

厚生労働科学研究補助金（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 15 年 3 月

主任研究者 白澤卓二

（東京都老人総合研究所 分子老化研究グループ グループリーダー）

厚生労働科学研究補助金（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

インスリンシグナルの酸化ストレスと寿命制御機構			
分担研究者	馬場智規、清水孝彦、白澤卓二		
	東京都老人総合研究所 分子老化研究グループ		2
臓器特異的 MnSOD 欠損マウスの解析			
分担研究者	池上隆司、清水孝彦、白澤卓二		
	東京都老人総合研究所 分子老化研究グループ		8
クロック-1 遺伝子の生物学的機能			
分担研究者	高橋真由美、中井大輔、清水孝彦、白澤卓二		
	東京都老人総合研究所 分子老化研究グループ		15
Mn-SOD による寿命制御機構			
分担研究者	本田修二		
	東京都老人総合研究所・老化レドックス制御研究グループ・主任研究員		20
活性酸素による DNA 損傷の修復機構とその欠損の老化への影響に関する研究			
分担研究者	安井 明	東北大学加齢医学研究所教授	23
ポリコーム群タンパク質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物学教授	28
長寿遺伝子探索のための遺伝子多型解析応用の検討			
分担研究者	村松正明	東京医科歯科大学難治疾患研究所教授	32

インスリンシグナルの酸化ストレスと寿命制御機構

分担研究者 馬場智規 清水孝彦 白澤卓二
東京都老人総合研究所分子老化研究グループ

研究要旨

線虫の長寿変異体である *daf-2* の遺伝的および分子生物学的解析の結果、インスリン様受容体遺伝子に長寿命遺伝子変異が発見された。その後、線虫やショウジョウバエでインスリンシグナル伝達の異常により、酸化ストレス耐性を獲得し、寿命が延長する変異体が相次いで報告された。本研究で我々は、*daf-2* 線虫の長寿命変異と相同の変異をマウスインスリン受容体遺伝子に導入したノックインマウス（インスリン受容体変異マウス）を作製した。インスリン受容体変異マウスは高酸素負荷、パラコート投与、およびブレオマイシン投与のいずれの酸化ストレスに対しても強い耐性を示した。この結果は哺乳類（マウス）においても、インスリンシグナルの異常が酸化ストレス耐性を高めることを示すもので、線虫から哺乳類までの高等多細胞生物に保存された普遍的シグナルの存在を明らかにした。

はじめに

線虫の長寿変異体である *daf-2* の遺伝的および分子生物学的解析の結果、インスリン様受容体遺伝子で長寿命遺伝子変異が発見された¹⁾。この解析から、*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、および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可能性が示唆された。線虫やショウジョウバエではインスリン様シグナル伝達の異常により、老化の一因である活性酸素等を無毒化する MnSOD 等の発現が増大し、酸化ストレス耐性を獲得し寿命が延長することが示唆されている^{2) 3)}。本研究の目的はインスリン様シグナル伝達の異常が哺乳類においても酸化ストレス耐性能を獲得し、寿命が延長するのかを検討することである。

これまでに我々は、線虫の長寿命変異と相同の変異を持つノックインマウスの作製に成功した⁴⁾。このマウスはインスリン受容体蛋白 1195 番目のプロリン残基がロイシン残基に置換して

いる。インスリン受容体変異マウスは、ホモ接合体にすると生後約 48 時間以内に糖尿病性ケトアシドーシスで死亡することが判明し、インスリン受容体欠損ホモ接合体マウスと同じ表現形を示した。ヘテロ接合体マウスは、インスリン抵抗性を示すが糖尿病は発生せず、いわば前糖尿病状態のまま健康に生存することがこれまでの実験結果から示唆されている。

対象と方法

高酸素負荷

8週、12週、16週、9ヶ月齢の雄マウス（各 10 匹）を 80%酸素濃度チャンバーにて飼育し、その生存率と加齢による影響を比較検討した。また、高酸素負荷による Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) 中の細胞浸潤およびタンパク量の変化を以下の方法で測定した。マウスをエーテル麻酔し、正中気管切開後チューブを挿入し、0.6ml の PBS を注入後、回収した。これを計 3 回行い回収液量が 90%以上の

ものを使用した。回収した BALF を 300G で遠心し、全細胞数およびマクロファージ数、リンパ球数、好中球数を測定した。全細胞数はヘモサイトメーターを使用してカウントした。ギムザ染色後それぞれマクロファージ数、リンパ球数、好中球数をカウント（計 400 細胞以上）し全細胞数に占めるパーセント値から細胞数を算定した。上清はさらに 15000 回転で遠心した後、肺障害、血管透過性の指標としてタンパク量をローリー法にて定量した。また、BAL 施行後の肺は -80°C で保存し RT-PCR を行う試料とした。

パラコート投与

15 週齢雌マウス(各 10 匹)にパラコート 70mg/kg を腹腔内注射し、その生存率を検討した。2 時間毎に死亡の有無を確かめ、計 120 時間観察した。

ブレオマイシン投与

マウスの尾静脈より、ブレオマイシ

ン 50mg/kg または 100mg/kg 静脈注射した。コントロール群には生理的食塩水を投与した。投与は初回のみとし、3 週間後に肺の病理学的検討を行い点数化した。

結果

高酸素負荷

酸化ストレスは老化の原因の一つと考えられており、線虫やショウジョウバエでは酸化ストレス耐性は寿命延長に関連すると考えられている⁵⁾。そのメカニズムはスーパーオキシドを無毒化する酵素である MnSOD 活性の上昇で説明されている²⁾。インスリン受容体変異マウスでもインスリンシグナル伝達の異常により、抗酸化酵素の発現が増大し酸化ストレス能を獲得している可能性がある。80%酸素濃度チャンバー内での生存率を比較したところ、インスリン受容体変異マウスは野生型マウスより有意に生存の延長を示した(図 1)。

