

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

寿命制御遺伝子に関する分子遺伝学的研究

平成 14 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

寿命制御遺伝子に関する分子遺伝学的研究

目次

インスリン受容体シグナルと酸化ストレス耐性	2
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	
分担研究者 小河原緑 東京都老人総合研究所分子遺伝学部門	
スーパーオキシドディスムターゼと寿命	15
分担研究者 池上隆司、清水孝彦 東京都老人総合研究所分子遺伝学部門	
ミトコンドリア機能と個体寿命～クロック-1 ノックアウトマウスの解析	19
分担研究者 中井大輔 東京都老人総合研究所分子遺伝学部門	
Mn-SOD による寿命制御機構	30
分担研究者 本田修二、本田陽子 東京都老人総合研究所アイソトープ部門	
ポリコーム群タンパク複合体の構造と機能	34
分担研究者 古関明彦 千葉大学大学院発生病学教授	

## インスリン受容体シグナルと酸化ストレス耐性

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  
分担研究者 小河原緑 東京都老人総合研究所・分子遺伝学部門

### 研究要旨

線虫の長寿命変異体 *daf-2* 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)。そこで、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) をノックインした遺伝子改変マウスを作製した。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。ヘテロ接合体マウスでは、インスリンシグナル伝達をチロシンキナーゼ活性で測定すると、野生型マウスの 20-30% に抑制されている事が判明した。また、酸化ストレスにたいして耐性を示し、80% 酸素下の生存は野生型マウスに比べ有意に延長し、個体レベルで酸素毒性に対するストレス耐性能を示した。これらの結果は、インスリン様シグナルが種を越えて酸化ストレス耐性能に関与することを示唆した。

### 研究目的

インスリンシグナルは哺乳類まで保存されており、哺乳類におけるインスリンシグナルの異常が寿命シグナルとして機能する可能性を提示した。線虫の長寿命変異体 *daf-2* 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、野生型マウスの肝臓より、1% Triton X-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、 $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -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

オグラフィーを行い95kD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

野生型マウス、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

野生型マウス、ヘテロ接合体マウス(3ヶ月齢)を100%、90%、80%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生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生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 Biotechnologis Corp)と一晚反応させ、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繊維芽細胞を培養し、ホモ、ヘテロ、野生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

野生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, 4µg/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  $\mu$ M ヒポキサンチン、25  $\mu$ M WST-1）とサンプル 10  $\mu$ l をとり、PBS(-)または 50mM KCN 20  $\mu$ l を加え、キサンチンオキシダーゼ 20  $\mu$ 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インスリン抵抗性：生化学的解析

IRP1195L 変異はインスリン受容体チロシンキナーゼドメインの点突然変異であることから、キナーゼ活性の欠失およびインスリンシグナルの失活が予想される。そこで、ヘテロ接合体マウスのインスリンシグナル伝達をチロシンキナーゼ活性で測定することにより検討した。チロシンキナーゼ活性はヘテロ接合体マウスで野生型マウスの 20-30% に抑制されている事が判明した（図-1）。

