

平成10年度
厚生科学研究費補助金研究報告書
(長寿科学総合研究事業)

長寿遺伝子に関する分子遺伝学的研究
(H10-長寿-002)

(財)東京都老人総合研究所
分子遺伝学部門
白澤卓二

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

長寿遺伝子に関する分子遺伝学的研究

主任研究者 白澤卓二 東京都老人総合研究所

研究要旨 線虫の長寿ミュータントである Daf-2 を用いて、長寿に関連する遺伝子（長寿関連遺伝子）を探索・単離し、これらの遺伝子および遺伝子産物を分子生物学的に解析する事により、個体の寿命決定の分子機構を明らかにする。この目的のために、Daf-16 遺伝子に蛍光マーカー蛋白である EGFP を融合させた組み換え遺伝子を導入したトランスジェニック線虫を確立した。また、Daf-2、Clk-1 等の線虫の長寿変異をマウスの染色体に導入した長寿マウスを遺伝子工学的に作製するために、マウスインスリン受容体遺伝子（Daf-2 相同遺伝子）およびマウス Clk-1 遺伝子に線虫で発見された長寿変異を導入したベクターを構築後、ES 細胞に導入し、相同組み換えを起こした長寿変異株を選別中である。

分担研究者氏名

三谷昌平 東京女子医科大学・医学部・
助教授

本田修二 東京都老人総合研究所・研究
員

古関明彦 千葉大学・医学部・教授

森啓 大阪市立大学・医学部・教授

これらの遺伝子および遺伝子産物を分子生物学的に解析する事により、個体の寿命決定の分子機構を明らかにする。また、Daf-2、Clk-1 等の線虫の長寿変異をマウスの染色体に導入した長寿マウスを遺伝子工学的に作製し、哺乳類の個体寿命の遺伝子操作の可能性を検討する。

A. 研究目的

線虫の長寿ミュータントである Daf-2 を用いて、長寿に関連する遺伝子（長寿関連遺伝子）を探索・単離し、

B. 研究方法

(1)長寿命関連遺伝子の探索：線虫ゲノムより Daf-16 遺伝子を単離、第 10 エ

クソンに緑色蛍光マーカー遺伝子 (EGFP) を挿入後、Daf-16::EGFP 融合遺伝子を線虫にトランスジーンし、Daf-16 遺伝子発現が蛍光顕微鏡下にモニター可能な線虫を樹立する。Daf-16/Daf-2 二重変異体は Daf-2 長寿形質が抑制されたサプレッサーミュータントであるが、このサプレッサーミュータントに上記の DAF-16::GFP トランスジーンを導入し、Daf-2 長寿形質が復活したトランスジェニック線虫を単離する。形質がレスキューされた Daf-16/Daf-2 二重変異体から抗 GFP 抗体を用いて、Daf-16 野標的遺伝子を検索する。(2)インスリン受容体改変(長寿)マウスの作製：マウスゲノムライブラリーよりインスリン受容体遺伝子を単離し、第 20 エクソンに長寿変異を導入したゲノム改変ベクターを構築する。更に、相同組み換えにより長寿変異が導入された ES 細胞を単離する。インスリン様増殖因子受容体遺伝子 (IGF-1R) に関しても同様に第 19 エクソンに長寿変異が導入されたゲノム改変ベクターを構築する。更にこれらの ES 細胞を用いてミュータントマウスを作製する。(3)クロック遺伝子の単離とその解析：ヒトおよびマウスのクロック相同遺伝子を PCR 法で単離する。遺伝子野構造を決定しその発現様式、染色体の局在を決定する。(4)クロック遺伝子改変マウスの作製：マウスゲノムライブラリーよりクロック染

色体遺伝子を単離し、染色体遺伝子の構造を明らかにする。更に、第 2 エクソンをネオマシン耐性遺伝子で置換したノックアウトベクターを構築し、ノックアウトマウスを作製する。

(5)転写因子 DAF-16 の標的遺伝子 SOD の解析：Mn-SOD 遺伝子が転写因子 DAF-16 の標的遺伝子であることを遺伝学的に同定する。さらに daf-2 と clk-1 の二重変異体における Mn-SOD の発現を解析し、Mn-SOD と Daf-2 シグナル、Clk-1 シグナルの関係を遺伝学的に明らかにする。

