

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13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 森 望

平成14（2002）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	3-5
II. 分担研究報告書	
1. Shc 遺伝子ファミリーの構造解析および N-Shc を介した新たなシグナルルートの解析 森 望	6-10
2. PKC 関連酵素 PKN の細胞周期制御における 機能解析 小野功貢	11-12
3. 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	13-15
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	16-18
IV. 研究成果の刊行物・別刷 (抜粋)	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。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、Shc 関連遺伝子群の構造解析を行い、Sck と N-Shc の全長構造を明らかにした。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。PKC 関連酵素である PKN の細胞周期における機能も明らかにした。N-Shc の新たなシグナルアウトプットがわかり、アクチン骨格系の再編成を誘起することがわかった。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。老化と寿命制御におけるシグナル伝達系の役割と意義について整理し、考察を加えた。

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、PKN

〔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）
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）

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、PKC 関連タンパク質の解析、さらにショウジョウバエにおける長寿遺伝子の探索を行った。

A. 研究目的

イタリアの研究グループから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いた寿命遺伝子解析の進

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。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 (Kojima et al., 2001)、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 (中村ら、未発表)。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., 2002)。N-Shc 変異体トランスジェニックマウスの作成も進めたが、結局、mRNA 発現がみられないことがわかり、継続を断念した

(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 (曾根ら、未発表)。今後、Shc 関連分子の神経機能と寿命制御への役割のを考察するとともに、老化研究全般の中でシグナル研究の意義についても論じた (森, 2002)。

(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)。PKC 関連酵素である PKN について解析を進め、細胞周期の制御と細胞の微小管制御における役割を明らかにした (Misaki et al., 2001; Taniguchi et al., 2001)。

(3) 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 (Aigaki et al., 2001)。

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の実験により証明する必要がある。また、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みえてきた。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、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構造解析および
N-Shc を介した新たなシグナルルートの解析

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、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が、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。実際、神経細胞においても、酸化ストレス下に N-Shc のリン酸化がおこっている可能性が示された。また、N-Shc 活性化によりアクチン骨格系の再編成が誘起されることが判明した。P66-Shc のセリン 36 特異的なリン酸化認識抗体を作製することにより、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： リン酸化、遺伝子、寿命、シグナル伝達、アクチン、細胞骨格

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。さらに N-Shc の神経シグナル伝達における役割を探る。

B. 研究方法

マウス P1 ライブラリーおよびファージライ

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。

(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。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 69kD 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 69kD 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。

(3) N-Shc の新たなシグナルルートの解析：N-Shc と Shc の配列を比較すると、進化的保存性の高い PTB ドメインと SH2 ドメインに挟まれた CH1 領域が比較的ユニークな配列を含むことがわかる。すでに Shc でよく知られた 2 ヶ所の Grb2 サイトは両者でよく保存されている。しかし、実際に N-Shc でそれが同定に機能するかどうかを検討した。その結果、N-Shc の場合、一箇所は Grb2 結合をおこすが、他方は Crk に結合すること、さらに他の位置にも Crk がつきうることがわかった。また、細胞へ N-Shc を強制発現するとアクチン骨格の再編成を誘起することがわかり、この Crk サイトを介していることが良そうされた。N-Shc からアクチン系へのシグナルを媒介しうる新しい GAP 分子をも単離することに成功し、これを Grit と名付けた。Grit は神経栄養因子受容体にも N-Shc にも結合し、G 蛋白を活性化することから、神経膜受容体直下でのシグナル伝達にかかわっていると推測される。

D. 考察

Sck/ShcB の全長が CH2 ドメインを含む 69kD 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う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係して

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

Kuwahara K, Saito Y, Ogawa E, Takahashi N, Nakagawa Y, Naruse Y, Harada M, Hamanaka I, Izumi T, Miyamoto Y, Kishimoto I, Kawakami R, Nakanishi M, Mori N and Nakao K.: The neuron-restrictive silencer element-Neuron-restrictive

silencer factor system regulates basal and endothelin 1-inducible atrial natriuretic peptide gene expression in ventricular myocytes. *Mol. Cell. Biol.* 21 (6) 2085-2097 (2001)

