代謝および熱産生と加齢変化	----- 20
佐藤 祐造	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 24

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書

老化による熱産生機能低下の原因解明と予防に関する基礎的研究

主任研究者 山下 均 国立療養所中部病院 長寿医療研究センター  
分子遺伝学研究部 分子生物学研究室 室長

研究要旨 加齢に伴う熱産生機能の低下は、種々の生理機能の低下のみならず、肥満や糖尿病などの生活習慣病の発症と関連する。我々は、熱産生機能低下の原因を明らかにするためにミトコンドリア脱共役蛋白質（UCP）群に注目し、2つの新しいマウスモデル系、加齢ラットおよび細胞培養系を用いて検討を行った。その結果、UCPは寒冷環境における熱産生/体温維持だけではなく、エネルギー消費や抗酸化作用などとも関連することが強く示唆された。UCP熱産生機能の維持と活性化は老化の予防や付随する代謝性疾患の予防・治療につながる可能性が高いと考えられる。

分担研究者

堀尾文彦 助教授

名古屋大学大学院生命農学研究科  
応用分子生命科学バイオモデリング講座

西尾康二 助手

名古屋大学大学院医学研究科  
機能形態学講座

佐藤祐造 教授

名古屋大学総合保健体育科学センター

能力（食事誘導性熱産生）の低下により肥満を引き起こすことが明らかになっている。多くの疫学的研究は、肥満者が痩せると平均余命が延びることを示している。しかし、このように生命活動の様々な領域で作用する基本的な機能であるにもかかわらず、熱産生機能については今尚不明な点が多く残されている。

熱産生蛋白質として発見された脱共役蛋白質（UCP）は、エネルギー産生のあるミトコンドリアに存在し、糖や中性脂肪などの酸化的リン酸化により生じたプロトンを ATP 合成と共役することなく熱として消費する働きを有すると考えられている。また最近、ミトコンドリアの呼吸鎖で生じたプロトンは活性酸素生成の要因ともなるが、UCP は余剰のプロトンを消費することにより過酸化水素などの生成を抑制する役割を持つ可能性も示唆されている。本研究は、詳細な熱産生のメカニズムの理解と

A. 研究目的

熱産生機能は、体温の調節・維持のみならず、エネルギーの備蓄と消費、感染防御、脳内温度の調節による睡眠・覚醒の制御などと密接に係る重要な生理機能である。これらの熱産生機能の低下は、ヒトを含む加齢動物で一般的に認められる変化であり、細菌感染に対する抵抗性（免疫応答性熱産生）や耐寒性（寒冷誘導性熱産生）の低下、あるいは過剰に摂取したエネルギーの消費

老化過程における種々の熱産生機能の低下と栄養、環境温度、細菌感染、ストレスなどの環境要因との関連について、熱産生蛋白質の働きを中心に発生工学的手法や分子遺伝学的手法を用いて細胞、組織、個体レベルで明らかにすることを目的とする。

## B. 研究方法

(1) 非ふるえ熱産生において中心的役割を果たすミトコンドリア脱共役蛋白質 I 型 (UCP1) 欠損マウスを用いて、UCP1 欠損が老化とエネルギー代謝に関連する種々の表現型や寿命に及ぼす影響とそのメカニズムを、生理学並びに分子生物学的手法を用いて検討した。

(2) 加齢と共に肥満及びインスリン非依存性糖尿病を発症するマウスとして選抜された SMxA-5 マウスを含む SMxA-リコンビナント・インブリード (SMxA-RI) マウス系統とその親株である SM/J と A/J マウスを用いて、骨格筋における UCP3 の発現レベルと糖代謝との関連を検討した。また、21 種類の SMxA-RI マウスを用いて量的遺伝子座 (QTL) 解析を実施した。

(3) *In vitro* aging との関連から、分裂回数の異なる各種ヒト培養細胞における UCP2 遺伝子の発現変動を調べた。また、UCP2 は免疫系組織において高い発現が認められることからマクロファージ系培養細胞における UCP2 の発現誘導機構と免疫系での役割について細胞生物学並びに生化学的手法を用いて解析した。

(4) 寒冷環境下における骨格筋のふるえ熱産生との関連から、老若ラットを 5℃環境下で 24 時間飼育し、筋タイプ間における UCP3、脂肪酸結合蛋白質 (HFABP)、

グルコース輸送体 4 型 (GLUT4) の遺伝子発現の違いや加齢の影響を分子生物学的手法を用いて検討した。

## C. 研究結果

(1) UCP1 欠損マウスの表現型変化に対する加齢の影響についての解析を進めた結果、UCP1 欠損マウスは生後 1 ヶ月まで発育の遅れがあることが明らかとなった。しかし、この遅れは性成熟の終了する 3 ヶ月齢までに解消され、6 ヶ月齢まで体重や体温について正常マウスとの間に有意な差はみられていない。しかし、UCP1 欠損マウスの雄は正常マウスに比べて過食であることが明らかになった。また、UCP1 欠損マウスは正常マウスと比べて若齢時には良好な耐糖能を持つが、加齢に伴い耐糖能の悪化と肥満度の上昇が観察された。

(2) SMxA-5 マウスを用いた解析から、骨格筋における UCP3 発現量の低さが糖尿病形質の発現に寄与している可能性が示唆された。また、SMxA-RI マウス系統からのデータと Strain distribution patterns を用いた QTL 解析により、肥満と糖代謝に関与する遺伝子座が各々第 1, 6, および 2, 10, 18 番染色体上に存在することが明らかになった。

(3) 3 つの異なるヒト組織 (皮膚、肺、血管内皮) 由来の培養細胞における UCP2 遺伝子発現量は、老化した細胞で低下していた。単球系細胞を用いた検討から、マクロファージへの分化によりミトコンドリアの酸化機能が著明に亢進すると共に、UCP2 の発現レベルも大きく上昇することが明らかとなった。

(4) 寒冷環境下におけるラット骨格筋で

の UCP3 遺伝子発現は、若齢ラットの腓腹筋(速筋)において強く誘導されたが、老齢ラットではその発現量にほとんど変化はみられなかった。ヒラメ筋(遅筋)ではUCP3 遺伝子の発現は逆に低下した。HFABP と GLUT4 の遺伝子発現は老若ラットの腓腹筋で寒冷曝露により上昇し、脂肪酸と糖の取り込みと供給レベルの上昇が推察された。