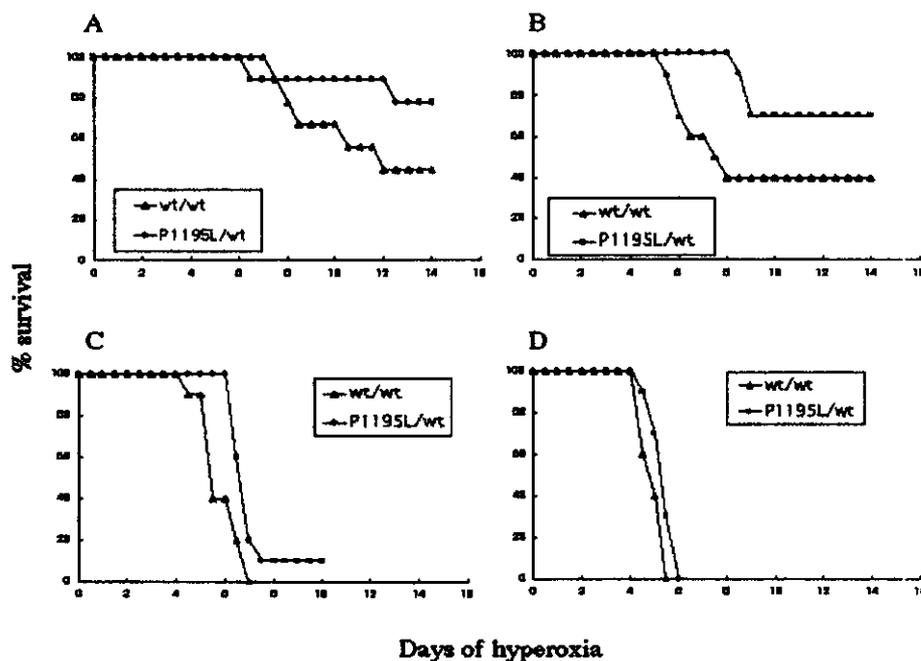


図 1 80%酸素条件下での生存曲線 (P1195L/wt (■) : インスリン受容体変異マウス、wt/wt (◆) : 野生型マウス) A: 8週齢 B: 12週齢 C: 16週齢 D: 9か月齢
インスリン受容体変異マウスは有意に生存が延長した。

8週齢マウスではインスリン受容体変異マウスは6日目に1匹死亡するものの14日目まで80%が生存していた。野生型マウスは7日目より死にはじめ、その後急激に死亡し14日目までに40%の生存に留まった(図1A)。12週齢では、野生型マウスが5日目より死にはじめるのに対し、インスリン受容体変異マウスは8日まで死亡しなかった。最終的にはインスリン受容体変異マウスは70%生存し野生型マウスは40%が生存していた(図1B)。16週齢になると野生型マウスは4日目より死にはじめ、7日目に全て死亡した。インスリン受容体変異は7日目から死にはじめるが8日目以降も10%が生存していた(図1C)。9ヶ月齢では生存率の差は非常に少なくなり両者ともに4日目よ

り死にはじめる6日目までに全て死亡するが、5日目の時点での生存率はインスリン受容体変異マウスで70%、野生型マウスで40%となっていた(図1D)。以上よりインスリン受容体変異マウスは高酸素負荷による酸化ストレスに対して耐性を獲得していることが判明した。この耐性能は週齢によって差があり、若いインスリン受容体変異マウスほど高酸素負荷に対する耐性が高い傾向を示した。

次に高酸素負荷による肺障害を調べるために、12週齢マウスの野生型マウスが死にはじめる酸素負荷5日までのBALを行った。全細胞数は、酸素負荷後増加傾向にあるがコントロール群との間に有意差を認めなかった(図2A)。

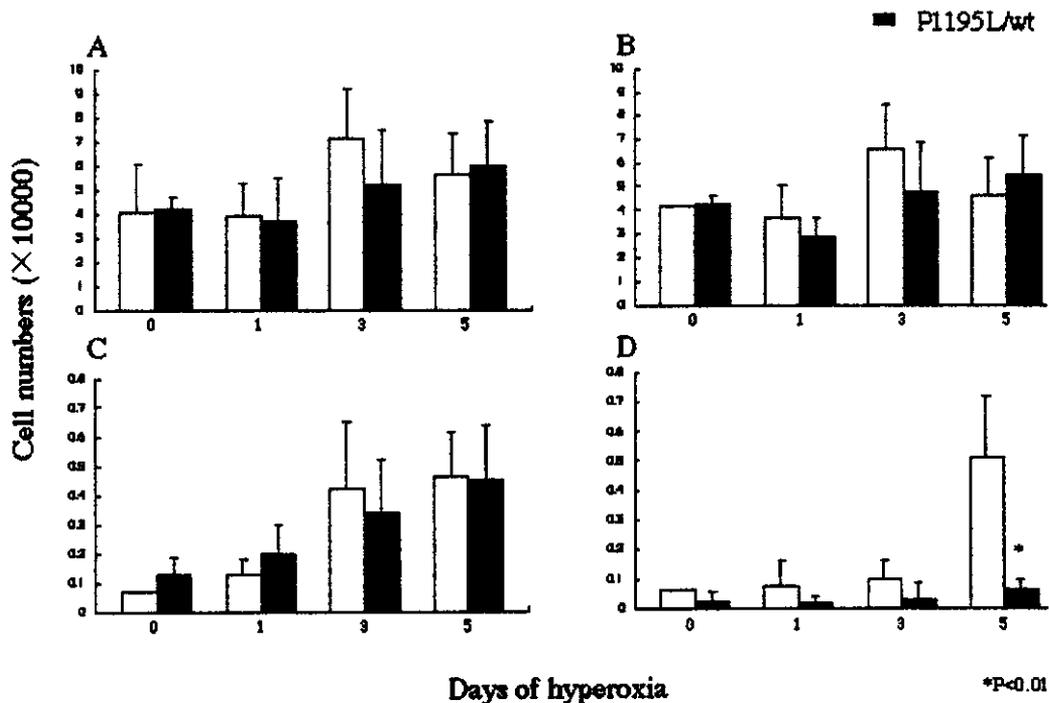


図2 80%酸素負荷によるBALFの細胞数の変化 (P1195L/wt: 黒カラム、wt/wt: 白カラム) A: 全細胞数 B: マクロファージ C: リンパ球 D: 好中球

酸素負荷により細胞数は増加傾向にあるが、インリン受容体変異マウスで好中球の増加は有意に抑制していた。細胞分画ではマクロファージ数、リンパ球数において有意差はなかった(図 2B, C)。一方、好中球はコントロール群で酸素負荷 5 日目に急激な増加を認めたが、インスリン受容体変異マウスではほぼ定常状態時と変わらなかった(図 2D)。BALF 中のタンパク量は酸素負荷 1 日目より 3 日まで両群ともに増加した。コントロール群で酸素負荷 5 日目に急激なタンパク量の増加を認めたが、インスリン受容体変異マウスでは増加が緩やかであった(図 3)。

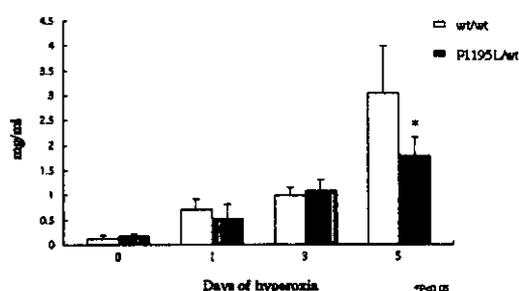


図 3 80%酸素負荷によるBALFのタンパク量の変化。インリン受容体変異マウスは酸素負荷後 5 日目に有意にタンパク量を抑制していた。

このタンパク質の本体は、ほとんどがアルブミンであることから、インスリン受容体変異マウスでは血管透過性の亢進を抑制していることが示唆された。

MnSOD の発現を解析するためにBAL 処理後の肺組織から mRNA を抽出し cDNA を合成した。MnSOD と GAPDH に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。その結果、定常状態ではインスリン受容体変異マウスで MnSOD の発現が有意に亢進していた(図 4)。