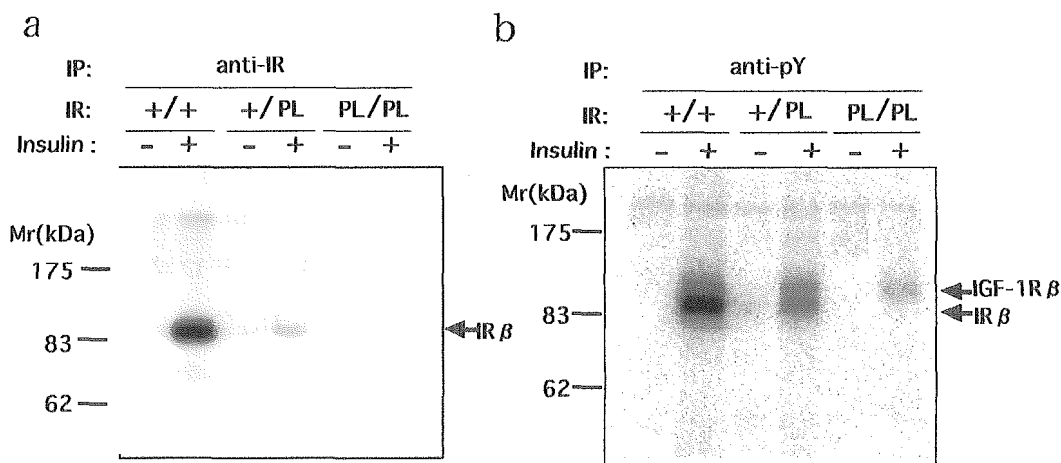


図 1 IRP1195L ヘテロ接合体マウス、ホモ接合体マウスにおけるインスリン受容体自己リン酸化能の失活

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

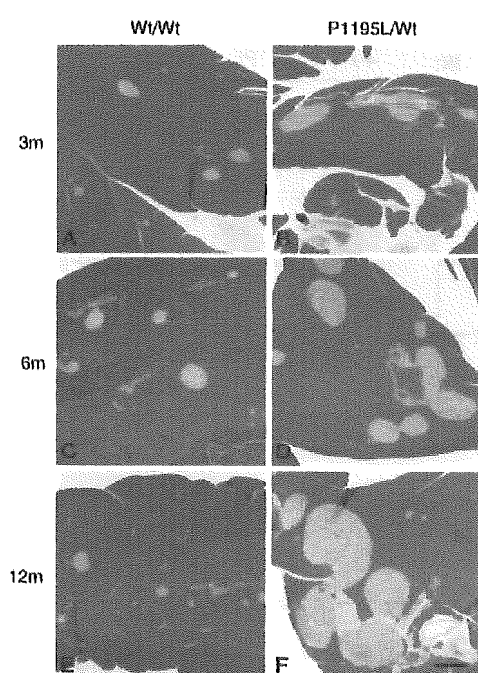


図 2 IRP1195L ヘテロ接合体マウスにおける膵臓ランゲルハンス島の肥大

A: 野生型マウスの膵病理像、3ヶ月齢、HE染色。

B: IRP1195L ヘテロ接合体マウスの膵病理像、3ヶ月齢、HE染色。

C: 野生型マウスの膵病理像、6ヶ月齢、HE染色。

D: IRP1195L ヘテロ接合体マウスの膵病理像、6ヶ月齢、HE染色。

E: 野生型マウスの膵病理像、12ヶ月齢、HE染色。

F: IRP1195L ヘテロ接合体マウスの膵病理像、12ヶ月齢、HE染色。

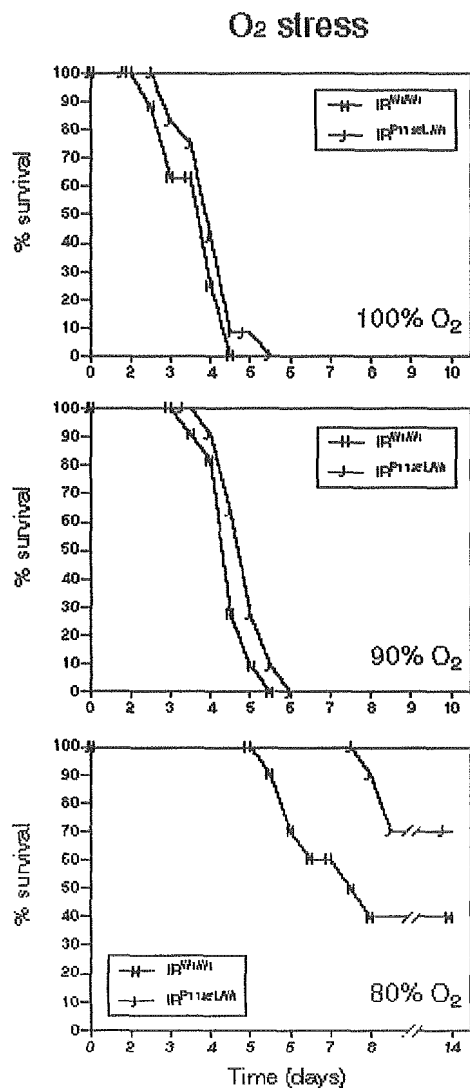


図 3 IRP1195L ヘテロ接合体マウスにおける 100%、90%、80%酸素吸入下での生存曲線

100%酸素吸入下での生存曲線（上段）、90%酸素吸入下での生存曲線（中段）、80%酸素吸入下での生存曲線（下段）を示す。IRP1195L ヘテロ接合体マウスは野生型マウスに比べ、100%、90%、80%酸素吸入下での生存に延長傾向を認め、特に 80%では生存が有意に延長し、酸素毒性に対するストレス耐性能を示した。

また、ヘテロ接合体マウスは血精インスリン値が、野生型マウスと比べ約 6 倍に増加し、高インスリン血症を示し、インスリン抵抗性を獲得していることを明らかにした（表 1）。そこで、膵臓の病理像を観察するとランゲルハンス島の顕著な肥大が認められた（図-2）。

## 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

これまでに線虫の Daf-2 長寿命変異体で強い酸化ストレス耐性と Mn-SOD の遺伝子発現が抗進し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野生型マウスに比べ、100%、90%、80%酸素吸入下での生存に延長傾向を認め、特に 80%では生存が有意に延長し、酸素毒性に対するストレス耐性能を示した（図-3）。

