

クロック-1 遺伝子産物はデメトオキシユビキノンから5-ヒドロキシユビキノンの生合成に必要である。

るといわれている(9)。ミトコンドリアは活性酸素を産生する器官であるとともに

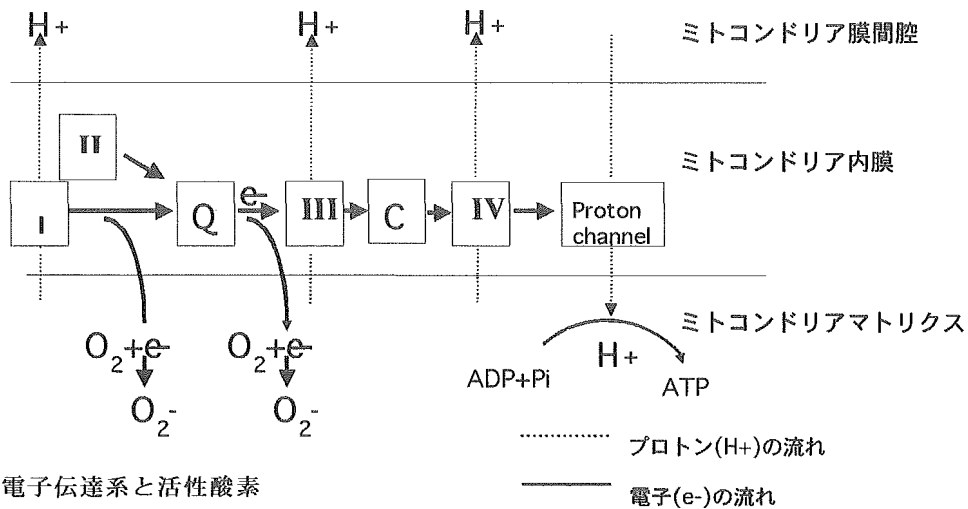


図 2. 電子伝達系と活性酸素

呼吸複合体 I からユビキノンを經由して複合体 III に電子を受け渡す過程で漏出した電子が酸素と結合し、活性酸素(O₂⁻)が発生する。

I ~ IV : 呼吸複合体
 Q : ユビキノン
 C : チトクローム C

化的リン酸化反応によって ATP が産生される。酸化的リン酸化反応は電子伝達系ともよばれ、電子を受け渡す反応である(図 2)。ユビキノンはビタミンの 1 種と考えられ、酵母から我々ヒトの高等生物まで広く生物界に存在する。ユビキノンの側鎖イソプレン単位の数(図 1)は個々の生物によって異なる(6)。例えば、ヒトではイソプレン単位は 10 のため、CoQ₁₀ と称され、マウス、トウモロコシでは 9、大腸菌では 8、*Hansenula* 酵母では 7、出芽酵母では 6 単位のイソプレン側鎖を持つユビキノンを有している。

また、電子伝達系で電子を受け渡しする際、その副産物として活性酸素が産生され(7)(図 2)、過剰な活性酸素は生体に有害であると考えられている(8)。好氣的呼吸で消費される酸素の約 2-3%は活性酸素に変換されると言われており、ラットの典型的な体細胞は DNA が活性酸素による攻撃を 1 日に約 10 万ヶ所受け

に、活性酸素によるダメージを受けやすい細胞内器官でもある(10)。ミトコンドリア DNA は核 DNA に比べて活性酸素による変異を受けやすいとの報告もある(11)。生体に有害な活性酸素の発生量が寿命を規定する因子であるという考えは広く受け入れられている(8)。

ユビキノン生合成が低下している *clk-1* 変異体は電子伝達系を通じたエネルギー産生量が低下する(表現型としてはリズム異常が生じる)とともに活性酸素種の発生も低下しているという仮説が考えられる。我々はマウスとヒトにおけるクロック-1 遺伝子単離に成功した(12, 13)。そして、クロック-1 遺伝子産物はミトコンドリアで発現していることを報告した(13)。今回ヒトにより近いマウスでクロック-1 欠損モデルを作製し、それらのミトコンドリア機能を評価することを試みた。

マウスでのクロック-1、ユビキノンの役割を明らかにすることで高等生物における寿命決定機構に迫ることが本研究の目的である。

クロック-1 ノックアウトマウスの作製

クロック-1 遺伝子のエクソン II をネオマイシン耐性遺伝子により置換したコンストラクトを作成し(図 3A)(14)、それを導入後、相同組換えを起こした ES 細胞(胚性幹細胞)を凝集法により偽妊娠マウスの子宮内に移植した。その子孫の中からクロック-1 遺伝子の欠損したマウスを繁殖させてノックアウトマウスを樹立した。ホモ接合体には、クロック-1 遺伝子産物である蛋白質 (COQ7/CLK-1) が存在しないことが確認された(図 3B)。そしてヘテロ接合体は正常に発育するが、ホモ接合体は産出仔の中に生存しないことが明らかになった。ホモ接合体が胎児のどの段階まで生存しているかを調べたところ、胎生期 8.5 日目から 11.5 日目の間で胎児死亡していることが明らかになった(表 1)。胎生期 10.5 日目の野生体とホモ接合体を形態学的に比較すると、野生体(図 4A,C) が 20 倍の湿重量がある。そしてホモ接合体は神経管が未閉鎖であり(図 4B 矢印)、約 48 時間の発生の遅れがあると考えられた(図 4B,D)。これ

表 1. *coq7/clk-1*(+/-) マウス間交配による子孫・胎児の数

Stage	Total offspring	<i>coq7</i> (+/+)	<i>coq7</i> (+/-)	<i>coq7</i> (-/-)	resorbed
E8.5	29	4	16	7 (24%)	2
E9.5	82	16	47	16 (20%)	13
E10.5	84	15	49	13 (15%)	7
E11.5	44	8	21	0	15
E12.5	16	4	8	0	4
E13.5	15	4	8	0	3
Weanling	286	98	188	0	

