

# 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

## 研究要旨

線虫の長寿命変異の寿命延長の機構は十分解明されていない。長寿命変異体 *daf-2* は酸化ストレス耐性を持ちミトコンドリアに局在する Mn-SOD 発現が変化することから酸化ストレス防御能の亢進が寿命延長に関わると考えられてきた。本研究では Mn-SOD が酸化ストレス防御とともに、それとは異なる機構により寿命を制御していることが明らかになった。高等動物とも共通の寿命制御機構と考えられる。

## A. 研究目的

老化は活性酸素が生体構成成分に酸化傷害を与えることによって起こるとする仮説が提唱されている。しかし活性酸素がどのような機構で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である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わりを解明する。

## B. 研究方法

既に変異剤と UV を用いて作製した *sod-2*、*sod-3* 遺伝子欠損変異体を長寿

命変異体 *daf-2* と組換えにより 2 重変異体にした。酸化ストレス耐性は生体内にスーパーオキシドが発生するパラコートを用いた。発現パターンの解析は *sod-2* と *sod-3* 遺伝子下流に GFP と RFP 遺伝子を融合させ微量注入し蛍光の局在をを蛍光顕微鏡で調べた。

## C. 研究結果

線虫の長寿命遺伝子変異体 *daf-2* (インスリン受容体ファミリー) での寿命延長における Mn-SOD の役割を調べるために Mn-SOD の 2 つのアイソフォーム *sod-2*、*sod-3* 遺伝子欠損の影響を検討した。*daf-2* 変異体の寿命延長は *sod-2* 遺伝子欠損との 2 重変異で減少した。一方 *sod-3* 遺伝子欠損との 2 重変異では *daf-2* 変異体よりもさらに寿命延長がみられた。*sod-2* と *sod-3* 遺伝子欠損両者と *daf-2* の 3 重変異でも *sod-3* 遺伝子

欠損と daf-2 との 2 重変異と同様さらなる寿命延長がみられた。一方 daf-2 変異体は強い酸化ストレス耐性を示すが sod-2 および sod-3 それぞれ一方の遺伝子欠損の影響を受けない。しかし sod-2 と sod-3 遺伝子欠損両者と daf-2 の 3 重変異では著しい酸化ストレス感受性を示すようになり、酸化ストレス耐性と寿命延長に必ずしも関連するものではないことが示された。sod-2 と sod-3 は共に頭部神経系で発現することを示した。

#### D. 考察

長寿命変異体 daf-2 は酸化ストレスに強い耐性を持ち、Mn-SOD の発現が変化する。酸化ストレス耐性が寿命延長の原因であるかどうかを確認するために Mn-SOD の 2 つのアイソフォーム sod-2 と sod-3 の両者のを daf-2 変異体に導入して酸化ストレス感受性にして寿命を調べたところ、むしろ daf-2 自体よりも寿命が延長した。すなわち酸化ストレス耐性と寿命延長に相関がみられず、daf-2 変異体での酸化ストレス耐性は長寿命の原因ではなく長寿命に付随するものと考えられた。sod-3 遺伝子欠損を daf-2 に導入しても寿命延長がみられ、sod-3 欠損では生存維持能を高めるプラスの影響が出るということがわかった。一方 sod-2 と sod-3 の両者の遺伝子欠損では酸化ストレス感受性になることから Mn-SOD には酸化ストレス防御能を持つとともにそれとは異なる寿命を制御する機能を持つ

ことが考えられる。sod-2 と sod-3 は共に頭部神経系で発現することから中枢神経系からなされる寿命制御に関わっている可能性が示唆される。高等動物とも共通の寿命制御機構と考えられる。

