

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

平成 11 年度総括研究報告書

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

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 ES 細胞の単離に成功した。これらの ES 細胞より凝集法を用いてキメラマウスを作製し、ヘテロ接合体マウスの樹立に成功した。今後、これらのミュータントマウスを用いて、哺乳動物における長寿遺伝子の役割を解析する計画である。

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

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、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。

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。

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 10-11 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。平成 11 年度は、相同組換えが確認された ES 細胞から、凝集法を用いてキメラマウスを作製した。更に、キメラマウスを C57BLACK/6 マウスに交配し、daf-2 変異が germline に移行したヘテロ接合体マウスの作製に成功した。ヘテロ接合体マウスを交配し、ホモ接合体マウスの表現形を検討した。その結果、ホモ接合体マウスは胎児期もしくは新生児期に死亡することが明らかとなった。新生児肝臓よりインスリン受容体を免疫沈降し、自己リン酸化能を検討すると、インスリン刺激に対して、受容体がリン酸化を受けないことから、daf-2 変異はインスリン受容体のキナーゼ活性を失うことにより、インスリンのシグナル伝達に異常を来していることを明らかとした。インスリン様増殖因子受容体遺伝子 (IGF-1R) についても同様に第 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 12 年度はインスリン様増殖因子受容体遺伝子に関しても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。平成 11 年度は単離されたヒトおよびマウスのクロック 1 遺伝子を clk-1 線虫にインジェクション法を用いて導入し、脱糞のリズムに与える影響を検討した。その結果、ヒトおよびマウスのクロック 1 遺伝子は線虫の運動リズムを制御する生物学的活性を有することを示した。現在、導入されたマウスのクロック 1 遺伝子が線虫寿命を制御する可能性を検討中である。

(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。平成 11 年度は上記のノックアウトベクターを ES 細胞に導入後、相同組み換えを起こした ES 細胞の単離に成功した。更に、凝集法を用いてヘテロ接合体マウスの作製に成功し、現在ヘテロ接合体マ

ウスの交配実験により、ホモ接合体マウスの作製を行っている。

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。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：daf-2 長寿変異がインスリン受容体遺伝子に導入されたマウスの作製に成功した。ホモ接合体マウスは胎児期あるいは新生時期に死亡することから、インスリンのシグナル伝達異常が示唆された。生化学的解析から、daf-2 変異はインスリン受容体のチロシンキナーゼ活性が失われることにより、インスリンのシグナル伝達異常をきたしていることを明らかとした。(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。また、単離されたヒトおよびマウスのクロック 1 遺伝子を線虫に導入し、哺乳動物

のクロック 1 遺伝子、線虫の運動リズムを制御する活性があることを示した。この結果は、ヒトおよびマウスのクロック 1 遺伝子が個体寿命をも制御している可能性を示唆した。更にクロック染色体遺伝子にネオマイシン遺伝子が挿入され標的破壊を受けたノックアウトマウスの作製に成功した。

E. 研究発表 1. 論文発表 Fukuda, H., Shimizu, T., Nakajima, M., Mori, H., and Shirasawa, T. (1999). Synthesis, Aggregation, and Neurotoxicity of the Alzheimer's Abeta1-42 Amyloid Peptide and Its Isoaspartyl Isomers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 9, 953-956.

Asami, S., Kuroyanagi, H., Seki, N., and Shirasawa, T. (1999). Orthologues of the *Caenorhabditis elegans* Longevity Gene *clk-1* in Mouse and Human. *Genomics* 58, 293-301.

Nakano, H., Sakon, S., Koseki, H., Takemori, T., Tada, K., Matsumoto, M., Munechika, E., Sakai, T., Shirasawa, T., Akiba, H., Kobata, T., Santee, S. M., Ware, C. F., Rennert, P. D., Taniguchi, M., Yagita, H., and Okumura, K. (1999). Targeted disruption of *traf5* gene causes defects in CD40- and CD27- mediated lymphocyte activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9803-9808.

Tomoda, T., Bhatt, R. S., Kuroyanagi, H., Shirasawa, T., and Hatten, M. E. (1999). A mouse serine/threonine kinase homologous to *C. elegans* UNC51 functions in parallel fiber formation of cerebellar granule neurons. *Neuron* 24, 833-846.

