

厚生科学研究補助金（長寿科学総合研究事業）

総括・分担研究報告書

長寿遺伝子に関する分子遺伝学的研究

平成 13 年 3 月

主任研究者 白澤卓二

（東京都老人総合研究所 分子遺伝学部門 室長）

厚生科学研究補助金 (長寿科学総合研究事業)

総括・分担研究報告書

長寿遺伝子に関する分子遺伝学的研究

目次

インスリン抵抗性と寿命シグナル

主任研究者 白澤卓二 東京都老人総合研究所・分子遺伝 1

スーパーオキシドジスムターゼと長寿命遺伝子

研究分担者 本田修二 老人総合研究所・アイソトープ 14

老化研究素材としての線虫：ゲノム解析の現状と将来

分担研究者 三谷昌平 東京女子医科大学・第二生理 29

ポリコーム群タンパク複合体の構造と機能

分担研究者 古関明彦 千葉大学大学院・発生生物 39

プレセニリン1 遺伝変異はアミロイド老人斑の A β 42 成分
だけでなく A β 40 成分の沈着も亢進する。

分担研究者 森啓 大阪市立大学大学院・脳神経 43

インスリン抵抗性と寿命シグナル

主任研究者 白澤卓二 東京都老人総合研究所室長

研究要旨

我々は、マウスのインスリン受容体遺伝子に *daf-2* 長寿命線虫で発見された遺伝子変異(P1195L)を導入した遺伝子改変マウスの作製に成功した。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。ヘテロ接合体マウスはインスリンシグナルが傷害され、インスリン抵抗性を示した。また、酸化ストレスにたいして耐性を示し、100%酸素下の生存は野生株マウスに比べ延長していた。この結果より、インスリンシグナル伝達異常が、哺乳動物でも個体寿命を長寿化する可能性を示唆した。

研究目的

1997年に線虫の長寿命変異体の分子遺伝学的解析から、インスリンのシグナル伝達系の異常が個体レベルでの長寿をもたらす可能性が示唆された(1)。この線虫長寿命変異体の実験結果はこれまでマウスをカロリー制限するとマウスの寿命が3割程度長寿化するという実験事実を生化学的側面から支持するものであった。線虫の長寿

命変異体で発見された *daf-2* (インスリン受容体相同遺伝子) の遺伝子変異はヒトでも同一の変異が発見され(インスリン抵抗性症例より) 2)、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。しかしながら、同一の変異を有するインスリン抵抗性の症例が果たして長寿の遺伝的背景を有しながらも、2型糖尿病あるいは肥満病態を発症するために、即ち、

新たに獲得された病気の為に本来の長寿命を全うできずに短命に終わっているという可能性がある。この可能性を証明すると共に、細胞レベルでのエネルギー制御が個体を長寿化する有力な戦略であることを示す目的で、マウスのインスリン受容体遺伝子に *daf-2* 変異をノックインした遺伝子改変マウスを作製した。これまでの解析で、ホモ接合体マウスは糖尿病性ケトアシドーシスの病態で 48 時間以内に死亡することを確認した。これはインスリン受容体ノックアウトマウスとほぼ同様の表現形で (3)、*daf-2* 変異が、インスリンのシグナル伝達異常をもたらすことを *in vivo* で証明した。ヘテロ接合体マウスは数ヶ月の時点では明らかな糖尿病は発症せず、交配・生殖可能であった。そこで、個体の長寿化の分子機構を解析するため、ヘテロ接合体マウスを用いて、インスリン抵抗性と酸化ストレス応答性について検討した。

研究方法

1. IRP1195L 変異マウスの作製

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 *Daf-2* 長寿命線

虫で発見された P1195L アレルの遺伝子変異 (IRP1195L) を導入したベクターを構築した。常法に従い IRP1195L 変異を有する ES 細胞を単離し、この ES 細胞からキメラマウスを樹立し、キメラマウスと C57BL/6 マウスと交配させヘテロ接合体マウス (IRP1195L/wt) を得た。ヘテロ接合体マウスどうしの交配でホモ接合体マウス (IRP1195L/P1195L) を作製した。

2. 生化学的解析

①チロシンキナーゼ活性の測定法

生後 1 日齢のホモ接合体マウス、ヘテロ接合体マウス、野性型マウスの肝臓より、1% TritonX-100 を含むバッファーで膜蛋白を溶出し、その上清を WGA カラムを使い、インスリン受容体蛋白を粗精製した。これをインスリンで処理した後、 ^{32}P - γ -ATP を加えて自己リン酸化反応させ、この反応液をインスリン受容体 C 末端抗体またはリン酸化チロシン抗体で免疫沈降を行った。これを SDS-ポリアクリルアミドゲルに泳動後、オートラジオグラフィを行い 9.5 kD のバンドの濃度によりチロシンキナーゼ活性を測定した。

②空腹時血糖値、血清インスリン

値の測定

野性型マウス、ヘテロ接合体マウス（12ヶ月齢）を15時間空腹にさせ血糖値、血清インスリン値を測定した。血糖値はグリコカード（アベンテスファーマ社）で測定した。血清インスリン値はラットインスリン値をコントロールとする RAT INSULIN RIA KIT（リンコ・リサーチ社）で測定した。

3.高酸素負荷実験

野性型マウス、ヘテロ接合体マウス（10週齢）を>98%酸素チャンバーで死亡するまで飼育し、酸素毒に対する耐性を検討した。

4.ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色

高酸素負荷で死亡した野性型マウス及びヘテロ接合体マウスの肺に、気管支よりカテーテルで4%ホルマリンを注入し固定した後、常法に従いパラフィン切片を作製した。脱パラフィンした後にヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行った。