#### E. 結論

線虫のミトコンドリアに局在する二つの Mn-SOD アイソフォームは協働して酸化ストレス防御にあたり、両者が酸化ストレス防御とは異なる機構で寿命を制御する機能を持つことを示した。daf-2 長寿命変異体では Mn-SOD の発現を調節してこれらの機能を増強していることがわかった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Honda, Y. and Honda S.,: Oxidative stress and life-span determination in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Ann. New York Acad. Sci. 959: 466-474, 2002
- 2) Honda, Y. and Honda, S.: Life span extensions 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, 21-28, 2002

- 3) 本田陽子, 本田修二 : 線虫 *C. エレガンス* の長寿命変異, 基礎老化研究 26(2), 152-161, 2002
- 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* 39, 534-542, 2002.
- 5) 本田陽子, 本田修二 : 線虫のゲノムに書かれた寿命の設計図, 東京都老年学会誌, 9, 192-196, 2002

## 2. 学会発表

- 1) 本田陽子, 本田修二 : 線虫の Mn-SOD と寿命, 日本基礎老化学会第 25 回大会シンポジウム, つくば, 2002. 5. 17 ~18
- 2) 本田陽子, 本田修二 : 線虫のゲノムに書かれた寿命の設計図, 第 9 回東京都老年学会, 東村山, 2002. 11. 29
- 3) 本田陽子, 本田修二 : Effects of the gene disruption of two Mn-SOD isoforms on oxidative stress sensitivity, dauer formation and life span in *Caenorhabditis elegans*. 第 3 回 *C. エレガンス* 日本集会, 名古屋, 2002. 8. 6~8

## 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

**研究要旨** 老化の原因ではないかと疑われている活性酸素による DNA 損傷の内でもっとも頻繁に生じるのは塩基の損傷であり、そのなかでもチミングリコールなどのピリミジン塩基の損傷は修復されないと大腸菌で細胞死をもたらすことが知られているが、哺乳動物での影響は全く分っていない。これらを明らかにするために、これら損傷を取り除く DNA グリコシラーゼであるエンドヌクレアーゼ III をコードする大腸菌 *nth* 遺伝子のマウスホモログ *mNth1* を gene targeting で不活化したマウスを作成した。その *mNth1* 欠損マウスにはこれまでのところ異常は見つかっていない。このマウスの肝臓の核及びミトコンドリア画分の抽出液を部分精製して、mNTH1 蛋白の活性のなくなっていることを確認したが、TGG1 (ミトコンドリア) および TGG2 (核) と名付けた 2 種類の新規のチミングリコールグリコシラーゼ活性を発見した。また、マウス cDNA データベースにピリミジン塩基損傷を切る大腸菌のもう一つのグリコシラーゼであるエンドヌクレアーゼ VIII (*nei* と呼ぶ遺伝子にコードされている) に似た三つの遺伝子を発見し、*Neil1*, *Neil2*, *Neil3* と名付け、マウス肝臓抽出液の生化学的解析の結果、NEIL1 にはチミングリコールを切る活性があり、上述の TGG1 や TGG2 と異なることが明らかとなった。このように哺乳動物には、活性酸素によるピリミジン塩基損傷を取り除く多数のグリコシラーゼがあり、それぞれが独自の機能を持っていると考えられ、その機能と欠損の解析が DNA 損傷による老化を考える上で重要な課題となってきた。

### A. 研究目的

活性酸素は細胞内の様々な物質を修飾し老化の原因となることが明らかとなってきたが、老化の引き金となるターゲット分子はまだ見つかっていない。DNA は活性酸素による老化のターゲット分子の候補の一つであるが、明確な証拠はまだ示されていない。活性酸素でもっとも頻繁に生じる塩基損傷のうち、チミングリコールなどのピリミジン塩基の損傷は修復されないと大腸菌で細胞死をもたらすことが知られているが、哺乳動物での影響は全く分っていない。これらを明らかにするために、チミングリコールなどのピリミジン塩

基の損傷を取り除く唯一の哺乳動物 DNA グリコシラーゼと考えられているエンドヌクレアーゼ III をコードする大腸菌 *nth* 遺伝子のマウスホモログ *mNth1* を gene targeting で不活化したマウスを作成して解析した。