Yan, J., Kuroyanagi, H., Tomemori, T., Okazaki, N., Asato, K., Matsuda, Y. i., Suzuki, Y. i., Ohshima, Y., Mitani, S., Masuho, Y., Shirasawa, T., and Muramatsu, M. a. (1999). Mouse ULK2, a novel member of the UNC-51-like protein kinases: unique features of functional domains. *Oncogene* 18, 5850-5859.

Fujita, T., Shirasawa, T., and Maruyama, N. (1999). Expression and structure of senescence marker protein-30 (SMP30) and its biological significance. *Mech Ageing Dev* 107, 271-280.

Shirasawa, T. (1999). Characterization of protein isoaspartyl methyltransferase (PIMT)- deficient mice. *Seikagaku* 71, 134-140.

Fujita, T., Shirasawa, T., Inoue, H., Kitamura, T., and Maruyama, N. (1998). Hepatic and renal expression of

senescence marker protein-30 and its biological significance. *J Gastroenterol Hepatol* S124-31.

Kobayashi, S. i., Morimoto, K. i., Shimizu, T., Takahashi, M., Kurosawa, H., and Shirasawa, T. Association of EXT1 and EXT2, Hereditary Multiple Exostoses Gene Products, in Golgi Apparatus. *Biochem Biophys Res Commun* 268, 860-867.

2. 学会発表

清水孝彦、福田宏之、中島光業、森啓、白澤卓二 (1999) アミロイドβ イソアスパラギン酸修飾とアルツハイマー病 日本基礎老化学会、第22回大会 京都 1999.06.16-06.18

黒柳秀人、金岩、留守卓也、黒岩麻人、松田洋一、鈴木陽一、増保康彦、大島靖美、三谷昌平、村松正明、白澤卓二 (1999). マウス ULK2 (UNC-51-like kinase 2) 遺伝子の単離と解析: 軸策伸展におけるキナーゼドメインの保存された機能 第22回日本神経科学大会 大阪 1999.07.06-08

湯浅茂樹、石川裕子、相澤秀樹、酒井毅、小泉健一、古関明彦、中島光業、白澤卓二 (1999). プレセニリン1遺

伝子ノックアウトマウスにおける胎
児期中枢神経の形成異常の解析 第
22 回日本神経科学大会 大阪
1999.07.06-08

清水孝彦、福田宏之、中島光業、森
啓、白澤卓二 異性化アミロイドβ
の凝集特性 第 2 回 日本神経化学
会 広島 1999.09.15-17

小河原緑 瀬戸口靖弘 清水孝彦
高橋真由美 白澤卓二 Protein L-
Isoaspartyl Methyltransferase
(PIMT)欠損マウス由来初代培養神経
細胞に対する遺伝子治療 第 72 回日
本生化学会大会 横浜 1999.10.06-
09

清水孝彦 福田宏之 中島光業 森
啓 白澤卓二 アミロイドβイソア
スパラギン酸修飾による凝集特性と
アルツハイマー病 第 72 回日本生
化学会大会 横浜 1999.10.06-09

Kishimoto, K. Ozaki, M., Nakadate, K.,
Xu, L. H., Kuroyanagi, H., Suzuki, Y.,
Shirasawa, T., and Watanabe, Y. (1999).
A Stimulus- and Time-dependent, Brain-
specific Novel Phospholipase A2. In
Society for Neuroscience 29th Annual
Meeting, Miami Beach, U.S.A.
1999.10.22-10.28

Kuroyanagi, H., Jin, Y., Tomemori, T.,
Kuroiwa, A., Matsuda, Y., Suzuki, Y.,
Ohshima, Y., Mitani, S., Muramatsu, M.
and Shirasawa T. (1999). Molecular
Cloning and Functional Analysis of
Mouse ULK2, UNC-51 (*C. elegans*)-like
kinase 2. In Society for Neuroscience
29th Annual Meeting, Miami Beach,
U.S.A. 1999.10.22-10.28

Shimizu, T., Fukuda, H., Nakajima, M.,
Mori, H. and Shirasawa T.. (1999).
Amyloid beta-proteins containing
Isoaspartic acid at position 23 are
selectively deposited around the
Amyloid-bearing vessels. In Society for
Neuroscience 29th Annual Meeting,
Miami Beach, U.S.A. 1999.10.22-10.28

小泉健一、酒井毅、小林信一郎、中
島光業、森啓、白澤卓二、古関明彦
(1999). Presenilin 1 による体節中胚
葉分節化のコントロール 第 22 回日
本分子生物学会年会 福岡市
1999.12.7-12.10

