

厚生科学研究研究費補助金

長寿科学総合研究事業

長寿命遺伝子としての Shc シグナリング
に関する分子遺伝学的研究

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 森 望

平成13(2001)年 3月

目 次

I. 総括研究報告書		
	長寿命遺伝子としての Shc シグナリングに 関する分子遺伝学的研究 森 望	3-6
II. 分担研究報告書		
1.	Shc 遺伝子ファミリーのゲノム構造解析および p66-Shc セリンリン酸化の特異的検出 森 望	7-9
2.	Shc と PKC シグナリングのクロストーク： PKC および PKC 関連酵素による Shc 蛋白質 のリン酸化の解析 小野功貢	10-11
3.	線虫とマウスの寿命制御系の比較研究： マウスにおける線虫 daf2-daf16 関連シグナル の分子応答 古山龍雄	12-13
4.	ショウジョウバエの寿命関連遺伝子の探索： ショウジョウバエ遺伝子の強制発現による寿命 の制御 相垣敏郎	14-16
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		17-18
IV. 研究成果の刊行物・別刷		19-

厚生科学研究補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

長寿命遺伝子としての Shc シグナリングに関する分子遺伝学的研究

森 望（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長）

我々は、遺伝子による長寿命制御の分子基盤を探る目的で、以下4点について研究を行った。線虫における長寿命形質発現に必須である *daf-16* 相当遺伝子 *AFX/FKHR* は転写活性化因子だが、そのターゲット遺伝子の一つが *SOD3* であることを明らかにした。一方、マウスにおける長寿命遺伝子として指摘されたシグナル伝達アダプター分子 Shc の関連分子の遺伝子発現の加齢変動を検討した。また、*p66-Shc* のセリンリン酸化を特異的に認識する抗体を作製し、神経特異的 Shc 関連分子 *N-Shc* が *PKC delta* と特異的に結合することを明らかにした。一方、ショウジョウバエに異所性ランダム突然変異導入系を使って寿命制御遺伝子の系統的な探索を試み、有為な複数の長寿命形質に関連する候補遺伝子を単離した。初年度ではあるが、マウス、線虫、ハエの寿命制御系の共通原理の有無の解明へ向けて非常に有意義な知見が得られた。

キーワード： 老化、寿命、遺伝子、酸化ストレス、シグナル伝達、リン酸化、PKC、FKHR

[研究組織]

- 森 望（国立療養所中部病院長寿医療研究センター部長）
- 古山龍雄（国立療養所中部病院長寿医療研究センター室長）
- 小野功貢（神戸大学理学部バイオシグナル研究センター教授）
- 相垣敏郎（東京都立大学理学部助教授）

いた寿命遺伝子解析の進展が著しい。我々は、動物個体の寿命制御にかかわる遺伝子経路の共通原理があるか否かを探索することを目的とした。具体的には、Shc 関連遺伝子群の実体把握、新規シグナルルートの解析、線虫の *daf-16* 相当遺伝子 *FKHR* のターゲット解析、さらにショウジョウバエにおける長寿命遺伝子の探索を行った。

A. 研究目的

一昨年、シグナル伝達アダプター分子 Shc の遺伝子欠損マウスの寿命が30%ほど延びることが報告されて以来、長寿命遺伝子としての Shc の役割が注目されている。一方で、線虫等、遺伝学的解析の容易な無脊椎動物を用

B. 研究方法

主任研究者の森を中心として、Shc/ShcA, Sck/ShcB, N-Shc/ShcC の機能解析を進め、N 末ドメインのセリンリン酸化の実体と意義、細胞のストレス応答と生存・アポトーシスのシグナルへの関与を究明する。森は、また、

研究協力者の長嶺から Shc のリン酸化部位変位体の分与を受け、各種刺激下での細胞の Shc 応答を検討する。分担研究者の小野は PKC 分子種の変異体を森に供給し、PKC と Shc 関連分子との相互作用について解析する。研究協力者の古山は、マウスの PI3K-Akt/PKB シグナリングを中心に解析するが、森と協力して Akt/PKB シグナルから AFX/FKHR を介して、そのターゲットとなるエネルギー代謝あるいは寿命制御関連遺伝子の実体解明を目指す。相垣は、ショウジョウバエの寿命変異体を体系的にスクリーニングし、長寿命系統を選択してその原因遺伝子を特定する。

(倫理面への配慮)

全体的に試験管内実験、細胞へのマウスの遺伝子導入実験、および、ショウジョウバエを用いた実験であり、ヒトの遺伝子や組織を使ったものではないので、該当しない。

D. 結果

(1) p66-Shc の相同遺伝子として単離した p68-Sck/ShcB、p64-N-Shc/ShcC のゲノム構造解析およびドメイン解析を行った。その結果、いずれの遺伝子も Shc と同様、12 エクソンからコードされるが、遺伝子サイズは Shc<Sck<N-Shc となっていることがわかった。さらに Sck/ShcB の完全長の実体が明らかとなり(小島ら、投稿準備中)、N-Shc、Sck にも、p66-Shc 同様、N 末の CH2 ドメインがあることがわかった。また、p66-Shc の S36 サイトのリン酸化特異抗体を作製した。これにより、初めて in vivo での Shc セリンリン酸化の状態を検討することが可能となった。一方、N-Shc については従来知られてい