C. 結果と考察

(1)長寿命関連遺伝子の探索：インスリン受容体ホモログ (Daf-2) の下流で Daf-2 シグナルを伝達している転写因子 Daf-16 の標的遺伝子を単離することにより、長寿遺伝子を検索する。この目的のために、平成 10 年度は線虫ゲノムより Daf-16 遺伝子を単離、第 10 エクソンに緑色蛍光マーカー遺伝子 (EGFP) を挿入後、Daf-16::EGFP 融合遺伝子を線虫にトランスジーンし、Daf-16 遺伝子発現が蛍光顕微鏡下にモニター可能な線虫を樹立した。Daf-16/Daf-2 二重変異体は Daf-2 長寿形質が抑制されたサプレッサーミュータントである。今後、このサプレッサーミュータントに更に上記の DAF-16::GFP トランスジーンを導入し、Daf-2 長寿形質が復活したトランスジェニック線虫を単離する。

(2)インスリン受容体改変(長寿)マウスの作製：長寿線虫ミュータントで発見された Daf-2 の遺伝子変異はヒトでも同一の変異が報告され(肥満変異)、哺乳類でも長寿形質が遺伝的に存在しうる可能性を提供した。本課題では、線虫の長寿ミュータントと同一の遺伝子変異を有するミュータントマウスを遺伝子工学的に作製し、哺乳類の個体寿命が線虫と同様のメカニズムで長寿化する可能性を検討する。平成 10 年度は、マウスゲノムライブラリーよりインスリン受容体遺伝子を単離し、第 20 エクソンに長寿変異を導入したゲノム改変ベクターを構築した。更に、相同組み換えにより長寿変異が導入された ES 細胞の単離に成功した。インスリン様増殖因子受容体遺伝子(IGF-1R)に関しても同様に第 19 エクソンに長寿変異が導入されたゲノム改変ベクターを構築した。平成 11 年度はこれらの ES 細胞を用いてミュータントマウスを作製する予定である。

(3)クロック遺伝子の単離とその解析：平成 10 年度は、ヒトおよびマウスのクロック相同遺伝子を PCR 法で単離した。遺伝子解析の結果、クロック遺伝子の構造は種を越えて保存されている事、発現解析の結果、哺乳動物では筋組織に特異的な遺伝子発現を認める事を明らかとした。また、ヒトのクロック遺伝子を染色体 16p12-13 にマップした。

(4)クロック遺伝子改変マウスの作製：平成 10 年度はマウスゲノムライブラリー

よりクロック染色体遺伝子を単離し、染色体遺伝子の構造を解析した。更に、第 2 エクソンをネオマシン耐性遺伝子で置換したノックアウトベクターを構築した。(5)転写因子 DAF-16 の標的遺伝子 SOD の解析：Mn-SOD 遺伝子が転写因子 DAF-16 の標的遺伝子の 1 つの長寿関連遺伝子であることを遺伝学的に同定した。さらに Mn-SOD は daf-2 と clk-1 の両長寿遺伝子から相乗的に影響を受けていることを明らかにした。

D. 結論

(1)長寿命関連遺伝子の探索：インスリン受容体ホモログ(Daf-2)の下流の長寿遺伝子を検索するために、daf-2 シグナルの下流に位置する転写調節因子 daf-16 にマーカーを融合した Daf-16::EGFP 融合遺伝子を作製、線虫にトランスジェニックし、Daf-16 遺伝子発現が蛍光顕微鏡下にモニター可能な線虫を樹立した。このトランスジェニック線虫を用いて長寿関連遺伝子の探索を開始する。(2)インスリン受容体改変(長寿)マウスの作製：マウスゲノムライブラリーよりインスリン受容体遺伝子を単離し、第 20 エクソンに長寿変異を導入したゲノム改変ベクターを構築した。更に、相同組み換えにより長寿変異が導入された ES 細胞の単離に成功した。今後これらの ES 細胞を用いてミュータントマウスを作製する。(3)クロック遺伝子の単離とその解析：ヒトおよびマウスのクロック相同

遺伝子を PCR 法で単離し、遺伝子を解析した。その結果、クロック遺伝子の構造は種を越えて保存されている事、哺乳動物では筋組織に特異的な遺伝子発現を認める事を明らかとした。更にマウスゲノムライブラリーよりクロック染色体遺伝子を単離し、ノックアウトベクターを構築した。(4)転写因子 DAF-16 の標的遺伝子 SOD の解析：Mn-SOD 遺伝子が転写因子 DAF-16 の標的遺伝子の 1 つの長寿関連遺伝子であることを遺伝学的に同定した。

E. 研究発表

1. 論文発表

Shindo, M., Nakano, H., Kuroyanagi, H., Shirasawa, T., Mihara, M., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Yagita, H., and Okumura, K. (1998). cDNA cloning, expression, subcellular localization, and chromosomal assignment of mammalian aurora homologues, aurora-related kinase (Ark) 1 and 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 285-292.