また、抗酸化防御に関わる酵素の活性を測定したところ、ヘテロ接合体マウス肝臓、腎臓における Mn-SOD 活性が野生型マウスに比べ、1.3 倍、2 倍に上昇し、有意の差が得られた（図-4）。



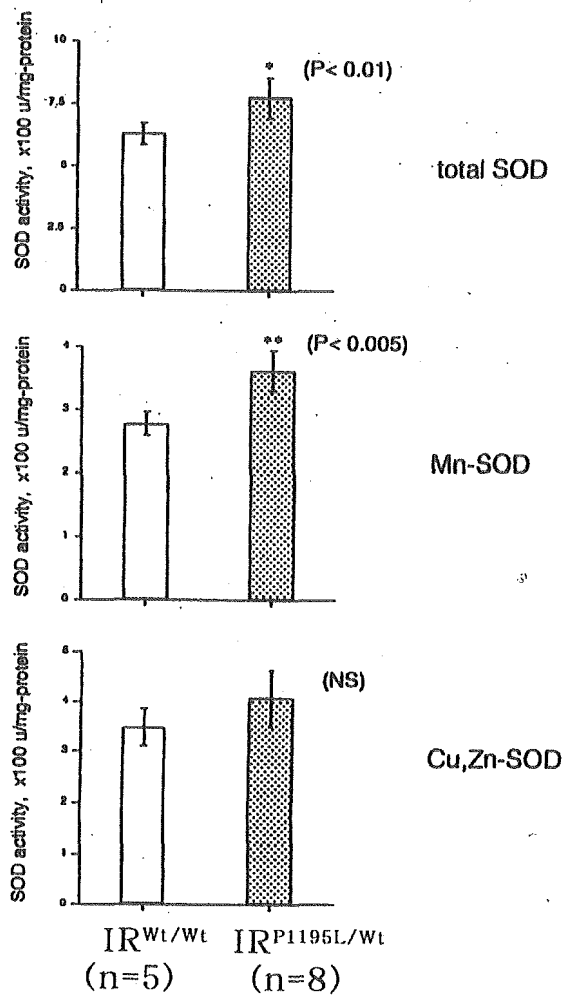


図 4 IRP1195L ヘテロ接合体マウス肝臓における Mn-SOD 活性  
野生型マウス（白カラム）および IRP1195L ヘテロ接合体マウス（黒カラム）肝臓における SOD 活性（上段）、Mn-SOD 活性（中断）、Cu/Zn-SOD 活性（下段）を示す。IRP1195L ヘテロ接合体マウスの Mn-SOD 活性は野生マウスの 1.3 倍の活性値を示した。

一方、酸化ストレスによる肺組織に与える影響を 100%、80%の酸素負荷後死亡したマウスを用いて病理学的に検討した。酸素負荷した野生型マウス(Wt/Wt)の HE 染

色では (図-5 C)、肺胞構造の破壊がひどく厚い硝子膜の形成が認められたが、酸素負荷した IRP1195L ヘテロ接合体マウス(Wt/P1195L)の HE 染色では (図-5 D)、硝子膜の形成は軽度であった。Mn-SOD の発現を免疫組織化学で観察すると、酸素負荷した Wt/Wt (図-5 E) では弱い発現しか認められず、Wt/P1195L (図-5 F) では酸素負荷による Mn-SOD の発現増強が認められた。