たいわゆる Grb2 サイト以外に新たなシグナルアウトプット領域があることを明らかにした(Nakamura et al., submitted)。N-Shc 変異体トランスジェニックマウスの作成も進めた(小島ら、未発表)。また、Shc、N-Shc、Sck の遺伝子発現レベルを老若ラットで比較し、ごくわずかではあるが、老齢動物で発現変動が観察された(森ら、2000)。今後、Shc 関連分子の神経機能と寿命制御への役割の解明をめざす予定である(森、2000)。

(2) 各種 PKC と Shc, Sck, N-Shc との相互作用の可能性について系統的に検索した。最初、in vitro pull-down 法により検討した結果、N-Shc が PKC delta と特異的に結合することがわかった。この結合は COS 細胞への遺伝子導入実験により in vivo でも確認され、さらに、この結合が H2O2 添加により増強されることがわかった。したがって、N-Shc は細胞の酸化ストレス下に PKC delta と結合することが想定された。次いで、N-Shc と PKC delta の結合領域を特定するために N-Shc の部分ドメイン発現体や PKC delta の位置特異的チロシン変異体(Y/F 変異体)の遺伝子導入後、結合度合を比較した。その結果、主として N-Shc の SH2 ドメインで結合すること、PKC 側は N 末の調節領域と C 末の活性ドメインとの境界部に存在するチロシンに結合していることが判明した。さらに、N-Shc が結合すると PKC 活性がおよそ半分程度に抑えられることがわかった。以上のことから、N-Shc は神経細胞の酸化ストレス下に PKC delta 活性を抑制し、PKC 下流のアポトーシスシグナルを抑制している可能性がみられた(Ihara et al., 投稿準備中)。

(3) 我々は数年前から、線虫の age-1 に相当するマウスの PI3K の 110 kD サブユニット

トの cDNA をクローン化し、その活性変異体を過剰発現するトランスジェニックマウスの作製の準備を進めていた (Furuyama and Mori, 未発表)。しかし、その後、海外で相次いで線虫の daf-2, daf-16 等の遺伝子が同定され、下等生物における長寿命制御のシグナル経路に関する理解が急展開するに伴い、研究方針を PI3K に限定せず、それから核へのシグナル系全体を見渡すように変更し、特に daf-16/FKHR 系転写因子の制御系の研究を開始した。線虫の daf-16 に相当するマウスの Forkhead 型転写因子 AFX/FKHR 遺伝子を単離した。特に本年度は *in vitro* での結合サイト選択法により AFX/FKHR の認識 DNA 配列の特定に成功し、遺伝子配列バンクを通じて *in vivo* でのターゲット遺伝子の推定を行った結果、そのターゲット遺伝子のひとつが酸化ストレス応答に関連する SOD3 であることをつきとめた (Furuyama et al., *Biochem. J.* 349:629-634 (2000))。

(4) ショウジョウバエのゲノム中に UAS を含む Gene Search ベクターをランダムに挿入した系統 (GS 系統) を多数作成し、その中から寿命変異体を体系的にスクリーニングし、長寿命系統を同定することを目的として実験を行った。これらの各系統について RT-PCR 法により強制転写産物を増幅し原因遺伝子の部分配列を決定した。その結果、いくつかの EST にマッチする新規遺伝子の他、HSP26, DmGST2 等ショウジョウバエにおける酸化ストレス応答に関係する遺伝子に相当することがわかった (相垣ら、未発表)。

D. 考察

今年度の研究により、いくつかの重要な発見があった。一つは、N-Shc が PKC delta

と特異的に結合し、PKC 活性を抑えることが明らかとなった。これは、恐らくは、細胞の酸化ストレス下におこり、細胞のアポトーシス抑制にかかわる可能性がある。しかし、その点については来年度以降の実験により証明する必要がある。また、線虫の長寿命変異をきたす daf 経路に存在する AFX, FKHR 転写因子の下流解析の結果、線虫の SOD3 遺伝子のプロモーター領域に daf16/FKHR の結合配列があり、実際にこの配列を介して、転写活性が制御されうることが明らかにした。今後は、マウスにおけるターゲット配列を解析していくことが必要であるが、これも、寿命制御の一旦が、細胞の酸化ストレス応答にかかわる SOD をも含むことを示しており、細胞の酸化解毒作用の重要性を示唆しているものである。さらに、ショウジョウバエの長寿命変異体をスクリーニングし、単一遺伝子変異により個体寿命に影響を与える変異体を複数樹立した。その中の一部が、やはり酸化ストレス応答に関係すると思われる遺伝子の変異であることもわかった。今後さらに、変異の実体と、メカニズムを解明していく必要がある。