Yamamoto, A., Takagi, H., Kitamura, D., Tatsuoka, H., Nakano, H., Kawano, H., Kuroyanagi, H., Yahagi, Y.-i., Kobayashi, S.-i., Koizumi, K.-i., Sakai, T., Saito, K.-i., Chiba, T., Kawamura, K., Suzuki, K., Watanabe, T., Mori, H., and Shirasawa, T. (1998).

Deficiency in Protein L-isoaspartyl Methyltransferase Results in a Fatal Progressive Epilepsy. *J. Neurosci.* 18, 2063-2074.

Kuroyanagi, H., Yan, J., Seki, N., Yamanouchi, Y., Suzuki, Y., Takano, T., Muramatsu, M., and Shirasawa, T. (1998). Human ULK1, a novel serine/threonine kinase related to UNC-51 kinase of *Caenorhabditis elegans*: cDNA cloning, expression, and chromosomal assignment. *Genomics* 51, 76-85.

Suzuki, G., Nakata, Y., Dan, Y., Uzawa, A., Nakagawa, K., Salto, T., Mita, K., and Shirasawa, T. (1998). Loss of SDF-1 receptor expression during positive selection in the thymus. *Int. Immunol.* 10, 1049-1056.

Yan, J., Kuroyanagi, H., Kuroiwa, A., Matsuda, Y., Tokumitsu, H., Tomoda, T., Shirasawa, T., and Muramatsu, M. (1998). Identification of mouse ULK1, a novel protein kinase structurally related to *C. elegans* UNC-51. *Biochem Biophys Res Commun* 246, 222-227.

Fujita, T., Shirasawa, T., and Maruyama, N. (1998). Senescence

marker protein-30 (SMP-30) and its gerontological significance. *Current Science* 74, 872-877.

2. 学会発表

白澤卓二、池谷裕二、山田光則、蛋白質イソ体アスパラギン酸化と神経変性、基礎老化研究 vol. 22, p. 70, 1998

白澤卓二、山本明広、黒柳秀人、清水孝彦、小河原緑、鈴木勝士、川村光毅、森啓、イソ体アスパラギン酸メチル転移酵素欠損マウスの解析、第 41 回日本神経化学大会 東京 1998.09.21-09.23

黒柳秀人、金岩、関直彦、山内泰子、鈴木陽一、高野貴子、大島靖美、三谷昌平、村松正明、白澤卓二 (1998). ヒト ULK1-線虫 *Caenorhabditis elegans* UNC-51 類似新規セリン・スレオニンキナーゼ - : cDNA クローニング、発現解析と遺伝子マッピング 第 21 回日本分子生物学会年会 横浜市 1998.12.16-12.26

Kuroyanagi, H., Yan, J., Seki, N., Yamanouchi, Y., Suzuki, Y.-i., Shimizu, T., Takano, T., Muramatsu, M.-a., and Shirasawa, T. (1998). HUMAN ULK1, A NOVEL SERINE/THREONINE KINASE RELATED TO UNC-51 KINASE OF *Caenorhabditis elegans*: cDNA

CLONING, EXPRESSION AND CHROMOSOMAL ASSIGNMENT. In Society for Neuroscience 28th Annual Meeting, Los Angeles, U.S.A. 1998.11.07-11.12

Sahara, N., Shirasawa, T., Watanabe, K., and Mori, H. (1998). Molecular cloning of bovine presenilin cDNA. In Society for Neuroscience 28th Annual Meeting, Los Angeles, U.S.A. 1998.11.07-11.12

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

線虫を用いた逆遺伝学的解析法の開発

分担研究者 三谷昌平 東京女子医科大学・医学部・助教授

研究の要旨 Trimethylpsoralen と紫外線を用いる欠失変異分離法の開発により、線虫の逆遺伝学的アプローチを効率化した。この方法は安定なストレインが得られるため、老化研究のような長期の培養が必要な実験系に特に有用であると思われる。