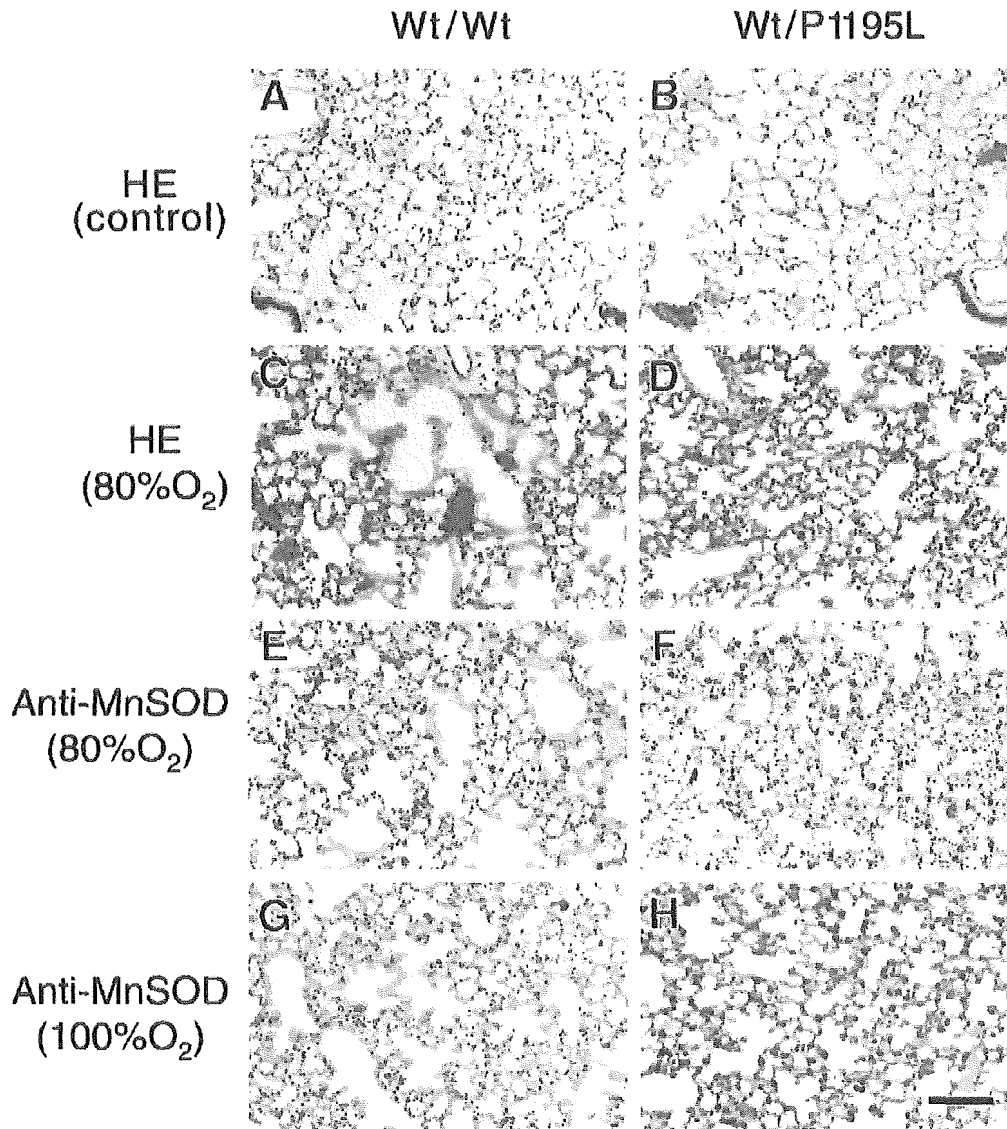


図5 IRP1195Lヘテロ接合体マウス肺臓における酸素負荷によるMn-SODの発現増強

A: 野生型マウスの肺病理像、HE染色、酸素負荷前。

B: IRP1195Lヘテロ接合体マウスの肺病理像、HE染色、酸素負荷前。

C: 野生型マウスの肺病理像、80%酸素吸入後6日で死亡、HE染色、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、80%酸素吸入後8日で死亡、HE染色。野生型マウスに比べ、硝子膜形成は軽度であった。

E: 野生型マウスの肺におけるMn-SODの発現局在。80%酸素吸入後6日で死亡、抗Mn-SOD抗体で免疫染色、肺胞上皮細胞で弱いMn-SODの発現を認めた。

F: IRP1195Lヘテロ接合体マウスの肺におけるMn-SODの発現局在、80%酸素吸入後8日で死亡、抗Mn-SOD抗体で免疫染色、肺胞上皮細胞で軽度のMn-SODの発現増強を認めた。

G: 野生型マウスの肺におけるMn-SODの発現局在。100%酸素吸入後60時間で死亡、抗Mn-SOD抗体で免疫染色、肺胞上皮細胞で軽度のMn-SODの発現を認めた。

H: IRP1195Lヘテロ接合体マウスの肺におけるMn-SODの発現局在、100%酸素吸入後84時間で死亡、抗Mn-SOD抗体で免疫染色、肺胞上皮細胞で著しいMn-SODの発現増強を認めた。