らの事実からクロック-1 は発生の進行に必須の遺伝子であることが明らかになった。

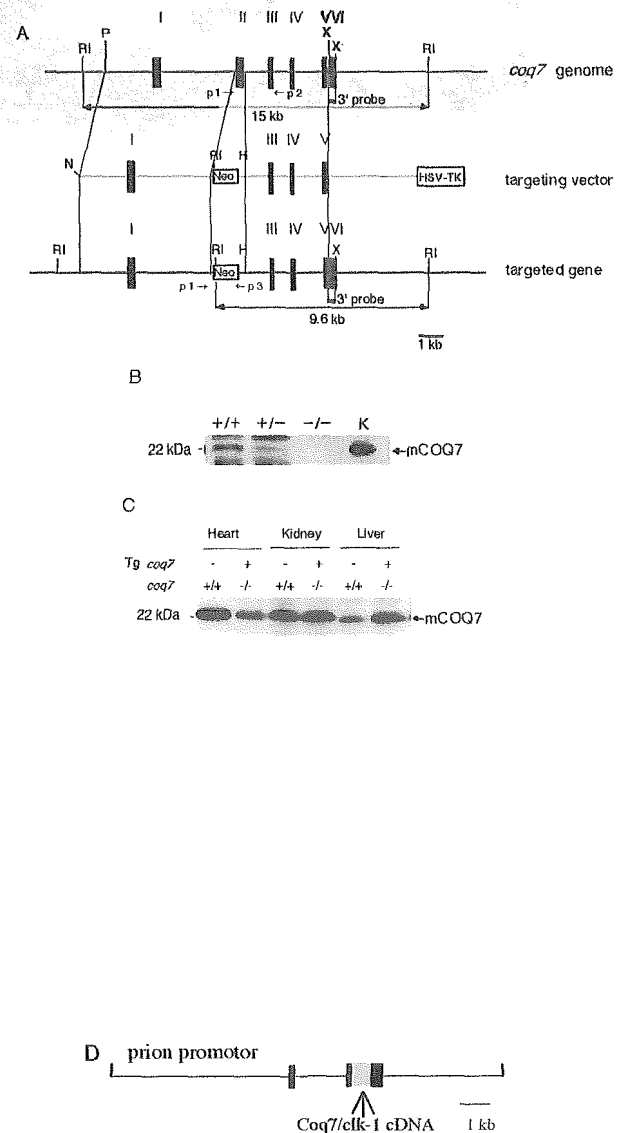


図 3. クロック-1 ノックアウトマウスとクロック-1 トランスジェニックマウスの作製

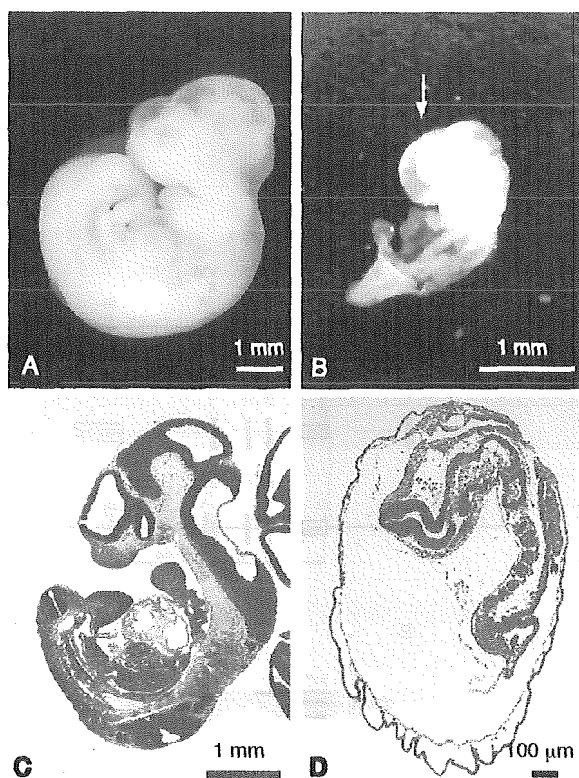


図 4. クロック-1 ノックアウトマウスの組織像

クロック-1 遺伝子は神経発生に必須である

胎生期 10.5 日目のマウスを詳細に組織学的に解析した(14)。図 5 は胎生期 10.5 日目の野生体とホモ接合体マウスの脳皮質の組織を光学(図 5A,B)・電子(図 5C,D)顕微鏡で観察したものである。野生体(図 5A,C)では脳の中心に近い脳室側から外側の柔膜に向かって紡錘型の神経細胞が放射状に規則正しく配列している。しかし、ホモ接合体(図 5B,D)では円型～多角形の細胞が敷石状に不規則に配列している。また細胞の多くは様々

な大きさの顆粒を細胞質に含んでいる(図 5B,D 矢印)。

クロック-1 遺伝子はミトコンドリアのメンテナンス(形態維持)に必須である

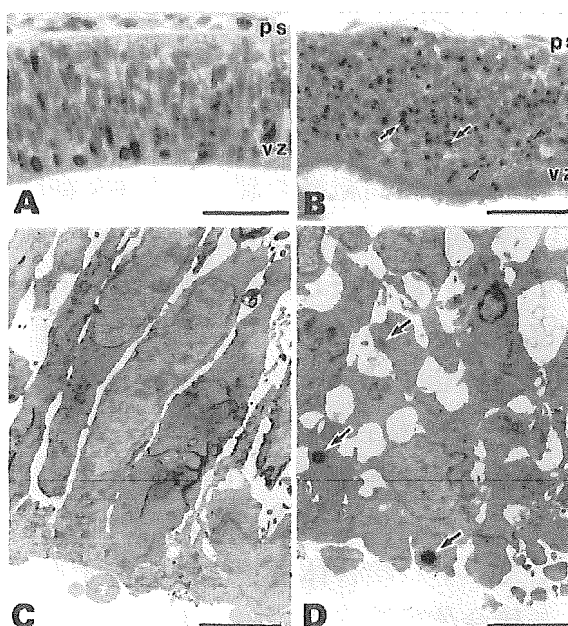


図 5. 胎生期 10.5 日目クロック-1 ノックアウトマウスの脳組織像(scale bars: A and B, 50 μm; C and D, 5 μm)