Maekawa S, Morii H, Kumanogoh H, Sano M, Naruse Y, Sokawa Y, Mori N.: Localization of neuronal growth-associated, microtubule-destabilizing factor SCG10 in brain-derived raft membrane microdomains. *J. Biochem.* 129, 691-697 (2001)

Kojima T, Murai K, Naruse Y, Takahashi N, and Mori N.: Cell-type non-selective transcription of mouse and human genes encoding neural-restrictive silencer factor. *Mol. Brain Res.* 90 (2), 174-186 (2001)

Kojima T, Yoshikawa Y, Takada S, Sato M, Nakamura T, Takahashi N, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, and Mori N.: Genomic organization of the Shc-related phosphotyrosine adapters and characterization of the full-length Sck/ShcB: Specific association of p68-Sck/ShcB with pp135. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 284, 1039-1047 (2001)

Nishitani H, Hirose E, Uchiyama Y, Nakamura M, Umeda M, Nishii K, Mori N and Nishimoto T.: Full-sized Ran-BPM cDNA encodes a protein possessing a long stretch of proline and glutamine within the N-terminal region, comprising a large protein complex. *Gene* 272, 25-33 (2001)

Nakamura T, Komiya M, Gotoh N, Koizumi S, Shibuya M, and Mori N.: Discrimination between

phosphotyrosine-mediated signaling properties of conventional and neuronal Shc adapter molecules. *Oncogene* 21, 22-31 (2002)

Mori N, Mizuno T, Murai K, Nakano I, and Yamashita H : Effect of age on the gene expression of neural-restrictive silencing factor NRSF/REST. *Neurobiol. Aging* 23, 255-262 (2002)

Nakazawa T, Nakano I, Sato M, Nakamura T, Tamai M, and Mori N : Comparative expression profiles of Trk receptors and Shc-related phosphotyrosine adapters during retinal development: Potential roles of N-Shc/ShcC in BDNF signal transduction and modulation. *J. Neurosci. Res.*, in press.

森 望:Q & A: ヒトの寿命はどうして違うのですか?また、寿命を規定する遺伝子は見ついているのですか? *Clinical Neuroscience* 19 (5), 605 (2001)

森 望:老化研究へのノックアウト:筋萎縮性側索硬化症研究の新展開、蛋白質・核酸・酵素 46 (13) pp1999-2000 (2001)

中村岳史、森 望: チロシンリン酸化アダプター分子 Shc ファミリーの多様な機能と神経系での新たな展開、生化学 73 (11) pp1322-1325 (2001)

森 望: 「脳の老化と寿命制御」わかる実験医学シリーズ『老化研究がわかる』 pp107-113 (羊土社)

森 望: 「誕生後まもなく分裂を停止し、一

生のあいだ生きつづける細胞がある」ニュートン別冊『ヒューマンボディー』 pp98-99 (ニュートンプレス)

中澤 徹、玉井 信、森 望:網膜の発生・再生過程における神経栄養因子シグナル応答 in 「網膜・視神経の発生と再生」福田淳(編集) *Molecular Medicine* (中山書店) 39, 28-37 (2002)

森井博史、中澤 徹、森 望:神経突起伸展関連分子の多様性と視神経再生応答における役割 in 「網膜・視神経の発生と再生」福田淳(編集) *Molecular Medicine* (中山書店) 39, 148-156 (2002)

森 望:老化と寿命制御におけるシグナル伝達 in 「ここまで分かった形づくりのシグナル伝達:細胞極性・細胞運動制御から情報伝達破綻による疾病まで」竹縄忠臣・帯刀益夫(編集) *実験医学 増刊* 20 (2) 367-375 (羊土社) (2002)