浅海直、黒柳秀人、関直彦、白澤卓
二 (1999). 線虫長寿遺伝子 *clk-1* の
ヒト及びマウスでのオーソログス遺
伝子 第 22 回日本分子生物学会年
会 福岡市 1999.12.7-12.10

Asaumi, S., Kuroyanagi, H., Seki, N.,

and Shirasawa, T. Orthologous gene of
C. elegans longevity gene, *clk-1*, in
human and mouse. Biology of Ageing,
Gordon Research Conference, Ventura,
CA, USA. 2000.01.30-02.24

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出す目的で線虫の single locus 遺伝子であるベータ・チューブリン *ben-1* の種々の変異条件によるアリルを分離した。抗チューブリン薬である 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。得られた各々のアリ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

線虫長寿遺伝子変異体のうち特に age-1 について酸化ストレスに対する感受性を調べる。またそれらの 2 重変異体の感受性を調べ、長寿を引き起こす遺伝子経路と酸化ストレス抵抗性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

線虫の長寿遺伝子変異 age-1 と種々の遺伝子変異との 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。PI3 キナーゼの遺伝子変異 *age-1* は酸化ストレスに強い耐性を示した。PI3 の脱リン酸酵素である PI3 フォスファターゼ DAF-18 の遺伝子変異 *daf-18* と *age-1* の 2 重変異では酸化ストレス耐性は維持された。一方フォークヘッド転写因子 DAF-16 の遺伝子変異 *daf-16* と *age-1* の 2 重変異では *age-1* で見られた酸化ストレス耐性は消失した。この結果は *daf-18* は *age-1* の下流には位置せず *daf-16* は *age-1* の下流に位置することを示す。この遺伝子経路は長寿経路と全く同じ経路であり、酸化ストレス耐性を規定する機構が長寿を引き起こすことが示唆された。この経路の最下流 *daf-16* は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。*age-1* 変異体では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-18* と *age-1* との 2 重変異体では増大したままであったが、*daf-16* と *age-1* の 2 重変異体では野生体と同様であった。*daf-18* は *daf-2* の下流であることを考慮すると、*daf-2*, *daf-18*, *age-1* から *daf-16* に至る経路は Mn-SOD などの抗酸化防御酵素の遺伝子発現を調節することによって、酸化ストレスに対する耐性を変化

させ、よって寿命を制御することが示唆された。*age-1* は過酷な環境下で形成される耐性幼虫の成立に関わる遺伝子であることから抗酸化防御酵素の遺伝子発現を調節することにより、耐性幼虫としてストレス耐性を獲得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 oxidativestress resistance and Mn-SOD gene expression. FASEB Journal 13(8) 1385-1393 1999

(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

- 1.特許取得 なし
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他 なし

(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

老人斑形成アミロイド蛋白生成へのプレセニン1の作用に関する研究

分担研究者 森 啓 大阪市立大学医学部教授

研究の要旨 老人斑は老化およびアルツハイマー病に特異的な神経病変であり、これを形成するアミロイド蛋白の生成は重要な老化と痴呆病因の解明に繋がることが考えられている。本研究では、アルツハイマー病原因遺伝子の1つであるプレセニン1の作用を検討したものであり、培養細胞を用いた実験系ではプレセニン1の変異効果は細胞内発現量を高進する可能性があることを示すことができた。

A. 研究目的

<目的>老人斑構成成分であるアミロイド蛋白は線維化しやすい性質をもつ。特に A β 42 成分は初期沈着成分として病因にとって重要であり、その量変化は鍵反応と考えられている。一方、A β 40 成分はアミロイド沈着形成にとって後期に寄与する成分であり、アポリポ蛋白に関連して脳内に蓄積すると考えられている。最近になり、遺伝性（家族性）アルツハイマー病の原因遺伝子産物がプレセニン1であることが明らかにされ、その突然変異も脳内の A β 42 を増加させることが報告された。これらのことから、A β 42 の増加をもたらす代謝機序の解明が、アルツハイマー病の予防、治療法の確立に必須であると考えられている。アルツハイマー病（AD）原因遺伝子産物プレセニン1（PS1）はアミロイド前駆体タンパク質（APP）代謝に関与し、A β 産生を制御していることが知られている。最近、PS1 は APP をはじめとするタンパク輸送系に関与するという報告がなされている一方、PS1 は γ 分泌酵素そのものであるという報告もなされ、APPC 末断片の輸送に関与しているのか、あるいは直接代謝に