5.免疫組織化学法

高酸素負荷で死亡した野性型マウス及びヘテロ接合体マウスの肺のパラフィン切片を脱パラフィンし

た後、抗 MnSOD 抗体（StressGen Biotechnologies Corp）と一晩反応させ、ABC（ペルオキシダーゼ）キット（VECTASTAIN）を用いて染色した。

6. IRP1195L 変異マウス由来線維芽細胞における酸化ストレス応答性

IRP1195L 変異マウス胎児より線維芽細胞を培養し、ホモ、ヘテロ、野性型マウス由来の細胞を調整した。これらの細胞における酸化ストレス耐性を検討する目的で培養細胞に酸素毒であるパラコート（0.1、1、10mM）を添加し、MTT アッセイで細胞の生存を測定した。

7. Mn-SOD および Cu,Zn-SOD の酵素活性測定法

野性型マウス及びヘテロ接合体マウスの肝臓を homogenization buffer（2mMEDTA, 2mM EGTA, 2mM PMSF, 4 μg/ml leupeptin in PBS(-)）でホモジナイズし、超音波処理、遠心（12000g, 30min）してサンプルを調整した。分光光度計の石英セル（1ml 用）に Assay mix（100 μM ヒポキサンチン、25 μM WST-1）とサンプル 10 μl をとり、PBS(-)または 50mM KCN 20 μl を加え、キサン

チンオキシダーゼ 20 μ l を添加し、すばやく石英セルを転倒攪拌した。OD438 の経時変化を記録し、その傾きから吸光度の変化速度を求めた。50mM KCN を添加して測定した場合の活性を Mn-SOD 活性とし、KCN を添加しない総 SOD 活性からその値を差し引いた値を Cu,Zn-SOD 活性として求めた。

結果

1. IRP1195L 変異マウスにおける

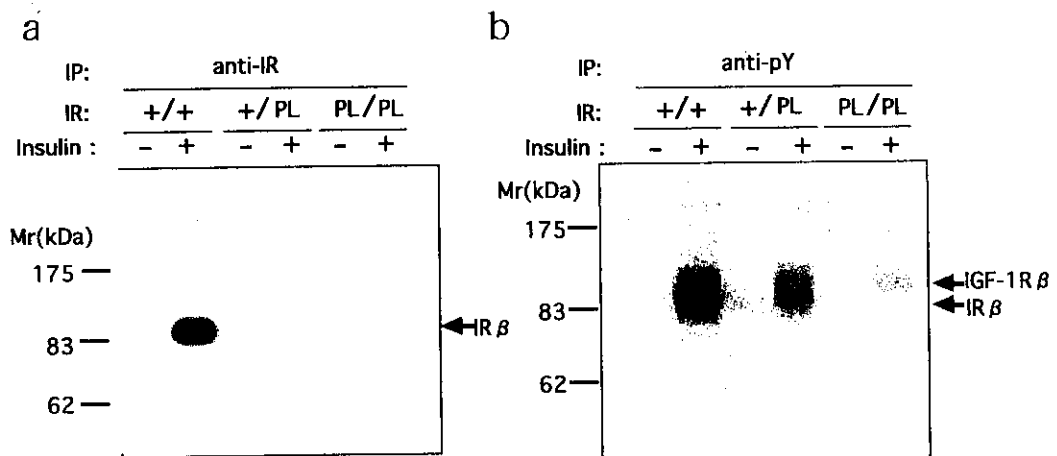


図 1 IRP1195L ヘテロ接合体マウス、ホモ接合体マウスにおけるインスリン受容体自己リン酸化能の失活

a 野生型マウス (+/+), IRP1195L ヘテロ接合体マウス (+/PL), IRP1195L ホモ接合体マウス (PL/PL) の新生児肝臓より抽出したインスリン受容体蛋白にインスリン刺激を加え、自己リン酸化を検討した。その結果、ホモ接合体マウスはインスリン受容体のリン酸化は検出できなかった (レーン 6)。ヘテロ接合体マウスはインスリン刺激後、弱いながら、インスリン受容体の自己リン酸化が検出された (レーン 4)。

b ヘテロ接合体マウス (+/PL) におけるクロストークシグナルの検出。

インスリンで刺激後、抗リン酸化チロシン抗体で免疫沈降を行い、シグナルのクロストークを検討した。その結果、ホモ接合体マウス及びヘテロ接合体マウスはインスリンから IGF-1 受容体を介したシグナルが活性化されていることが判明した（レーン4およびレーン6の上のバンド）。この所見はインスリン抵抗性の病態を支持するものである。

表1 IRP1195L ヘテロ接合体マウスにおける体重、血糖、および血清インスリン

	野生型マウス	ヘテロ接合体マウス
Body weight (g)	38.6±4.1 (n=6)	35.1±2.8 (n=12)
Blood glucose (mg/dL)	67.3±10.4 (n=6)	56.9±5.5 (n=12)
Plasma insulin (ng/mL)	0.38 (n=5)	2.24 (n=5)