A. 研究目的

線虫 *C. elegans* では細胞系譜や形態の記載が完成しており、ゲノムや cDNA の塩基配列情報が整備されている。発現パターンやホモロジーなどの情報により着目する遺伝子の機能を逆遺伝学的手法を用いて解析することが有用と思われる。逆遺伝学的手法には、主に、二本鎖 RNA を注入して同一または、ホモロジーの高い遺伝子を不活性化する RNA 干渉法と欠失変異を分離する方法とがある。前者は容易に実験ができることが特徴であるが、細胞系譜などに依存して特に後期発生などでは不活性化がかからなくなる例が知られている。寿命の研究の目的と方法を考えると安定した欠失変異体の分離を行う

必要があると考えられる。

B. 研究方法

適当な大きさの欠失変異の入り易い条件を見い出す目的で線虫の single locus 遺伝子であるベータ・チュープリン *ben-1* の種々の変異条件によるアレルを分離した。抗チュープリン薬である benomyl アナログ carbendazim を予め 10^{-6} M となるように線虫培養培地中に添加し（選択培地）、ここに種々の条件で変異を加えた線虫を置いて培養した。変異体が野生株に比べ増殖が早い、運動性が正常であることなどにより変異体の分離を行った。得られた各々のアレルにおける欠失変異の有無と大きさを PCR 法にて検定した。

C. 結果と考察

EMS 法で得られた変異体 (77 アリル) には PCR で検出できる欠失変異は無かった。一方、TMP/UV 法で得られた変異体 (91 アリル) については TMP 濃度および UV 照射量を調節することにより欠失変異の頻度を上昇させることができた (30 アリル)。

次に、TMP/UV 法で得られた欠失変異体の DNA と野生型 DNA とを用いて欠失変異の PCR による検出感度を上げ、かつ、スクリーニングにおける偽陽性の頻度を下げる条件を検討した。1.2 kb の欠失を持つ DNA が野生型 DNA との比が 1 : 10,000 程度で検出可能な条件を見出した。

D. 結論

線虫の逆遺伝学は、ゲノム塩基配列の解読の完了によって多くの研究者の今後の研究戦略として重要になると思われる。本研究はその技術的背景を提供するもので有用と思われる。

E. 研究発表

総説：三谷昌平 (1999) 新しい細胞標識法 GFP. 脳の科学 21, 89-94.

2. 学会発表

安藤恵子、三谷昌平 逆遺伝学的解析法のための線虫 *C. elegans* 遺伝子破壊法の効率化、第 1 回 C.エレガンス

ス日本集会、1998 年 7 月、金沢
黒柳秀人、三谷昌平、大島靖美、白澤卓二 UNC-51 セリン・スレオニンキナーゼのマウスホモログの機能ドメインの解析、第 1 回 C.エレガンス日本集会、1998 年 7 月、金沢

安藤恵子、三谷昌平 逆遺伝学的解析法のための線虫 *C. elegans* 遺伝子破壊法の効率化、第 2 1 回日本神経科学・第 4 1 回日本神経化学合同大会、1998 年 9 月、東京

安藤恵子、三谷昌平 逆遺伝学的解析のための線虫 *C. elegans* 遺伝子破壊法の効率化、第 2 1 回日本分子生物学会、1998 年 12 月、横浜

山田葉子、三谷昌平、大島靖美 線虫 *C. elegans* の温度走性に関する LIM-homeobox 遺伝子 *ttx-3* の解析、第 2 1 回日本分子生物学会、1998 年 12 月、横浜

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：無し
2. 実用新案登録：無し
3. その他：無し

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

線虫C. エレガンスの長寿命遺伝子ネットワークと Mn-SOD

分担研究者 本田修二 東京都老人総合研究所研究員

研究の要旨 線虫の長寿遺伝子ネットワークは酸化ストレス耐性形質を規定している。このネットワークに沿って DAF-16 転写因子がこの酸化ストレス耐性形質を Mn-SOD 遺伝子発現調節により規定し寿命を決定していることが示された。この長寿遺伝子ネットワークは線虫が過酷な環境下で耐性幼虫として長期間生存するためにストレス耐性を獲得するための機構であり、それが変異により通常の状態が発現すると長寿が引き起こされると考えられた。