関与しているのか不明である。我々はこれまで PS1 と APP 代謝との関連性を解析し、突然変異 PS1 を発現する PC12D 細胞で、APPC 末断片の増加傾向が見られることを見出した。平成 11 年度の研究ではヒト PS1 および突然変異型 PS1 を安定的に発現する PC12D 細胞を用いて、PS1 と APPC 末断片の細胞内の分布、量的な関係等を解析し、PS1 が APPC 末断片の代謝にどのように関与するのか検討した。

B. 研究方法

(1) 野生型ヒト PS1 および突然変異 PS1 (A260V) を安定的に発現する PC12D 細胞は、これらの遺伝子とヒト遺伝子の野生型 APP695 をリポフェクション法によって導入したあと抗生物質である G418（ネオマイシン）耐性を指標に選択した（表1）。PC12D 系の細胞は 5% 非動化胎児ウシ血清、5% ウマ血清を含む DMEM 培地中で経代培養した細胞を 0.25M sucrose 溶液でホモゲナイズした後、1,000 x g の遠心上清をさらに遠心し、5,000 x g 沈殿画分(P2a)、8,000 x g 沈殿画分(P2b)、100,000 x g 沈殿画分(P3)に分画した。

表 1

ヒト野生型および変異型 (A260V)
PS1 を発現する PC12 細胞株

Class	Expression	Cell line
PS1H	PS1 high expression	PS1-6
PS1L	PS1 low expression	PS1-4, -10, -13
A260V	PS1A260V	A260V-E, -Y

(2) それぞれの膜画分に含まれる APP および APPC 未断片は RIPA 緩衝液 (22mM リン酸, 緩衝液 pH7.5, 500mM 塩化ナトリウム, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% デオキシコール酸ナトリウム, 0.02% NaN_3) で処理後、再度高速遠心処理をした上清を膜蛋白画分として得た。

(3) ヒト PS1 および突然変異 PS1 (A260V) を安定的に発現する PC12D 細胞および野生型 PC12D 細胞を用いて、細胞内での γ 分泌酵素活性 ($\text{A}\beta 40$ および $\text{A}\beta 42$) をドットプロットにより定量測定した。

(4) イムノブロッティングは対象試料を 2-メルカプトエタノールを含んだ SDS サンプルバッファ中で溶解した後、5 分間熱処理をした。プレセニン 1 を解析する場合には、37°C にて加温処理した。処理したサンプルを 10% のポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、150mA 定電流で 2 時間 PVDF 膜に転写した。転写した膜は、3% スキムミルクと 1% ウシ血清アルブミンを含んだトリス緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH 7.6, 150mM NaCl) で室温 1 時間ブロッキングを行い、トリス緩衝液で希釈した一次抗体で室温 3 時間反応させた後、1000 倍希釈したビオチン化 2 次抗体 (抗マウス IgG (免疫生物研究所) ある

いは抗ラビット IgG (Vector labs., Burlingame, CA) で室温 1 時間反応させた。トリス緩衝液で洗浄後、アビチン-ビオチン複合体 (Vector labs.) に室温 30 分間反応させ、4-クロロ-1-ナフトールもしくは ECL キット (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) を用いて発色させた。タンパク染色には、転写された膜を CBB 色素で染色した。また、プロット結果の定量解析に NIH imaging ソフトを用いた。蛋白定量は BCA 蛋白定量キット (Pierce 社) を用いた。

C. 研究成果

(1) 野生型 PS1 および PS1A260V を安定的に発現する PC12D 細胞および野生型 PC12D 細胞において、PS1 および PS1A260V と α および β 分泌酵素による切断活性との間の関連性は見出せなかった。

(2) PS1 および PS1A260V を安定的に発現する PC12D 細胞では、野生型 PC12D 細胞に比べ APPCTF の量が若干増加していた (図 1)。突然変異の有無での差は見られなかった (図 2)。

(3) PS1 および PS1A260V を安定的に発現する PC12D 細胞の各膜画分における APPCTF の量比を野生型のものと比べると、P2a 画分に含まれる APPCTF の量が有意に増加していた。また突然変異の有無によらず、導入された PS1 あるいは PS1A260V の発現量の多いものほど、P2a 画分にある APPCTF の量が増加していた。

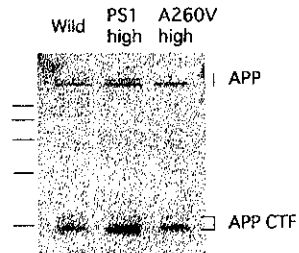


図1 PC12D 細胞におけるアミロイド蛋白前駆体 (APP) およびその分解産物 (CTF) full-size の APP から APP CTF を経てアミロイド蛋白が産生される。