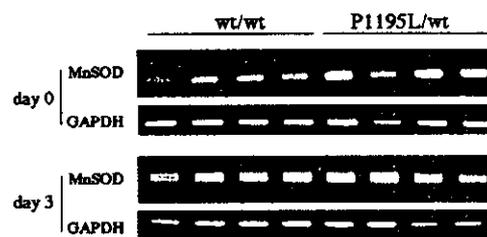


図 4 RT-PCR

各 4 匹ずつ、肺をサンプルに RT-PCR を施行した。インスリン受容体変異マウスで MnSOD の発現亢進が持続していた。

酸素負荷 3 日目においてインスリン受容体変異マウスの MnSOD 発現の亢進は持続していた。一方野生型マウス MnSOD の発現亢進も認められた。RT-PCR の解析から、インスリン受容体変異マウスの肺では、MnSOD の発現が恒常的に高く持続され、その発現は高酸素負荷によっても保たれていることが示された。

パラコート投与実験

70mg/kg を腹腔内投与したマウスを 2 時間おきに観察した。その結果、48 時間目より死亡するマウスが観察された。投与後 4 日目に野生型マウスは急激に死亡するがインスリン受容体変異マウスは生存していた。以上より、インスリン受容体変異マウスは、高酸素負荷による酸化ストレス耐性に加えてパラコートに対する酸化ストレス耐性能も有していることが判明した(図 5)。

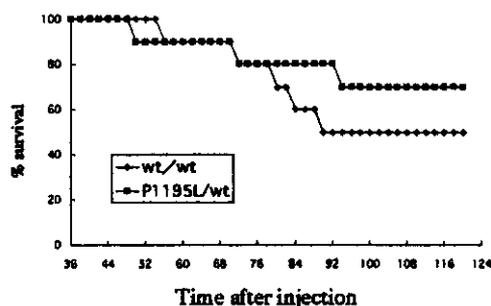


図5 パラコート投与による生存曲線
 パラコート (70mg/kg) を腹腔内投与し生存を観察した。80%酸素負荷と同様にインスリン受容体変異マウスで生存が延長した。

ブレオマイシン投与実験

ブレオマイシンをマウスの尾静脈より投与し、3週間後に肺病変を観察した。ブレオマイシン 50mg/kg 投与群では野生型マウスに対してインスリン受容体変異マウスで肺の線維化は抑えられる傾向にあった。ブレオマイシン 100mg/kg 投与群で有意差を認め、インスリン受容体変異マウスでは野生型マウスで著明に認められた線維性病変や炎症細胞の浸潤は軽度であった(図6)。

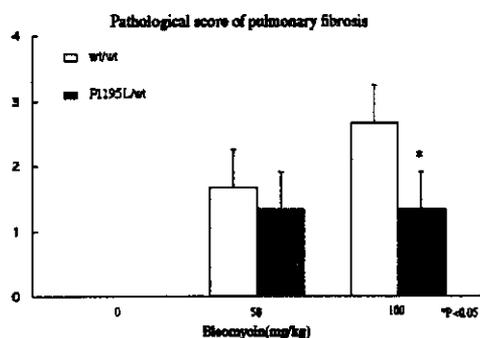


図6 ブレオマイシン投与による肺線維化
 ブレオマイシンを尾静脈注射し肺病変を点数化した。インスリン受容体変異マウスはブレオマイシン誘発性肺線維症の病変を軽減した。

考察、結論

Clancy⁶⁾らはインスリン受容体基質の変異ショウジョウバエ (Chico) の解析から、インスリン様シグナルの異常が酸

化ストレス耐性を獲得し、寿命が延長することを報告した。この寿命延長は雌にだけ認められインスリンシグナルの異常が性によってコントロールされていることが示唆された。Holzenberger⁷⁾らはインスリン様成長因子 1 受容体(IGF-1R)欠損ヘテロマウスが雌マウスで寿命延長とパラコートによる酸化ストレス耐性を獲得することを明らかにした。このことから哺乳類 (マウス) において IGF-1 シグナルが寿命および酸化ストレス耐性をコントロールしていることが明らかになった。また、IGF-1R 欠損ヘテロ雄マウスには寿命延長および酸化ストレス耐性が認められなかったことから哺乳類においても性差が IGF-1 シグナルに影響をおよぼしていることが示唆された。しかしながら、脂肪組織特異的なインスリン受容体欠損マウスは性差に関係なく寿命が延長する⁸⁾という報告もあることから、インスリン受容体変異マウスについて性差の影響を検討することが今後の課題である。

肺における MnSOD の発現を mRNA level で調べたところ、酸素負荷前の定常状態では発現は野生型マウスに比べて有意に上昇していた。酸素負荷により MnSOD の発現は亢進状態が維持されていた。このことは、インスリン受容体変異マウスにおける酸化ストレス能獲得には MnSOD の発現亢進が重要な役割の一端を担っていることが示唆された。

また、BALF の解析から酸素負荷 5 日目にコントロールマウスで急激な好中球の浸潤、血管透過性の亢進が認められた。80%酸素負荷の条件では 5 日目にコントロールマウスが死亡することから、これらの現象が肺障害の進行に重要な役割を担うことが裏付けられた。一方、インスリン受容体変異マウスは有意に好中球の浸潤、血管透過性を抑制することからインスリンシグナルの異常が高酸素負荷に

よる肺障害の進行に抑制的に働くことが明らかになった。急性肺障害では好中球の影響が示唆されており⁹⁾、なかでも傷害物質である好中球エラスターゼの関与が注目されている¹⁰⁾。つまり、肺障害の少ないインスリン受容体変異マウスでは、好中球エラスターゼの活性が抑制され肺胞内への好中球の浸潤を阻害している可能性がある。

特発性肺線維症の発症要因は活性酸素種、好中球エラスターゼなどの傷害物質、ウイルス感染などが考えられている。本研究においてインスリン受容体変異マウスがブレオマイシンによる肺線維症の発症を抑制したこと、肺での MnSOD の定常的な発現の誘導、好中球浸潤の抑制を示したことから、活性酸素による酸化ストレスと好中球浸潤がブレオマイシンによる肺線維化の増悪因子であることを裏付けた。

本研究からインスリン受容体変異マウスは、高酸素負荷、パラコート投与およびブレオマイシン投与による酸化ストレスに対して耐性を獲得していることが明らかになった。酸化ストレス耐性と寿命延長は密接に関連することから、インスリン受容体変異マウスの寿命が有意に延長することが期待される。現在、インスリン受容体変異マウスの寿命の解析中であり、マウスにおいてインスリンシグナルの異常が寿命をコントロールしているかどうか明らかにしていく予定である。