#### D. 考察

熱産生機能は、我々恒温動物の生存にとって必須の機能であり、誕生以降様々な局面で生体のホメオスタシスを保つために利用される。例えば、皮下脂肪のほとんどない出生直後の新生児は、まず自ら熱を作って体温を維持し外界に適応しなければならない。UCP1 は非ふるえ熱産生の主要組織である褐色脂肪組織で特異的に発現され、寒冷曝露により強く誘導されることが知られている。今回我々の研究から、UCP1 の欠損が出生後の外気温への適応と発育に大きく影響することが明らかになった。寒冷環境下では、UCP1 の早い誘導に続き UCP2 もゆるやかに誘導される。ラットを用いた解析から、寒冷曝露により解糖系の発達した速筋で UCP3 遺伝子の発現上昇が明らかとなり、骨格筋ふるえ熱産生における役割が強く示唆された。また、UCP3 遺伝子レベルの上昇は老齢ラットではみられないことから、他の UCP と同様に、寒冷刺激に応答した骨格筋での UCP3 遺伝子の発現誘導能の低下が老齢動物の耐寒性低下の一因である可能性が考えられた。

一方、室温飼育環境（～23℃）に適応した 2～11 ヶ月齢の UCP1-KO マウスの体温は正常マウスと差がなかったが、加齢

に伴う耐糖能の低下と肥満傾向が観察されたことは、UCP1 欠損が成熟後のエネルギー代謝においても重要であること、その影響が加齢と共に顕在化してくることを示唆するものと考えられた。肥満は、近年増え続ける糖尿病の主要なリスクファクターであり、今尚明らかではない原因の解明と予防法・治療法開発のための動物モデルは極めて重要である。興味あることに、今回我々が利用した SMxA-RI マウス系統、特に加齢と共に糖尿病を発症する SMxA-5 マウスは UCP3 発現レベルが低く、骨格筋熱産生並びにエネルギー消費が低下していることが予想された。最近、UCP3 と糖代謝やインスリン抵抗性との関連が指摘されており、SMxA-5 マウスは熱産生機能と関連する糖尿病モデルマウスとして今後の解析が期待される。さらに、SMxA-5 マウスを含む 21 種類の SMxA-RI マウスを用いた QTL 解析から、従来報告されていない第 10 染色体遺伝子座の関与などが明らかになったことは大きな成果であり、責任遺伝子の同定を今後進めていく。

酸化ストレスによるダメージの蓄積が老化の大きな原因となると考えられている。最近、UCP の新たな機能として抗酸化システムの中での役割が示唆されている。免疫系細胞は、この抗酸化システムを巧みに利用し異物排除に利用してきた。今回我々が見出したマクロファージの分化およびミトコンドリア酸化機能の亢進と UCP2 の発現誘導の結果は、この分子が活性酸素生成の調節役として働いている可能性を示唆するものと考えられる。UCP2 は他の UCP と異なり免疫系細胞を含む殆どの組織で発現されていることから、UCP2 の機能低下

は全身的な酸化ストレスの上昇につながるかもしれない。従って、UCP2 機能の維持と活性化は老化の予防につながる可能性があり、その詳細な分子機構の解明が待たれる。

#### E. 結論

熱産生蛋白質として発見された UCP は、エネルギー消費や抗酸化作用などとも関連する多機能分子と考えられつつあり、今回の結果はそれを支持するものであった。すなわち、UCP 熱産生機能の維持と活性化は老化の予防や加齢に伴う肥満や糖尿病など生活習慣病発症の予防・治療につながる可能性が高いと考えられる。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Mizuno, T., Miura-Suzuki, T., Yamashita, H., and Mori, N. Distinct regulation of brain mitochondrial carrier protein-1 and uncoupling protein-2 genes in the rat brain during cold exposure and aging. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 278:691-697, 2000.
- 2) Ohno, T., Horio, E., Tanaka, S., Terada, M., Namikawa, T. and Kitoh, J. Fatty liver and hyperlipidemia in IDDM (insulin-dependent diabetes mellitus) of streptozotocin-treated shrews. *Life. Sci.* 66: 125-131, 2000.
- 3) Anunciado, R.V.P., Imamura, T., Ohno, T., Horio, E. and Namikawa, T. Developing a new Model for non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) by using the Philippine wild

mouse, *Mus musculus castaneus*. *Exp. Anim.* 49: 1-8, 2000.

- 4) Anunciado, R.V.P., Horio, E., Ohno, T., Tanaka, S., Nishimura, M. and Namikawa, T.: Characterization of Hyperinsulinemic Recombinant inbred (RI) strains (SMXA-5 and SMXA-9) derived from normoinsulinemic SM/J and A/J mice. *Exp. Anim.* 49: 83-90, 2000.
- 5) Anunciado, R.V.P., Ohno, T., Mori, M., Ishikawa, A., Tanaka, S., Horio, E., Nishimura, M. and Namikawa, T. Distribution of body weight, blood insulin and lipid levels in the SMXA recombinant inbred strains and the QTL analysis. *Exp. Anim.* 49: 217-224. 2000.
- 6) Watanabe, D., Honda, T., Nishio, K., Sugiura, Y. and Nishiyama, Y. Corneal infection of herpes simplex virus type 2-induce neuronal apoptosis in the brain stem of mice with expression of tumor suppressor (p53) and transcription factors. *Acta Neuropathol (Berl)* 100: 647-653, 2000.
- 7) C.Nakao, T.Ookawara, T.Kizaki, S.Oh-ishi, H.Miyazaki, S.Haga, Y.Sato, L.L.Ji and H.Ohno. Effects of swimming training on three superoxide dismutase isoenzymes in mouse tissues. *J.Appl.Physiol.* 88: 649-654, 2000.
- 8) Y.Shimomura, T.Murakami, N.Nakai, M.Nagasaki, M.Obayashi, Z.Li, M Xu, Y.Sato, T.Kato, N.Shimomura, N.Fujitsuka, K.Tanaka and M.Sato. Suppression of glycogen consumption during acute exercise by dietary branched-chain amino acids in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 46: 71-77, 2000.
- 9) C.Nakao, T.Ookawara, Y.Sato, T.Kizaki,

N.Imazeki, O.Matsubara, S.Haga, K.Suzuki, N.Taniguchi and H.Ohno. Extracellular superoxide dismutase in tissues from obese (ob/ob) mice. *Free Rad Res.* 33: 229-241, 2000.