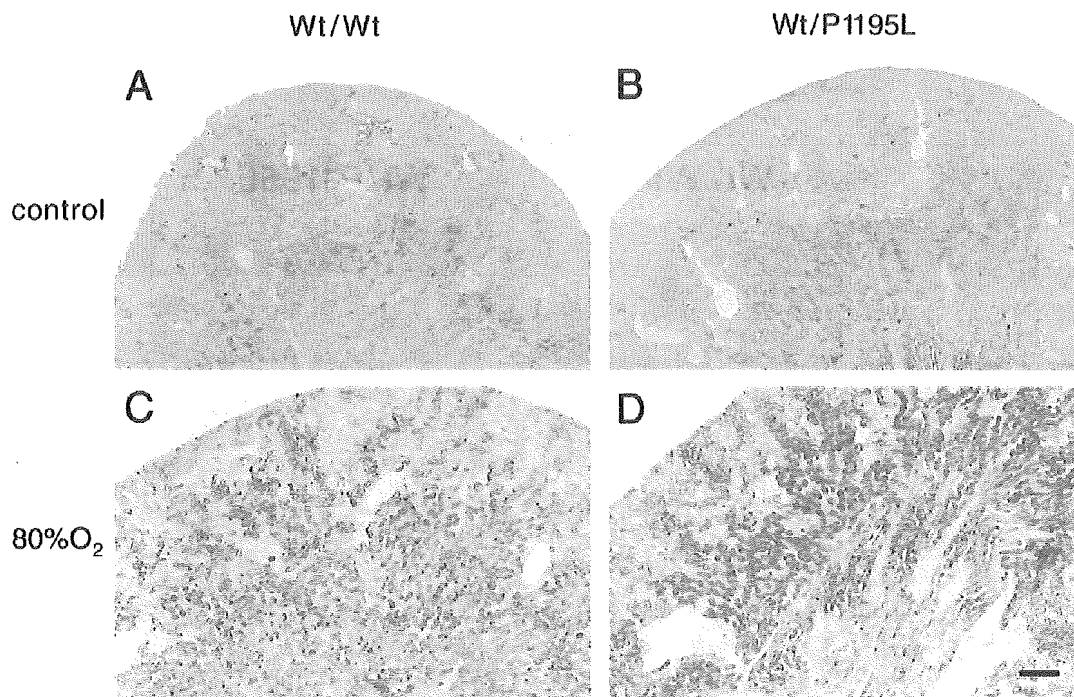


図 6 IRP1195L ヘテロ接合体マウス腎臓における酸素負荷による Mn-SOD の発現増強

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

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

C: 野生型マウスの腎における Mn-SOD の発現局在。80%酸素吸入後 6 日で死亡、抗 Mn-SOD 抗体で免疫染色、軽度の Mn-SOD の発現を認めた。

D: IRP1195L ヘテロ接合体マウスの腎における Mn-SOD の発現局在、80%酸素吸入後 8 日で死亡、抗 Mn-SOD 抗体で免疫染色、著しい Mn-SOD の発現増強を認めた。

100%酸素負荷後死亡したマウスを用いて急性期の Mn-SOD の発現を免疫組織化学で観察すると、Wt/Wt (図-5 G) と比べて、Wt/P1195L (図-5 H) では、酸素負荷による Mn-SOD の発現増強が顕著に認められた (図-5)。

また 腎組織においても酸素負荷による Mn-SOD の発現増強が観察され、酸素負荷した野生型マウス (図-6C) と比べて、IRP1195L ヘテロ接合体マウス (図-6D) では、酸素負荷による Mn-SOD の著しい発現増強が認められた (図-6)。

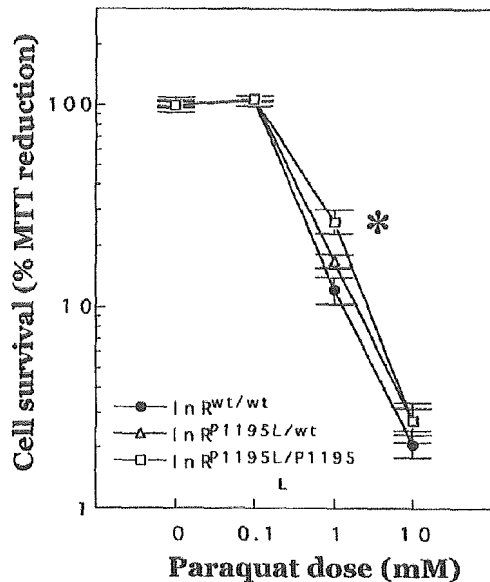


図 7. IRP1195L ホモ接合体マウス、ヘテロ接合体マウス由来胎児線芽細胞における酸化ストレス応答能  
インスリン受容体遺伝子改変マウスより培養した線維芽細胞に酸化毒であるパラコートを追加し、細胞死を MTT 還元能で検討した。1mM 濃度のパラコートでホモ接合体由来細胞は有意の酸化ストレス耐性を示した。

### 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-7)。(P<0.0001)

### 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 ホモローグも同様に 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に移るだろう。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.