参考文献

- 1) Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G: daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 277: 942-6, 1997
- 2) Honda Y, Honda S: The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J*, 13(11):1385-93, 1999
- 3) Tatar M, Kopelman A, Epstein D, Tu MP, Yin CM, Garofalo RS: A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science*, 292(5514):107-10, 2001.4
- 4) 玉置正勝, 鈴木陽一, 白澤卓二, 青山昭徳, 吾妻安良太: 肺線維症発症要因としてのインスリン様受容体シグナル. 厚生科学研究 (特定疾患対策研究事業) びまん性肺疾患研究班平成 12 年度研究報告書. 206-212, 2001.
- 5) Melov S, Ravenscroft J, Malik S, Gill MS, Walker DW, Clayton PE, Wallace DC, Malfroy B, Doctrow SR, Lithgow GJ: Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science*, 289(5484):1567-9, 2000.
- 6) Clancy DJ, Gems D, Harshman LG, Oldham S, Stocker H, Hafen E, Leevers SJ, Partridge L: Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science*, 292:104-6, 2001
- 7) Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Geloën A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y: IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature*, 421:182-7, 2003
- 8) Kahn M, Kahn BB, Kahn CR: Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science*, 299:572-4, 2003.
- 9) Davis WB, Rennard SI, Bitterman PB, Gadek JE, Sun XH, Wewers M, Keogh BA, Crystal RG: Pulmonary oxygen toxicity. Bronchoalveolar lavage demonstration of early parameters of alveolitis. *Chest*, 83: 35S, 1983
- 10) Lee WL, Downey GP.: Leukocyte elastase: physiological functions and role in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 164(5):896-904, 2001

臓器特異的 MnSOD 欠損マウスの解析

研究分担者 池上隆司 清水孝彦 白澤卓二
東京都老人総合研究所分子老化研究グループ

研究要旨

マンガンスーパーオキシドディスムターゼ (MnSOD) の欠損マウスは生後早期で死亡する。そのため長期にわたる活性酸素の個体老化へ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、Cre-loxp システムを用いた遺伝子改変法を用いて、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、肝臓特異的に MnSOD を欠損させたモデルマウスを作製、解析した。その結果、肝臓での酵素活性の欠損を認めるも、生化学的解析に有意な差は認められなかった。従って、肝臓における MnSOD の役割は少なく、ミトコンドリアで発生した活性酸素は別の経路によって処理されることが示唆された。

本モデルマウスを用いて様々な臓器で MnSOD を欠損させることにより、老化と活性酸素による酸化ストレス傷害の分子メカニズムが解析できると期待される。

研究目的

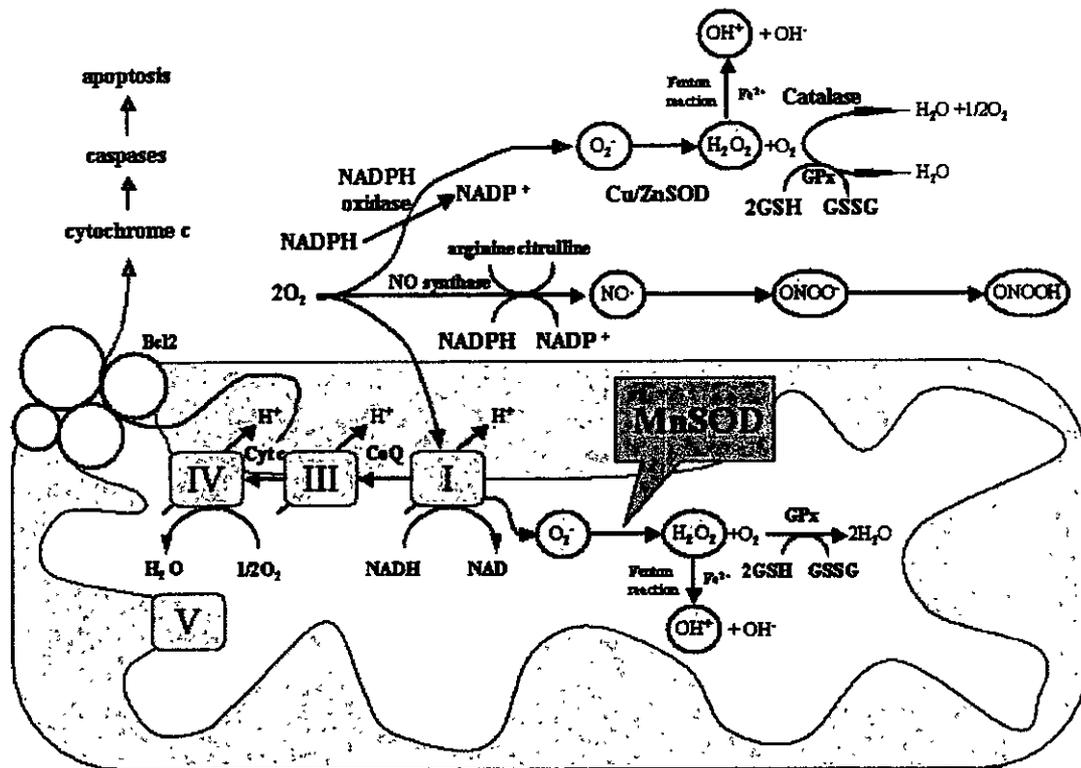
加齢により生体は退行性変化を示すが、この根本的な原因は明確に解明されていない。活性酸素による傷害が有力な原因の一つとして考えられている。活性酸素は脂質、蛋白質、DNA に様々な化学修飾を与え、生体に対して悪影響を及ぼすことが示唆されている。

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^- が発生する。この O_2^- を H_2O_2 に変換する酵素が MnSOD であり、ミトコンドリア内に局在している (図 1)。MnSOD は 25 kD の蛋白質

であり、四量体を形成し、その中心にマンガンをも 1 分子配位する。

MnSOD は脳や心臓の虚血後再還流時に発現が上昇する報告がある¹⁻⁴⁾。またパーキンソン病患者におけるドーパミン産生ニューロンを含む黒質で Cu/ZnSOD は不変であったが、MnSOD の発現が上昇しているという報告もある⁵⁾。このように MnSOD は多くの病態の発症に防御的な役割を担っていることが示唆されている。

1995 年に Li らは MnSOD 欠損マウスは拡張型心筋症を伴い生後早期に死亡してしまうことを報告した⁶⁾。そのため MnSOD 欠損マウスを用いて慢性的



Wallace DC et al, Nat Genet 1998

図1 ミトコンドリア内の MnSOD の役割。MnSOD は発生した O_2^- を H_2O_2 に変換する。

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。

Williams らは MnSOD 欠損ヘテロ接合体マウスの経過を長期間観察した結果、ミトコンドリア内のミトコンドリア DNA のグアニンの酸化物である 8-OH-グアニンの量が増加していたことを明らかにした⁷⁾。しかし老化の症状は早期に現れず、ヘテロ接合体では活