A. 研究目的

寿命を決定する遺伝子ネットワークが実際に長寿を引き起こす分子機構を、主に線虫を用いて明らかにする。特に既に明らかになっている長寿命誘発経路であるインスリン受容体から情報伝達分子である PI3 キナーゼそしてフォークヘッド転写因子に至って実際にシグナルに応答して転写される遺伝子の解明を行う。この遺伝子の候補として Mn-SOD を見出したので Mn-SOD が長寿を引き起こす機構を解明する。

B. 研究方法

酸化ストレスに対する種々の線虫長寿遺伝子変異体およびそれらの 2 重変異体の感受性を調べ、酸化ストレスと寿命との関係を明らかにする。変異体の抗酸化防御酵素の遺伝子発現を調べる。

C. 結果と考察

線虫の種々の長寿遺伝子変異と 2 重変異が酸化ストレスに対する感受性に及ぼす影響を調べた。インスリン受容体から情報分子 PI3 キナーゼ

を経てフォークヘッド転写因子に至る長寿経路と全く同じ経路で酸化ストレス耐性が規定されていることを明らかにした。この経路の最下流は DAF-16 転写因子であることから、酸化ストレス耐性を支配する遺伝子の発現が調節されていることが示唆された。さらに長寿が相乗的に促進されることが知られている *daf-2* と *clk-1* 遺伝子の 2 重変異では酸化ストレス耐性も促進されることを示した。酸化ストレス耐性に平行してミトコンドリアにある Mn-SOD の遺伝子発現が増大することを明らかにした。*daf-2* と *clk-1* の 2 重変異では著しい Mn-SOD 発現がみられた。*daf-2* は耐性幼虫形成に関与する遺伝子であることから耐性幼虫化と Mn-SOD 遺伝子との関わりを調べた。通常、耐性幼虫化に伴い、Mn-SOD 遺伝子発現が増大することを明らかにした。しかし、*daf-2* 遺伝子に変異があると成虫においても耐性幼虫においても Mn-SOD 遺伝子発現は高いことが示された。以上の結果から、線虫の長寿遺伝子ネットワークは Mn-SOD の発現増大によりミトコンドリアでの活性酸素の生成を抑制し酸化ストレスを低下させて老化を遅延させることが示唆された。

D. 結論

線虫の長寿遺伝子ネットワークは酸化ストレス耐性形質を規定している。このネットワークに沿って DAF-16 転写因子がこの酸化ストレス耐性形質を Mn-SOD 遺伝子発現調節により規定し寿命を決定していることが示された。この長寿遺伝子ネットワークは線虫が過酷な環境下で耐性幼虫として長期間生存するためにストレス耐性を獲得するための機構であり、それが変異により通常の状態が発現すると長寿が引き起こされると考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

(1) Yoko Honda & Shuji Honda: The *daf-2* gene network regulates oxidative stress resistance and Mn-SOD gene expression. FASEB Journal 1999 (in press).

(2) 本田修二&木村幸太郎：線虫 *C. elegans* の寿命を制御する遺伝子ネットワーク 医学の歩み 188(1) 15-19 1999

(3) 木村幸太郎 & 本田修二： *C. elegans* の寿命を制御するインスリン様シグナル伝達経路 細胞工学 17 (9) 1393-1398 1998

(4) 本田修二、本田陽子、鈴木捷三：線虫C. エレガンスの放射線感受性突然変異体
RADIOISOTOPES 47 665-666
1998

2.学会発表

(1) 本田陽子&本田修二：線虫C. エレガンスの長寿命突然変異体と sod-3 遺伝子発現 日本基礎老化学会 第21回大会 東京 1998年6月

(2) 本田修二：線虫の寿命を制御する遺伝子 シンポジウム「癌化と老化の分子メカニズム」 日本学術会議、癌・老化研連シンポジウム 札幌 1998年6月

(3) 本田陽子&本田修二：線虫 C. elegans 長寿命変異体の酸化ストレス耐性 第1回日本線虫集会 金沢 1998年7月

G.知的所有権の取得状況

- 1.特許取得 なし
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他 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

家族性アルツハイマー病原因遺伝子間相互作用に関する基礎医学的研究

分担研究者 森 啓 大阪市立大学医学部教授

研究の要旨 アルツハイマー病原因遺伝子であるプレセニリン 1 とアミロイド前駆体蛋白は脳内沈着性のアミロイド蛋白を分析することにより、相互作用があることが示唆されるが、このことはなお間接的であり、結論を得るには至っていない。われわれはプレセニリン 1 突然変異型遺伝子を導入した培養細胞を用いた実験系で、アミロイド産生断片であるアミロイド前駆体蛋白の C T F 量が異常高進することを見いだした。