2. 学会発表

Mori N: From Shc to HDACs: Molecular basis of the loss of neuronal plasticity in brain aging and their potential roles in longevity determination in mammals. 第14回国際発生生物学会議

森 望: 「脳の世紀」「長寿の世紀」への分子遺伝学: 遺伝子からみた脳の老化、第6回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会

中村岳史、佐藤仁彦、小島拓哉、森望: 神経

栄養因子シグナリングにおけるアダプター分子 N-Shc の特異的アウトプット、Neuro2001 (第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会)

Nozomu Mori : Molecular basis of the loss of neuronal plasticity in the aged brain: From gene transcription to neural remodeling, Neuro2001 (第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会)

Nozomu Mori: Shc signaling in neural development, regeneration, oxidative stress response and brain aging、VRIA Annual Meeting

Mori N, Mizuno T, Murai K, Nakano I, Yamashita H : Effect of age on the gene expression of neural-restrictive silencing factor NRSE/REST. The 2nd Neurobiology of Aging Conference “Brain Aging”

Uezono Y, Shibuya I, Yanagita T, Kojima T, Wada A, Taniyama K, Nakamura T, and Mori N : Differential modulation by the Shc adapter protein family of the Gq-coupled receptor- or insulin-like growth factor mediated signaling. Society for Neuroscience, 31st Annual Meeting

森 望 : 神経可塑性の genetics と epigenetics : 老化脳における神経の可塑性制御の分子基盤 第 23 回日本基礎老化学会秋季シ

ンポジウム

森 望 : 寿命制御・老化制御シグナル、第 1 回東北大加齢研—国立長寿研合同シンポジウム

中村岳史、小宮美沙子、広瀬英司、森井博史、太田安隆、森 望 : 神経栄養因子レセプター TrkA に結合する新規 RhoGAP 分子機能分析、第 24 回日本分子生物学会年会

小島拓哉、佐藤仁彦、中村岳史、高橋直樹、森望 : Sck/ShcB アダプター分子によるアクチン細胞骨格制御機構の解析、第 24 回日本分子生物学会年会

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

PKC 関連酵素 PKN の細胞周期制御における機能解析

小野功貴 （神戸大学・バイオシグナル研究センター教授）

細胞骨格の構築に重要な役割を担っている低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho の標的分子のひとつである PKC 関連蛋白質リン酸化酵素 PKN は、細胞骨格系の調節のみならず、アポトーシスおよび細胞周期制御の過程にも関与している可能性が示唆されている。本研究では、この PKN の細胞周期における機能を解析することにより、細胞増殖機構の解明の一助とすることを目指した。

キーワード： 蛋白質リン酸化酵素、PKN、細胞周期

A. 研究目的

細胞増殖制御は、基本的に細胞周期制御によって成り立っていると言っても過言ではない。従って、細胞周期制御機構を理解することは、ひいては個体レベルでの老化を含む現象の理解に結びつくと思われる。本研究では、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 をリン酸化する可能性のある PKC および低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho の標的分子のひとつである PKC 関連蛋白質リン酸化酵素 PKN の細胞周期制御における機能を解析することを目的とした。

B. 研究方法

アフリカツメガエル卵へ、活性型 PKN を微量注入することにより、卵割に対する PKN の影響を検討した。さらに、アフリカツメガエル卵細胞抽出液を用いた試験管内細胞周期解析系に精製 PKN を添加することにより、分裂期の進行への PKN の影響を検討した。

（倫理面への配慮）

全体的に試験管内実験であり、該当しない。

C. 結果

活性型 PKN をアフリカツメガエル二細胞期の片側の割球に微量注入した結果、注入したほうの割球だけ卵割が阻害された。緩衝液のみ、または不活性型の PKN を注入しても卵割は阻害されなかったことから、PKN が、卵割に伴う細胞骨格系の制御、あるいは、細胞周期に関与している可能性が示唆された。そこでアフリカツメガエルの卵抽出液を用いた試験管内細胞周期解析系により PKN の効果を検討した結果、活性化型 PKN を加えたサイクリングエクストラクトでは、コントロールと比較して間期が長く、一回目の核膜崩壊までの時間が長いことが確認された。さらに分裂期の進行に中心的な役割を持つ cdc2 キナーゼ活性の変動を測定した結果、その変動がコントロールと比較して遅延していること、その際に cdc2 キナーゼの抑制性のリン酸化サ