10) Y.Oshida, Y.Tachi, Y.Morishita, K.Kitakoshi, N.Fuku, Y-Q. Han, I.Ohsawa and Y.Sato. Nitric oxide decreases insulin resistance induced by high-fructose feeding. *Hormone and Metabolic Research*, 32: 339-342, 2000.

11) M.Xu, N.Nakai, K.Ishigure, T.Nonami, M.Nagasaki, M.Obayashi, Z Li, Y.Sato, N.Fujitsuka, T.Murakami and Y.Shimomura. The  $\alpha$ -ketoisocaproate catabolism in human and rat livers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276: 1080-1084, 2000.

12) M.Nagasaki, N.Nakai, Y.Oshida, Z.Li, M. Xu, M.Obayashi, T.Murakami, A.Yoshimura, N.Fujitsuka, Y.Shimomura and Y.Sato. Exercise training prevents maturation-induced decreases in insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in rat skeletal muscle. *Metabolism* 49: 954-959, 2000.

## 2. 学会発表

1) 山下 均、水野隆文、鈴木友子、森 望：老化に伴う熱産生機能の低下と骨格筋におけるミトコンドリア脱共役蛋白質の発現誘導の変化。第 23 回日本基礎老化学会大会、2000 年 6 月、大府。

2) 森 望、曾根秀明、小島拓哉、山下 均、吉川義顕、高田慎治、中村岳史：リン酸化チロシンアダプター分子 p66-Shc の遺伝子ノックアウトによるマウスの寿命延長および Shc 関連遺伝子群の加齢応答。第 23 回日本基礎老化学会大会、2000 年 6 月、大府。

3) 紺谷靖英、王作成、水野隆文、鈴木友子、佐藤祐造、山下 均、森 望：骨格筋におけるミトコンドリア脱共役蛋白質の発現に対する加齢、神経切除の影響。第 73 回日本生化学会大会、2000 年 10 月、横浜。

4) 山下 均、佐藤祐造：UCP1 遺伝子の発現調節と肥満。第 21 回日本肥満学会、2000 年 10 月 20 日、名古屋。

5) Yamashita, H. Age-related decline in thermogenesis and uncoupling proteins. GRC-NILS workshop, 26th Oct., 2000, Baltimore.

6) 小林美里、堀尾文彦、河合隆博、辻厚至、大野民生、西村正彦、野口民夫：リコンビナント・インブレッド (RI) 系マウスである SMXA-RI 系統における系統間での耐糖能と血中インスリン濃度の違い。日本農芸化学会 2000 年度大会、2000 年 4 月、東京。

7) 小林美里、大野民生、河合隆博、辻厚至、西村正彦、堀尾文彦：SMXA-RI (リコンビナント・インブレッド) 系マウスにおけるマウスにおける耐糖能と血中インスリン濃度の遺伝解析。日本農芸化学会 2001 年度大会、2001 年 3 月、京都。

8) 佐々木淳治、西尾康二、井上晃、腫抑制蛋白質 p 53 のビメンチンへのアンカーリング機能ドメインの解析。第 23 回日本基礎老化学会、2000 年 6 月、大府。

9) K., Nishio, J., Sasaki. and A., Inoue. Vimentin-dependent cytoplasmic anchoring of p53 mutant that are defective in both apoptosis and G1-arrest. International congress on differentiation, molecular and cell biology. Gold Coast, Sept. 2000.

10) 韓 艶清、押田 芳治、北越 香織、福 典之、佐藤 祐造：身体トレーニング

のインスリン感受性改善効果に関する研究  
-NO とグルコサミンの果たす役割-。第  
43 回日本糖尿病学会年次学術集会.名古屋.  
2000 年 5 月。

11)徐 明、中井 直也、下村 吉治、長  
崎 大、押田 芳治、佐藤 祐造：糖尿病  
および運動トレーニングがラット肝臓の  $\alpha$ -  
-ketoisocaproate(KIC)-dioxygenase 活  
性に及ぼす影響。第 43 回日本糖尿病学会  
年次学術集会.名古屋. 2000 年 5 月。

12) F.Kawano, T.Nomura, M.S. Kang,E.Y.Han,  
Y.C.Chiu, J.H.Lee, Y.Sato and Y.Ohira.  
Respects of back muscle fibers to chronic hind-  
limb susbention. International Conference on  
the Biochemistry of Exercise: Molecular  
Aspects of Physical Activity and Aging. Little  
Rock, Jun. 2000.

13) K.Kitakoshi, Y.Oshida, Y.Han, N.Fuku,  
N.Nakai and Y.Sato. Additive effects of  
troglitazone and tunning on insulin resistance  
induced by high fructose diet in rats.  
International Conference on the Biochemistry  
of Exercise: Molecular Aspects of Physical  
Activity and Aging. Little Rock, Jun. 2000.

14) T.Takeyasu, N.Fuku, Y.Oshida, M.Higuchi,  
M.Tanaka and Y.Sato. Mitochondrial ATP  
synthase polymorphism associated with  
exercise endurance. International Conference  
on the Biochemistry of Exercise: Molecular  
Aspects of Physical Activity and Aging.  
Little Rock, Jun. 2000.

15) Y.Sato. Effects of physical training on the  
decreased insulin action caused by diabetes,  
obesity and aging: molecular biological studies.  
International Conference on Exercise and  
Nutrition for Better Health and Chronic

Disease. Beijing, Jun. 2000.

16) 佐藤祐造：肥満運動療法の今日的課題。  
会長講演、第 21 回日本肥満学会.名古屋.  
2000 年 10 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。



厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

熱産生蛋白質欠損マウスを用いた老化過程における熱産生機能低下のメカニズムの解明

主任研究者 山下 均 国立療養所中部病院長寿医療研究センター  
分子遺伝学研究部 分子生物学研究室 室長

研究要旨 熱産生蛋白質であるミトコンドリア脱共役蛋白質I型（UCP1）を欠損するマウスの表現型の加齢変化を体温調節機能及びエネルギー代謝との関連から検討した。その結果、UCP1欠損マウスにおいて少なくとも離乳後成熟期まで、室温環境下における体温調節の異常は認められないが、加齢と共に耐糖能が低下し肥満になる傾向が認められた。これらの結果は、UCP1が寒冷環境下における体温調節のみならずエネルギー代謝においても重要な役割を果たすこと、その影響が加齢と共に顕在化してくることを強く示唆するものと考えられた。