本研究ではマウス、線虫、ハエという様々な生物種における寿命制御系遺伝子の探索という各々の分担研究ごとに独立に研究を進めたが、結果的には、幸い、「寿命制御」と「酸化ストレス応答」という共通の接点が見えてきた。本研究の大きなゴールは、種を超えた寿命制御システムの共通理解という点であったが、初年度にしてすでにそれが、少なくとも、細胞の酸化ストレス応答にかかわるシグナル伝達系が重要であることが示唆された。来年度は、これらの知見をさらに検討し、論文としてとりまとめるとともに、ショウジョ

ウバエの系を使ってマウスの寿命関連遺伝子を導入して寿命観察をし、種をこえた寿命制御の共通系があるかどうか証明へむけて研究を展開していく予定である。

E. 結論

個体寿命の制御系に関して、無脊椎動物と脊椎哺乳動物とを比較し、いずれも細胞の酸化ストレス応答に関係するシグナル伝達系の遺伝子が重要であることが示唆された。哺乳動物で唯一の長寿命遺伝子である p66-Shc については、酸化ストレスからアポトーシスへ連携するシグナルを媒介する 36 位のセリンのリン酸化を特異的に認識する抗体の作製に成功した。今後、これをもって、*in vivo* で p66-Shc シグナル応答を老若動物で比較するとともに、寿命制御にかかわる Shc シグナルの分子機構解析へ応用が可能となった。

厚生科学研究補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

Shc 遺伝子ファミリーのゲノム構造解析および
p66-Shc セリンリン酸化の特異的検出

森 望 （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長）

マウスの Shc 関連遺伝子群、Shc, Sck, N-Shc の遺伝子を単離し、ゲノム構造の解析を行った。また、それから、全長構造の知られていなかった Sck/ShcB の構造を明らかにした。その結果、Shc/ShcA, Sck/ShcB, N-Shc/ShcC いずれも N 末に CH2 ドメインをもつ長い分子が存在することがわかった。この CH2 ドメインには、p66-Shc の場合、酸化ストレス下にアポトーシスシグナルへ伝えるリン酸化されるセリン残基がある。N-Shc/ShcC の場合もリン酸化される可能性のあるセリン残基が散在していた。P66-Shc のセリン 36 特異的なリン酸化認識抗体を作製した。これにより、in vivo で、p66-Shc の酸化ストレス下のシグナル活性化を検討することが可能となった。

キーワード： Shc、リン酸化、遺伝子、抗体、寿命、シグナル伝達

A. 研究目的

マウスにおける Shc 遺伝子ファミリーの構造解析をし、Shc 関連分子の遺伝子操作の基礎を作るとともに、Shc 関連分子のうち特に全長構造が知られていない Sck/ShcB の全長構造を明らかにする。また、マウスの寿命延長効果に必須である p66-Shc の Ser36 のリン酸化を特異的に検出できる抗体の作製を試みる。

の作製にあたっては、p66-Shc の Ser36 を中心に 11 アミノ酸からなるペプチドを合成し、KC アミドとし、リン酸化、非リン酸化ペプチドそれぞれウサギ 2 羽を免疫する。ペプチド吸着によるアフィニティー精製を行う。P66-Shc および p66-Shc(S36A)変異体は Dr. Nagamine より供給。これを用いて、COS 細胞での発現抽出液での Western blot によりリン酸化抗体の特異性をチェックする。

B. 研究方法

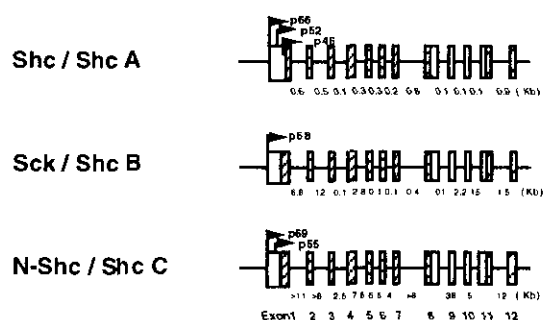
マウス P1 ライブラリーおよびフェージライブラリーを各 Shc 関連分子特異的 cDNA および PCR によりスクリーニングする。サブクローニング、塩基配列決定は常法による。抗体