イトである 15 番目のチロシン残基のリン酸化レベルが上昇し、リン酸化された状態が長く続いていることが明らかとなった。そこでこの機構を明らかにするために精製 PKN, Cdc2/cyclinB、および Cdc2 の 15 番目のチロシン残基を脱リン酸化する脱リン酸化酵素 Cdc25C を用いた試験管内再構成実験により検討したところ、PKN が Cdc25C を直接リン酸化することにより Cdc25C 活性を阻害し、その結果として Cdc2 の活性を抑制していることを明らかにした。

D. 考察

細胞は、紫外線、放射線などの環境ストレスを受けた時、細胞周期の進行を G2/M 期で停止させ、修復する時間を稼ぎ、修復しきれない場合はアポトーシスに向かわせることは、よく知られている。しかし、その分子機構は完全には理解されていない。PKN がこのような G2/M 期停止に関与している可能性が示されたことによりストレス応答における PKN の関与も示唆される。老化においてもストレス応答の加齢による変化との関連が議論されており、今後更なる詳細な検討が必要と思われる。今年度は、Shc のリン酸化に PKC およびその関連酵素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

アフリカツメガエル卵細胞抽出液を用いた試験管内細胞周期解析系に精製 PKN を添加することにより、分裂期の進行が遅れることを見出した。この分裂期の進行の遅れは、分裂期の進行に中心的な役割を持つ Cdc2/cyclinB 活性を制御する Cdc25C を PKN が直接

リン酸化することによりその活性を阻害した結果であることを明らかにし、細胞周期制御にも PKN が何らかの役割を担っていることを示唆した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Misaki, K., Mukai, H., Yoshinaga, C., Oishi, K., Isagawa, T., Takahashi, M., Ohsumi, K., Kishimoto, T., and Ono, Y. PKN delays mitotic timing by inhibition of Cdc25C: Possible involvement of PKN in the regulation of cell division. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 125-129 (2001)

Taniguchi, T., Kawamata, T., Mukai, H., Hasegawa, H., Isagawa, T., Yasuda, M., Hashimoto, T., Terashima, A., Nakai, M., Ono, Y., and Tanaka, C. Phosphorylation of tau is regulated by PKN. *J. Biol. Chem.*, **276**, 10025-10031 (2001)

Matsumoto, M., Ogawa, W., Hino, Y., Furukawa, K., Ono, Y., Takahashi, M., Ohba, M., Kuroki, T., and Kasuga, M. Inhibition of insulin-induced activation of Akt by a kinase-deficient mutant of the isozyme of protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, **276**, 14400-14406 (2001)

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：

向井秀幸（神戸大学バイオシグナル研究センター）

高橋美樹子（神戸大学バイオシグナル研究センター）

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の原因遺伝子として、DPOSH（Drosophila Plenty of SH3s）を同定し、その cDNA をクローニングした。DPOSH の神経系における過剰発現は成虫の平均寿命を 14% 延長した。一方、発生段階での過剰発現は様々な形態異常を引き起こし、この時 JNK/SAPK の標的遺伝子（*puc*）が活性化されること、また JNK/SAPK 経路の突然変異は DPOSH の過剰発現による形態異常を抑圧することを明らかにした。寿命の延長にも JNK 経路の活性化が関与する可能性がある。

キーワード： 寿命遺伝子、DPOSH、神経細胞、JNK/SAPK 経路

A. 研究目的

寿命決定の分子機構へのアプローチとして、ショウジョウバエ長寿命変異体の遺伝子解析を行う。本研究では、マウスの POSH 遺伝子と相同な配列をもつ DPOSH 遺伝子がショウジョウバエの寿命を延長する機構として、神経系の重要性および関与するシグナル伝達系を解明することを目的とする。