12-month-old, male mice

また、ヘテロ接合体マウスは体重、空腹時血糖では、野生型マウスと比べて差がなく、インスリン抵抗性を獲得し、高インスリン血症を示していることを明らかにした（表1）。

2. IRP1195L 変異マウスにおける酸化ストレス応答性と活性酸素除去機構

Daf-2 変異の線虫で強い酸化スト

レス耐性と Mn-SOD の遺伝子発現が増大されていることが報告されている(4)。そこで酸化ストレス耐性を検討するために、高酸素負荷実験を行った。ヘテロ接合体マウスは、98%以上の高酸素チェンバーの中で飼育した結果、野生型マウスに比べて生存に延長傾向を認めた（図-2）。

Survival of IR^{P1195L/wt} mice under hyperoxia

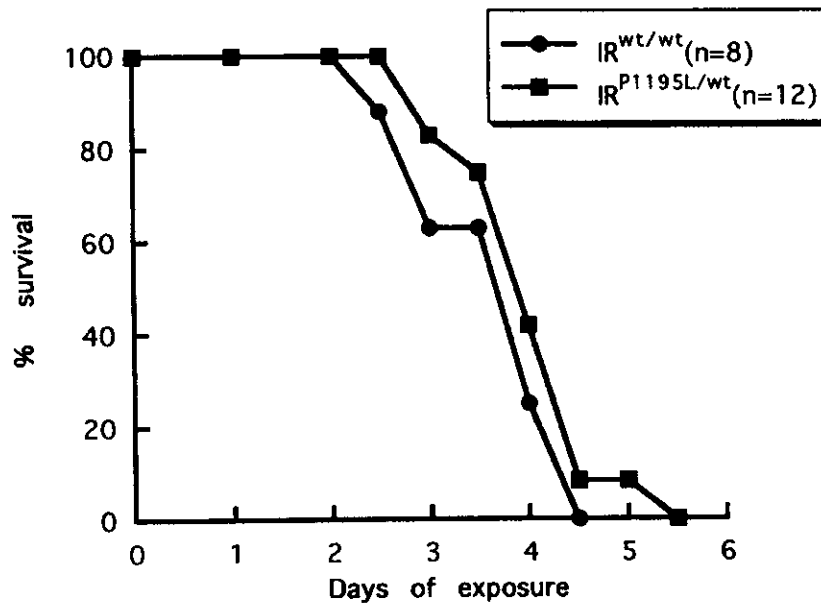


図 2

IRP1195Lヘテロ接合体マウスにおける98%酸素吸入による98%酸素吸入下での生存曲線

IRP1195Lヘテロ接合体マウスは野生型マウスに比べ、98%酸素吸入下での生存が延長する傾向が認められた。

一方、酸化ストレスによる肺組織に与える影響を病理学的に検討した。高酸素負荷60時間で死亡した野生型マウス(図-3A,C)と、72時間で死亡したヘテロ接合体マウス(図-3B,D)の肺をHE染色し、

野生型マウスでは肺胞構造の破壊がひどく厚い硝子膜の形成がみられ、病変の進行が速いことを示した。ヘテロ接合体マウスではうっ血が強いが硝子膜の形成は弱く薄いのが認められた。