性酸素による酸化ストレス傷害と老化の関連を解析するには不十分である。本研究で、我々は cre-loxp system を用いて、臓器特異的な MnSOD 欠損マ

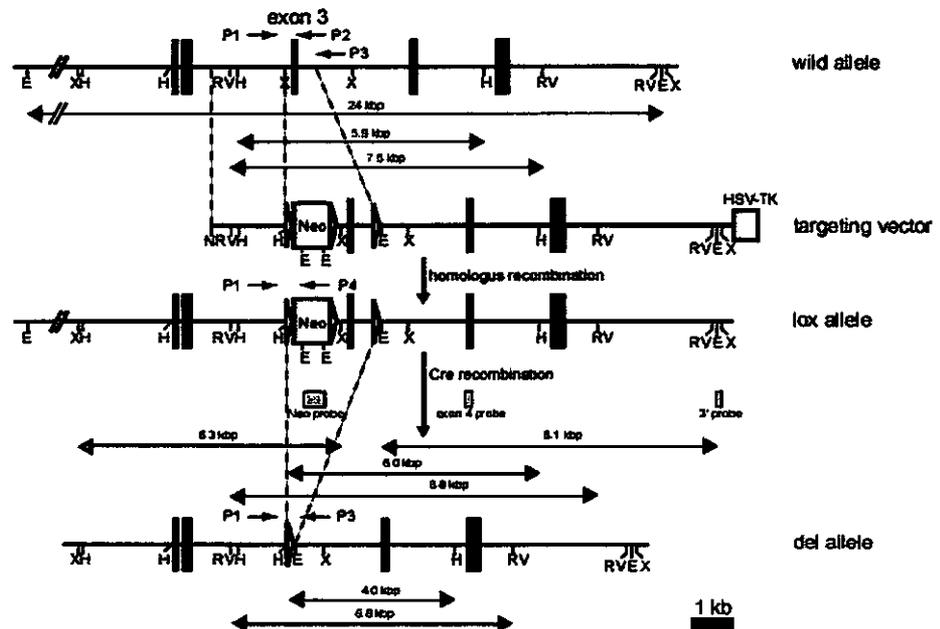


図2 MnSOD コンディショナルノックアウトマウス作製のための標的ベクター

ウスを作製した。このことにより、臓器特異的に MnSOD を欠損させ、特定の臓器に酸化ストレスによる傷害を慢性的に与えることが可能となった。このモデル系を解析することで活性酸素による酸化ストレス傷害と個体（臓器）の老化の関係が *in vivo* で明らかになることが期待される。

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 までを含むゲノム 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 2）。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、サザンブロット法、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 3）。

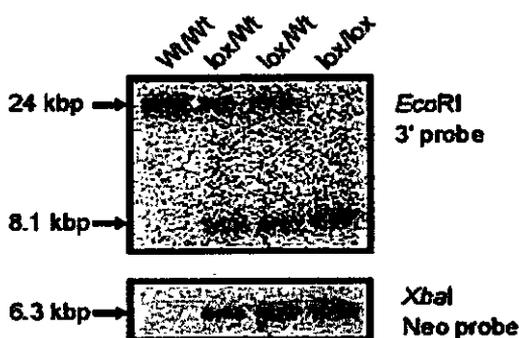


図 3 サザンハイブリダイゼーション
3'側のアウトサイドプローブと Neo プローブを用いて、各々の遺伝子型を確認した。

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⁹⁾。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

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 β -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を用いた⁹⁾。このマウスと交配した産出仔は0匹であった(図4)。

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

図4 産出仔と遺伝子型の割合

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トングを施行した(図5)。

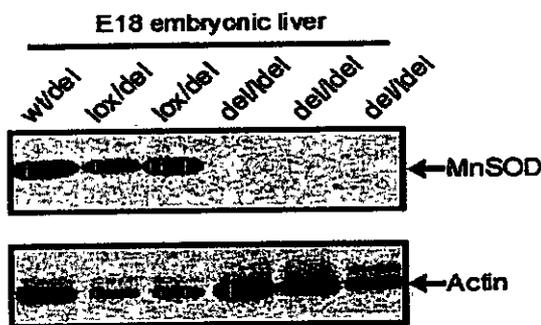


図5 ウェスタンブロット

胎生18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トングを施行した。MnSOD欠損マウスホモ接合体のサンプルのバンドは検出できなかった。

この結果全身性にMnSODが欠損していることが確認された。

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¹⁰⁾。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。まずこのマウスの肝臓からゲノムDNAを抽出し、バクテリオファージP1のリコンビナーゼによる遺伝子の組換えをサザンハイブリダイゼーション法で確認した(図6)。

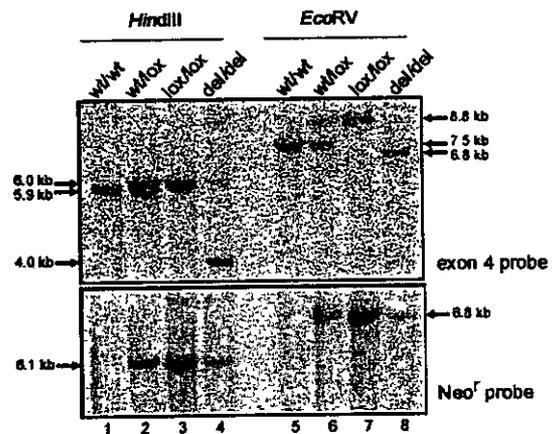


図6 サザンハイブリダイゼーション

肝臓からのゲノムDNAを用いてサザンハイブリダイゼーションを施行した。肝臓特異的MnSOD欠損マウスは予想通りの組換えを起こし、エクソン3上のプローブとNeoプローブで各バンドが検出され

さらにこのマウスの各臓器を用いてウェスタンブロットングを施行し、組織特異的にMnSODが欠損していることを確認した(図7)。

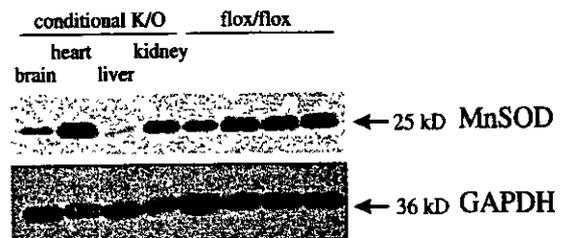


図7 ウェスタンブロット

肝臓においてのみMnSODの欠損が認められた。

また、肝臓からのサンプルを用いてSODの酵素活性を測定した。Cu/ZnSOD

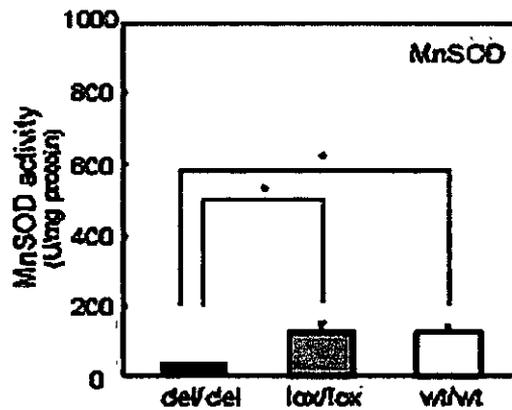
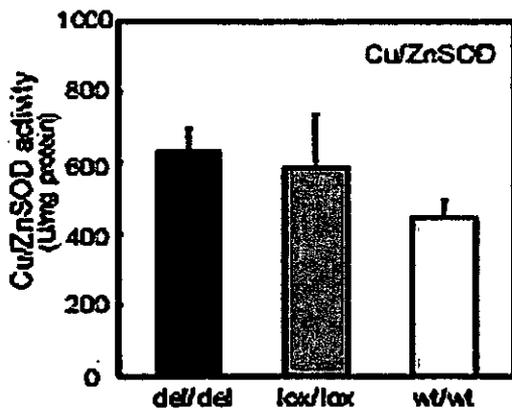