図 5 の脳皮質の細胞を電気顕微鏡を用いて観察した(14)。野生体(図 6A)に比べ、ホモ接合体(図 6B,C)では細胞内小器官ミトコンドリアが大きく膨らみ、内部の特有の切れ込み膜構造(クリステ)が維持されていないことがわかる。また図 6C の顆粒

(*)は破壊された膜構造を貪食処理しているライソゾームで、その周辺には形態異常のミトコンドリアが集まり、中にはミトコンドリア同士が融合しているものも観察された。今までにヒトミトコンドリア脳筋症患者(15)やチトクローム c オキシダーゼ活性の減少した変異ミトコンドリア DNA をもつサイブリッド(16)やミトコンドリア DNA 転写因子欠損マウス(17)のミトコンドリアに類似した所見が報告された。このような異常形態のミトコンドリアはミトコンドリア機能異常との関連が強く示唆される。

酵母、線虫で明らかにされたユビキノン合成とクロック-1 遺伝子との関係を明らかにするために、胎生期 9.5 日目のクロック-1 ノックアウトマウスからの脂溶成分を高速液体クロマトグラフィ(HPLC)により解析した(図 7A)(14)。野生型とヘテロ接合体に認められる 11.9 分のピークは標品ユビキノン(CoQ_9) に相当するが、ホモ接合体は同じピークはなく、11.0 分に別のピークが観察された。これらはユビキノン合成の前駆体、デメトオキシユビキノン(DMQ_9) に相当するものであることが明らかになった(後述)。また面白いことに野生型とヘテロ接合体はクロック-1 遺伝子

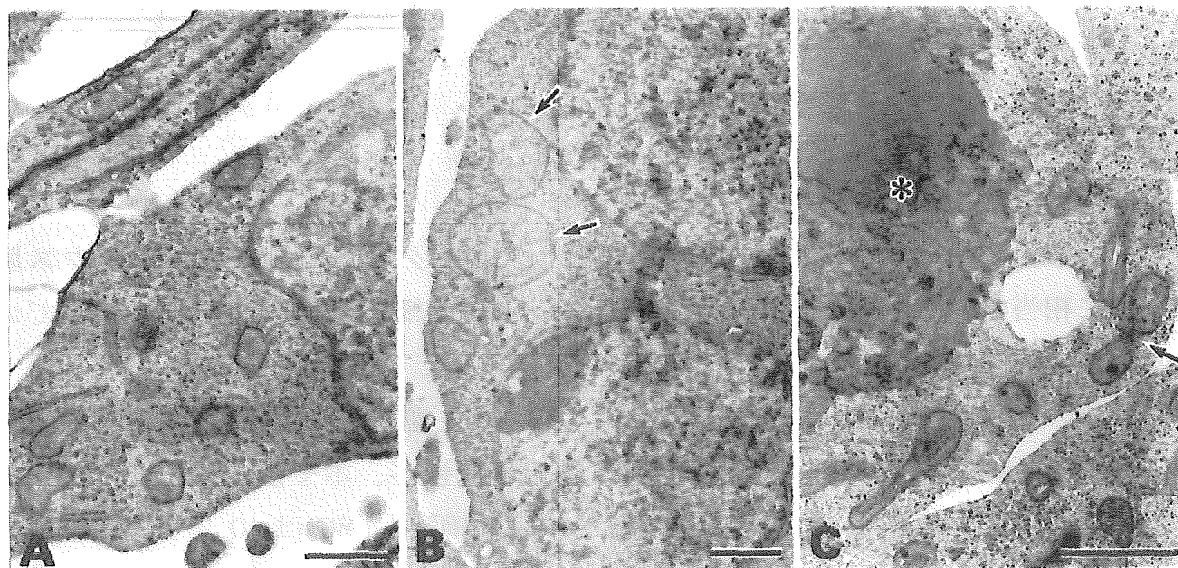


図 6. 胎生期 10.5 日目クロック-1 ノックアウトマウスの脳皮質の電子顕微鏡所見(scale bars, 1 μm)

クロック-1 遺伝子はユビキノン合成に必須である

我々はクロック-1 遺伝子の過剰発現モデルであるクロック-1 トランスジェニックマウスも作製している (図 1D)。ノックアウトマウスとトランスジェニックマウスを交配し、クロック-1 トランスジーンをクロック-1 ホモ接合体に発現させると、ホモ接合体は生育が可能となった。これをレスキューマウスと呼ぶ。レスキューマウスはメンデルの法則に従って出生し、明らかな外見上の異常を認めず、心臓、腎臓、肝臓でのクロック-1 遺伝子産物の発現を確認した (図 1C)。

その臓器からの抽出物を HPLC にて解析したところ(14)、腎臓では 19.8 分の野生型、標品ユビキノン (CoQ₉) のピークに加えて 17.9 分にもう 1 つピークが認められた(図 7B)。そのピークの分取物を質量分析したところ、デメトオキシユビキノン (DMQ₉) の質量に相当することが明らかになった (図 7C)。このような異なるユビキノン類の混在は脳や心臓にも認められたが、肝臓では DMQ₉ は検出限界以下であった。