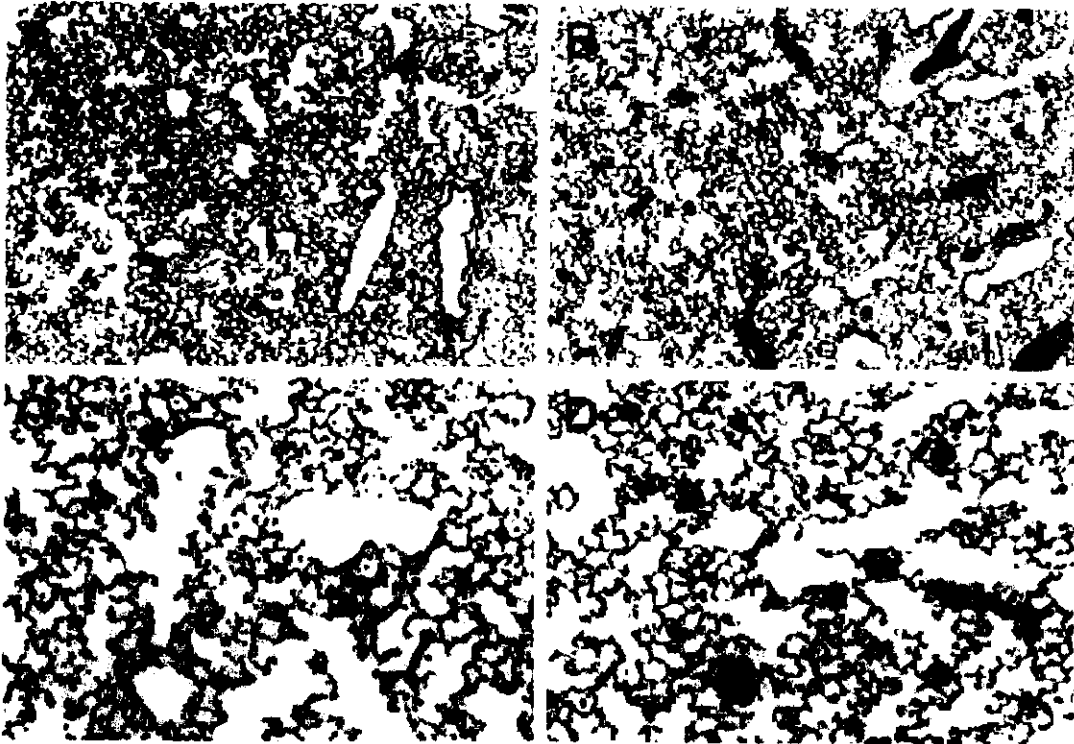


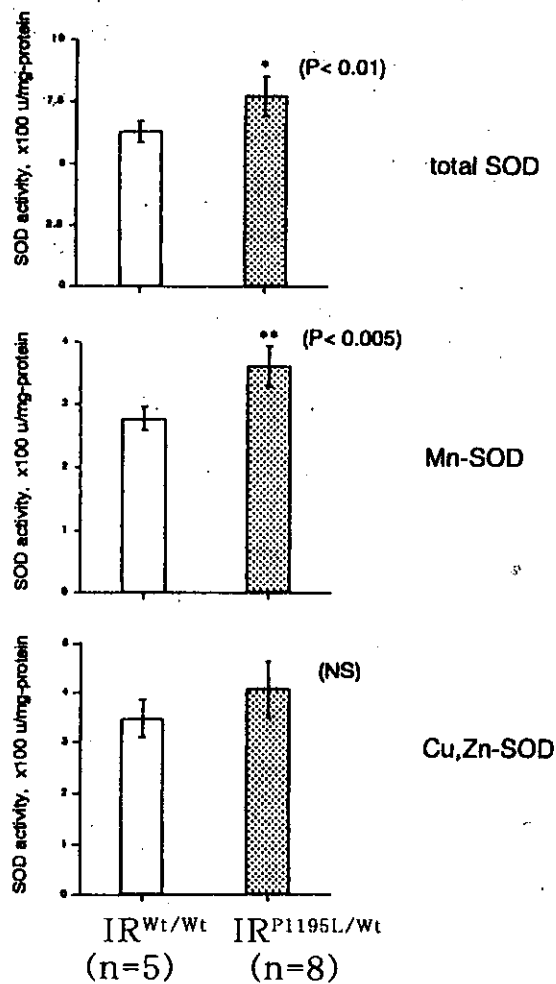
図 3 IRP1195L ヘテロ接合体マウスにおける 98%酸素吸入による急性肺臓炎

- A: 野生型マウスの肺病理像、98%酸素吸入後 60 時間で死亡、HE 染色、弱拡大、高度の炎症細胞浸潤を認めた。
- B: IRP1195L ヘテロ接合体マウスの肺病理像、98%酸素吸入後 72 時間で死亡、HE 染色、弱拡大
- C: A 切片の強拡大像、高度の硝子膜形成と肺胞破壊像を認めた。
- D: IRP1195L ヘテロ接合体マウスの肺病理像、強拡大。野生型マウスに比べ、硝子膜形成は軽度、炎症細胞浸潤の軽度、高度の鬱血像を認めた。

また酸化ストレスに対して、ヘテロ接合体マウスで生存の延長傾向を認めたので、抗酸化防御に関わる酵素の活性を測定した (図-4)。Mn-SOD 活性がヘテロ接合体マウスで野生型マウスに比べて約 1.3 倍高く、有意の差が得られた。

図 4 IRP1195L ヘテロ接合体マウス
肝臓における Mn-SOD 活性
野生型マウス（白カラム）および
IRP1195L ヘテロ接合体マウス（黒カ
ラム）肝臓における SOD 活性（上段）、
Mn-SOD 活性（中絶）、Cu/Zn-SOD
活性（下段）を示す。IRP1195L ヘテ
ロ接合体マウスの Mn-SOD 活性は野
生マウスの 1.3 倍の活性値を示した。

高酸素負荷 60 時間で死亡した野性
型マウス（図-5B,C）の肺では弱
い発現しか認められなかったが、84
時間で死亡したヘテロ接合体マウ
ス（図-5E,F）では強い Mn-SOD
の発現が認められた。