### B. 研究方法

*mNth1* targeting マウスの作成 : 01a129-derived E14 ES 細胞の DNA を LA-tag DNA ポリメラーゼで増幅して 8904bp の DNA 断片を得てこれをもとに targeting construct を作成した。これをもとに *mNth1* 遺伝子の組み換え ES 細胞の作成とノックアウトマウスを作成し

た。

マウスの解析：放射線に対する感受性は15日の embryo からの細胞を4日の培養の後にメナディオオンや過酸化水素を処理して、24時間後にミトコンドリアの酵素活性を調べる事により細胞の感受性を測った。

マウス個体での放射線により生じたチミングリコールの量の測定：1、6 Gy/min で8 Gy の放射線を照射したマウスから DNA を調整し、チミングリコールに対する抗体と蛍光測定によりその存在量を同定した。

核やミトコンドリアの抽出液の準備とチミングリコールのグリコシラーゼ活性の *in vitro* アッセイ法：エキストラクトは標準的な生化学の方法でヘパリン=アガロース、UNO-S およびブルーセファローズカラムクロマトグラフィーに掛け、20ヌクレオチドで中央にチミングリコールを持ち、その5'側を 32P で標識したオリゴヌクレオチドに相補鎖をアニールさせたものを基質とし、これが切られるかどうかを反応後アクリルアミドゲルに流し、オートラジオグラフィーで調べた。

その他の詳しい実験法は参考文献の論文を参照のこと。

### C. 研究結果

マウス *mNth1* 遺伝子の欠損個体の解析：我々は、これまで全く分かっていなかった、酸化されたピリミジン塩基の哺乳動物での意義を理解するために、哺乳動物で唯一のグリコシラーゼとして知られていた エンドヌクレアーゼ III (endoIII) ホモログをコードするマウス *Nth1* 遺伝子を単離し、そ

の遺伝子を gene targeting でノックアウトした個体を作成した。ノックアウトは head to head に存在している anti-oncogene である *Tsc2* 遺伝子に影響の起きないように設計し、その結果を mRNA の発現解析で確認した。これまで（1年半以上）のところ、*mNth1* ホモ欠損マウスに異常は見つからず、X 線で肝臓に生じたチミングリコールは、野生型マウスと比べてよりゆっくりではあるが取り除かれていた。このことは、*mNth1* 以外にチミングリコールを切る他のグリコシラーゼが存在することを示唆する。そこでこのマウスの肝臓エキストラクトの生化学的解析を行い、核とミトコンドリアに存在する二つの新しいチミングリコールのグリコシラーゼ TGG1 (ミトコンドリア) と TGG2 (核) を発見し、その活性を同定した。TGG1 はさらに精製すると、チミングリコールを基質とする、微生物にもこれまで報告されたことのない Aplyase 活性を持たないグリコシラーゼで、*mNth1* 欠損マウスでは 20-30 倍の活性の上昇がミトコンドリアのエキストラクト中に認められた。TGG2 はチミングリコールを基質とする Aplyase 活性を持つグリコシラーゼで、核にのみその活性が確認出来たが、TGG1 のように *mNth1* 欠損マウスで発現が昂進していることは認められなかった。

マウスデータベースで見つかった大腸菌エンドヌクレアーゼ VIII をコードする *nei* の三つのホモログ *Nei1*, *Nei2*, *Nei3*: 2001 年後半に、マウスの cDNA データベースに3種類の *nei-Fapy* ホモログ遺伝子（これは、大腸菌の MutM 及び *Nei* (endoVIII) のホモログであり、出芽、分裂酵母やショウジョバエや