B. 研究方法

GS2007 系統は、遺伝子強制発現システムを用いて同定された長寿命変異体である。強制転写産物解析から、その原因遺伝子候補として DPOSH を同定した。DPOSH cDNA の全塩基配列は Berkeley Drosophila Genome Project の EST クローン GM9451、および 5'RACE 法により決定した。DPOSH 全長 cDNA を形質転換ベクター pUAST にク

ローニングし、個体へ導入してトランスジェニックフライを作製した。神経特異的に GAL4 を発現する Appl-GAL4 系統を UAS-DPOSH 系統に交配して得られた F1 個体を 25°C で飼育して、寿命を測定した。導入遺伝子を持たない *yw* 系統と Appl-GAL4 系統を交配した F1 を同一の飼育瓶で飼育し、寿命測定の対照群とした。発生期の強制発現の影響を調べるためには、成虫原基の一部で発現する *ptc*-GAL4 系統を用いた。

（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。

C. 結果

GS2007 系統において強制発現された

遺伝子は、マウスで報告されている POSH タンパク質に類似した産物をコードしていたので、DPOSH と命名した。マウス POSH は 4 個の SH3 ドメインと Ring ドメインをもつタンパク質であり、細胞骨格を制御する small GTPase タンパク Rac1 と相互作用するタンパク質として知られている。アミノ酸レベルの類似性は全体では 23% 程度であるが、RING ドメイン、SH3 ドメインでは約 50% の高い保存性を示した。

個体寿命の決定における神経系の役割を検討するために、UAS-DPOSH を導入したトランスジェニック系統を作成し、分化した神経細胞でのみ強制発現させたところ、対照群に比べて平均寿命が 14% 延長された。しかし、最大寿命は対照群との間に有意な差は認められなかった。一方、発生過程で発現させると、様々な形態異常（翅、脚、雄生殖器）を誘発した。DPOSH が JNK 経路に関与しているか否かを検討するために、JNK 経路によって活性化されることが知られている Puckard 遺伝子の発現と JNK 経路に関わる遺伝子との相互作用を検討した。ptc-GAL4 を使って DPOSH を成虫原基の一部で強制発現させたところ、その発現パターンに従って puckard の発現が誘導された。さらに、hemipterus(JNKK)や basket(JNK) の突然変異と組み合わせた個体を作製し、翅の形態にあらわれる異常を指標として表現型を解析したところ、DPOSH によっておこる形態異常を軽減することが判明した。これらのことは、DPOSH の強制発現が JNK 経路を活性化する作用をもつこと、そして適度な活性化は個体寿命の延長効果があることを示唆した。

D. 考察

これまでの研究から、DPOSH をショウジョウバエの成虫で強制発現させると、約 15% の寿命延長効果があることが示唆されていた。しかし、実験を 30° C で行っており、一般性があるかどうかは不明であった。本研究では 25°C で実験を行うために、AppI-GAL4 系統を用いた。成虫期以前にも発現されるが、特に発生異常は認められなかったことから、DPOSH の神経細胞における負の効果はほとんどないものと考えられる。一方、成虫では平均寿命を 14% 延長する効果が認められた。これらの結果は、DPOSH が寿命を延長する作用を有することを確立すると共に、神経細胞における過剰発現が重要な意味をもつことを示唆した。

マウス POSH を培養細胞において過剰発現させると、JNK/SAPK を活性化し、細胞死を引き起こすことが知られている。マウス POSH は Rac1 と結合する領域が特定されているが、ショウジョウバエの相同遺伝子 DPOSH はその領域の配列は保存されていない。従って、同様な機能をもつかどうかは不明であった。しかし、DPOSH を発生期の分裂細胞で過剰発現させると、さまざまな形態異常を誘発した。これらの表現型は JNK 経路に影響を及ぼす変異体のいくつかで知られているものと一致した。本研究では、JNK 経路に関わる遺伝子との相互作用を解析し、DPOSH が JNK 経路を活性化することを生体内で証明した。