Cu,Zn-SOD 活性も上昇傾向が認
められた。そこで Mn-SOD の発現
を免疫組織化学法を用いて調べた。

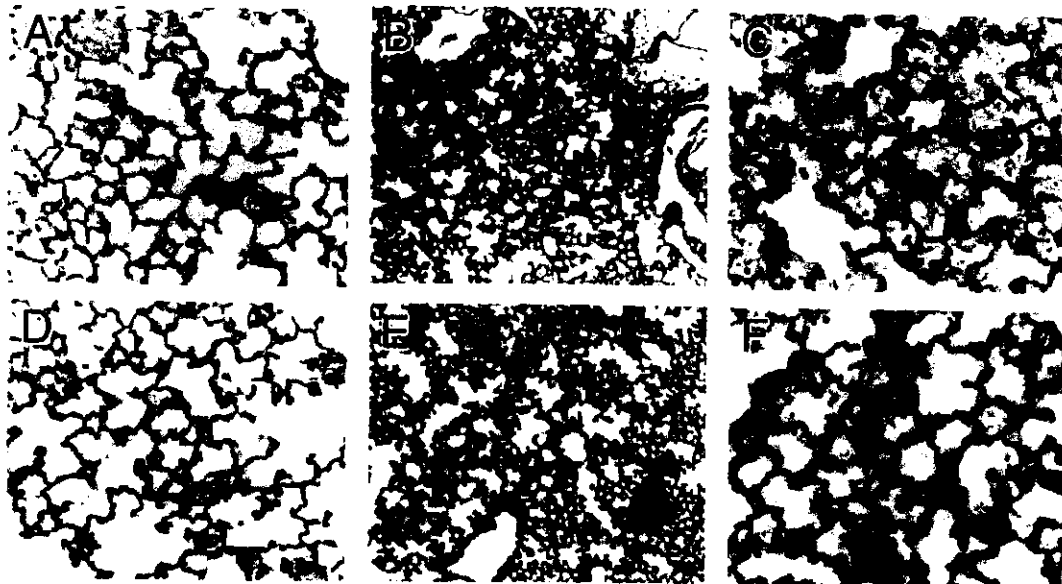


図5 IRP1195L ヘテロ接合体マウス酸素負荷による Mn-SOD の発現増強

A: 野生型マウスの肺における Mn-SOD の発現局在、抗 Mn-SOD 抗体で免疫染色、弱拡大、酸素負荷前。

B: 野生型マウスの肺における Mn-SOD の発現局在。98%酸素吸入後 60 時間で死亡、抗 Mn-SOD 抗体で免疫染色、弱拡大、肺胞上皮細胞で軽度の Mn-SOD の発現を認めた。

C: B の強拡大病理像、肺胞の破壊像と細胞浸潤を認める。軽度の Mn-SOD の発現を認めた。

D: IRP1195L ヘテロ接合体マウスの肺における Mn-SOD の発現局在、抗 Mn-SOD 抗体で免疫染色、弱拡大、酸素負荷前。

E: IRP1195L ヘテロ接合体マウスの肺における Mn-SOD の発現局在、98%酸素吸入後 84 時間で死亡、抗 Mn-SOD 抗体で免疫染色、弱拡大、肺胞上皮細胞で Mn-SOD の発現増強を認めた。

F: E の強拡大病理像、Mn-SOD の発現増強を認めた。

3. IRP1195L 変異マウス由来線維芽細胞における酸化ストレス応答性

IRP1195L 変異マウス由来線維芽細胞における酸化ストレス耐性を検討する目的で、ホモ、ヘテロ、

野生型マウス由来の培養細胞に酸素毒であるパラコートを追加した。

その結果、ホモ由来の細胞は 1mM のパラコート存在下にて 26.4%の細胞生存率を示し、対照群の 12.2%と比較するとパラコートに対する

有意な耐性を示した (図-6)。
($P < 0.0001$)

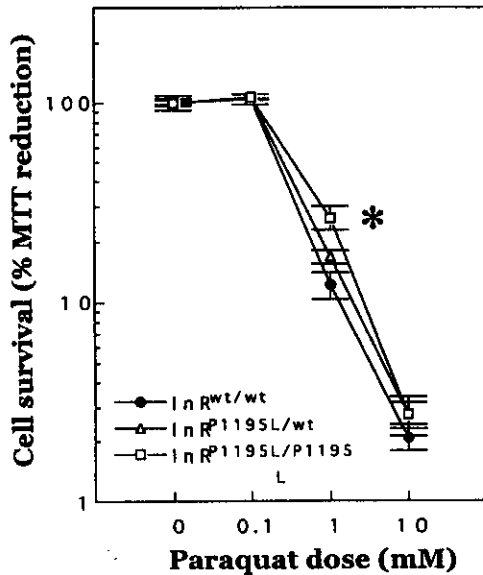


図 6. IRP1195L ホモ接合体マウス、ヘテロ接合体マウス由来胎児線芽細胞における酸化ストレス応答能
インスリン受容体遺伝子改変マウスより培養した線維芽細胞に酸化毒であるパラコートを追加し、細胞死を MTT 還元能で検討した。1mM 濃度のパラコートでホモ接合体由来細胞は有意の酸化ストレス耐性を示した。

考察

我々は、マウスのインスリン受容体遺伝子に *daf-2* 長寿命線虫で発見された遺伝子変異(P1195L)を導入した遺伝子改変マウス (インスリン抵抗性モデルマウス) の作製に成功した。*daf-2* 長寿命変異体では、インスリン様シグナル伝達

に異常があり、下流の DAF-16 転写因子が活性化されて、形態変化、エネルギー代謝変化、長寿などに

必要な遺伝子群の転写が誘導されるのではないかと考えられている(1)。線虫ではインスリン様受容体遺伝子はゲノムに 1 コピーのみ存在する。しかしながら、哺乳動物には *daf-2* に相同性をしめすインスリン受容体遺伝子および IGF-1 受容体遺伝子の 2 つの相同遺伝子が存在する。これらの 2 つの遺伝子は分子進化の過程で、同じ祖先遺伝子の重複によって多様化したものと考えられる。もう 1

つの構造上の特徴は線虫の *daf-2* 遺伝子が C 末に IRS (Insulin Receptor Substrate) 様のシークエンスを有する点である。ショウジョウバエの *daf-2* ホモログも同様に C 末に IRS 様シークエンス構造を示すことから、哺乳動物のインスリン受容体遺伝子は進化の過程で、インスリン受容体遺伝子と IRS 遺伝子に分離したと考えられる。哺乳動物では、IRS に IRS-1 と IRS-2 の 2 種類が存在することにより、進化の過程でインスリン様シグナルが更に多様化したと考えられる。線虫の *daf-2* シグナルのうち寿命を制御しているシグ