線虫等にはホモログが見つからない)が登録された。これらの遺伝子を NEIL (Nei-like)1, 2, 3 と名付けて、*in vitro* translation 及びリコンビナント蛋白の活性を調べたところ、NEIL1 が各種のピリミジン損傷のみならず、ウラシルを切る活性を持つグリコシラーゼであることが分かった。そこで、*mNth1* のノックアウトマウスの肝臓細胞抽出液中の活性を調べたところ、TGG1 と TGG2 とは異なる、高い塩濃度で抽出される NEIL1 の活性を同定した。すなわち、哺乳動物には NTH1 を含めて4種類の核あるいはミトコンドリアゲノム上のチミングリコールを切る活性のあることが分かった。マウスでは *mNth1* は肺、肝臓、精巣などで発現が高く、*mNei11* は心臓や脾臓などで *mNth1* より発現が高い。また、NEIL1 は単鎖上の損傷も切り取る能力があり、NTH1 とは機能分担をしていると考えられる。

#### D. 考察

老化の原因として細胞死の加齢にともなう増加が考えられているが、活性酸素による DNA の塩基の損傷は最も頻度が高く、なかでもチミングリコールは除去されないと複製が止まり細胞死をもたらすことが大腸菌で示されている。大腸菌では、最近見つかった損傷を乗り越える Y ポリメラーゼ (*dinB*) もチミングリコールを乗り越えることが出来ない。我々は、ここに示した研究において初めて、マウスのチミングリコールを切るグリコシラーゼが *endoIII* のみでなく、少なくとも4種類の酵素が核或いはミトコンドリアで

働いていることを発見した。取り分け興味のあることは、大腸菌で知られていた *endoVIII* の高等動物のホモログがデータベースで3種類見つかり、そのうち一つ (*Nei11*) のチミングリコールを切る活性がマウスの肝臓の抽出液中に同定できたことである。これらの遺伝子が大腸菌等のバクテリアを除いては脊椎動物以上の高等動物にのみ発見されることは、これらの機能が動物の高次な防御機構に関与していることを示唆している。それぞれの酵素の機能はまだこれから詳しく解析し、それぞれの欠損マウスも作成していく予定である。

#### E. 結論

*mNth1* のノックアウトマウスの生化学的解析とデータベースで得られた新規遺伝子の解析により、哺乳動物には活性酸素によるピリミジン塩基損傷の修復を行う少なくとも4種の DNA グリコシラーゼのあることが明らかとなった。これらの修復酵素は、それぞれが独自の機能を持っていると考えられ、その機能と欠損の解析が DNA 損傷による老化を考える上で重要な課題となってきた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表 (2002年度)

- (1) Okano S, Lan L, Caldecot K, Mori T, and Yasui A. Spatial and temporal assembly of the proteins involved in repair of single-strand breaks in human cells. *Mol. Cell. Biol.* in press.
- (2) Takahashi H, Umeda N, Tsutumi Y, Fukumura R, Ohkaze H, Sujino M, van der Horst, G, Yasui A, Inoue ST,