図 8 SOD 活性の測定

コントロールマウスと比較して肝臓特異的 MnSOD 欠損マウスは Cu/ZnSOD 活性は保たれているが、MnSOD 活性は有意に低下している。

活性はコントロールのマウスとほぼ同様であったが、MnSOD 活性は有意に低下していた (図 8)。肝臓の病理所見においては、コントロールのマウスとは差が認められなかった。また、肝臓における活性酸素による酸化によって生じる過酸化脂質の測定を行うも、有意な差は認められなかった (図 9)。

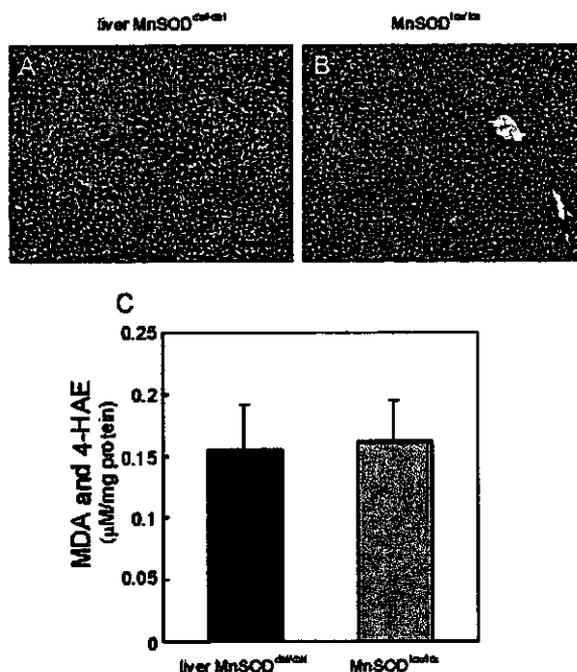


図 9 組織像と過酸化脂質の解析

A, B コントロールマウスと肝臓特異的 MnSOD 欠損マウスの肝臓の組織像に差は認められなかった。 C 過酸化脂質は両者で有意な差は認められなかった。

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。

肝臓特異的 MnSOD 欠損マウスを作製し、表現型の解析をおこなった。肝臓だけで遺伝子は予想通りに組換えがおこり、酵素活性の欠損が確認できた。病理所見、生化学的解析により、MnSOD の欠損による酸化ストレス傷害が認められなかった。このことは、肝臓は活性酸素に対して強い耐性を有しているか、もしくは他に活性酸素に対する防御機構の存在が示唆された。

パーキンソン病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。本モデルマウスを用いて、活性酸素の処理システムを臓器特異的に破壊させることで、酸化ストレス傷害と老化の関係が明らかにできると期待される。

現時点では肝臓特異的 MnSOD 欠損マウスの解析のみであるが、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、脳、筋肉、皮膚、心臓、ドーパミン産生ニューロンに活性酸素が蓄積するようなモデルマウスを用いて老化と寿命の分子メカニズムを解析する予定である。

参考文献

- 1) Chan P.H. : Oxygen radicals in focal cerebral ischemia, *Brain Pathol.* 4, 59-65. 1994
- 2) Kinouchi H., Epstein C.J., Mizui T., Carlson E., Chen S.F., Chan P.H. : Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 11158-11162. 1991
- 3) Euler D.E. : Role of oxygen-derived free radicals in canine reperfusion arrhythmias. *Am. J. Physiol.* 268, H295-300. 1995
- 4) Samaja M., Motterlini R., Santoro F., Dell' Antonio G., Corno A.,: Oxidative injury in reoxygenated and reperfused hearts. *Free Radic. Biol. Med.*, 16, 255-262. 1994
- 5) Saggi H., Cooksey J., Dexter D., Wells F. R., Lees A., Jenner P., Marsden C. D. : A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in parkinsonian substantia nigra. *J Neurochem* 53, 692-697
- 6) 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
- 7) Williams MD, Van Remmen H, Conrad CC, Huang TT, Epstein CJ, Richardson A.: Increased oxidative damage is correlated to altered mitochondrial function in heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mice. *J Biol Chem* 273, 28510-5. 1998
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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

論文発表

Ikegami T., Suzuki Y., Shimizu T., Isono
K., Koseki H., Shirasawa T. : Model mice
for tissue-specific deletion of the
manganese superoxide dismutase
(MnSOD) gene. Biochem Biophys Res
Commun , 3, 296, 729-36. 2002

学会発表

池上 隆司 鈴木 陽一 清水 孝彦
磯野 協一 黒澤 尚 古関 明彦 白
澤 卓二
組織特異的 MnSOD 欠損マウスの解
析
第 25 回日本分子生物学会、 横浜、
12 月、 2002 年

研究要旨

長寿ミュータントであるクロック-1 (*clk-1*)線虫の原因遺伝子である *clk-1* の哺乳動物における役割を解明するため *clk-1* 欠損マウスを作成し解析した。*clk-1* 欠損マウスは胎生致死であることから、*clk-1* 遺伝子はマウスの初期発生に必須である事が示唆された。*clk-1* 欠損マウスではミトコンドリア呼吸鎖の電子伝達体であるユビキノンが全く検出されず、その前駆体であるデメトキシユビキノンが蓄積していた。これより *clk-1* の遺伝子産物はユビキノンの合成に不可欠である事が示唆された。*clk-1* 欠損マウスでの胚発生の遅延および胎児由来細胞血清添加培養での細胞分裂頻度、心臓の心拍数の遅延がみられることから、*clk-1* 遺伝子は哺乳動物においても生体リズムの調節に関与している事が示唆された。

はじめに

線虫の長寿ミュータントであるクロック 1 (*clk-1*) 変異線虫から分離された *clk-1* 遺伝子の遺伝子産物は、ミトコンドリア呼吸鎖の電子伝達体のひとつであるユビキノン(CoQ)の合成酵素であることが線虫や酵母で明らかにされている(1-3) (図 1)。Clk-1 変異線虫は、発生初期(幼虫期)に UbiF(*clk-1* の大腸菌 homologue)を欠損した大腸菌を餌として育てると致死となるが、幼虫期に正常な大腸菌を与えれば、成虫期以降 CoQ 欠損の大腸菌を餌としても寿命延長が見られる(3-5)。また寿命が延長するだけでなくいろいろな運動のタイミングや発生のタイミングが遅くなることから、*clk-1* は本来線虫の初期発生には必須だが、一定の条件下では寿命・生体リズム・発生といった一見独立した生命現象のタイミングを単一遺伝子でコントロールしている可能性が示唆される。そこで、哺乳動物においても *clk-1* 遺伝子が発生や