ナルが果たして、インスリン受容体の下流にあるのか、IGF-1 受容体シグナルの下流にあるのか、あるいは両シグナルの下流にそれぞれ存在するのか現段階では不明である。哺乳動物では、インスリンシグナルが主に代謝関連の遺伝子発現をシグナルの下流で制御しているのに対し、IGF-1 は細胞増殖関連の遺伝子をシグナルの下流で制御している傾向が見られる。今回我々は、まず手始めに、インスリン受容体遺伝子にノックイン法を使って、daf-2 線虫で発見された遺伝子変異をマウスのゲノムに導入した。我々が最初にインスリン受容体遺伝子を最初に注目した背景には次の 2 つの事実がある。まず第 1 に、線虫の daf-2 変異 (IRP1195L) と同一の遺伝子変異がインスリン抵抗性の症例から報告されている。従って、我々が作製したモデルマウスは長寿命のバックグラウンドを有すると同時にインスリン抵抗性の病態を示すことが示唆される。即ち、インスリン抵抗性と個体長寿化の間に共通の分子機構が存在する可能性があり、生物学的観点から大変興味深い。インスリン抵抗性の病態では、エネルギーを脂肪細胞に蓄え、肥満傾向を示すが、線虫が耐性幼虫

化する際に細胞にエネルギーを蓄えて、厳しい環境に耐えうる代謝モードに入る為のシグナルと同様のシグナルを利用している事にも共通点を見いだせる。もう 1 つの興味深い事実は、これまで、ラットやマウスにカロリー制限を加えると、寿命が延びると報告されているが、カロリー制限が寿命にもたらす分子メカニズムは解明されていないのが現状である。カロリー制限により寿命が延長すると同時に、動脈硬化等の老人病の発生頻度も減少することが報告されている。もし、daf-2 の長寿メカニズムとカロリー制限の長寿化メカニズムが共通であるとするれば、細胞内のエネルギー代謝が減少することが、個体が長寿化する事に中心的な役割を果たすことになり、長寿化戦略は栄養制限よりもむしろ細胞内シグナル制御にフォーカスが移るだろう。また、細胞内の代謝シグナルの制御により、老人病の発症をコントロールできる可能性を含んでいる。いずれにしても、我々が作製したモデルマウスはこれらの作業仮説に対して、ある程度答えを出してくれると期待している。

本研究課題では、酸化ストレス耐性の獲得に関しても検討を

加えた。これまでに *daf-2* 変異体で Mn-SOD の遺伝子発現が亢進していることが報告されている (4)。SOD やカタラーゼ活性を有する薬剤を線虫に投与すると矢張り寿命が延長する事が報告されているので (5)、この事実からも *daf-2* の長寿化メカニズムの 1 つとして Mn-SOD の遺伝子発現増強が注目される。Mn-SOD は活性酸素種であるスーパーオキシドを過酸化水素に変換する酵素活性を有することから、生物個体の寿命を延長するために、スーパーオキシドの産生を押さえるか、もしくはスーパーオキシドの処理能力を亢進させることが有望かも知れない。我々のモデルマウスでは肝臓で Mn-SOD の活性が野生マウスの 1.3 倍に上昇していたが、酸素負荷後の肺組織を免疫組織化学で観察すると、酸素負荷による遺伝子誘導は更に増強されている可能性がある。構成的な遺伝子発現上昇が寿命の延長に重要なのか、ストレス負荷が加えられた際のストレス応答が個体の長寿化に必要なのか興味深い問題で、今後の検討課題である。

参考文献

1. Kimura, K. D., Tissenbaum, H. A., Liu, Y., and Ruvkun, G. (1997). *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 277, 942-946
2. Kim, H., Kadowaki, H., Sakura, H., Odawara, M., Momomura, K., Takahashi, Y., Miyazaki, Y., Ohtani, T., Akanuma, Y., Yazaki, Y., *et al.* (1992). Detection of mutations in the insulin receptor gene in patients with insulin resistance by analysis of single-stranded conformational polymorphisms. *Diabetologia* 35, 261-266
3. Domenico Accili, John Drago, Eric J. Lee, *et al.*, (1996). Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nature Genetics* 12, 106-109.
4. Honda, Y., and Honda, S. (1999). The *daf-2* gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Faseb J* 13, 1385-1393.
5. Melov, S., Ravenscroft, J., Malik, S., Gill, M. S., Walker, D. W., Clayton, P. E., Wallace, D. C.,

Malfroy, B., Doctrow, S. R., and
Lithgow, G. J. (2000). Extension of
life-span with superoxide
dismutase/catalase mimetics.
Science 289, 1567-1569.

知的所有権の取得状況
該当する知的所有権なし。

研究分担者 本田修二 老人総合研究所アイソトープ部門

研究要旨

daf-2 変異は、酸化ストレス耐性の獲得に関与した一連の遺伝子を活性化させると推察される。これらの遺伝子のいくつかは抗酸化防御系の構成因子であると示唆されている。私達は *daf-2* 変異体において、スーパーオキシドの発生源であるミトコンドリアに局在する Mn-SOD をコードする *sod-3* 遺伝子の mRNA レベルが高くなっていることを見出した。また *daf-16* と *daf-18* 遺伝子の変異がそれぞれ *daf-2* 変異体の Oxr 表現型と *sod-3* mRNA レベルの上昇を抑制することも明らかにした。これらの結果はインスリン様シグナル伝達の経路が Mn-SOD 遺伝子発現を介して酸化ストレス耐性を獲得していることを示唆している。

活性酸素は生体の成分や細胞機能を障害し、遺伝子レベルの変化をもたらすことから、癌や動脈硬化など種々の疾患や老化を引き起こす要因と考えられている。生体にはこのように有害な活性酸素種を除去する防御機構が備わっており、酵素ではスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)やカタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼなどが、低分子化合物としてはビタミン C やグルタチオン、ビタミン E などが抗酸化分子群として相互に作用しながら活性酸素種を消去している。中でも 1969 年に Fridovich