(4) ヒト PS1 および突然変異 PS1 (A260V) を安定的に発現する PC12D 細胞ではドットプロットにより $A\beta 42$ 活性の増加が見られたが、この結果はアミロイド蛋白形成の

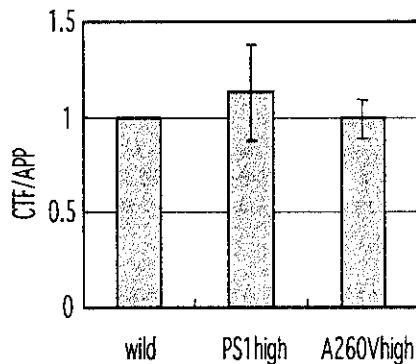


図2 ヒトプレセニリン 1 (PS1) を導入した PC12D 細胞におけるアミロイド蛋白前駆体 (APP) と分解産物 (CTF) 比の解析

直接の前駆体である APP 断片の量効果であった。

D. 考察

以上の結果から導入した PS1 は突然変異の有無にかかわらず PC12D 細胞内で APPCTF の分布を変化させていると考えられる。最近、PS1 をノックアウトした培養細胞では APPCTF が増加し、 γ 分泌酵素活性が見られなくなること、PS1 の

アンチセンスを導入した細胞では、 $A\beta 42$ 活性が増加すること、PS1 が細胞間接着に参加し、情報伝達に密接に関与していること等の報告がなされている。本研究の結果とこれらの結果をあわせて考えると、PS1 は γ 分泌酵素そのものであるとするより APPCTF の輸送を担い、輸送に障害が生じると $A\beta 42$ 活性が上昇すると推定された。今回の実験結果では突然変異自身の効果というより遺伝子発現量効果が示された内容になっている。このことは、細胞内のプレセニリン 1 代謝回転が変異によって変化する事を示唆しており、最近の ER ストレス説で唱えられているプレセニリン 1, APP タンパクの ER 滞留延長病因論とも一致した結果であると考えられる。

E. 結論

PS1 の高発現はアミロイド蛋白特に $A\beta 1-42/43$ の生成と前駆体である APP の分解代謝に対して、PS1 変異効果と同じ効果を示した。小胞体分画における APP 分子の滞留延長が重要な病因であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

1) Arai, T., Ikeda, K., Akiyama, H., Haga, C., Usami, M., Sahara, N., Iritani, S., & Mori, H. (1999) *Acta Neuropathol.* 97, 82-84 A high incidence of apolipoprotein E ϵ 4 allele in middle-aged nondemented subjects with cerebral amyloid β protein deposits

2) Akiyama, H., Mori, H., Saido, T., Kondo, H., Ikeda, ., & McGeer, P.L. (1999) *Glia* 25, 324-331 Occurrence of the diffuse amyloid β -protein (A β) deposits with numerous A β -containing glial cells in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease

3) Hong, C.-S., Caromile, L., Nomata, Y., Mori, H., Bredesen, D.E., & Koo, E.H. (1999) *J. Neurosci.* 19 (2): 637-643

Contrasting role of presenilin-1 and presenilin-2 in neuronal differentiation in vitro

4) Fukuda, H., Shimizu, T., Nakajima, M., Mori, H., & Shirasawa, T. (1999) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 9 (7): 953-956

Synthesis, aggregation, and neurotoxicity of the Alzheimer's A β 1-42 amyloid peptide and its isospartyl isoformers

5) Arai, T., Akiyama, H., Ikeda, K., Kondo, H., & Mori, H. (1999) *Brain Res.* 823 (1-2): 202-206

Immunohistochemical localization of amyloid beta-protein with amino-terminal aspartate in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease

6) Lippa, C. F., Ozawa, K., Mann, D. M., Ishii, K., Smith, T. W., Arawaka, S., & Mori, H. (1999) *Arch Neurol.* 56 (9): 1111-1118

Deposition of beta-amyloid subtypes 40 and 42 differentiates dementia with Lewy bodies from Alzheimer disease

総説

1) Tomiyama, T., Corder, E.H., & Mori, H. (1999) *Cellular and Molecular Life Sciences* 56, 268-279

Molecular pathogenesis of apoE-associated late-onset Alzheimer's disease

2) 佐原成彦、森 啓 (1999) *医学のあゆみ* 189

(1), 37-42

系統学的見地からみたプレセニリンの蛋白構造に関する生物学的意義

3) 村山繁雄、森 啓 (1999) *Clinical Neuroscience* 17 (8), 64-65

神経原線維変化型痴呆: Tauopathy とは

4) 森 啓 (1999) *神経研究の進歩* 43 (6), 838-844. 特集: 第 34 回脳のシンポジウムー痴呆性疾患の細胞障害分子機構

アルツハイマー病とタウオパチー

5) 森 啓 (1999) *実験医学* 17, 2224-2230.