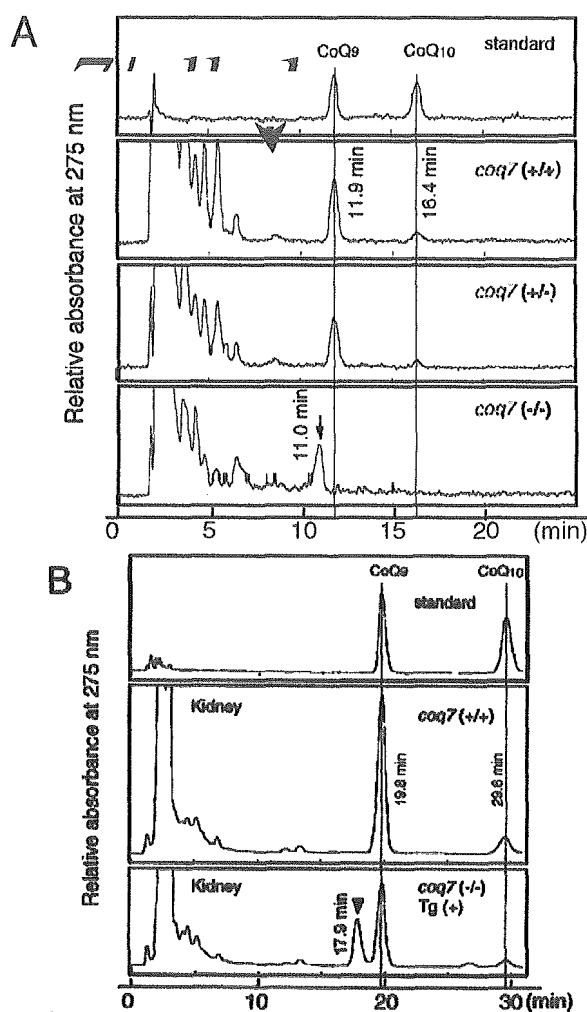
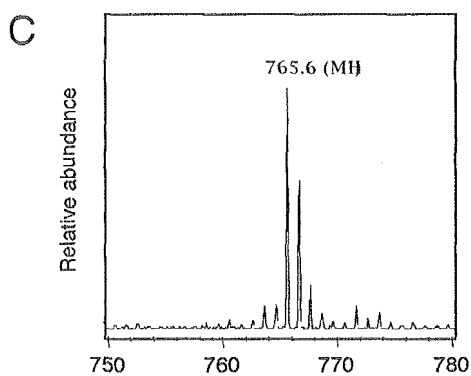


図 7. クロック-1 ノックアウトマウスのユビキノン解析

クロック-1 ノックアウトマウス胎児由来細胞は増殖能が欠損している

野生型マウス胎児由来の細胞(図 8A)に比べ、ホモ接合体マウス胎児由来の細胞(図 8C)は 10 %ウシ胎児血清 (FBS) を含んだ培養液中での増殖が緩やかであった (図 8E) (14)。しかし、血清を含まない培養液に条件を変更すると、ホモ接合体由来の細胞

は増殖が停止し、培養6日目にはほぼ死滅してしまった(図 8D,F)。一方、野生型の細胞数は少なくなるが



細胞は維持されている。(図 8B,F)。このことからホモ接合体由来の細胞増殖は培養液中のウシ胎児血清に依存していると考えられた。そこで血清中のユビキノンを含有を調べたところ、87 nM CoQ₁₀ が含まれていた。これはマウス血清中 CoQ₉ 濃度とほぼ同じである(18)。よってウシ胎児血清中のユビキノンのよってホモ接合体由来の細胞増殖がなされていることを示唆する結果となった。そして CoQ₁₀ によるホモ由来細胞の増殖は野生型のそれよりは緩徐である。この現象は線虫における *slowed behavior* 表現型と

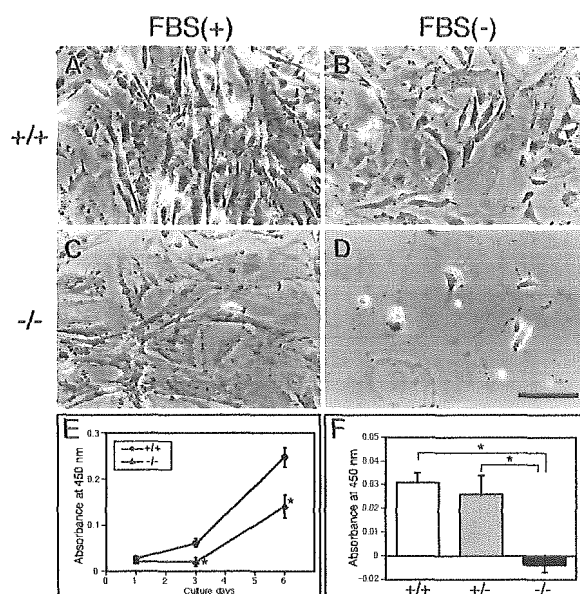


図 8. クロック-1 欠損細胞の増殖(scale bar, 100 μ m)

相似しており (長寿線虫の生育には餌の中の大腸菌のユビキノロン (CoQ₈) が必要であることが報告されている (19, 3))、このことから哺乳類細胞においても再現性のある表現型と考えられる。また、ヘテロ接合体マウスの細胞増殖が野生型とほぼ同じ (図 8F) であることより、クロック-1 遺伝子は半数でもユビキノロン合成には足りることが予想でき、我々のヘテロ接合体でリズム異常、ミトコンドリア機能異常を認めないデータに矛盾しない(未発表データ)。

ユビキノロンの生物学的役割

ユビキノロンのイソプレノイド基の長さは種によって異なる。このこと

がどのような生物学的意義を持つかは明らかでない。CoQ₁₀はCoQ₉と較べて電子受容能や活性酸素種発生能が異なることが報告されている(6)。またCoQ₁₀は生体内で脂質膜(20)やリポ蛋白(21)に包含されているという報告もあり、外的に与えたCoQ₁₀がどれだけミトコンドリアに運搬され電子受容体として利用されているかという問題がある。さらに外的に加えたユビキノンは活性酸素処理に作用し、結果としてミトコンドリアエネルギー産生の制御因子の redox state を変化させている可能性も考えられる(3)。