#### A. 研究目的

老化によるエネルギー代謝及び熱産生機能の低下は、肥満や耐寒性の低下と関連し、中高年者の健康にとって重大な問題である。熱産生蛋白質として知られるミトコンドリア脱共役蛋白質(Uncoupling protein, UCP)は、熱産生を介してエネルギーを消費し、エネルギー代謝に深く関わる。また、細胞内の活性酸素レベルの調節にも関連することが示唆されている。しかし、褐色脂肪組織のみに存在する UCP1 の役割は、げっ歯類に比べてヒトでは極めて小さく UCP1 に依存しない機構の重要性が示唆される。一方、最近新たに UCP1 のホモログとして発見された UCP2 と UCP3 は、ヒト成人でも白色脂肪組織や骨格筋などで発現が認められている。本研究は、UCP1 欠損 (UCP1-KO) マウスを用いて老化過程における熱産生機能及びエネルギー代謝の低下のメカニズムを明らかにすることを

目的とする。

#### B. 研究方法

(1) UCP1 欠損 (UCP1-KO) マウスの表現型の加齢変化の解析

動物個体の表現型は、その個体の遺伝的背景と環境要因により大きく影響を受ける。特に加齢の効果を検討する場合、飼育環境の均質化とコンジェニックな実験動物の利用が重要である。我々は、スピードコンジェニック法を用いて UCP1-KO マウスを C57BL/6J マウスに戻し交配することにより、C57BL/6J の遺伝的背景のみを受け継ぐ UCP1-KO マウスを作製した。Wild type マウスと UCP1-KO マウス (N12 ~ N14) は生後 3 ヶ月間標準食で飼育した。次に各マウスを 2 群に分け、それぞれ標準食 (CE-2, 日本クレア) 又は高脂肪食 (CE-2+粉末牛脂 20%) で飼育を開始し、1 ヶ月毎に血糖量、食餌摂取量、体重の測定を行った。ま

た、3ヶ月毎に血液サンプルを用いてインスリン、レプチン、遊離脂肪酸、コレステロールなどを測定した(24ヶ月齢まで継続予定)。

## (2) 老若マウスの表現型比較

10週齢と10~11ヶ月齢のマウスについて肥満度と耐糖能を調べた。また、老齢マウスの各組織より Total RNA を調製しノーザンブロット法により UCP 遺伝子発現を比較検討した。肥満度は、生殖器周囲、鼠径、後腹膜部位より採取した白色脂肪組織から算出した。耐糖能は、15時間絶食後1.5又は2.0g/Kg体重のグルコースを腹腔に投与し、0、30、60、120分後に血糖値を測定した。

## C. 研究結果

UCP1-KOマウスの体重は、離乳時(生後23~27日)において雄雌共に Wild type 及び Hetero type マウスの体重より約20%少なかった。しかし、3ヶ月齢では Wild type マウスの体重に追いつき、その後6ヶ月齢までは Wild type マウスとの間に有意な差はみられていない(標準食群)。高脂肪食群(雄のみ)も6ヶ月齢までは差がみられない。直腸温も2~6ヶ月齢まで両群間に差は認められなかった。標準食群の食餌摂取量は、雌では6ヶ月齢まで Wild type と KO マウスの間に差はないが、雄では KO マウスの摂食量が4及び5ヶ月齢で有意に多かった。しかし、高脂肪食群では Wild type と KO マウスの間に差はみられていない。血糖値(随時)は3ヶ月齢で雄雌共に両群間に差はないが、インスリンレベルは雄で KO マウスの方が有意に低かった(標準食群、高脂肪

食群は未測定)。標準食群3ヶ月齢の血清コレステロール、遊離脂肪酸レベルは雄雌共に両群間で差はなかった。

次に、10週齢と10~11ヶ月齢の老若マウスについて種々の表現型を比較検討した。体重は、老若マウスにおいて KO マウスと Wild type 又は Hetero type マウスの間に差はみられなかった。しかし、肥満度の指標である Adiposity Index は、若齢では KO マウスと Wild type 又は Hetero type マウスの間に差はみられなかったが、老齢では KO マウスの方が Wild type マウスよりも高かった(Wild type マウス雄 W1: 3.19, W2: 3.21, 雌 W3: 4.59; KO マウス雄 K1: 4.86, 雌 K2: 6.16, K3: 5.14)。耐糖能は、若齢では雄雌共に KO マウスの方が Wild type 及び Hetero type マウスに比べて優れていた。一方、老齢では逆に KO マウスの方が Wild type マウスよりも耐糖能が劣っているように思われた。老齢マウスにおける UCP2 と UCP3 の遺伝子発現は、褐色脂肪組織における UCP2 mRNA レベルにやや差があるものの、調べた他の大部分の組織で違いはみられなかった。

## D. 考察

今回作製したコンジェニック UCP1-KO マウスは、離乳時において Wild type 及び Hetero type マウスよりも有意に小さかった。しかし、この発育の遅れは3ヶ月齢までに取り戻され正常に発育するので、UCP1欠損の影響が一時的なものでありマウスの成熟を妨げるものではないと思われる。UCP1-KO マウスは出生後の熱産生/体温維持に重要な UCP1 が欠損

するため、UCP1 に代わる熱産生機能の発達 (UCP2 の代償的誘導など?) に時間とエネルギーを必要とし、その環境適応の遅れが授乳行動などに影響し発育の遅れにつながっている可能性が考えられる。

また現在のところ、コンジェニック UCP1-KO マウスは非コンジェニック UCP1-KO マウスと同様に、6 ヶ月齢までは高脂肪食飼育においても肥満になっていない。最近報告された UCP3 トランスジェニックマウスは過食だが肥満にならず正常マウスより痩せている。加えて、脂肪組織特異的に UCP2 の発現量を高めたトランスジェニックマウスは高脂肪食飼育でも肥満にならないことが報告されている。面白いことに UCP1-KO マウスの雄はやや過食であることが明らかになった。にもかかわらず優れた耐糖能を有し肥満にならないのは、出生時に代償的に誘導された UCP2 の効果によるのかもしれない。