アルツハイマー病とその関連疾患

2. 学会発表

国内学会

1) 森 啓 (1999) 第 34 回脳のシンポジウム・シンポジウム「痴呆性疾患の細胞障害分子機構」(東京; 杏林大学医学部臨床講堂、3 月 19 ~20 日)

「アルツハイマー病とその関連疾患」

2) 富山貴美、荒若繁樹、森 啓 (1999) 第 22 回日本神経科学大会・シンポジウム「変性性痴呆とタウ蛋白の病理」(大阪; 大阪南港・アジア太平洋トレードセンター、7 月 6~8 日)

「神経変性疾患とタウ蛋白アイソフォーム」

3) 富山貴美、森 啓 (1999) *International Symposium on Dementia · Symposium 3 Pathogenesis of Dementia-Tau* (神戸; International Conference Center Kobe、9 月 11~13 日)

“The effect of tau mutations on cytoskeletal networks of microtubules and cell organelles”

4) 富山貴美、森 啓 (1999) 第 42 回日本神経化学会 (広島; 広島国際会議場、9 月 15~17 日) シンポジウム: オーガナイザー「神経老化の最前線」

「D-アミノ酸と神経の老化」

5) 清水孝彦、福田宏之、中島光業、森 啓、白澤卓二 (1999) 第 42 回日本神経化学会 (広島; 広島国際会議場、9 月 15~17 日)

異性化アミロイド β の凝集特性

6) 亀谷富由樹、田中喜久子、宇佐美美穂子、丸山敬、森 啓 (1999) 第 42 回日本神経化学会 (広島; 広島国際会議場、9 月 15~17 日)

アルツハイマー病原因遺伝子産物プレセニリンと A β アミロイド前駆体タンパク質の C 末断片の関係について

7) 森 啓 (1999) 第 18 回日本痴呆学会・シンポジウム: オーガナイザー「タウの変異と神経変性のメカニズム」(熊本; 熊本市産業文化会館、10 月 7~8 日)

タウオパチー研究に望んでいること

8) 亀谷富由樹、田中喜久子、関島良樹、徳田隆彦、池田修一、森 啓 (1999) 第 18 回日本痴呆学会 (熊本; 熊本市産業文化会館、10 月 7~8 日)

脳膜確聞のプレセニリン 1 およびアルツハイマーアミロイド前駆体タンパク

9) 玉岡晃、宮武史子、松野佐好子、石井一弘、庄司進一、佐原成彦、森 啓 (1999) 第 18 回日本痴呆学会 (熊本; 熊本市産業文化会館、10 月 7~8 日)

アルツハイマー病脳における脂質過酸化とアミロイド β 蛋白や APOE 遺伝子型との相関

10) 森 啓、富山貴美 (1999) 大阪大学蛋白質研究所セミナー・シンポジウム「タンパク質のフォールディング問題ーその物理学的基礎と生物学的意義」(大阪; 大阪大学微生物病研究

所講堂、11月25~26日)

「ニューロン内異常フォールディング蛋白の病理学的意義ーアルツハイマー病神経原線維変化を例として」

(2b) 国外学会

1) Sahara, N., Arawaka, S., Tomiyama, T., Lee, G., Schellenberg, G.D. & Mori, H. (1999) Society for Neuroscience 29th Annual Meeting for Neuroscience (Miami Beach, Oct. 23-28)
The tau mutation (Val 337 Met) disrupts cytoskeletal networks of microtubules

2) Tomiyama, T., Arawaka, S., & Mori, H. (1999) Society for Neuroscience 29th Annual Meeting for Neuroscience (Miami Beach, Oct. 23-28)
Molecular anatomy of tau inclusions in AD brain using tau isoform-specific antibodies

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、老化の抑制に寄与しう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、老化の抑制に寄与しう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.*