ユビキノン欠損と寿命延長

我々の実験結果より、マウスにおけるクロック-1 (*coq7/clk-1*) 遺伝子の完全欠損は胎児の子宮内死亡に到ることが明らかになったが、*clk-1* 変異線虫はなぜ死亡せずに長寿を呈するのであろうか？重要な報告が2つある。1つは発生期にユビキノンが欠損した食餌を与えると *clk-1* 変異線虫は死亡してしまうこと(19, 3)。もう1つは正常の線虫や成虫以降の *clk-1* 変異線虫にユビキノンが欠損した食餌を与えると通常のユビキノンの含まれた食餌の場合より寿命が延長することである(22)。これらの事実からユビキノンの発生と寿命規定への役割

が予想される。またミトコンドリアにおける電子伝達系でユビキノンを含む部位は活性酸素種のスーパーオキシドラジカル(O₂⁻)の主要発生部位であることが知られている(7) (図2)。このことから、*clk-1* 変異線虫ではユビキノンからデメトオキシユビキノンに電子受容体に変化し、活性酸素種の産生が低下している可能性が考えられる(22)。さらにマウスと異なり、食餌中のユビキノン(CoQ₈)が発生、成長に最低限必要な量だけ利用されており、副作用としての活性酸素種も少量に留まっているという解釈が可能である。また、食餌中のユビキノンは大腸菌由来であり、異種のユビキノンは活性酸素種の発生量が少量である可能性もある。そして、ユビキノンそのものが活性酸素種を処理もしくは α -トコフェロキシラジカルといった活性酸素処理物質の共役因子として働く(23)などの可能性も考えられる。

今後の展望

今回我々がトランスジーンによりレスキューしたノックアウトマウスは長寿命変異体である線虫 *clk-1* の哺乳類モデルとなる可能性が期待される。これらのマウスのユビキノンの構成、量ならびにミトコンドリア機能を検討する。さらに線虫変異体に認めら

れるような、リズム異常が認められるか否かを検討する。そしてストレス耐性や寿命を検討することで、ミトコンドリア機能と生体リズム（ウルトラディアンリズム）の個体寿命への関与を明らかにしていきたい。

参考文献

1. Wong, A., Boutis, P., and Hekimi, S. (1995) Mutations in the *clk-1* gene of *Caenorhabditis elegans* affect developmental and behavioral timing. *Genetics* **139**, 1247-1259.
2. Ewbank, J. J., Barnes, T. M., Lakowski, B., Lussier, M., Bussey, H., and Hekimi, S. (1997) Structural and functional conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene *clk-1*. *Science* **275**, 980-983.
3. Jonassen, T., Larsen, P. L., and Clarke, C. F. (2001) A dietary source of coenzyme Q is essential for growth of long-lived *Caenorhabditis elegans* *clk-1* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 421-426.
4. Marbois, B. N., and Clarke, C. F. (1996) The *COQ7* gene encodes a protein in *saccharomyces cerevisiae* necessary for ubiquinone biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **271**, 2995-3004.
5. Miyadera, H., Amino, H., Hiraishi, A., Taka, H., Murayama, K., Miyoshi, H., Sakamoto, K., Ishii, N., Hekimi, S., and Kita, K. (2001) Altered quinone biosynthesis in the long-lived *clk-1* mutants of *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **276**, 7713-7716.
6. Lass, A., Agarwal, S., and Sohal, R. S. (1997) Mitochondrial ubiquinone homologues, superoxide radical generation, and longevity in different mammalian species. *J Biol Chem* **272**, 19199-19204.
7. Turrens, J. F., Alexandre, A., and Lehninger, A. L. (1985) Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **237**, 408-414.
8. Sohal, R. S., and Weindruch, R. (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* **273**, 59-63.
9. Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in

- mammalian organs. *Physiol Rev* **59**, 527-605.
10. Felkai, S., Ewbank, J. J., Lemieux, J., Labbe, J. C., Brown, G. G., and Hekimi, S. (1999) CLK-1 controls respiration, behavior and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* **18**, 1783-1792.
 11. Tanaka, M., Gong, J., Zhang, J., Yamada, Y., Borgeld, H. J., and Yagi, K. (2000) Mitochondrial genotype associated with longevity and its inhibitory effect on mutagenesis. *Mech Ageing Dev* **116**, 65-76.
 12. Asaumi, 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.
 13. Takahashi, M., Asaumi, S., Honda, S., Suzuki, Y., Nakai, D., Kuroyanagi, H., Shimizu, T., Honda, Y., and Shirasawa, T. (2001) Mouse *coq7/clk-1* Orthologue Rescued Slowed Rhythmic Behavior and Extended Life Span of *clk-1* Longevity Mutant in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* **286**, 534-540.
 14. Nakai, D., Yuasa, S., Takahashi, M., Shimizu, T., Asaumi, S., Isono, K., Takao, T., Suzuki, Y., Kuroyanagi, H., Hirokawa, K., Koseki, H., and Shirasawa, T. (2001) Mouse homologue of *coq7/clk-1*, longevity gene in *Caenorhabditis elegans*, is essential for coenzyme Q synthesis, maintenance of mitochondrial integrity, and neurogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 463-471.
 15. Perez-Atayde, A. R., Fox, V., Teitelbaum, J. E., Anthony, D. A., Fadic, R., Kalsner, L., Rivkin, M., Johns, D. R., and Cox, G. F. (1998) Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy: diagnosis by rectal biopsy. *Am J Surg Pathol* **22**, 1141-1147.
 16. Nakada, K., Inoue, K., Ono, T., Isobe, K., Ogura, A., Goto, Y. I., Nonaka, I., and Hayashi, J. I. (2001) Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA.