## スーパーオキシドディスムターゼと寿命

分担研究者 池上隆司 清水孝彦  
東京都老人総合研究所分子遺伝学部門

### 研究要旨

線虫で長寿や酸化ストレス耐性を示すインスリン様受容体変異をマウスに導入した加齢遅延モデルマウスを作製・解析した結果、肺における酸化ストレスの生体反応として活性酸素の処理酵素であるスーパーオキシドディスムターゼ (MnSOD) の発現が上昇していた。

MnSOD の欠損マウスはホモ接合体では生後早期で死亡するという報告があり、長期にわたる活性酸素の影響を解析することは困難であった。この問題を解決する方法として、臓器特異的 MnSOD 欠損マウスの作製を試みた。このモデル系を用い、各臓器に MnSOD を欠損させることにより、長寿と活性酸素の関係が解析できると期待される。

### 研究目的

1997 年に木村らにより線虫の長寿命変異体である *daf-2* の遺伝学的解析および分子生物学的解析の結果、責任遺伝子が線虫のインスリン様受容体遺伝子であることが発見された<sup>1)</sup>。また *daf-2* 線虫ではインスリン様シグナル伝達に異常があること、インスリン様シグナル伝達異常が個体寿命を延長させること、抗酸化酵素である MnSOD の発現が増大し、酸化ストレス耐性を獲得していることが報告されている<sup>2)</sup>。

加齢により生体は退行性変化を示すが、この根本的な原因は明確に解明されていない。活性酸素も候補のひとつであり、脂質、蛋白質、DNA において様々な修飾、影響を与え、結果的に生体に対して悪影響を及ぼす可能性が示唆されている。

ミトコンドリアは生体がエネルギーを産生する重要な器官であるが、エネルギーとして ATP を産生する際に活性酸素の一種である  $O_2^{\cdot -}$  が発生する。この  $O_2^{\cdot -}$  を分解、代謝する酵素のひとつが MnSOD である。

MnSOD 欠損マウスは 1995 年に Li らにより拡張型心筋症を伴い生後早期に死亡してしまうことが報告されている<sup>3)</sup>。そのため MnSOD 欠損マウスを用いて慢性的な酸化ストレスを長期に渡って解析することは困難である。そこで、我々は cre-loxp system を用いて、臓器特異的な MnSOD 欠損マウスを作製し、長期の解析を可能にした。このことにより、臓器特異的に抗酸化酵素である MnSOD を欠損させたマウスは老化促進モデルマウスとなる可能性が示唆される。



## 結果と考察

### MnSOD コンディショナルノックアウトマウスの作製

エクソン3は39アミノ酸をエンコードしており MnSOD は4量体を形成するが、その結合ドメインが含まれているためこの部分を欠失するように戦略を立てた。生体内でエクソン1から5までを含む genome DNA から PCR 法によりエクソン3を取り出し、ネオマイシン耐性遺伝子の3'、5'側に lox 配列が付加されたカセットに挿入することによりネオマイシン選別が可能となるようにした。さらにその3'側に lox 配列を付加した。この上、下流にショートアーム、ロングアームを組み込み相同組換えが起こり易くした(図1)。

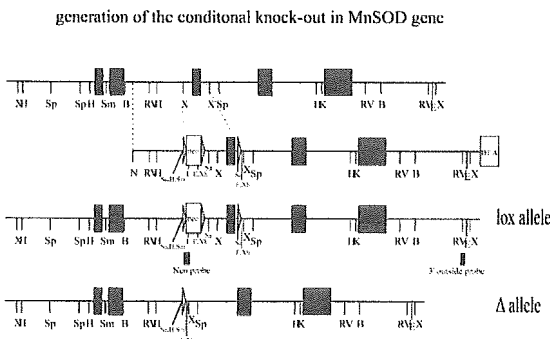


図1

MnSOD コンディショナルノックアウトマウス作製のための標的ベクターの構築

このターゲットベクターを線状化し、エレクトロポレーション法によって ES 細胞に導入した。ネオマイシン耐性 ES クローンを G418 および GANC (ガンシクロビル) によって選択し、サザンプロット法、PCR 法によって

相同組換え体を同定した。相同組換えの起こった ES クローンを用い、生殖系列のキメラマウスを作製した。マウスを野生型の C57BL/6 の雌マウスと交配させ、PCR 法によってヘテロ接合体マウス (F1:雑種一代) の産出を確認した。

### 相同組み換えの確認

3'側のアウトサイドプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを施行した。各々のバンドが検出され、相同組換えが予想通りになっていることを確認した(図2)。