（倫理面への配慮）

全体的に試験管内実験、細胞へのマウスの遺伝子導入実験であり、ヒトの遺伝子や組織を使ったものではないので、該当しない。

D. 結果

(1) Shc 遺伝子ファミリーのゲノム構造解析：マウス P1 ゲノムライブラリーおよびファージライブラリーのスクリーニングにより Shc, Sck, N-Shc 遺伝子の全領域をカバーするクローンを得た。制限酵素マップの作製および塩基配列の解析によりすべてのイントロン/エクソンの境界を決定した。遺伝子サイズは大きく異なるが、いずれも 12 エクソンで構成されることが明らかとなった(下図)。各遺伝子の染色体上の位置も決定した。この過程で、pseudo 遺伝子一個の存在が明らかとなった。Sck ゲノム解析の結果、全長 Sck は約 69 kD で、N 末に CH2 ドメインをもつことが明らかとなった。CDNA 発現によっても、実際に 69 kD の産物を与えることを確認した。



(2) p66-Shc セリンリン酸化の特異的検出：p66-Shc の Ser36 周辺のペプチド配列を元に、リン酸化および非リン酸化ペプチドを合成し、それを抗原としてウサギを免疫し、ポリクローナル抗体を作製した。これにより、HA-wildtype p66Shc を COS-1 細胞に一過性に発現させたものの細胞可溶化液、および抗 HA 抗体での免疫沈降物中での phospho-Ser36 を特異的に検出できた。特異性は 2 つの方法で確認した。まず、S36A 変異体では、

上記に対応するバンドは全く検出されなかった。また、遺伝子導入細胞を EGF で刺激した細胞の抽出液から、抗 HA 抗体で p66Shc を回収し、その免疫沈降物を alkali phosphatase で脱リン酸化処理をすると用量依存的に phospho-Ser36 p66Shc と推定されるバンドが消失した。以上のデータから、p66Shc を一過性に発現させた細胞での Western であれば、この抗体は、特異的抗体として十分に使用できると考えられた。

D. 考察

Sck/ShcB の全長が CH2 ドメインを含む 69 kD であることから、Shc, Sck, N-Shc のどれもが p66-Shc に相当する分子を発現していることが明らかとなった。このことから、神経細胞においては p69-Sck, p68-N-Shc がそれぞれの CH2 ドメイン中のセリンのリン酸化を介して細胞のストレス応答に関与している可能性が考えられた。来年度、特にその点を検討してゆきたい。

内在性の p66Shc については、COS-1 細胞で Western で確認する限りでは明瞭なバンドとして確認することはできなかった。COS-1 細胞での Shc p66 の発現量が低いのも一因だろうが、この抗体の抗体価は標準以下と思われ、その意味でこの抗体の限界はあるものと思われた。これについては、通常の抗 Shc 抗体で免疫沈降した上でこの抗体を使用することで内在性の p66Shc の検出は一応可能であろうと考えられる。細胞染色、組織染色は検討しておらず、今後の課題である。来年度、特にストレス下での Ser36 のリン酸化を組織染色で検討できれば非常に興味深いと思われる。

E. 結論

Shc 関連遺伝子群はいずれも 12 エクソンでコードされ、Sck/ShcB も N-Shc/ShcC も、共に p66-Shc に相当する N 末に CH2 ドメインをもった分子が存在することが明らかとなった。今回作製した特異抗体を用いて、p66-Shc のセリンリン酸化を識別することが可能となった。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kojima T, Yoshikawa Y, Takada S, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Sato M, Nakamura T, Takahashi N and Mori N. Genomic organization of the Shc gene family in the mouse and characterization of the full-length Sck/ShcB. (in preparation)

Nakamura T, Komiya M, Goto N, Koizumi S, Shibuya M and Mori N. Discrimination between phosphotyrosine-mediated signaling properties of conventional and neuronal Shc adapter molecules. (submitted)

森 望 リン酸化チロシンアダプター分子 Shc (p66^{Shc}) の遺伝子ノックアウトによるマウスの寿命延長、Molecular Medicine 37 110-114 (2000)

森 望 老化に関する新しい知見：p66Shc 遺伝子欠損によるマウスの寿命延長 臨床検査 44, 571-573 (2000)

森 望 遺伝子から見た老化のなぞ 教育と医学 6月号 62-70 (2000)

2. 学会発表

Nakamura T, Komiya M, Hirose E, and Mori N. The specific roles of N-Shc adapter protein in neuronal signal transduction, 7th CGGH Symposium 2000 "Neuronal Signaling and Protein Phosphorylation-Dephosphorylation" (2000)

森 望、曾根清明、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 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 (2000)

小島拓哉、佐藤仁彦、中村岳史、森 望 Sck/ShcB アダプター分子の全長構造及びカルシウムシグナル応答における機能解析 第 23 回日本神経科学会 (2000)

森 望 老化制御・寿命制御の分子基盤：長寿命遺伝子としての Shc 第 23 回日本分子生物学会シンポジウム講演 (2000)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

研究協力者：

中村岳史 (科学技術振興事業団)

小島拓哉 (奈良先端科学技術大学院大学)