一方、老齢 (10~11 ヶ月齢) マウスを用いた基礎検討から、UCP1-KO マウスは正常マウスよりも adiposity が高く耐糖能が悪いことが示唆された。また、若年マウスでみられた褐色脂肪組織における UCP2 遺伝子の強い誘導が、老齢 UCP1-KO マウスでは減弱しているように思われた。ヒトを含む哺乳動物では熱産生機能が加齢と共に低下すること、老齢ラットでは脂肪組織における UCP2 遺伝子の誘導に異常がみられることから、UCP1-KO マウスにおいて代償的に誘導された UCP2 の加齢に伴う低下がその表現型の変化に関連している可能性がある。加齢の影響を明確にするには今後のさらなるデータの蓄積を待たねばならない。

以上のように、UCP1-KO マウスは室温環境下における体温維持に問題はみられない (2~11 ヶ月齢) が、加齢と共に耐糖能が低下し肥満になる可能性が示唆された。また、今回得られた結果は非コンジェニック UCP1-KO マウスでは明確ではなかったものであり、UCP1-KO マウスのコンジェニック化により明らかになった表現型と考えられる。

## E. 結論

我々の開発したコンジェニック UCP1-KO マウスは、加齢に伴う熱産生機能及びエネルギー代謝の低下のメカニズムを明らかにするための良い動物モデルになると思われる。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Mizuno, T., Miura-Suzuki, T., Yamashita, H., and Mori, N. (2000) Distinct regulation of brain mitochondrial carrier protein-1 and uncoupling protein-2 genes in the rat brain during cold exposure and aging. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 278:691-697.

### 2. 学会発表

1) 山下 均、水野隆文、鈴木友子、森 望：老化に伴う熱産生機能の低下と骨格筋におけるミトコンドリア脱共役蛋白質の発現誘導の変化。第 23 回日本基礎老化学会大会、2000 年 6 月、大府。

2) 森 望、曾根秀明、小島拓哉、山下 均、

吉川義顕、高田慎治、中村岳史：リン酸化チロシンアダプター分子 p66-Shc の遺伝子ノックアウトによるマウスの寿命延長および Shc 関連遺伝子群の加齢応答。第 23 回日本基礎老化学会大会、2000 年 6 月、大府。

3) 紺谷靖英、王作成、水野隆文、鈴木友子、佐藤祐造、山下 均、森 望：骨格筋におけるミトコンドリア脱共役蛋白質の発現に対する加齢、神経切除の影響。第 73 回日本生化学会大会、2000 年 10 月、横浜。

4) 山下 均、佐藤祐造：UCP1 遺伝子の発現調節と肥満。第 21 回日本肥満学会、2000 年 10 月 20 日、名古屋。

5) Hitoshi Yamashita: Age-related decline in thermogenesis and uncoupling proteins. GRC-NILS workshop, 26th Oct., 2000, Baltimore.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

熱産生に対する栄養条件の影響に関する分子遺伝学的解析

分担研究者 堀尾 文彦 名古屋大学大学院生命農学研究科 助教授  
応用分子生命科学バイオモデリング講座

研究要旨 (1)新規な糖尿病モデルマウスになる可能性を有する系統 (SMXA-5 系統)の特性を熱産生に着目して明らかにすること、(2)この系統を含む SMXA-リコンビナント・インブリード(SMXA-RI)系統群を用いて糖尿病発症遺伝因子の染色体マッピングを行うことを目的とした。(1)6週齢の雄の SMXA-5 および対照系統の SM/J,A/J 系統に、調製飼料（12%カゼイン、5%コーン油）を与えることにより栄養条件を一定にして飼育したところ、この系統は若齢期（2ヶ月齢前後）から軽度の肥満、耐糖能異常、高インスリン血症を示した。この糖尿病の発症機構として、インスリン抵抗性の存在が一因として考えられた。これらの3系統について各組織の UCP の mRNA 発現レベルを比較したところ、興味あることに骨格筋（ヒ腹筋）の UCP3 mRNA レベルは、SM/J に比べて SMXA-5 と A/J では顕著に低かった。SMXA-5 では骨格筋での熱産生が低く、このことがインスリン抵抗性および肥満に寄与している可能性が考えられた。(2)21系統の SMXA-RI 系統（各系統10匹ずつ）の肥満度、脂肪組織重量、耐糖能を測定して、これらの形質を支配する遺伝子の量的遺伝子座解析を行った。その結果、肥満度に関しては第1および6染色体の A アリルが肥満促進作用を有していることが示唆された。また、耐糖能に関しては、第2および18染色体の A アリルと、第10染色体の SM アリルが耐糖能増悪作用を有していることが示唆された。

A. 研究目的

2型糖尿病は、aging に伴って起こってくる代謝性疾患の代表的なものの一つである。2型糖尿病のほとんどは多因子性であり、その発症機構および発症遺伝子を探求するためには、まだまだ多数のモデル動物の開発が必要である。本研究では、新規な糖尿病モデルマウスになる可能性を有する SMXA-5 系統の特性を明らかにすることと、この系統の関連系統群を用いた量的遺伝子

座(Quantitative Trait Loci: QTL)解析により糖尿病発症遺伝因子の染色体マッピングを行うことを目的としている。SMXA-5 系統は、今までの我々の解析結果から、軽度の肥満を呈するモデル系統である。近年、肥満 - エネルギー代謝 - 糖尿病を結ぶライン上の重要な因子として、各組織での熱産生があげられる。この熱産生を制御する脱共役タンパク質 (Uncoupling protein: UCP) に着目し、SMXA-5 系統においてこの遺伝

子発現が対照系統に比べて違いがあるかを検討した。

## B. 研究方法

### (1) SMXA-5 系統マウスの糖尿病形質の解析

6週齢の雄の SMXA-5 系統マウスに調製飼料（12%カゼイン、5%コーン油）を与えて、2カ月齢、3カ月齢および5カ月齢時に、肥満度、血糖値、血中インスリン濃度、グルコース誘導性インスリン分泌能を測定し、耐糖能試験およびインスリン負荷試験を行った。またそれぞれの時期に、副睾丸脂肪組織（白色脂肪）、肩甲骨間褐色脂肪組織および骨格筋での脱共役タンパク質（uncoupling protein: UCP）1、2および3の mRNA レベルを測定した。対照系統として、SM/J と A/J 系統を用いた。