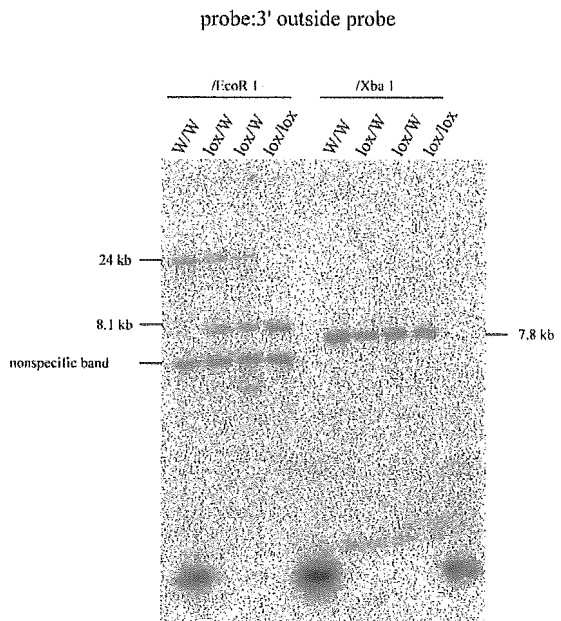


図2

サザンハイブリダイゼーション

3'側のアウトサイドプローブを用いて、各々の遺伝子型を確認した。

### CAG-cre トランスジェニックマウスとの交配

前述の lox 配列はバクテリオファージ P1 のリコンビナーゼ(Cre)によ

って認識され、lox 配列ではさまれた部分は環状に切り取られるように除去される<sup>4)</sup>。従って、図1のようにエクソンをlox配列によってはさみこむことにより、Cre存在下でknockout mouseを作製できる。Creを導入する方法のひとつとして、Cre-トランスジェニックマウスが挙げられる。臓器特異的(組織特異的)プロモーターによって制御されたトランスジェニックマウスと交配させることにより、その子は臓器特異的(組織特異的)MnSODノックアウトマウスとなることが予想された。胎生早期から全身性に発現するcytomegalovirus immediate early enhancer chicken  $\beta$ -actin hybrid(CAG) promoterによって制御されたCre-トランスジェニックマウスと交配したが産出子は0匹であった(図3)。

	del/W CAG/+		lox/lox +/+		
	del/W CAG/+	del/del CAG/+	del/lox +/+	lox/W +/+	
offsprings	9	0	9	12	
Mendelian ratio	1	:	1	:	1
E 14.5	1	4	2	1	

図3

産出子と遺伝子型の割合

生後約4週のマウスの尾を用いて遺伝子型を確認したところMnSOD欠損マウスホモ接合体は期待と異なり0匹であった。

胎生期致死が考えられた。胎生14.5日のマウスの肝臓の遺伝子型を確認し、抗MnSOD抗体を用いてウェスタンブロッティングを施行した(図4)。この結果全身性にMnSODが欠損していることが確認された。

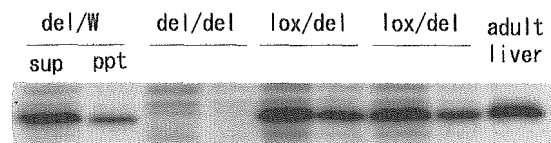


図4

ウェスタンブロッティング

胎生14.5日において肝臓をサンプルに抗MnSOD抗体を用いてウェスタンブロッティングを施行した。MnSOD欠損マウスホモ接合体は期待通りにバンドの検出ができなかった。

### Albumin-cre トランスジェニックマウスとの交配

CAG-cre トランスジェニックマウスは全身性にリコンビナーゼを発現するが、Albumin-cre トランスジェニックマウスは肝臓特異的に発現する<sup>5)</sup>。このマウスと交配することにより、肝臓特異的MnSOD欠損マウスを作製した。このマウスの各臓器を用いてウェスタンブロッティングを施行した(図5)。

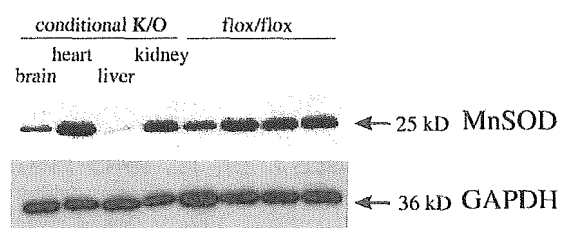


図5

肝臓においてのみMnSODの欠損が認められた。

### まとめ

臓器特異的なMnSOD欠損マウスを作製し、遺伝子型の確認を行った。さらに全身性にMnSODが欠損すると胎生期致死になることを確認した。

老化による退行性変化は様々な原因が挙げられるが、活性酸素は有力

な候補である。肺線維症を含め活性酸素が特定の疾患に関与することは報告されているが、老化と活性酸素の関係を明確に示した報告はあまりみられない。

この活性酸素と老化の関係を解析することにより、長寿の解析に役立つと思われる。

実験の進行状況は現時点では遺伝子型の確認のみであるが、今後は様々な臓器特異的 MnSOD 欠損マウスを作製し、膵臓β細胞、軟骨に活性酸素を蓄積するようなモデルマウスを用いて老化と長寿の分子メカニズムを解析する予定である。