DPOSH の強制発現の効果が発生期の細胞と成体の細胞とで異なることは極めて興味深い。寿命の延長効果は分裂終了細胞群でのみにみられるもので、分裂細胞では JNK/SAPK の活性化によって細胞死を引き起こすものと考え

られる。このような遺伝子は従来の突然変異誘発法では検出することが困難であり、GAL4-UAS システムを用いたスクリーニングの有効性も示している。

E. 結論

ショウジョウバエの DPOSH 遺伝子産物はマウスやヒトの相同遺伝子と共通の機能ドメイン、RING フィンガー、4 つの SH3 モチーフを有するが、Rac1 結合部位は保存されていない。DPOSH を神経細胞において強制発現させると、平均寿命を 14%延長する。発生期の分裂細胞で発現させると、JNK 経路を活性化して様々な形態異常を誘発する。寿命の延長は分裂終了細胞群で強制発現させた場合にのみ起こるものと考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Seong, K.-H., Ohashiwa, T., Matsuo, T., Fuyama, Y. and Aigaki, T. (2001): An application of the gene search system to a screen for longevity gene in *Drosophila*. *Biogerontology* 2, 209-217.

Ejima, A., Nakayama, S. and Aigaki, T. (2001): Phenotypic association of spontaneous ovulation and sexual receptivity in virgin females of *Drosophila melanogaster*. *Behav. Genetics* 31, 437-444.

Seong, K.-H., Matsuo, T., Fuyama, Y. and Aigaki, T. (2002): Neural specific

overexpression of *DPOSH*, *Drosophila* Plenty of SH3s, extends the longevity of adult flies. *Biogerontology* 2, 271-281.

相垣敏郎 (2001) ショウジョウバエゲノムの機能解析, 蛋白質・核酸・酵素 46, 2436-2440.

相垣敏郎 (2002) 飛び続ける遺伝学のスター ショウジョウバエ, 細胞工学 21, 63-68.

2. 学会発表

Aigaki, T., Seong, K.-H., Ogashiwa, T., Matsuo, T. and Fuyama, Y. (2001): A gain-of-function mutagenesis searching for longevity determinant genes in *Drosophila*. Gordon Res. Conf., Biology of Ageing, July, Oxford, UK.

Aigaki, T., Seong, K.-H., Ogashiwa, T., Matsuo, T. and Fuyama, Y. (2001): Identification of longevity determinant genes using a gain-of-function mutagenesis in *Drosophila*. 2nd Inter. Conf. Oxidative Stress, April, Hawaii, USA.

相垣敏郎、ショウジョウバエの寿命制御遺伝子、分子生物学会ワークショップ、パシフィコ横浜、2001 年 12 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 |

研究成果の刊行に関する一覧表

1. Kuwahara K. et al.
The neuron-restrictive silencer element-Neuron-restrictive silencer factor system regulates basal and endothelin 1-inducible atrial natriuretic peptide gene expression in ventricular myocytes.
Mol. Cell. Biol. 21 (6) 2085-2097 (2001)
2. Maekawa S, et. al.
Localization of neuronal growth-associated, microtubule-destabilizing factor SCG10 in brain-derived raft membrane microdomains.
J. Biochem. 129, 691-697 (2001)
3. Kojima T, et al.
Cell-type non-selective transcription of mouse and human genes encoding neural-restrictive silencer factor.
Mol. Brain Res.. 90 (2), 174-186 (2001)
4. Kojima T, et al.
Genomic organization of the Shc-related phosphotyrosine adapters and characterization of the full-length Sck/ShcB: Specific association of p68-Sck/ShcB with pp135.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 284, 1039-1047 (2001)
5. Nishitani H, et al.
Full-sized Ran-BPM cDNA encodes a protein possessing a long stretch of proline and glutamine within the N-terminal region, comprising a large protein complex.
Gene 272, 25-33 (2001)
6. Nakamura T, et al.
Discrimination between phosphotyrosine-mediated signaling properties of conventional and neuronal Shc adapter molecules.
Oncogene 21, 22-31 (2002)
7. Mori N, et al.
Effect of age on the gene expression of neural-restrictive silencing factor NRSF/REST.
Neurobiol. Aging 23, 255-262 (2002)
8. Nakazawa T, et al.
Comparative expression profiles of Trk receptors and Shc-related phosphotyrosine adapters during retinal development: Potential roles of N-Shc/ShcC in BDNF signal transduction and modulation.
J. Neurosci. Res., 印刷中.