厚生科学研究補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

Shc と PKC シグナリングのクロストーク：
PKC および PKC 関連酵素による Shc 蛋白質のリン酸化の解析

小野功貢（神戸大学理学部バイオシグナル研究センター教授）

Shc は基本的にはリン酸化チロシンに対するアダプター分子だが、最近、セリンリン酸化によりアポトーシスシグナルを媒介する可能性が出てきた。また、以前から、Shc は Ca 応答系と成長因子応答系とのクロストークに係わる可能性も指摘されていた。そこで、本研究では Shc 関連分子（Shc, N-Shc, Sck）とプロテインキナーゼ C（PKC）との機能関連の可能性を検討した。その結果、N-Shc が酸化ストレスに応じて、PKC delta と特異的に結合し、PKC 活性を抑えることが明らかとなった。

キーワード： Shc、PKC、リン酸化、シグナル伝達、酸化ストレス応答

A. 研究目的

Shc, N-Shc, Sck の各分子が PKC と特異的に相互作用するか否かを解明することを目的とした。その背景には、Shc 関連分子が細胞のシグナルクロストークに関係する可能性が指摘されていたこと、Shc が従来知られていたチロシンリン酸化応答ばかりでなく、セリン/スレオニンのリン酸化をも介して、シグナル伝達に係わることが明らかになったが、どのキナーゼがそれを媒介するのか不明である事実がある。したがって、p66-Shc の Ser36 をリン酸化するキナーゼの同定をも視野に入れて検討することを目的とした。

B. 研究方法

PKC および Shc 関連分子の大腸菌および哺乳動物細胞（COS, HEK）での発現コンストラクトを作成し、in vitro pull-down 法および Western blot により結合を定量する。

細胞培養は常法。遺伝子導入はリポフェクションにより行う。PKC との共沈物中の PKC 活性測定は人工基質ペプチド（RKRTLRL）に対する ³²P-ATP からリンの取り込みを定量した。

（倫理面への配慮）

全体的に試験管内実験、細胞へのマウスの遺伝子導入実験であり、ヒトの遺伝子や組織を使ったものではないので、該当しない。

D. 結果

PKC $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ の各 cDNA を発現ベクターに挿入し、COS 細胞で発現させた。同時に、T7-tag 付の Shc, N-Shc, Sck をも発現し、細胞抽出液の免疫沈降物の解析により双方の結合を比較検討した。その結果、N-Shc が PKC δ および PKC β II と特異的に結合し、Shc, Sck はどの PKC とも結合しなかった。PKC δ と N-Shc の結合は TPA では増強され

なかったが、H₂O₂ 添加により増強された。

次に、結合ドメインを特定する目的で、N-Shc の PTB, CH1, SH2 の各ドメインを GST との融合蛋白質として大腸菌で発現させ、COS7 細胞で発現した PKC δ との結合を比較した。その結果、N-Shc の SH2 ドメインを介して結合することがわかった。また、結合度は PKC δ のチロシンリン酸化の程度と比例した。一方、PKC δ のどのチロシンのリン酸化に対して結合していくのかを調べるために、PKC δ の様々なチロシン部位 (Y52, Y187, Y312, Y332, Y512) の Y/F 変異体を T7-N-Shc と共に COS7 細胞で強制発現し、結合を比較した。その結果、N-Shc は Y52, Y311, Y332, Y512 をターゲットとして結合していると考えられた。

最後に、PKC δ に N-Shc が結合すると、何が起こるかを調べる目的で、PKC 活性を検討した。その結果、Shc 存在下には何ら影響はないが、N-Shc 存在下には PKC 活性が約半分に落ちていることがわかった。

D. 考察

今回明らかになった、N-Shc と PKC δ との特異的な相互作用、その過酸化水素による増強および結合後の活性抑制という事実は、細胞内における N-Shc の酸化ストレス下でのシグナル伝達での役割を示唆しており、非常に興味深い。N-Shc は脳特異的分子であり、PKC δ も脳内での発現が高いので、神経細胞でのストレス応答シグナルに関係する可能性がある。今後、神経細胞内での役割を検討してゆきたい。

今年度は、p66-Shc の S36 のリン酸化に PKC が関与するか否かは検討できなかったが、来年度の重要検討課題としたい。

E. 結論

N-Shc は過酸化水素刺激下に PKC delta と特異的に結合し、PKC 活性を抑制することが明らかとなった。したがって、N-Shc は神経細胞中において、酸化ストレス応答において PKC delta を介して、神経保護、あるいはアポトーシスへ向けたシグナル応答に関係する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kitajima-Ihara T, Sato M, Kojima T, Konishi H, Kikkawa U, Ono Y and Mori N. Neural-specific adapter protein N-Shc interacts with PKC delta in response to H₂O₂, to be submitted.