### (2) SMXA-RI 系統を用いた肥満および糖尿病形質を支配する遺伝因子の染色体マッピング

SMXA-5 を含む 21 系統の SMXA-RI 系統（雄）を用いて、6週齢から前記の調製飼料を与えて、3カ月齢と5カ月齢まで飼育した。両時点において、肥満度、耐糖能、血糖値、血中インスリン濃度を測定した。SMXA-RI 系統は、SM/J と A/J マウスから作出されたリコンビナント・インブリード系統である。SMXA-RI 系統の各系統の染色体の 400 箇所において、SM/J アリルなのか A/J アリルなのかが調べられ Strain Distribution Pattern (SDP) が作製されている。前記の各系統の測定値と、SDP とを用いて Map Manager QT（解析ソフト）にて QTL 解析を行い、糖尿病形質を支配する遺伝子領域の染色体マッピングを行った。

## C. 研究結果

### (1) SMXA-5 系統マウスの糖尿病形質の解析

SMXA-5 系統は、2ヶ月齢前後から軽度の肥満、耐糖能異常、高インスリン血症を示した。SM/J と A/J 系統ではこれらは全て、正常域にあった。SMXA-5 のグルコース誘導性インスリン分泌能は、両対照系統と大きな差異は観察されなかった。SMXA-5 系統は皮下脂肪組織、内臓脂肪（白色脂肪）組織、肩甲骨間褐色脂肪組織の重量が最も大きく、SM/J 系統が一番小さかった。これらの3系統について2ヶ月齢、3ヶ月齢、5ヶ月齢の各組織の UCP の mRNA 発現レベルを比較したところ、肩甲骨間褐色脂肪組織の UCP1 mRNA レベルは3系統で大きな差はなかった。副睾丸脂肪組織の UCP2 mRNA レベルはこの脂肪組織の重量と呼応して、SMXA-5, A/J, SM/J の順に高かった。興味あることに、骨格筋（ヒ腹筋）の UCP3 mRNA レベルは、SM/J に比べて SMXA-5 と A/J では顕著に低かった。

### (2) SMXA-RI 系統を用いた肥満および糖尿病形質を支配する遺伝因子の染色体マッピング

21 系統の SMXA-RI 系統（各系統 10 匹ずつ）の 3カ月齢、5カ月齢の肥満度、脂肪組織重量、耐糖能のデータと各系統の SDP を用いて QTL 解析を行った。その結果、肥満度に関しては第1および6染色体の A アリルが肥満促進作用を有していることが示唆された。また、耐糖能に関しては、第2および18染色体の A アリルと、第10染色体の SM アリルが耐糖能増悪作用を有していることが示唆された。

## D. 考察

(1) SMXA-5 系統は若齢時 (2ヶ月齢) から血中インスリン濃度が高く、このことはインスリン抵抗性の存在を示唆している。この時期に肥満症状は決して明確ではない。SMXA-5 の耐糖能異常および軽度の高血糖の発症機構として、インスリン抵抗性の存在が一因として考えられた。また、SMXA-5 は骨格筋での UCP3 の発現量が低いことから、この組織でのエネルギー熱産生が低く、このことがインスリン抵抗性および肥満に寄与している可能性が考えられた。現在知られている 2 型糖尿病モデル動物の中で、骨格筋の熱産生が低いモデルは見あたらないことから、SMXA-5 はユニークなモデル系統と考えられる。

(2) SM/J と A/J 系統では、肥満度は A/J が明らかに高い。肥満度を支配する第 1 および 6 染色体の遺伝子領域は、両親系統の肥満度の差異にも貢献している可能性がある。耐糖能を支配している第 2 および 18 染色体の領域は、他の糖尿病モデル系統 (TSOD および NZO マウス) を用いた解析においても糖尿病を支配する QTL の一つとして報告されているものの近傍である。このことは、我々の解析結果の信頼性を示唆している。一方、第 10 番染色体の領域は今までに報告されていない独自のものである。今後、3つの染色体領域の耐糖能および血糖値に対する効果を実証するために、これらの3つの領域を持ったコンジェニック系統を作成する。今回の解析結果で興味あることは、SM/J も A/J も糖尿病形質を発現しないが、RI 系統である SMXA-5 は糖尿病形質を有している。つまり、両親系統は糖尿病形質を支配している遺伝因子を

有しており、各々の染色体の組み合わせが変わることにより、それらの作用が明確に見知できるようになったと推定される。

## E. 結論

新たな 2 型糖尿病モデルマウスである SMXA-5 系統の特性を解析し、若齢からのインスリン抵抗性の存在がこの系統の糖尿病形質の発現に寄与していることが示唆された。また、この系統は骨格筋の UCP3 発現が低く、そこでの熱産生が低下していることが推定された。21 系統の SMXA-RI マウス群を用いて糖尿病形質の遺伝解析を行ったところ、第 2, 10, 18 染色体に糖尿病形質を支配する染色体領域が存在する結果を得た。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ohno,T., Horio,F., Tanaka,S., Terada,M., Namikawa,T. and Kitoh,J. Fatty liver and hyperlipidemia in IDDM (insulin-dependent diabetes mellitus) of streptozotocin-treated shrews. *Life. Sci.* 66: 125-131, 2000.
- 2) Anunciado,R.V.P., Imamura,T., Ohno,T., Horio,F. and Namikawa,T. Developing a new Model for non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) by using the Philippine wild mouse, *Mus musculus castaneus*. *Exp. Anim.* 49: 1-8, 2000.
- 3) Anunciado, R.V.P., Horio,F., Ohno,T., Tanaka,S., Nishimura,M. and Namikawa,T.: Characterization of Hyperinsulinemic

Recombinant inbred (RI) strains (SMXA-5 and SMXA-9) derived from normoinsulinemic SM/J and A/J mice. *Exp. Anim.* 49: 83-90, 2000.

4) Anunciado, R.V.P., Ohno, T., Mori, M., Ishikawa, A., Tanaka, S., Horio, F., Nishimura, M. and Namikawa, T. Distribution of body weight, blood insulin and lipid levels in the SMXA recombinant inbred strains and the QTL analysis. *Exp. Anim.* 49: 217-224. 2000.