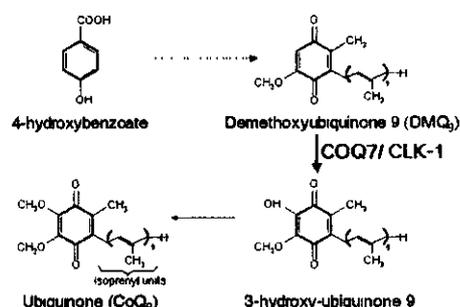


図1 ユビキノンの合成経路

生体リズム・寿命の制御にどのように関与しているかを明らかにする目的で *clk-1* ノックアウトマウス(6)を作成し解析を行った。

Clk-1 欠損マウスの形態学的解析

ターゲットアレルをヘテロに持つマウス(ヘテロマウス)は生存及び妊娠可能で、顕著な表現型の変異は認められなかった。ところが、null アレルをホモに持つマウス(ホモマウス)はヘテロマウス同士の交配からは産れてこなかったため、発生を遡って解析した所、胎生 10.5 日

TABLE 1
Analysis of Embryos and Weaning from Intercrosses of *Coq7* (+/-) mice

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	

表1 ヘテロマウス交配による子孫の遺伝子型

から11.5日目までに胎生致死と成ることが明らかとなった(表1)。

胎生10.5日目のホモマウスは野生型に比べ非常に小さく、形態学的に約48時間の発生の遅れが認められた(図2)。またパラフィン切片をHE染色した所、ホモマウスには全身で顕著な細胞の脱落が認められ、脱落した細胞の中にapoptosisを示す典型的な核の凝縮像が多数観察された(図3)。apoptosisによるDNAのfragmentationを検出するTUNEL法により切片を染色した結果、野生型マウスではTUNEL陽性の細胞はほとんど見られなかったのに対し、ホモマウスではTUNEL陽性の細胞が多数認められた。(図4)

以上の結果から *clk-1* 遺伝子はマウスの初期発生に必須であり、その初期発生は餌の大腸菌から UbiF を除いた場合の *clk-1* 変異線虫の初期発生過程と類似していた。また *clk-1* 欠損による胎生致死の直接原因は細胞における apoptosis の誘導である可能性が示唆された。

ユビキノロン産生と membrane potential

clk-1 の遺伝子産物は、ミトコンドリア呼吸鎖の電子伝達体のひとつであるユビキノロン(CoQ)の合成酵素であることが

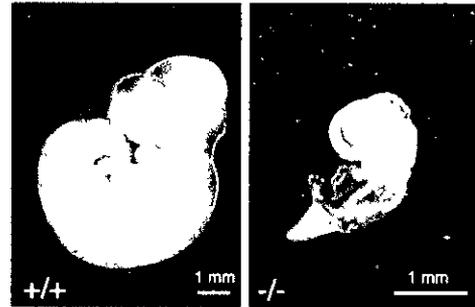


図2 *clk-1* 欠損マウスの発生遅延 (E10.5)

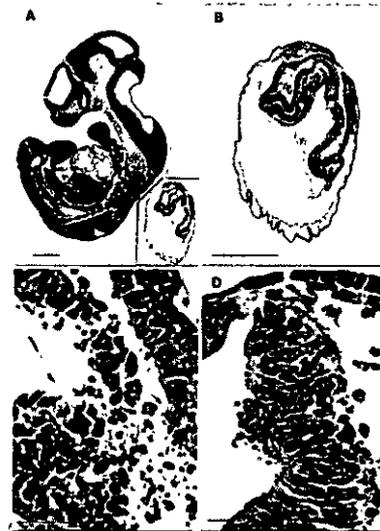


図3 *clk-1* 欠損マウスの組織学的解析

A: 野生型マウス、A挿入図とBは *clk-1* 欠損マウス、C、DはBの拡大図



図4 apoptosisによる細胞死

野生型マウス(A),ホモマウス(B,C)

酵母や線虫で明らかにされている(図1)。哺乳動物においても *clk-1* 遺伝子産物はデメトキシユビキノロンからのユビキノロンの生合成に関与していると考えられる為、*clk-1* 欠損マウスでは、ユビキノロンは合成されず、その前駆体

であるデメトキシユビキノンが蓄積している可能性が考えられた。そこで胎生 9.5 日目の胎児の脂溶性画分を HPLC 分析したところ、野生型マウスやヘテロマウスでは CoQ9 が検出されたが、ホモマウスにはユビキノンが全く検出されなかった (図 5A)。またユビキノンと溶出位置がわずかに異なるピークをマススペクトルで分析した結果このピークはデメトキシユビキノン 9 と同定された (図 5B)。すなわち *clk-1* 遺伝子はマウスにおいてもユビキノンの産生に関与している事を示している。

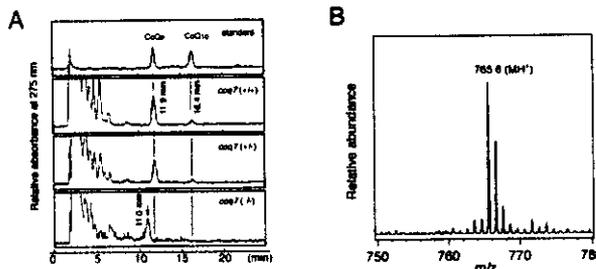


図 5 CoQ の生化学的解析

clk-1 欠損マウスに電子伝達体であるユビキノンが全くないことからホモマウスの細胞では呼吸鎖が回っていないことが示唆された。そこで胎生 10.5 日の胎児の細胞をミトコンドリアの membrane potential を蛍光表示できる Rhodamine123 で染色したところ

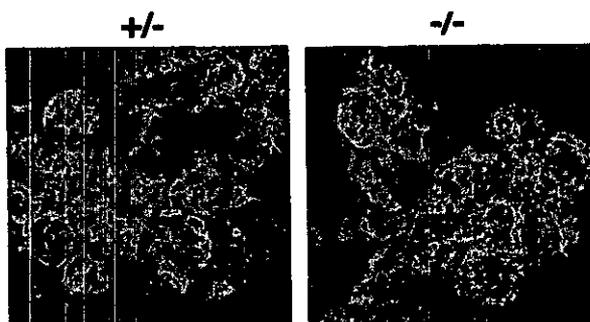


図 6 Rhodamine123 による胎児細胞の蛍光染色

ホモマウス由来の細胞も野生型やヘテロマウスの細胞と同じように蛍光染色された (図 6)。このことからホモマウスの細胞のミトコンドリアもユビキノンの産生が無いにも拘わらず membrane potential が全く失われている訳ではなく、少なくともある程度呼吸鎖が回っている可能性が示唆された。

clk-1 遺伝子と細胞増殖

clk-1 変異線虫では幼虫期に正常な大腸菌を餌として与えた場合に発生初期における細胞分裂速度の遅れが報告されている。*clk-1* 欠損マウスは胎生致死であるため、細胞レベルでの細胞分裂頻度測定を試みた。胎生 10.5 日のホモマウス胎児由来の細胞は、インシュリン、トランスフェリンを含む無血清培地中では生存することはできなかったが、10%牛胎児血清を添加した培養液では培養可能であった (図 7、8)。