- Fujimori A, Ohhata T, Araki R, and Abe M. Mouse dexamethasone-induced RAS protein I gene is expressed in a circadian rhythmic manner in the suprachiasmatic nucleus. *Mol. Brain Res.* in press.
- (3) Takao M, Kanno S, Kobayashi K, Zhang Q-M, Yonei S, van der Horst GTJ, and Yasui A. A back-up glycosylase in *Nth1*-knockout mice is a functional Nei (endonuclease VIII) homologue. *J. Biol. Chem.* **277**: 42205-42213, 2002.
- (4) Chigancas V, Batista LF, Brumatti G, Amarante-Mendes GP, Yasui A, Menck CF. Photorepair of RNA polymerase arrest and apoptosis after ultraviolet irradiation in normal and XPB deficient rodent cells. *Cell Death Differ.* **9**: 1099-1107, 2002.
- (5) Oster H, Yasui A, van der Horst GTJ, and Albrecht U. Disruption of *mCry2* restores circadian rhythmicity in *mPer2* mutant mice. *Genes Dev.* **16**: 2633-2638, 2002.
- (6) Albus H, Bonnefont X, Chaves I, Yasui A, Doczy J, van der Horst GT, Meijer JH. Cryptochrome-deficient mice lack circadian electrical activity in the suprachiasmatic nuclei. *Curr Biol.* **9**: 1130-1133, 2002.
- (7) Schul W, Jans J, Rijksen YMA, Klemann HM, Eker APM, de Wit J, Nikaido O, Nakajima S, Yasui A, Hoeijmakers JHJ, and van der Horst GTJ. Enhanced repair of cyclobutane pyrimidine dimers and improved UV resistance in photolyase transgenic mice. *EMBO J.* **21**: 4719-4729, 2002.
- (8) Miyabe I, Zhang QM, Kino K, Sugiyama H, Takao M, Yasui A, and Yonei S. Identification of 5-formyluracil DNA glycosylase activity of human hNTH1 protein. *Nucleic Acids Res.* **30**: 3454-3463, 2002.
- (9) Takao M, Kanno S, Shiromoto T, Hasegawa R, Ide H, Iikeda S, Sarker AH, Seki S, Xing JZ, Le XC, Weinfeld M, Kobayashi K, Miyazaki J, Muijtjens M, Hoeijmakers JHJ, van der Horst GTJ, and Yasui A. Novel nuclear and mitochondrial glycosylases revealed by disruption of the mouse *Nth1* gene encoding an endonuclease III homologue for repair of thymine glycol. *EMBO J.* **21**: 3486-3493, 2002.

## 2. 学会発表 (2002年度)

### (国際会議での招待講演)

- (1) Akira Yasui, Repair of Base Damage and Single-Strand Breaks, 1<sup>st</sup> Japan-US DNA Repair Meeting, 2002, October 27-31, Sendai, Japan.
- (2) Akira Yasui, Repair of Oxidative Base Damage and Single-Strand Breaks in Mammals. International Symposium on DNA Repair in the Twenty-first Century. October 07, 2002, Erasmus Medical Center, Rotterdam, The Netherlands.
- (3) Masashi Takao and Akira Yasui, A Back-up Glycosylase in *Nth1*-Knockout Mice Is a Functional Nei (endonuclease III) Homologue. 1<sup>st</sup>

Japan-US DNA Repair Meeting, 2002,  
October 27-31, Sendai, Japan.

- (4) Satoshi Okano and Akira Yasui,  
Spatial and Temporal Assembly of  
The Proteins Involved in Repair of  
Single-Strand Breaks in Human  
Cells. 1<sup>st</sup> Japan-US DNA Repair  
Meeting, 2002, October 27-31,  
Sendai, Japan.
- (5) Akira Yasui, Repair Strategy for  
UV-induced DNA Damage in  
Eukaryotes; Alternative Repair  
Mechanisms, 1<sup>st</sup> Asian Conference on  
Photobiology, 2002, June 26-28,  
Awaji Yumebutai International  
Conference Center, Hyogo, Japan.

(国内学会でのシンポジウム)

- (1) 安井 明、活性酸素による損傷塩基を修復する新しいマウス DNA グリコシラーゼ。DNA Repair Workshop。2003年2月24-26日、淡路夢舞台、兵庫。
- (2) 安井 明、DNA 損傷および DNA 修復欠損と老化の関係について。シンポジウム「個体老化の分子機構—抗老化実現に向けた基礎的研究」第25回日本分子生物学会年会。2002年12月11-14日、横浜、日本。
- (3) 岡野 聡、蘭 利、森俊雄、安井 明、ヒト細胞の修復蛋白の可視化による単鎖切断のシグナルと修復機構の解明。ワークショップ「DNA 修復機構研究の新展開」第25回日本分子生物学会年会。2002年12月

11-14日、横浜、日本

- (4) 蘭 利、中島 敏、高尾雅、安井 明、RNAi を用いた DNA 修復遺伝子の発現制御とその応用。ワークショップ「ポストゲノムシークエンス時代の戦略としての RNAi」第25回日本分子生物学会年会。2002年12月11-14日、横浜、日本
- (5) 安井 明、活性酸素による DNA 損傷と修復欠損。シンポジウム「寿命と老化を決める遺伝子」第25回日本基礎老化学会。2002年5月17-18日。産業技術総合研究所、筑波、日本