## 2. 学会発表

1) 小林美里、堀尾文彦、河合隆博、辻厚至、大野民生、西村正彦、野口民夫：

リコンビナント・インブレット (RI) 系マウスである SMXA-RI 系統における系統間での耐糖能と血中インスリン濃度の違い。

日本農芸化学会 2000 年度大会、2000 年 4 月、東京。

2) 小林美里、大野民生、河合隆博、辻厚至、西村正彦、堀尾文彦：

SMXA-RI (リコンビナント・インブレット) 系マウスにおけるマウスにおける耐糖能と血中インスリン濃度の遺伝解析。

日本農芸化学会 2001 年度大会、2001 年 3 月、京都。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。



厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

免疫系細胞における熱産生誘導機構と細胞老化に関する研究

分担研究者 西尾 康二 名古屋大学大学院医学研究科 助手  
機能形態学講座

研究要旨 アンカッパー蛋白質(UCP)はミトコンドリア内膜における熱産生機能の中心的役割を演じている。そして加齢に伴う動物個体の熱産生機能の低下と UCP 遺伝子の発現不良との関連が指摘されている。また最近 UCP2 は活性酸素に対する抗酸化システムとしても機能することが示唆され、UCP の多面的機能が注目されている。さらに UCP2 及び UCP3 は種々の組織で発現しているため、熱産生以外の細胞生理機能、例えば酸化ストレスや老化の抑制にも働くことが期待される。本年度の研究において、細胞老化に伴って UCP2 mRNA の発現が顕著に低下することを見出した。この結果は UCP2 レベルの低下により起こる酸化ストレスの上昇が細胞老化に関与することを示唆している。またマウス白血病細胞 M1 とその分化型マクロファージ様細胞 Mm1 の研究により、免疫系細胞の分化過程と UCP2 の発現及びその制御機序に関して興味ある結果を得た。即ち、分化した Mm1 において UCP2 蛋白レベルは顕著に高く、Mm1 のミトコンドリア酸化機能も亢進していた。この UCP2 蛋白レベルの調節は転写後の翻訳制御によることが明らかであった。そして Mm1 の UCP2 蛋白レベルの上昇は細胞の活性酸素耐性に関与することが推測された。

A. 研究目的

細胞分化に伴う UCP2 遺伝子の発現及びその蛋白質の動態、そして細胞レベルの老化と UCP2 遺伝子発現制御についてはこれまで報告がない。そこで本年度の研究では、マクロファージ分化における UCP2 遺伝子発現制御、ヒト皮膚及び肺組織由来の線維芽細胞及びヒトさい帯静脈血管内皮細胞における熱産生蛋白 UCP2 及び UCP3 の発現レベルと細胞老化との関連について研究を行なった。また分化したマクロファージ様細胞である Mm1 を用いて、ミトコンドリア

の酸化機能と UCP2 蛋白質レベルを解析した。

B. 研究方法

細胞株及び培養：ヒト胎児皮膚組織由来の線維芽細胞(TIG3S)、同肺組織由来の線維芽細胞(W138)、及びさい帯静脈血管内皮細胞(KH12T2)（東京都老人研・細胞認識部門及び静岡県立大学大学院・老化制御研究室より提供された）を DMEM+10% 牛胎児血清で継代培養をし、これらの老化細胞（PDL45 以上）を作成した。PDL20

代の増殖の活発な若い細胞及び PDL 4 5 以上の増殖能が顕著に低下した老化細胞を実験に使用した。皮膚線維芽細胞(PDL28, PDL45)、肺線維芽細胞(PDL27, PDL46)及び血管内皮細胞(PDL28, PDL50)から RNA を調整した。各組織由来の若い細胞と老化細胞の UCP2 と UCP3 mRNA レベルを RT-PCR により解析した。マウス白血病細胞 M1 及びマクロファージ様細胞 Mm1 (理化学研究所細胞バンクより入手) を同様に培養し、各細胞における UCP2 の mRNA 及び蛋白レベルを解析した。

RT-PCR による UCP2 発現レベルの解析: QIAGEN RNAeasy Mini Kit (lot No: 74104, Qiagen Hilden, Germany) を用いて RNA を分離し、オリゴ(dT)プライマーを使用した逆転写反応により cDNA を合成した。生成した cDNA を鋳型 DNA として PCR を行った。GAPDH を内部標準物質として UCP2 mRNA を定量した。PCR の条件は初回熱変性を 95°C で 10 分、次の熱変性を 94°C で 30 秒、アーニリングを 55°C で 30 秒、合成反応を 72°C で 1 分。これらを 1 サイクルとして 30 サイクル繰り返し、最後に 72°C で 2 分の合成反応を加えた。PCR 産物を 1.5% アガロースゲルで電気泳動した後、エチジウムブロマイド染色—紫外線照射により PCR 増幅産物バンドを検出した。検出バンドをデジタルカメラで撮影しバンドインテンシティを測定した。

Western blotting analysis による M1 及び Mm1 細胞 UCP2 蛋白質レベルの解析: 細胞溶解液 (20 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium

orthovanadate) を用いて、培養 M1 及び Mm1 細胞の mitochondrial fraction を分離した。その 25  $\mu$ g を 5–15% SDS-PAGE を用いて電気泳動した後、PVDF 膜に転写し 3% アルブミンで約 1 時間室温にてブロッキングを行った。UCP2 抗体 (Stratagene 社、1:1000 希釈) と一晩反応させた。0.05% の Tween 20 を含んだ PBS にて 3 回洗浄後、ペルオキシダーゼ結合抗ラビット IgG (Sigma 社、1:1000 希釈) と室温で 1 時間反応させ、洗浄後 ECL 法にて UCP2 蛋白を検出した。

UCP2 蛋白の M1 及び Mm1 細胞内局在及びミトコンドリア機能の解析: Molecular Probes 社のミトコンドリア特異的な蛍光標識物質である MitoTracker red と anti-UCP2 抗体を使用し二重蛍光標識を行ない、UCP2 蛋白質のミトコンドリア局在性及び発現量を調べた。またミトコンドリアの酸化機能を解析するため、培養 M1 及び Mm1 細胞に Dihydrorohdamin 123 を取り込ませ、その酸化反応により生ずる Rohdamin123 の緑色蛍光を指標にしてミトコンドリアの機能的標識を行なった。処理後細胞は共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。

### C. 研究結果

ヒト肺線維芽細胞、血管内皮細胞、皮膚線維芽細胞において UCP2 mRNA の発現が認められた。またこれらの 3 種の細胞系の UCP2 mRNA の量はいずれも細胞老化に伴って低下することが明らかであった。UCP3 mRNA はいずれの細胞においても検出されなかった。