- Nat Med* **7**, 934-940.
17. Larsson, N. G., Wang, J., Wilhelmsson, H., Oldfors, A., Rustin, P., Lewandoski, M., Barsh, G. S., and Clayton, D. A. (1998) Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* **18**, 231-236.
 18. Lass, A., Forster, M. J., and Sohal, R. S. (1999) Effects of coenzyme Q10 and alpha-tocopherol administration on their tissue levels in the mouse: elevation of mitochondrial alpha-tocopherol by coenzyme Q10. *Free Radic Biol Med* **26**, 1375-1382.
 19. Hihi, A. K., Gao, Y., and Hekimi, S. (2002) Ubiquinone is necessary for *Caenorhabditis elegans* development at mitochondrial and non-mitochondrial sites. *J Biol Chem* **277**, 2202-2206.
 20. Kalen, A., Norling, B., Appelkvist, E. L., and Dallner, G. (1987) Ubiquinone biosynthesis by the microsomal fraction from rat liver. *Biochim Biophys Acta* **926**, 70-78.
 21. Tribble, D. L., van den Berg, J. J., Motchnik, P. A., Ames, B. N., Lewis, D. M., Chait, A., and Krauss, R. M. (1994) Oxidative susceptibility of low density lipoprotein subfractions is related to their ubiquinol-10 and alpha-tocopherol content. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1183-1187.
 22. Larsen, P. L., and Clarke, C. F. (2002) Extension of life-span in *Caenorhabditis elegans* by a diet lacking coenzyme Q. *Science* **295**, 120-123.
 23. Lass, A., and Sohal, R. S. (2000) Effect of coenzyme Q(10) and alpha-tocopherol content of mitochondria on the production of superoxide anion radicals. *Faseb J* **14**, 87-94.

Mn-SOD による寿命制御機構

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

研究要旨

線虫の Mn-SOD アイソフォーム欠損変異体のうち *sod-2* 欠損変異体および *sod-2; sod-3* 二重欠損変異体では大気下での成長速度と産卵数が低下したが、低濃度酸素下で回復した。また *sod-2* 欠損変異体は酸化ストレス感受性を示し、*sod-2* は酸化ストレスの防御の機能を持つことが示唆された。*sod-2; sod-3* 二重欠損変異体はさらに強い酸化ストレス感受性を示した。更に、長寿命変異体 *daf-2* (インスリン受容体ファミリー) と *sod-2* 欠損変異体および *sod-3* 欠損変異体、*sod-2; sod-3* 二重欠損変異体との二重および三重変異体を作製した。*daf-2* と *sod-2* の二重変異体は *sod-2* 変異体に比べて酸化ストレス感受性が弱まった。一方 *daf-2* と *sod-2; sod-3* 三重欠損変異体は強い酸化ストレス感受性を示した。*daf-2* 変異は *sod-3* 遺伝子発現を増大させることから、この結果は *daf-2; sod-2* 二重変異体では *daf-2* 変異により *sod-3* 発現が増大して *sod-2* 欠損の酸化ストレス感受性が弱まり、*daf-2; sod-2; sod-3* 三重変異体では *sod-2* と *sod-3* 両者の欠損のため補完できずに酸化ストレス感受性のままとなったことを示している。

研究目的

活性酸素が生体構成成分に酸化傷害を与え老化を引き起こすとする仮説が提唱されている。しかし実際にどのような機構で活性酸素が老化速度や寿命の決定に関与するかについては十分解明されていない。Mn-スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) は活性酸素の主要な生成場所のミト

コンドリアに局在して酸化ストレスを防御するなどの重要な役割を持つと考えられている。私達は線虫の長寿命遺伝子変異体で Mn-SOD の発現が変動することを見出した。そこで本研究では Mn-SOD が老化速度・寿命の調節にいかに関与するかを明らかにし、活性酸素の老化への関与の機構を解明する。

研究方法

線虫 *Caenorhabditis elegans* には 2 つの Mn-SOD アイソフォーム (*sod-2*, *sod-3*) が存在する。変異剤と UV を用いてこれらの遺伝子欠損変異体および両者の二重変異体を作製した。それらの表現形質、特に成長速度、酸化ストレス感受性、老化速度および寿命を測定した。また低濃度酸素チェンバーで飼育して酸化ストレスを低下させたときの成長速度を測定した。それぞれの遺伝子欠損の Mn-SOD 発現への影響を調べた。さらに様々な長寿命変異体と Mn-SOD 欠損変異体との二重変異体を作製し、酸化ストレス感受性、老化速度および寿命を測定し、長寿命変異体の長寿の機構に Mn-SOD が関与する可能性を確かめた。

結果

線虫の Mn-SOD アイソフォーム欠損変異体のうち *sod-2* 欠損変異体および *sod-2; sod-3* 二重欠損変異体では大気下での成長速度と産卵数が低下したが、低濃度酸素下で回復した。また *sod-2* 欠損変異体は酸化ストレス感受性を示し、*sod-2* は酸化ストレスの防御の機能を持つことが示唆された。*sod-2; sod-3* 二重欠損変異体はさらに強い酸化ストレス感受性を示した。

sod-2; sod-3 二重欠損変異体において *sod-3* 遺伝子を導入し過剰発現させると酸化ストレス感受性が弱まった。これらの結果は、*sod-2* と *sod-3* の両者が協同して酸化ストレスを防御していることを示唆している。*sod-2* 欠損により *sod-3* の遺伝子発現が増大することから、*sod-2* 遺伝子産物が不足すると *sod-3* の遺伝子発現の増大により補完することが示された。*sod-2* 欠損変異体および *sod-3* 欠損変異体、*sod-2; sod-3* 二重欠損変異体の寿命は野生体に比べて短縮した。長寿命変異体 *daf-2* (インスリン受容体ファミリー) と *sod-2* 欠損変異体および *sod-3* 欠損変異体、*sod-2; sod-3* 二重欠損変異体との二重および三重変異体を作製した。*daf-2* と *sod-2* の二重変異体は *sod-2* 変異体に比べて酸化ストレス感受性が弱まった。一方 *daf-2* と *sod-2; sod-3* 三重欠損変異体は強い酸化ストレス感受性を示した。*daf-2* 変異は *sod-3* 遺伝子発現を増大させることから、この結果は *daf-2; sod-2* 二重変異体では *daf-2* 変異により *sod-3* 発現が増大して *sod-2* 欠損の酸化ストレス感受性が弱まり、*daf-2; sod-2; sod-3* 三重変異体では *sod-2* と *sod-3* 両者の欠損のため補完できずに酸化ストレス感受性のままとったことを示している。