Takahashi, M., Mukai, H., Oishi, K., Isagawa, T., and Ono, Y. Association of immature hypophosphorylated protein kinase C ϵ with an anchoring protein CG-NAP. *J. Biol. Chem.*, 275, 34592-34596 (2000)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得	なし
2. 実用新案登録	なし
3. その他	なし

研究協力者:

小西博昭 (Harvard University)
井原智美 (名古屋大学理学部)

厚生科学研究補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

線虫とマウスの寿命制御系の比較研究：
マウスにおける線虫 daf2-daf16 関連シグナルの分子応答

古山龍雄（国立療養所中部病院長寿医療研究センター老化遺伝子研究室長）

線虫の寿命制御に必須な遺伝子 daf-16 のマウスホモログの細胞内局在に影響する領域を同定した。また8塩基からなる FKHR の DNA 結合配列を同定し、これが線虫の sod-3 の上流に存在することを見いだした。これからこの配列が機能的に働いている可能性が見いだされた。またこの配列を用いて転写調節を受ける遺伝子を同定できる可能性が示唆された。

キーワード： 寿命遺伝子、FKHR、フォークヘッド型転写因子、SOD、転写制御

A. 研究目的

線虫の長寿命変異体の寿命延長に必要な遺伝子として同定されている daf-16 のマウスの相同遺伝子として FKHR, L1, AFX の3種が知られている。まず、これらの cDNA を単離し、特にリン酸化による活性制御、核細胞質移行に関する制御の実態を把握する。また、FKHR 等の転写因子の結合配列を特定し、哺乳動物における FKHR 等のターゲット遺伝子を推理する。このことから、マウスにおいても PI3K-AKT/PKB-FKHR からなるシグナル伝達系が、細胞あるいは個体の生存シグナル、酸化ストレス応答シグナル、エネルギー代謝誘導シグナルとして機能しうるか否かを理解し、無脊椎動物と脊椎動物の寿命制御シグナルの異同について考察する。

B. 研究方法

これまでに単離されているヒトの AFX,

FKHR,FKHRL1 のマウスの相同遺伝子をマウス cDNA ライブラリーより単離し ORF の塩基配列を決定した。この中から FKHR cDNA を用いて哺乳類細胞での発現ベクターを構築した。これを基に Akt によりリン酸化されるセリン・スレオニン残基をアラニン残基に変えることによりリン酸化されないものを作成した。これらを NIH3T3 線維芽細胞に導入しその細胞内局在および 14-3-3 との結合への影響を検討した。また c 末より様々な長さに削りこんだベクターを作成しその細胞内局在を同時に検討した。またその DNA 結合配列を同定するために In vitro 結合測定を行った。

（倫理面への配慮）

全体的に試験管内実験、細胞へのマウスの遺伝子導入実験であり、ヒトの遺伝子や組織を使ったものではないので、該当しない。

D. 結果

FKHR のリン酸化とそれに伴う細胞内局在変動について検討した。その結果 T24A 変異体以外に S253A 変異体でもまた 14-3-3 との結合が見られなくなることが明らかになった。さらに FKHR の中央部に位置する核外移行シグナルと推定されるアミノ酸配列を削りこんだ場合に細胞質から核内に局在が変わること、およびこの配列に変異を導入することによっても同様の結果が得られた。この際 Akt によるリン酸化には影響がないこと、特に 14-3-3 との結合には影響が見られないことが明らかになった。in vitro 結合測定を行いその結果 TTGTTTAC の 8 塩基からなるエレメントを同定した。線虫の場合には、daf-16 によって転写調節を受けていると報告されている sod-3 の上流域にこのエレメントを同定した(Furuyama et al., 2000)。

D. 考察

FKHR の細胞内局在はインシュリン・IGF-1 の下流において Akt によるリン酸化によって核と細胞内を行き来する。特に 14-3-3 のリン酸化された T24 への結合が重要であることが示唆されていたが、これ以外にその中央部に位置する核外移行シグナルによってもその局在が影響を受けることが明らかになった。In vitro 結合実験により同定された 8 塩基の配列は、線虫で daf-2 長寿命変異体で発現上昇している遺伝子である Sod-3 の上流に位置することからこの配列が機能的に意味のある配列であることを強く指示する。

E. 結論

FKHR は核外移行シグナルと Akt によるリン酸化の両者によってその細胞内局在がコ

ントロールされている。またその DNA 結合配列は少なくとも線虫においては機能的に働いている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakazawa T, Nakano I, Furuyama T, Morii H, Tamai M and Mori N, The SCG10-related gene family in the developing rat retina: Persistent expression of SCLIP and stathmin in mature ganglion cell layer. Brain Res. 861, 399-407 (2000)

Furuyama T, Nakazawa T, Nakano I and Mori N, Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues, Biochem. J. 349, 629-634 (2000)

2. 学会発表

古山達雄、森 望 マウスにおける DAF-16 ファミリー蛋白の DNA 結合配列 第 23 回 日本基礎老化学会 (2000)