### 研究要旨

ポリコーム群タンパク複合体による細胞老化制御の分子機序を明らかにするために、ほ乳類ポリコーム群によるクロマチン構造の制御の分子メカニズムの解析を、主に遺伝子欠損マウスを用いて行った。新たに 8 個のポリコーム群複合体の構成因子または制御因子を同定し、そのうち Scmh 1 と Topors について、その生物学的機能を明らかにした。

#### A 研究目的

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ことにより、細胞老化に寄与しうるのかを明らかにすることを目的とする。

#### B 研究目標

Mph2 結合タンパクとして同定した Scmh 1 (Sex comb on midleg homolog-1) と Topors (Topoisomerase 1-binding RING finger protein) 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。

#### C 結果と考察

1) Scmh 1 (Sex comb on midleg homolog-1)

Scmh 1 は、Mph 2 に結合するタンパクとして同定された。N 端領域には mbt リピートが存在し、C 端付近には SPM ドメインが存在し、この SPM ドメインを介して

Mph2 と Rae28/Mph1 に結合すると想定されている。Scmh 1 欠損マウスでは、中軸骨格系のホメオティック変異は見られたもののその遺伝学的な浸透性はきわめて低く、他の構成成分に比べ、Hox の転写制御に対するインパクトはそれほど強くないことが想定された。しかしながら、Mph2 を欠損したマウスの胎児性繊維芽細胞で見られた細胞老化の急速な進行は Scmh 1 欠損マウスでも観察されたことから、同様なタンパク複合体として機能していることが示された。継代にしたがって、Ink4a 遺伝子と p53 タンパクの発現量は亢進する。約 70% の雄において不妊が観察され、精巣における顕著なプログラム細胞死の亢進によると考えられている。このプログラム細胞死は、男性ホルモンの増加によって抑制されうる生理的におこるパキテン期の細胞死が過剰におこるためであることを示した。Scmh 1 欠損マウス精巣では、Ink4a 遺伝子と p53 タンパクの発現量は亢進し、さらに p

21 と Bax の発現も亢進していることが示された。面白いことに、Scmh1 の精巣における発現は出生児にはほとんど検出されないが、生後30日ぐらいまで漸増し、その後はプラトーとなる。すなわち、Scmh1 の発現誘導が精細胞の生理的なプログラム細胞死の抑制に必要であることが示された。また、外来性の Scmh1 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。

## 2) Topors (Topoisomerase 1-binding RING finger protein)

Topors は、Mph2 結合タンパクとして同定され、RING フィンガー、ロイシンジッパー、PEST 領域を有する核タンパクである。培養細胞において、通常は PML 体に局在するが、カンプトテシン処理によって PML 体から解離することが知られている。Topors は、培養細胞において過剰発現させると Mph2 だけでなく p53 にも結合し、これらふたつのタンパクを安定化させることを明らかにした。Mph2 の安定化によるインパクトは明らかではないが、p53 の安定化を介して細胞死または G1 期停止を量依存的に誘導する。この過程は、p53 による下流遺伝子の転写活性化を促進することによってもたらされる。Topors の発現は、シスプラチンなどの DNA ダメージによって誘導されることから、Topors

は DNA ダメージ依存的 p53 活性化を媒介する分子として位置付けられる。ポリコーム群と p53 とは、細胞死制御の過程では拮抗的に作用すると考えられている。Topors は、その両方に対し安定化させることにより、細胞死の過剰発火を抑制することが推測される。