と McCord (1) によって発見された SOD は、活性酸素種の一つであり体内で他の活性酸素種生成のもととなるスーパーオキシドを還元して過酸化水素にする酵素として知られている。SOD には一次構造が異なる 3 種類の分子、CuZn-SOD、Mn-SOD、細胞外 (extracellular; EC)-SOD が存在している。

CuZn-SOD と個体寿命

分子内に活性部位を形成する Cu と構造保持をする Zn を含有する CuZn-SOD はすべての真核生物に存在し、後述の Mn-SOD と比べ発

現量の変動が少ない。近年家族制筋萎縮性側索硬化症 (FALS) の原因遺伝子であることが報告 (2) され、運動性ニューロンの生存に関連することが示唆されたが、この酵素を完全に欠損させたマウスは正常に発生し、6ヶ月目まで運動障害を全く示さなかった。しかし CuZn-SOD 欠損マウスの神経軸索を障害させると運動性ニューロンが消失しやすくなることから、CuZn-SOD は正常な運動性ニューロンの発生や機能には必要ないが、障害を受けた後の維持に必要であることが判明した (3)。現在では FALS の発症には CuZn-SOD の活性低下は必ずしも関係なく、この遺伝子の機能獲得型変異が問題と考えられている。ショウジョウバエにおいて遺伝的に長寿命の株 (原因遺伝子はまだわかっていない) では CuZn-SOD がタンパク質のレベルで増加していることが示されている (4)。さらにヒトの CuZn-SOD 遺伝子を運動神経で過剰に発現させたショウジョウバエの寿命はコントロールとくらべて 140%長いという報告 (5) がある。しかし CuZn-SOD を骨格筋で発現させた場合にはこのような寿命延長は見られていない。一方マウスにおいて、ユビキタスあるいは全神経で

過剰発現させた CuZn-SOD 遺伝子は固体寿命に影響を与えなかった (6,7)。マウスにおける CuZn-SOD の運動神経特異的な過剰発現の実験についてはまだ報告がない。

Mn-SOD と個体寿命

Mn-SOD は主にミトコンドリアに存在し、細菌から高等動物までアミノ酸配列が類似している。この遺伝子は核の DNA でコードされており、リボソームで合成された後、特異的な移行シグナルによってミトコンドリアへ移動する。放射線や、高酸素、パラコート、アドリアマイシン、腫瘍壊死因子 (TNF)- α 、インターロイキン(IL)-1、リポ多糖などが個体レベルや細胞レベルでの誘導因子として報告されている。Mn-SOD 遺伝子を相同遺伝子組み換えにより不活化したホモマウスは肥大型心筋症、肝臓や骨格筋への脂肪沈着、代謝性アシドーシスの症状を呈し、生後 10 日以内に死亡した (8)。ヒトの Mn-SOD 遺伝子を肺特異的に過剰発現させたマウスの 95%酸素下での生存日数はコントロールよりも有為に長く、この酵素が活性酸素種の消去に深く関わっていることが示唆された (9)。ショウジョウバエにおいては Mn-SOD 遺伝子を

運動神経特異的に過剰発現させると寿命が 130 %に延長することが報告されている (5)。しかし Mn-SOD のゲノム遺伝子を微量注入して発現量を 5-116%まで増大させたショウジョウバエでは寿命の延長は見られず、むしろ 4-5%短縮したという報告もある (10)。

EC-SOD と個体寿命

細胞外の血漿やリンパ液に存在することから命名されたが、その大部分は血管内皮細胞に結合している。Cu と Zn を含む金属酵素で CuZn-SOD とアミノ酸レベルで相同性が高い。EC-SOD 遺伝子のノックアウトマウスは正常に発育し、少なくとも生後 14 週までは健康であった。しかし高酸素負荷 (> 99%) をかけると野生体よりも生存率が低くなった (11)。このことから通常の生理状態では EC-SOD の欠損は他の抗酸化酵素によって補充されるが、酸化ストレス下ではそのシステムは充分機能しないことが判明した。EC-SOD 遺伝子の過剰発現と個体寿命に関してはまだ報告がない。

線虫 *C.elegans* における SOD と個体寿命

線虫は老化の分子遺伝学的研究

に多くの利点を持っている。第一に平均寿命が約 3 週間と短く、他の動物と比べて容易に老化や寿命を表現形質として解析できる。第二に遺伝学的操作が容易であるため、遺伝子の強制発現や機能破壊などを行って老化や寿命に影響を及ぼす遺伝子の機能を解析することができる。第三にゲノムプロジェクトにより全ゲノムの遺伝子配列が明らかになっていることである。そのため、他の動物の相同遺伝子をデータベース上で容易に探すことができる。また線虫のポストゲノムプロジェクトとして、遺伝子破壊による遺伝子機能の網羅的な解析が始まっている。

私達は線虫の寿命の遺伝子ネットワークにおける、酸化ストレス耐性をもたらす遺伝的な経路の存在を明らかにするために、種々の長寿命変異体の酸化ストレス耐性 (Oxr 表現形) を測定した(12)。Oxr 表現形には SOD をはじめとする活性酸素種 (ROS) の除去に関与した経路が関与している。線虫の SOD 蛋白質をコードしている遺伝子は 4 種類報告されている。すなわち *sod-1* は細胞質の CuZn-SOD (13)、*sod-2* と *sod-3* はそれぞれ Mn-SOD (14-16)を、*sod-4* は EC-SOD (17) をコードしている。