古山達雄、森 望 フォークヘッド型転写因子 FKHR の核外移行への 14-3-3 蛋白の関与 第 23 回 日本分子生物学会 (2000)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

厚生科学研究補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

ショウジョウバエの寿命関連遺伝子の探索
（ショウジョウバエ遺伝子の強制発現による寿命の制御）

相垣敏郎（東京都立大学理学部助教授）

ショウジョウバエの長寿命変異体を同定することを目的として、ゲノムの遺伝子を体系的に強制発現させる機能をもつベクター挿入システムをスクリーニングした。成体特異的に誘導したときに寿命延長効果を示す強制発現ベクター挿入株を22系統同定した。既知遺伝子および既知の機能をもつ哺乳類遺伝子と類似性を示すもの13個あり、そのうちの6個は酸化還元バランスやストレス応答に関与する遺伝子であった。

キーワード： 寿命遺伝子、遺伝子導入、ベクター、ストレス応答

A. 研究目的

ショウジョウバエの寿命変異体を体系的にスクリーニングし、長寿命システムを同定することを目的とする。これらの各システムについてRT-PCR法により強制転写産物を増幅し原因遺伝子の部分配列を決定する。データベース検索から各遺伝子産物について寿命決定機構における役割を推察する。

B. 研究方法

ショウジョウバエのゲノム中にUASを含むGene Searchベクターをランダムに挿入したシステム（GSシステム）を多数作成する。強制発現は成体特異的に行うために、温度依存的にGAL4を発現するシステム（hs-GAL4）を交配する。F1世代を発生過程は25°C、成体期を30°Cで飼育して寿命を測定する。これにより老化がおこる成体期に限定して強制発現された遺伝子の効果を検定することができる。発生段

階での傷害がほとんどなく、理論的には全遺伝子についてスクリーニングが可能である。

（倫理面への配慮）

全体的に試験管内実験、および、ショウジョウバエを用いた実験であり、ヒトの遺伝子や組織を使ったものではないので、該当しない。

D. 結果

約1,000のGSシステムをhsp70-GAL4システムに交配して、F1個体の成虫寿命を30°Cにおいて測定したところ、用いたGSシステムによって寿命が大きく異なった。ベクター挿入をもたないシステムを交配した対照群のF1個体の平均寿命は29日であったのに対して、ベクター挿入をもつ個体で成虫特異的な強制発現を行った群では、最長が34日、最短が2.5日の平均寿命を示した。極端に短命であったシステム（平均寿命10日以下）を除いて、分散分析を行っ

たところ、全分散の 36%が遺伝子型 (GS 系統) によるものと推定された。

GS 系統による寿命の差違が活性酸素に対する抵抗性と相関するかを調べるために、合計 30 系統をランダムに抽出してパラコート耐性を調べた。その結果、両者の間に有意な正の順位相関があることが判明した (Kendall's correlation coefficient, $r=0.449$, $p < 0.001$)。

変異体の中で、野生型に比べて有意に長寿命を示したものについて、強制転写産物の 5' 側部分配列を RT-PCR 法により決定した。比較的長命であった 25 系統について調べたところ、7 系統では既知遺伝子の配列に、16 の挿入系統は 18 種の EST に合致した (2 つの系統では隣接する 2 種類の異なる遺伝子に由来する産物を生じていた)。このことは、全て機能的な遺伝子座に GS ベクターが挿入され、強制発現を引き起こしていることを示した。既知遺伝子 7 個のうちの 6 個、EST 相同遺伝子 18 個のうち 16 個は遺伝子の転写開始点上流にベクターの挿入が起こっており、これらにおいては、完全長の遺伝子産物が過剰発現されていることを示唆した。

7 個の既知遺伝子のうち、3 個 (hsp26, nla, DmGST2) はストレス応答、または酸化還元バランスに関与しているものであった (表 2)。Hsp26 は分子シャペロンとして機能することが知られている。nla はヒトダウン症候群に関与する染色体領域の配列と類似する遺伝子であり、かつストレス誘導性タンパクである Adapt78 と類似している。また、DmGST2 は解毒酵素であり、酸化還元バランスに関与している。その他の遺伝子については、寿命の決定といかなる関連になるのか不明である。EST に対応する遺伝子で生物学的

機能が示唆されているものが 6 個存在した。そのうちの 3 個 (ほ乳類の TRX, GILT, POSH に相同) はストレス抵抗性、あるいは酸化還元バランスに関与する遺伝子として知られている。これらの結果は、老化や寿命の機構において酸化ストレス抵抗性が重要な要素であることを強く示唆した。