- 1) Kimura, K. D., Tissenbaum H. A., Liu Y., and Ruvkun G.: *daf-2* an insulin receptor-like gene that regulation longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 227, 5328, 942-6. 1997
- 2) Honda, Y. and Honda S. :The *daf-2* gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mnsuperoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Faseb J*, 13, 11, 1385-1393. 1999
- 3) Li Y., Huang T. T. , Carlson E. J., Melov S., Ursell P. C., Olson J. L., Noble L. J., Yoshimura M. P., Berger C., Chan P. H. ,Wallace D. C., Epstein C. J.: Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet*, 11, 376-81.

1995

- 4) Sternberg N., Hamilton D., Hoess R.: Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between *loxP* and the bacterial chromosome. *J Mol Biol* 25, 150, 487-507. 1981
- 5) Sakai K., Miyazaki Ji.: A transgenic mouse line that retains Cre recombinase activity in mature oocytes irrespective of the cre transgene transmission. *Biochem Biophys Res Commun* , 18, 237, 318-24. 1997
- 6) Postic C., Shiota M., Niswender K. D., Jetton T. L., Chen Y., Moates J. M., Shelton K. D., Lindner J., Cherrington A. D., Magnuson M. A. : Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *J Biol Chem* 274, 305-15. 1999

ミトコンドリア機能と個体寿命〜クロック-1 ノックアウトマウスの解析〜

分担研究者 中井大輔 東京都老人総合研究所分子遺伝学部門

研究要旨

クロック-1 (*coq7/clk-1*)は長寿命線虫より単離された遺伝子である。マウスクロック-1 の線虫・酵母ホモログはミトコンドリア呼吸に必要なユビキノ合成に不可欠である。我々はクロック-1 ノックアウトマウスを作製し、この遺伝子の生物学的な役割について研究している。このクロック-1 ノックアウトマウスは胎生期 10.5 日以降は全て子宮内胎児死亡することが明らかになった。そのノックアウトマウス胎生期 10.5 日目の光学顕微鏡所見で脳皮質の神経形成に異常を認めた。電子顕微鏡所見では膨化したミトコンドリアが特有の内膜構造を失っていた。これはヒトミトコンドリア病の所見に共通する。生化学的解析ではクロック-1 ノックアウトマウスはユビキノンの代わりに前駆体であるデメトオキシユビキノが蓄積していた。また細胞培養では、クロック-1 ノックアウトマウス由来の細胞はウシ胎児血清の添加で増殖が可能になったが増殖速度は遅く、線虫モデルの表現型と相似していた。これらの結果からマウスクロック-1 はユビキノ合成、ミトコンドリアのメンテナンス、神経形成に必須であることが明らかになった。

(*coq7/clk-1*) は生物のエネルギー合成

はじめに

1995年に Hekimi らが、線虫 *C.elegans* において咽頭ポンピング、スイミング、脱糞等のリズム(ウルトラディアンリズム)が遅くなり、寿命が約 1.5 倍にまで延長する個体群を発見した(1)。この線虫の変異を決定づける遺伝子を生体内リズム異常に関わるものとしてクロック遺伝子群(*clk*)と命名した(1)。1997年には Hekimi らにより *clk-1* が同定され、ホモログが酵母からヒトまで生物界に広く存在することを明らかにした(2)。

では、何故 *clk-1* が欠損するとリズムの遅い、長寿の表現型が出現するのであろうか？線虫、酵母(ホモログは *coq7/cat5*) の研究からクロック-1

に必要な補酵素ユビキノ(CoQ)を合成するのに必須であることが明らかにされた(3-5)(図 1)。このエネルギー合成過程はミトコンドリアという細胞内器官で酸

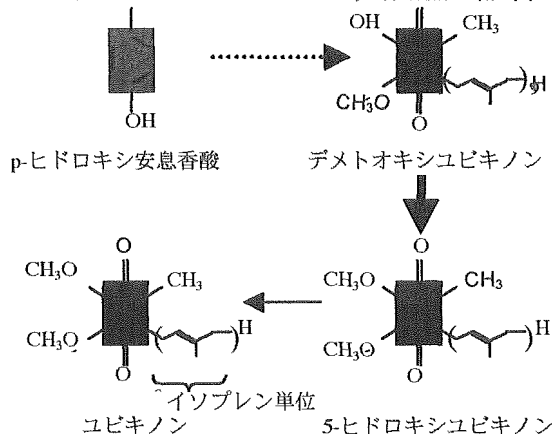


図 1. ユビキノンの合成経路