考察

線虫の Mn-SOD アイソフォームのうち *sod-2* は、欠損変異体が酸化ストレス感受性を示すことから、主要な酸化ストレス防御機能を持つことが示唆された。*sod-2*; *sod-3* 二重欠損変異体はさらに強い酸化ストレス感受性を示したことから *sod-2* と *sod-3* 両者が協同して酸化ストレスを防御していると考えられた。これらの欠損変異体が短寿命であることから、Mn-SOD は酸化ストレス防御を通して寿命の決定に役割を持つことが示された。一方 *daf-2* 長寿命変異により *sod-3* 発現が増大するが、*daf-2* 変異で *sod-2* 欠損の酸化ストレス感受性が弱まり、*sod-2* と *sod-3* 両者の欠損では強い酸化ストレス感受性を示すことから、*daf-2* 変異は *sod-3* 発現を増大させることにより、二つの Mn-SOD の酸化ストレス防御の協同作業を増強すると考察された。

E. 結論

線虫のミトコンドリアにおいて二つの Mn-SOD アイソフォームが協同作業により酸化ストレスの防御にあたっており、両者は寿命の決定に重要な役割を持つことを示した。*daf-2* 長寿命変異は *sod-3* 発現を増大させることにより、この協同作業を増強することを示した。

研究発表

1. 論文発表

(1) Honda, Y and Honda, S. : Increasing Healthy Life Span: Conventional Measures and Slowing the Innate Aging Process: Oxidative Stress and Life Span Determination in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. Annals New York Academy Science, 959, <http://www.annalsnyas.org/>, 2002

(2) Honda, S. and Honda, Y. : Life span extentions associated with upregulation of gene expression of antioxidant enzymes in *Caenorhabditis elegans*; Studies of mutation in the *age-1*, PI3 kinase homologue and short-term exposure to hyperoxia. J. Amer. Aging Assoc. (Age), 24 (3), in press.

(3) Takahashi M, Asaumi S, Honda S, Suzuki Y, Nakai D, Kuroyanagi H, Shimizu T, Honda Y, and Shirasawa T. : Mouse *coq7/clk-1* orthologue rescued slowed rhythmic behavior and extended life span of *clk-1* longevity mutant in *Caenorhabditis elegans*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 286: 534-540, 2001

(4) 本田修二、本田陽子：線虫のゲノムに書かれた寿命の設計図。Molecular Medicine 2002. in press

Angeles, 2001 6. 22-26

2.学会発表

(1) Honda, Y. and Honda, S. : The insulin-like signaling pathway for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. 9th Congress of the International Association of Biomedical Gerontology (Symposium). Vancouver, 2001. 6. 27-30

(2) Honda, Y. and Honda, S. : Effects of the gene disruption of two Mn-SOD isoforms on oxidative stress sensitivity and life span in *Caenorhabditis elegans*. The 13th International *C. elegans* Meeting, Aging and Stress Session, Los

(3) 森尾秀徳、本田陽子、森本宏一、清水孝彦、古川清、本田修二、白澤卓二 : EXT 遺伝子のホモログ、*rib-2* 遺伝子の欠損線虫の作製及び機能解析. 第24回日本分子生物学会年会、横浜、2001. 12. 9~12

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 なし

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学教授

研究要旨

Mel18 を含むタンパク複合体の候補として、今までに 15 個の遺伝子を酵母ツーハイブリッド法とホモロジースクリーニングによって同定した。現在までに、Mel18 と、そのインターラクターである Spliceosome-associated protein 155 (SAP155)、Ring1B、Mph2、また、Mph2 のインターラクターである Scmh1 について遺伝子欠損マウスの作出に成功し、それらの表現型の一部を明らかにした。ポリコーム群タンパクが Hox 複合体上にどのように結合しているのかを、染色体免疫沈降法を用いて解析し、マウス 11.5 日胚において HoxB8 遺伝子座近傍の Ring1B と Mph1 の結合領域を明らかにした。

A. 研究目的

本研究においては、哺乳類ポリコーム群がどのように核内の機能ドメインを構成し、どのように標的遺伝子座に作用するのかを明らかにすることを目的とする。そのために、哺乳類ポリコーム群のひとつである Mel18 を含むタンパク複合体の構成を明らかにし、個々の構成タンパクの機能を遺伝子欠損マウスを作製して明らかにする。また、哺乳類 Hox 複合体や GATA3 遺伝子座に、どのように哺乳類ポリコーム群タンパクが結合するのか、また、発生過程やリンパ球分化過程における結合パターンの変化を明らかにする。

B. 研究目標

Mel18 と相互作用するタンパクである Ring1B、Mph2、155kD Spliceosome associated protein (SAP155) と Mph2 結合タンパクである Scmh1 の個体発生過程や細胞増殖過程における機能を明らかにする。哺乳類 Hox 複合体への哺乳類ポリコーム群タンパクの結合パターンを明らかにする。

C. 結果と考察

Mel18 を含むタンパク複合体の候補として、今までに 15 個の遺伝子を酵母ツーハイブリッド法とホモロジースクリーニングによって同定した。現在までに、Mel18 と、そのインタ

ーラクターである Spliceosome-associated protein 155 (SAP155)、Ring1B、Mph 2、また、Mph 2 のインターラクターである Scmh 1 について遺伝子欠損マウスの作出に成功し、それらの表現型の一部を明らかにした。ポリコーム群タンパクが Hox 複合体上にもどのように結合しているのかを、染色体免疫沈降法を用いて解析し、マウス 11.5 日胚において HoxB8 遺伝子座近傍の Ring1B と Mph1 の結合領域を明らかにした。