9. 森 望：
Q & A: ヒトの寿命はどうして違うのですか？また、寿命を規定する遺伝子は見つかっているのですか？
Clinical Neuroscience 19 (5), 605 (2001)
10. 森 望：
老化研究へのノックアウト：筋萎縮性側索硬化症研究の新展開、
蛋白質・核酸・酵素 46 (13) pp1999-2000 (2001)
11. 中村岳史、森 望
チロシンリン酸化アダプター分子 Shc ファミリーの多様な機能と神経系での新たな展開、
生化学 73 (11) pp1322-1325 (2001)
12. 森 望：
「脳の老化と寿命制御」
わかる実験医学シリーズ『老化研究がわかる』 pp107-113 (羊土社)
13. 森 望：
「誕生後まもなく分裂を停止し、一生のあいだ生きつづける細胞がある」
ニュートン別冊『ヒューマンボディー』 pp98-99 (ニュートンプレス)
14. 中澤 徹ら
網膜の発生・再生過程における神経栄養因子シグナル応答 in 「網膜・視神経の発生と再生」福田淳（編集）
Molecular Medicine (中山書店) 39, 28-37 (2002)
15. 森井博史ら
神経突起伸展関連分子の多様性と視神経再生応答における役割 in 「網膜・視神経の発生と再生」福田淳（編集）
Molecular Medicine (中山書店) 39, 148-156 (2002)
16. 森 望：
老化と寿命制御におけるシグナル伝達 in 「ここまで分かった形づくりのシグナル伝達：細胞極性・細胞運動制御から情報伝達破綻による疾病まで」竹縄忠臣・帯刀益夫（編集）
実験医学 増刊 20 (2) 367-375 (羊土社) (2002)
17. Misaki, K. et al.
PKN delays mitotic timing by inhibition of Cdc25C: Possible involvement of PKN in the regulation of cell division.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 125-129 (2001)
18. Taniguchi, T. et al.
Phosphorylation of tau is regulated by PKN.
J. Biol. Chem., 276, 10025-10031 (2001)
19. Matsumoto, M., et al.
Inhibition of insulin-induced activation of Akt by a kinase-deficient mutant of the

- isozyme of protein kinase C.
J. Biol. Chem., 276 , 14400-14406 (2001)
- 2 0 . Seong, K.-H., et al.
An application of the gene search system to a screen for longevity gene in *Drosophila*.
Biogerontology 2, 209-217 (2001).
- 2 1 . Ejima, A., et al.
Phenotypic association of spontaneous ovulation and sexual receptivity in virgin females of *Drosophila melanogaster*.
Behav. Genetics 31, 437-444 (2001).
- 2 2 . Seong, K.-H., et al.
Neural specific overexpression of *DPOSH*, *Drosophila Plenty of SH3s*, extends the longevity of adult flies.
Biogerontology 2, 271-281 (2001).
- 2 3 . 相垣敏郎
ショウジョウバエゲノムの機能解析,
蛋白質・核酸・酵素 46, 2436-2440 (2001).
- 2 4 . 相垣敏郎
飛び続ける遺伝学のスター ショウジョウバエ,
細胞工学 21, 63-68 (2002).

20010220

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。