## D 発表

1. Nakayama, T., Kasprovicz, D.J., Yamashita, M., Schubert, L.A., Gillard, G., Kimura, M., Didierlaurent, A., Koseki, H., and Ziegler, S.F. (2002) The Generation of Mature, Single-Positive Thymocytes *In Vivo* is Dysregulated by CD69 Blockade or Overexpression. **J Immunol.** 168:87-94.
2. Miki, T., Suzuki, M., Shibasaki, T., Uemura, H., Sato, T., Yamaguchi, K., Koseki, H., Iwanaga, T., Nakaya, H., Seino, S. (2002) Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier *Kir6.1*. **Nature Med.** 8:466-72.
3. Murakami, H., Okawa, A., Yoshida, H., Nishikawa, S., Moriya, H., Koseki, H. (2002) *Elbow knee synostosis (Eks)*: A new mutation on mouse Chromosome 14. **Mammalian Genome**13:341-344.
4. O-Wang, J., Kajiwara, K., Kawamura, K., Kimura, M., Miyagishima, H., Koseki, H., Tagawa, M. (2002) An essential role for

- REV3 in mammalian cell survival: absence of REV3 induces p53-independent embryonic death. **Biochem Biophys Res Commun.** 293(3):1132-1137.
5. Ohara, O., Nagase, T., Mitsui, G., Kohga, H., Kikuno, R., Hiraoka, S., Takahashi, Y., Kitajima, S., Saga, Y., Koseki, H. (2002) Characterization of size-fractionated cDNA libraries generated by the in vitro recombination-assisted method. **DNA Research.** 9:47-57.
6. Yamaki M, Isono K, Takada Y, Abe K, Akasaka T, Tanzawa H, Koseki H. (2002) The mouse Edr2 (Mph2) gene has two forms of mRNA encoding 90- and 36-kDa polypeptides. **Gene**; 288:103-110
7. Suzuki. M., Mizutani-Koseki, Y., Fujimura, Y., Miyagishima, H., Kaneko, T., Takada, Y., Akasaka, T., Tanzawa, H., Takihara, Y., Nakano, M., Masumoto, H., Vidal, M., Isono K. and Koseki, H. (2002) Involvement of the Polycomb-group gene Ring1B in the specification of the anterior-posterior axis in mice. **Development** 129:4171-4183.
8. Zhang Y, Miki T, Iwanaga T, Koseki Y, Okuno M, Sunaga Y, Ozaki N, Yano H, Koseki H., Seino S. (2002) Otx3: identification, tissue expression and functional characterization of a novel member of the Otx family. **J Biol Chem.** 277:28065-28069.
9. Ishigami, A., Fujita, T., Handa, S., Shirasawa, T., Koseki, H., Kitamura, T., Enomoto, N., Sato, N., Shimosawa, T., and Maruyama, N. (2002) Senescence marker protein-30 knockout mouse liver are highly susceptible to TNF- and Fas-mediated apoptosis. **Am. J. Pathol.** 161:1273-1281.
10. Akasaka T, Takahashi N, Suzuki M, Koseki H., Bodmer R and Koga H. (2002) MBLR, a new RING finger protein resembling mammalian Polycomb gene products, is regulated by cell cycle-dependent phosphorylation. **Genes Cells.** 7:835-850.
11. Takeda U, Utani A, Wu J, Adachi E, Koseki H., Taniguchi M, Matsumoto T, Ohashi T, Sato M, and Shinkai H. (2002) Targeted Disruption of Dermatopontin Causes Abnormal Collagen Fibrillogenesis. **J Invest Dermatol.** 119:678-683.
12. Yuasa S, Nakajima M, Aizawa H, Sahara N, Koizumi K, Sakai T, Usami M, Kobayashi S, Kuroyanagi H, Mori H, Koseki H. and Shirasawa T. (2002) Impaired cell cycle control of neuronal precursor cells in the neocortical primordium of presenilin-1-deficient mice. **J Neurosci Res** 70:501-513

12. Shirasawa T, Izumizaki M, Suzuki YI, Ishihara A, Shimizu T, Tamaki M, Huang F, Koizumi KI, Iwase M, Sakai H, Tsuchida E, Ueshima K, Inoue H, Koseki H, Senda T, Kuriyama T and Homma I. (2002) Oxygen affinity of hemoglobin regulates O<sub>2</sub> consumption, metabolism, and physical activity. **J Biol Chem** in press.