(い) SAP155 ノックアウトマウス；ホモ接合体は、コンパクション後に致死となる。ヘテロ接合体においては、ホメオティック変異が中軸骨格系において観察された。また、その変異は、Mel18 変異によって強調されることが明らかになった。SAP155 と Mel18 および Ring1B への直接的な結合についても明らかにした。

(ろ) Ring1B ノックアウトマウス；hypomorph アリルを作製し、そこではホメオティック変異が中軸骨格系において観察され、その変異は、Mel18 変異によって強調されることが明らかになった。

(は) Mph2 ノックアウトマウス；ホモ接合体は、ホメオティック変異が中軸骨格系において観察された。Rae28/Mph1 との二重ミュータントを用いた解析から、Mph2 と Rae28/Mph1 の機能は、部分的にリダンダントである可能性が示された。

(に) Scmh 1 ノックアウトマウス；ホモ接合体においても、中軸骨格系にはホメオティック変異は全く観察されなかった。精巣において顕著な

細胞死の亢進が観察された。外来性の Scmh 1 タンパクは、細胞質に主に分配されることが示され、他のポリコームタンパクとは異なる性質を持つことが示されている。核内への分配には、mbt リピートが寄与している。

(ほ) ポリコーム群タンパクの Hox 複合体上への結合；マウス 12 日胚の Hoxb7 から Hoxb9 遺伝子座に至る領域における Ring1B と Mph1 の結合領域を解析したところ、それぞれの Hox 遺伝子のプロモーター領域に強い結合を認めた。おもしろいことに、それぞれの Hox 遺伝子の発現がおこっている胎児領域では、Mph1 は結合していたが Ring1B は結合していなかった。Hox 遺伝子の発現がおこっていない胎児領域では、両方とも結合していた。すなわち、Ring1B を含んでいるタンパク複合体が、転写抑制に寄与することが示唆された。

ポリコーム群複合体の機能的な多様性が示されつつあるが、他の核内ドメインとの機能的相関については、まだほとんど理解できていないと言わざるをえない。スプライセオソームについても、その遺伝的相互作用の本体について新たに検索するシステムの構築が必要である。また、ポリコーム結合領域を系統的に検索するためのマイクロアレイなどを構築する必要がある。

D. 発表

Atsuta, T., Fujimura, S., Moriya, H., Vidal, M., Akasaka, T., Koseki, H. (2001) Production of Monoclonal Antibodies against Mammalian Ring 1B Proteins. *Hybridoma* 20:43-46.

- Sudo, H., Tonegawa, A., Arase, Y., Aoyama, H., Mizutani-Koseki, Y., Moriya, H., Wilting, J., Christ, B., and Koseki, H. (2001) Inductive signals from the somatopleure mediated by bone morphogenetic proteins are essential for the formation of the sternal component of avian ribs. **Dev. Biol.** 232:284-300.
- Isono, K., Abe, K., Tomaru, Y., Okazaki, Y., Hayashizaki, Y. and Koseki, H. (2001) Molecular cloning, genetic mapping, and expression of the mouse Sf3b1 (SAP155) gene for the U2 snRNP component of spliceosome. **Mammalian Genome** 12:192-198.
- Koizumi, K., Nakajima, M., Yuasa, S., Saga, Y., Sakai, T., Kuriyama, T., Shirasawa, T. and Koseki, H. (2001) The role of Presenilin1 during somite segmentation. **Development** 128:1391-1402
- Fukamachi, H., Fukuda, K., Suzuki, M., Furumoto, T., Ichinose, M., Shimizu, S., Tsuchiya, S., Horie, S., Shiokawa, K., Suzuki, Y., Saito, Y., Watanabe, K., Taniguchi, M., and Koseki, H. (2001) Mesenchymal transcription factor FKH6 controls gastric epithelial development and differentiation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 280:1069-1076.
- Akasaka, T., van Lohuizen, M., van der Lugt, N., Mizutani-Koseki, Y., Kanno, M., Taniguchi, M., Vidal, M., Alkema, M., Berns, A. and Koseki, H. (2001) Mice doubly deficient for the Polycomb-Group genes *Mel18* and *Bmi1* reveal synergy and requirement for maintenance but not initiation of Hox gene expression. **Development** 128:1587-1597.
- Yamamoto, K., Fujii, R., Toyofuku, Y., Saito, T., Koseki, H., Hsu, V.W. and Aoe, T. (2001) The KDEL receptor mediates a retrieval mechanism that contributes to quality control at the endoplasmic reticulum. **EMBO J.** 20: 3082-3091.
- Ogita, J., Isogai, E., Sudo, H., Sakiyama, S., Nakagawara, A. and Koseki, H. (2001) The expression of chicken *Dan*. **Mech. Dev.** 109:363-5.
- Kimura, M., Koseki, Y., Yamashita, M., Watanabe, N., Shimizu, C., Katsumoto, T., Kitamura, T., Taniguchi, M., Koseki, H. and Nakayama, T. (2001) Regulation of Th2 cell differentiation by *mel-18*, a mammalian polycomb group gene. **Immunity** 15:275-87.
- Nakai D, Yuasa S, Takahashi M, Shimizu T, Asaumi S, Isono K, Takao T, Suzuki Y, Kuroyanagi H, Hirokawa K, Koseki H, Shirasawa T. (2001) Mouse homologue of *coq7/clk-1*, longevity gene in *Caenorhabditis elegans*, is essential for coenzyme Q synthesis, maintenance of mitochondrial integrity, and neurogenesis. **Biochem Biophys Res Com.** 289:463-71.
- Nakayama T, Kasprowicz DJ, Yamashita M, Schubert LA, Gillard G, Kimura M, Didierlaurent A, Koseki H, Ziegler SF. (2001) The generation of mature, single-positive thymocytes in vivo is dysregulated by CD69 blockade or overexpression. **J. Immunol.** 168:87-94.
- (4) 特許出願等
形質転換動物及びスクリーニング方法 (特願 2001-82181)