A. 研究目的

早期発症型家族性アルツハイマー病の主要な原因遺伝子であるプレセニリン 1 (PS1) の神経病変への作用はとくに病因機作を考える上で重要である。なかでもアルツハイマー病特異神経病変である老人斑構成成分アミロイド蛋白生成への分子レベルでの作用が注目されている。PS1 のトランスジェニックマウスおよび培養細胞等の解析から、この PS1 の突然変異がアミロイド線維の主成分である A β 42 を増加させることが明らかとなってきた^{1,2}。このことは、PS1 が A

β の前駆体タンパク質 (APP) の代謝過程に関与していることを示唆している。そこで本研究では、PS-1 と APP の関連性について、その分子機構を明らかにする目的で培養細胞を用いた解析をした。

B. 研究方法

APP695cDNA を安定的に遺伝子導入した PC12 細胞あるいは CHO 細胞に、発現ベクター pCMV に組み込んだ野生型 PS1、突然変異型 PS1A260V を遺伝子導入した。得られた遺伝子導入細胞から、PS1 の N 末抗体 AD3N、C 末抗体 CC3 および

APP の C 末抗体 R37 を用いて、PS1 および APP を免疫沈降させた。免疫沈降物は PS1 の N 末抗体 PSN2、ループ部抗体 AD3L、抗 APP 抗体 22C11 および APP の C 末抗体 R37 を用いて解析した。

C. 結果と考察

野生型と突然変異型 PS1 を導入した PC12 細胞の膜分画には成熟型 APP と未成熟型 APP 比に変化がなかった。この結果から PS1 の遺伝変異によって APP の発現と成熟過程には影響がないことが示唆された。次に、APP 代謝への影響についてみたが、分子量的には大きな変化がなかった。さらに、 $A\beta$ 産生断片である β セクレターゼ分解によって得られる β CTF と α CTF の比を見ても変化がなかったが、APP 由来の α CTF と β CTF の総量が PS1 突然変異によって大きく上昇することが有意さをもって見出された。

われわれは、野生型 PS1 では APP CTF が減少し、変異型 PS1 では上昇していることを見出した。この知見は、PS1 欠損線維芽細胞で全長 APP に変化がないが、APP CTF が PS1 欠損線維芽細胞や PS1 欠損神経細胞で上昇している成果^{3,4}と一致する。我々の成果は家族性アルツハイマー病患者と同じ遺伝変異を持つ PS1 を

用いていることから実際に患者脳内で生じている異常反応を正しく反映している可能性が高いと言える。

D. 結論

PS1 突然変異型遺伝子を導入した PC12 細胞や CHO695 細胞では APP のアミロイド産生断片である CTF 量を異常高進させる。

E. 研究発表

1. 論文発表

Tamaoka, A., Fraser, P.E., Ishii, K., Sahara, N., Ozawa, K., Ikeda, K., Saunders, A.M., Komatsuzaki, Y., Sherrington, R., Levesque, G., Yu, G., Rogueva, E., Shoji, S., Nee, L.E., Pollen, D.A., Hendriks, L., Martini, J.J., Van Broeckhoven, C., Roses, A.D., Farrer, L.A., St. George-Hyslop, P.H., and Mori, H. (1998) *Mol. Brain Res.* 56, 178-185
Amyloid- β -protein isoforms in brain of subjects with PS1-linked, BAPP-linked and sporadic Alzheimer's disease

Arawaka, S., Saito, Y., Murayama, S., and Mori, H. (1998) *Neurology.* 51, 887-889

Lewy body in neurodegeneration with brain iron accumulation type (NBIA 1) is immunoreactive for α -synuclein

2. 学会発表

Arawaka, S., Lee, G., Mori, H.: 28th Annual Meeting of society for Neuroscience (Los Angeles USA, November 7-12, 1998), Molecular anatomy of tau inclusions with antibodies that recognize tau isoforms