13. Fukuda K., Yoshida H., Sato T., Furumoto T., Mizutani-Koseki Y., Suzuki Y., Saito Y., Takemori T, Kimura M, Sato H., Nakayama T., Taniguchi M., Nishikawa S. and Koseki H. Mesenchymal expression of Foxl1, a winged helix transcriptional factor, regulates generation and maintenance of gut associated lymphoid organs. **Dev. Biol.** (in press).

14. Ryuichi Yamada, Yoko Mizutani-Koseki, Takanori Hasegawa, Noriko Osumi, Haruhiko Koseki and Naoki Takahashi Requirement for *Mab2111* during development of murine eye and preputial gland. **Development** (in press)

## 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

### 研究要旨

長寿関連遺伝子を探索する目的で SNP 解析を応用する方法を検討し、SNP のタイピング方法およびハプロタイプ解析方法の評価を行った。タイピング法は Taqman 法を、解析ソフトは LD support を用いて行い、良好な結果を得ることができた。

#### A. 研究目的

長寿者の一塩基多型 (SNP) を解析することにより、長寿関連遺伝子を探索することを目的とする。本年は SNP の大量タイピングを行うための手法として、Taqman 法の検討を行った。また SNP タイピング結果解析を用いて連鎖不平衡およびハプロタイプ解析を行うためのソフトウェアの評価を行った。

#### B. 研究方法

コリエル社より入手したヒト DNA サンプルを 94 検体を用いて。5 種類の SNP に対する Taqman 試薬を構築し、Applied BioSystem 社のプロトコールに従ってアッセイした。連鎖不平衡およびハプロタイプ解析ソフトに関しては LDsupport (Dr. Kamatani, Tokyo Womens Medical School)、Arlequin (Dr. Excoffier, Univ. Geneva)、および HapInfer (Dr. Clark,

Univ Penn State) を入手して行った。

#### C. 研究結果

Taqman 法は SNP 検出の成功率および精度に関して、昨年度使用した Invader 法とほぼ同程度であることが判った。一反応のコストは高いが、反応系を通常の 20ul 系から下げることが出来た点で改善があった。今回は両方を総合的に判断して、Taqman 法を中心にタイピングを行うことにした。また Taqman 法で解析できないが Invader 法では解析できる SNP、あるいはその逆のケースもあるので、Invader 法も一部の SNP 解析には残すことにした。

連鎖不平衡およびハプロタイプ解析ソフトは LDsupport (Dr. Kamatani, Tokyo Womens Medical School)、Arlequin (Dr. Excoffier, Univ. Geneva)、および HapInfer (Dr. Clark, Univ Penn State) を検討した。い

いずれもハプロタイプ解析アルゴリズムは期待値最尤法が用いられている。しかし入力する SNP データ形式、および結果の出力がどれも異なっており、計算できる連鎖不平衡パラメータの種類にもわずかな違いが認められた。同じ SNP データを入力したところ、LD Support, Arlequin に関しては同じ結果が得られたが、HapInfer は入力する SNP の順番をかえると、異なる結果が出る場合があることが判った。全 2 者はほぼ同等の機能を持っているが、作製者が近く、種々の機能変更や追加がより容易な点で LD support の方を今後の解析の中心として用いて行くことで決定した。

#### D. 考察

本年は SNP の大量解析に向けた準備段階として、SNP のタイピング方法およびタイピング結果の解析方法を検討した。

#### E. 結論

1. SNP タイピング方法は Taqman 法を主に Invader 法を従に大量解析システムを組む。
2. 連鎖不平衡、ハプロタイプ解析を行うためのソフトウェアとして LDsupport を用いる。

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的所有権の取得

なし