血清添加培養系を用い細胞の増殖曲線

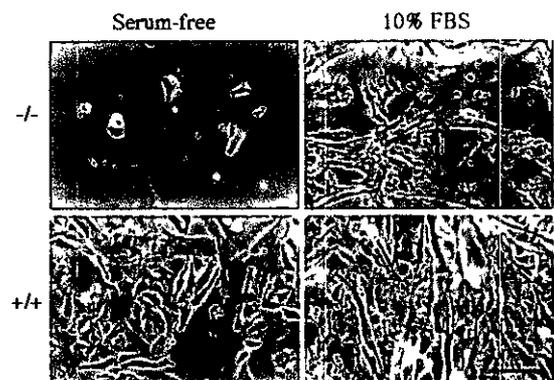


図 7 *clk-1* 欠損マウス胎児由来の初代培養細胞

を求めたところ、ホモマウス由来の細胞は野生型やヘテロマウス由来の細胞に比べて増殖速度が遅いことが明らかとなった (図 9)。

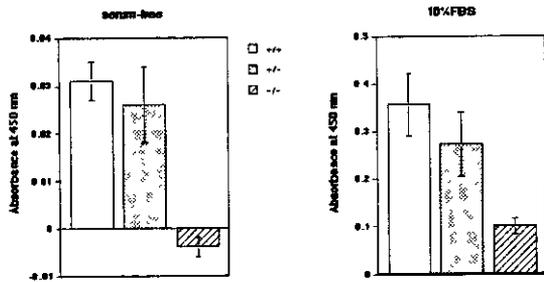


図8 細胞の生存に対する効果

次に、細胞への BrdU の取込みと、ヒストンと DNA に対するモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法により apoptosis の発生頻度のバランスを検討した結果、ホモの細胞は野生型やヘテロの細胞に比べて、分裂速度が遅くかつ apoptosis の頻度も高いため、細胞増殖速度が遅いことが判明した (図 10)。

これらの結果は、哺乳動物においても clk-1 遺伝子の欠損を血清添加により補完した場合に、細胞の分裂速度が遅延する事を示唆している。なお、血清中にユ

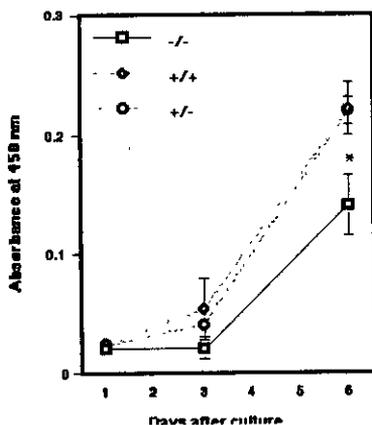


図9 血清添加培地での増殖曲線

ビキノンは検出されるが、合成ユビキノンの無血清培地への添加では細胞は生存できず、血清中の有効性分の同定には至っていない。

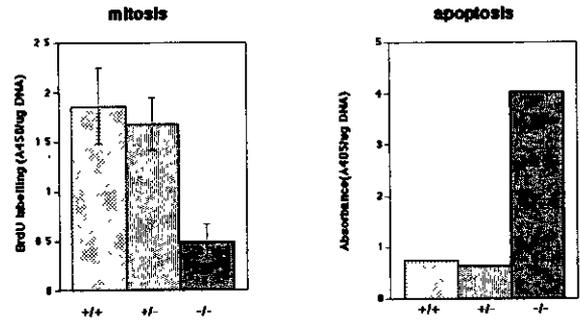


図10 血清添加培地中での細胞分裂と apoptosis の頻度

clk-1 遺伝子と心臓の拍動リズム

線虫の clk-1 変異体では、発生初期における細胞分裂頻度の遅れの他に、咽頭部のポンピング、脱糞など生体リズムの遅れが観察されている。そこで、哺乳動物の生体リズムのひとつである心臓の拍動リズムに clk-1 遺伝子が関与するか血清添加培養系を用いて検討した。

胎生 10.5 日の胎児の心臓を細胞培養あるいは器官培養し、それぞれ培養 4 日目に心拍数を測定した結果、野生型マウスやヘテロマウスの心筋細胞或いは心臓は 1 分間に 150 から 200 回拍動するのに対しホモマウスの心臓は約 45 回しか拍動せず、統計学的に有意差 ($p < 0.01$) が認められた (図 11)。これらの結果から、clk-1 遺伝子の欠損した心筋細胞あ

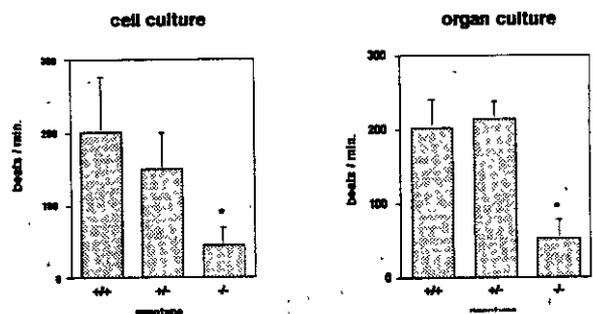


図11 clk-1欠損マウス由来心筋の拍動遅延

るいは心臓も血清添加により培養可能となるが、拍動リズムは遅延する事が明らかとなった。

まとめ

clk-1 遺伝子を欠損したホモマウスは胎生致死となる事から clk-1 遺伝子は哺乳動物において胎児の初期発生に必須であることが判った。また、胎生死の直接の原因は細胞における apoptosis の誘導である可能性が示唆された。一方、HPLC 解析から clk-1 の遺伝子産物はミトコンドリア呼吸鎖の電子伝達体であるユビキノンの合成に関与している事が示唆され、酵母や線虫の結果と一致した。clk-1 欠損マウスの細胞はユビキノンが全くないにも関わらず Rhodamine 123 による染色結果から定性的には membrane potential の発生が確認された。一般にミトコンドリアの membrane potential が維持できなくなると細胞の apoptosis が誘発されることが知られている。Membrane potential の発生がある clk-1 欠損マウスで apoptosis が誘発される原因について、今後詳細に検討を進める。

血清を添加した培養系においてホモマウス由来の細胞は細胞分裂速度の遅れと生体リズムのひとつである心筋の拍動リズムの遅れが観察された。これらの結果から clk-1 遺伝子は哺乳動物においても発生および生体リズムの制御に一定の条件下において関与している事が示唆された。初期発生に必須と考えられる clk-1 遺伝子を欠損したマウス由来細胞ないし心臓が血清添加により、何故培養可能なのか、また何故細胞分裂頻度と生体リズム(心筋の拍動)の遅延が見られるのか、引き続き細胞レベルでの検討を行う予定である。

参考文献

1. 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.

2. 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.
3. 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.
4. Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* **59**, 527-605.
5. 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.
6. 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.