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

老化関連遺伝子群・哺乳類ポリコーム遺伝子産物による細胞死のコントロール

分担研究者 古関明彦 千葉大学医学部教授

研究の要旨 ポリコーム遺伝子群は、無脊椎動物から脊椎動物に至るまで構造的に保存された遺伝子ファミリーであり、近年哺乳類においては、老化の抑制に寄与する可能性が示された。我々は、ショウジョウバエ・ポリコーム遺伝子群のひとつである Posterior sex combs (Psc) の哺乳類ホモログの機能を明らかにするために、mel-18 と bmi-1 の二重欠損マウスを作成し、その表現型を観察した。その結果、Mel-18 と Bmi-1 遺伝子産物とは、協調的に作用して、哺乳類初期胚における細胞死の抑制とホメオボックス遺伝子群の発現コントロールに必須であることを示した。

A. 研究目的と方法

ポリコーム遺伝子群は、無脊椎動物から脊椎動物に至るまで構造的に保存された遺伝子ファミリーであり、近年哺乳類においては、老化の抑制に寄与する可能性が示された。我々は、ショウジョウバエ・ポリコーム遺伝子群のひとつである Posterior sex combs (Psc) の哺乳類ホモログ mel-18 を、癌抑制遺伝子のひとつとして単離した。Mel-18 タンパクは、配列特異的な DNA 結合タンパクであ

り、その結合は近傍のエンハンサー活性を抑制する。その機能は、mel-18 欠失マウスを用いた解析から、(1) ショウジョウバエ Psc タンパク同様にホメオボックス遺伝子群の発現制御を介して、中軸構造の前後軸形成に必要であり、(2) リンパ球前駆細胞の IL-7 に依存した増殖にも必須であることが示された。

mel-18 欠損マウスのリンパ球においては、IL-7 に依存した STAT フ

ファミリータンパクの活性化は正常におこっていたが、Rbファミリーなどいくつかの増殖関連分子の発現が著しく減少していた。さらに、mel-18欠損マウスの胸腺においては、細胞死が強く亢進していること、そして、それがBadの発現亢進と相関していることを明らかにした。このことは、Mel-18タンパクは、リンパ球前駆細胞の細胞死の抑制を介して、細胞増殖に寄与している可能性を示している。また、これらの表現型はプロト癌遺伝子として単離されたもうひとつのPscホモログbmi-1欠失マウスでも観察されたことから、mel-18とbmi-1とはお互いに相補的な機能を有していると考えられ、mel-18/bmi-1二重欠失マウスを作成し、その表現型を観察した。二重欠失マウスでは、以下に示すような表現型が観察された。

B. 結果と考察

(a) mel-18またはbmi-1欠失マウスは周産期を生き延びるのに対し、二重欠失マウスは胎生期致死であり胎生9.5日までしか生存しえない。そして、それは細胞死の亢進にもとづくことを明らかにした。(b) ホメオボックス遺伝子群の部位特異的な発現ドメインは完全に失われ、ユビキタ

スに発現される。

(c) 神経管や脊索を構成する細胞の形態が野生型とは著しく異なり、特に、細胞相互の接着やその増殖が阻害されている。

D. 考察と結論

これらの実験事実は、Mel-18とBmi-1遺伝子産物とは、ショウジョウバエ・ポリコーム遺伝子群で観察されたのと同様に、協調的に作用することを示している。そして、このような遺伝的相互作用が、哺乳類初期胚における細胞死の抑制とホメオボックス遺伝子群の発現コントロールに必須であることが示された。

E. 研究発表

1. 論文発表

Furumoto, T., Miura, N., Akasaka, T., Mizutani-Koseki, Y., Sudo, H., Moriya, H., Taniguchi, M., Pavlova, M., Gossler, A., Imai, K., Dahl, E., Balling, R. and Koseki, H. (In press) Notochord dependent expression of MFH-1 and Pax-1 cooperates to maintain the proliferation of sclerotome cells during the vertebral column development. *Dev. Biol.*

Hiraoka, S., Furumoto, Y., Koseki, H., Takagaki, Y., Taniguchi, M., Okumura, K. and Ra, C. (1999) Fc receptor b subunit is required for full activation of mast cells

through Fc receptor engagement. Int. Immunol. 11:199-207.

Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Sato, H., Kondo, E., Harada, M., Koseki, H., Nakayama, T., Tanaka, Y. and Taniguchi, M. (1998) CD1d-restricted and TCR-mediated activation of Va14 NKT cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 5690-5693.

2. 学会発表

なし

E. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。