D. 考察

老化や寿命の形質には遺伝的基盤があることが明らかであるが、遺伝要因と環境要因とが複雑に絡んでいるため、遺伝的基盤の実体を解明することが困難であった。また、変異体が発生過程において異常を示す場合が多く、これらの遺伝子が老化や寿命におよぼす影響を独立に検定することができない。これまでショウジョウバエでは Cu/Zn SOD とカタラーゼを同時に過剰発現させると、野生型に比べて寿命がのびることが報告されている。同様な実験でヒト筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子でもある SOD1 を運動ニューロンで発現させた例では、40%寿命が延長されたことが報告されている。これらのことは、長寿命変異体をうるには、強制発現法が有効であることを示唆していたが、これまでの研究は、個別の遺伝子について強制発現させてその効果を見るものであった。本研究で作成した変異体では、強制発現を誘導する時期を成体に限定することができるため、老化や寿命のように発生が終わった後に現れる形質を扱うのに極めて都合がよい。成体特異的な強制発現によって寿命を延長する作用を有する遺伝子の候補を同定した。遺伝子の機能が既知のもの、あるいは示唆されているものにはストレス耐性や酸化還元バランスの制御に関わっているものが含まれていた。

寿命の決定にこれらの要素が重要な役割をもつことを示唆した。また同時に、老化や寿命と直接的な関連が不明な遺伝子も含まれており、異なる機構が存在する可能性もある。

E. 結論

本研究では、体系的に機能獲得変異体を作成する方法を用いて、成体期の強制発現により、長寿命になる遺伝子候補を同定した。寿命の決定に酸化還元バランスやストレス応答に関与する遺伝子の重要性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Toba, G. and Aigaki, T. (2000): Disruption of the Microsomal glutathione S-transferase-like gene reduces life span of *Drosophila melanogaster*. *Gene* 253, 179-187.

Aso, T., Yamazaki, K., Aigaki, T. and Kitajima, S. (2000): *Drosophila* von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Complex possesses E3 ubiquitin ligase activity. *Biochim. Biophys. Res. Com.* 276, 355-361.

Seong, K.-H., Ohashiwa, T., Matsuo, T., Fuyama, Y. and Aigaki, T. An application of the gene search system to a screen for longevity gene in *Drosophila*. *Biogerontology*, 印刷中 (2001)

Ejima, A., Nakayama, S. and Aigaki, T. Phenotypic association of spontaneous ovulation and sexual receptivity in virgin females of *Drosophila melanogaster*. *Behav. Genetics*, 印刷中 (2001)

相垣敏郎 ポストゲノムの神経科学 — ショウジョウバエの研究から, *脳の科学* 23: 59-63 (2001)

Aigaki et al. Neural-specific overexpression of DPOSH, *Drosophila* Plenty of SH3x, extends the longevity of adult flies. 投稿中

2. 学会発表

Aigaki, T. (2000) The 16th International Symposium in Conjunction with Award of the International Prize for Biology. "The gene search system and its application to a screen for longevity genes in *Drosophila*", November, Tokyo

Aigaki, T. Seong, K.-H. and Ohashiwa, T. (2000) Variation in longevity caused by overexpression of various genes in *Drosophila melanogaster*. BSRA Annual Scientific Meeting, London, UK. July

相垣敏郎, ショウジョウバエを用いた抗老化遺伝子の探索, 痴呆学会シンポジウム, かずさアカデミアパーク, 2000年9月

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Nakazawa T, et al.	The SCG10-related gene family in the developing rat retina: Persistent expression of SCLIP and stathmin in mature ganglion cell layer.	Brain Res.	861(2)	399-407	2000
Furuyama T, et al.	Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues,	Biochem. J.	349(2)	629-634	2000
Kojima T, et al.	Genomic organization of the Shc gene family in the mouse and characterization of the full-length Sck/ShcB.	準備中			
Nakamura T, Komiya et al.	Discrimination between phospho-tyrosine-mediated signaling properties of conventional and neuronal Shc adapter molecules. (submitted)	投稿中			
Takahashi, M., et al.	Association of immature hypo-phosphorylated protein kinase C ϵ with an anchoring protein CG-NAP.	J.Biol. Chem.	275	34592-34596	2000
Toba, G. et al.	Disruption of the Microsomal glutathione S-transferase-like gene reduces life span of <i>Drosophila melanogaster</i> .	Gene	253	179-187	2000
Aso, T. et al.	<i>Drosophila</i> von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Complex possesses E3 ubiquitin ligase activity.	Biochim. Biophys. Res. Com.	276	355-361	2000
森 望	リン酸化チロシンアダプター分子 Shc (p66 ^{Shc}) の遺伝子ノックアウトによるマウスの寿命延長	Molecular Medicine	37	110-114	2000
森 望	老化に関する新しい知見: p66Shc 遺伝子欠によるマウスの寿命延長	臨床検査	44	571-573	2000

森 望	遺伝子から見た老化のなぞ	教育と医学(特集：健康と遺伝子) (慶応義塾大学出版会)	6月号	62-70	2000
森 望	ポストゲノムの神経科学：ショウジョウバエから	脳の科学	23号	59-63	2000

20000221

以降のページは雑誌／図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」