1) 材料と方法

■線虫の株と飼育方法

線虫の株は NG 寒天培地上で大腸菌 OP-50 を餌として定法通り(18)、20 °Cにて飼育した。N2 Bristol 株を野生体として用いた。卵、幼虫(L1、L2、L3、L4)、ヤングアダルトの各ステージは 20 °Cで同調させ、単離した(19)。用いた株は以下のものである。

Linkage group (LG) I: *daf-16(m26)*

LG II: *fer-15(b26ts)*, *age-1(hx542)*; *fer-15(b26ts)*, *age-1(hx546)*; *fer-15(b26ts)*

LG III: *daf-7(e1372)*, *daf-2(e1370ts)*, *daf-2(sa189ts)*, *daf-2(sa193ts)*, *clk-1(e2519)*

LG IV: *daf-18(e1375)*, *daf-1(m40ts)*, *spe-26(hc138)*

LG V: *daf-11(m47)*

■酸化ストレス耐性試験

約 20 匹の L4 ステージの雌雄同体個体を 50mM パラコート (Sigma) また 20mM メナジオン (Sigma)、OP-50 1×10^7 /ml を含む 0.2 ml S メディウム中で、直径 15 mm の培養皿を用いて飼育した。動物は培養皿ごとプラスチック製のチャンバーに入れ、20 °Cで 98% 酸素に曝した (20)。チャンバーは 12 時間毎に開き、生きている線虫

を数え、再び 98%酸素で満たした。動物は機械的な刺激を与えた後、30 秒間動かなかった場合死亡とみなした。体内で幼虫が孵化したために死亡した個体は数えなかった。

■耐性幼虫の準備

2 つの *Daf-c* 変異体、*daf-2(e1370)* と *daf-7(e1372)* を 2 週間非許容温度 (25 °C)で飼育した。動物を 1% SDS で 30 分間処理し、溶けずに残った耐性幼虫を蒸留水で 3 回洗って材料とした。コントロールの成虫は *daf-2* と *daf-7* 変異体を許容温度 (20 °C)で L4 ステージから飼育することによって用意し、25 °Cで 1 日飼育して実験に用いた。

■ノーザンブロット解析

メッセンジャーRNA (mRNA) はヤングアダルトステージの線虫からグアニジン法 (21)にて総 RNA を抽出し、Oligo(dT)-セルロースカラムを通して精製した。2 μ g の mRNA を 1.2%のホルムアルデヒドアガロースゲルにて分離し、ナイロン膜にブロッティングした。mRNA の相対量は線虫のリボソームタンパク質 *rp21c* の cDNA をプローブとしたノーザンブロット解析により算出した。線虫の *sod-2* cDNA

プローブには BTK65-1 (14)の *Kpn* I/*Sac* I 制限酵素消化断片を用いた。線虫のカタラーゼ cDNA プローブには CeCAT (*Cat-1*)(X82175)の *Eco* RI 制限酵素消化断片を用いた。線虫 *sod-1* と *sod-3* の cDNA プローブはリバーストランスクリプション-ポリメラーゼチェーンリアクション(RT-PCR) 法を用いて線虫の総 RNA から合成した。RT-PCR 法に使用したオリゴ DNA プライマーおよび PCR の条件は次の通りである。

sod-1 : 5'-AGGTCGAAGCCGCTCAAAAAA-3' と 5'-ATTGTGTGGAGATTCAGAGA、
sod-3 : 5'-AATGCTGCAATCTACTGCTC-3' と 5'-AGCGTTTTAAACTACA

TCTG-3'。 cDNA の増幅後 (35 cycles、94° C、1 分; 55° C、1 分; 72° C、1 分)、PCR 産物は pGEM-T プラスミドベクター (プロメガ社) にサブクローニングし、さらに増幅させた。ハイブリダイゼーションは 5 X SSPE、10 X デンハルト溶液、50% ホルムアミド、1.4% SDS、0.1 mg/ml ニシン精子を含む溶液中で、³²P で標識した DNA をプローブとして 42 °C に行った。ハイブリダイゼーション後、膜を洗浄し、Fujix BAS 2500

レーザーイメージアナライザーを用いて解析した。

■RT-PCR 解析

線虫の総 RNA をグアニジン法にて抽出した。1-100 pg の RNA を RT-PCR のテンプレートとして用いた。*sod-1* と *sod-3* の RT-PCR にはノーザンブロット解析に用いたものと同様のオリゴ DNA をプライマーに用いた。その他のオリゴ DNA は *sod-2* : 5'-CTTCAAAAACACCGTTCGCTG-3' と 5'-CAGTGGAACAAGTCCAGTT-3'、*rp21c* : 5'-GCTTGCGTCTACCTGCTC-3' と 5'-TCCGGAAGAGACAGAAGTGA-3'。*sod-2* の解析に用いたプライマーセットは *sod-3* の cDNA を増幅せず、*sod-3* の解析に用いたプライマーセットは *sod-2* の cDNA を増幅しなかった。PCR は 94 °C 1 分、55 °C 1 分、72 °C 1 分の条件で 35 サイクル行った。

2) 結果

■酸化ストレス耐性

長寿命変異体が酸化ストレスに耐性を持つかどうかを明らかにするために、それぞれの変異体を酸素濃度 98%の条件下において細胞内のスーパーオキシド (O²) を増