還元型 Dihydrorohdamine 123 の取り込みによるミトコンドリアの機能的蛍光標識実

験を行ない、酸化反応により生じた Rohdamin 123 の蛍光標識強度を比較した。Mm1 細胞の蛍光強度は M1 のそれよりも顕著であった。この結果は Mm1 細胞のミトコンドリア酸化機能が M1 よりも著明に亢進していることを示唆している。Mm1 の UCP2 mRNA レベルは M1 の 1.5 倍程度であり、酸化機能の違いを反映するほどの大きな差は認められなかった。しかし蛋白レベルでは両者間に顕著な差が認められ、Mm1 細胞の UCP2 蛋白量は M1 の 10 倍以上であった。従って Mm1 細胞における UCP2 mRNA の翻訳が促進された結果、UCP2 蛋白質のレベルが上昇したと考えられた。また M1 及び Mm1 細胞の UCP2 蛋白のミトコンドリア局在を解析した。UCP2 の細胞質局在は蛍光色素 MitoTracker red のミトコンドリア局在と一致した。また同じ条件下で、Mm1 細胞のミトコンドリア UCP2 免疫蛍光標識の強度は M1 よりも強かった。M1 及び Mm1 における UCP2 のシグナル強度の差異は、蛋白レベルでの UCP2 の差を反映していると考えられた。

#### D. 考察

代謝過程から生じた活性酸素やフリーラジカルなどの酸化因子の有害作用、すなわち酸化ストレスが老化の原因となるとする仮説（老化の活性酸素説）が提唱されている。ミトコンドリアは酸素呼吸の中核として機能し、エネルギー平衡を調節すると共に活性酸素分子種 ROS(reactive oxygen species)を産生する。酸素呼吸を行なう好気性生物は、酸化ストレスを免れるため種々の酸化防御機構や傷害修復機構を備え

ている。最近、UCP ファミリー分子の中で UCP2 はミトコンドリア内膜電位を制限し、また ROS の過剰な産生を抑制する抗酸化システムとしても機能することが示唆されている。

ヒト皮膚線維芽細胞、肺線維芽細胞及び血管内皮細胞における UCP 遺伝子の発現に関して、これまで報告がされていない。我々は本研究において、老化したヒト皮膚線維芽細胞、肺線維芽細胞及び内皮細胞のいずれにおいても UCP2 の mRNA レベルが著明に低下していることを明らかにした。この UCP2 mRNA レベルの低下は細胞老化、即ち生体内酸化ストレスによる傷害蓄積の原因の一つではないかと推測される。

脾臓、肺及びマクロマージでの UCP2 の大量発現は UCP2 の免疫及び炎症反応における重要な役割を示唆している(Fleury, et al., 1997; Gimeno, et al., 1997; Larrory, et al., 1997)。UCP2 mRNA とその蛋白レベルが ob/ob マウスのマクロファージ及び肝細胞のミトコンドリアの H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生と関連している(Chavin, et al., 1999; Lee, et al., 1999)。UCP2 遺伝子 knock out マウスの場合、wild-type マウスより多量の ROS を産生し Toxoplasma gondii 感染による cyst 形成の数及び炎症反応を抑制する。マクロファージ系細胞の ROS 産生に対する UCP2 の抑制作用も明らかである(Arsenijevic, et al., 2000)。UCP2 mRNA の減少が免疫刺激による ROS 産生と関連し、また UCP2 mRNA の上昇は ROS 産生の抑制と関連しているのではないかと推測された(Arsenijevic, et al., 2000)。マクロファージが種々の刺激(LPS, interferon-gamma)を受け、NO (nitro oxide), nitrite, nitrate, nitrosoamine 等の ROS

を産生し、微生物感染や発癌防御において重要な役割を果たしている(Cunha, et al., 1993)。しかし未分化なマウス白血病細胞 M1 は NO を殆ど産生しない(Cunha, et al., 1993)。我々は M1 及びマクロファージ様細胞 Mm1 の UCP2 発現を mRNA 及び蛋白レベルで調べた結果、M1 から分化した Mm1 の UCP2 蛋白量は M1 の 10 倍以上であることを明らかにした。また還元型蛍光色素前駆体 Dihydrorhodamin 123 を用いた標識実験により Mm1 のミトコンドリア酸化機能は M1 のそれよりも著明に亢進していることが示された。これは Mm1 細胞の免疫機能特性に相応しい結果ではないかと考えられる。即ち、マクロファージが外来の微生物の侵入を防ぐために、つねに大量の活性酸素や NO などの ROS を産生する能力を持たなければならない、その一方、大量の ROS はマクロファージ自身にとっては有害な物質である。マクロファージはある程度の UCP2 を持つことで自身の細胞防御に働くのであろう。この点では、Diehl らは部分肝切除の時に、UCP2 の mRNA 及びタンパク質レベルは TNF alpha 依存性の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の生産量に一致することを指摘した(Lee, et al., 1999)。しかも彼らの肝細胞培養時 lipid emulsion 処理による実験では、ROS 上昇の後に UCP2 の生産が確認された(Cortez-Pinto, et al., 1999)。

その一方、我々の研究結果では Mm1 の UCP2 mRNA レベルは M1 の 1.5 倍に過ぎなかった。そして蛋白レベルでは M1 の 10 倍以上と著明に高かった。一見矛盾するが、UCP2 mRNA レベルと UCP2 蛋白の発現が一致しないことがすでに報告されている。原因の一つとしては UCP2 遺

伝子の exon 2 にアップストリーム ORF が存在し、その中の複数の開始コドン ATG を含む RNA 構造が UCP2 蛋白の翻訳を強く阻害していることが指摘された(Pecqueur et al., 2000)。我々は今後 UCP2 蛋白の翻訳調節に関連する因子について解析し、M1 と Mm1 細胞の UCP2 mRNA の翻訳制御メカニズムを解明する計画である。

## E. 結論

細胞老化による UCP2 遺伝子発現への影響をヒト培養細胞系で調べた。そして老化に伴って UCP2 遺伝子発現の著明な低下が起きていることが明らかとなった。この遺伝子発現の低下は線維芽細胞、血管内皮細胞の各細胞系のいずれにおいても認められた。分化型マクロファージ様細胞の UCP2 蛋白レベルは未分化の細胞の 10 倍以上に亢進していた。この UCP2 蛋白の発現調節は mRNA の転写後、即ち翻訳制御によるものであることが明らかとなった。今後この翻訳制御に関与する調節因子、UCP2 の老化抑制作用等について研究を進める計画である。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Daisuke Watanabe, Takashi Honda, Koji Nishio, Yasuo Sugiura and Yukuhiro Nishiyama. Corneal infection of herpes simplex virus type 2-induce neuronal apoptosis in the brain stem of mice with expression of tumor suppressor