

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 森 望

平成15(2003)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. N-Shc の新たなシグナルルートおよび 酸素ストレス下における神経保護の役割の解明 森 望	6-10
1. Shc と PKC シグナリングのクロストーク： p38MAP キナーゼシグナリングにおける PKN の 機能解析 小野功貢	11-13
2. ショウジョウバエの寿命関連遺伝子の探索： POSH シグナリング経路の解明 相垣敏郎	14-17

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	18-20
---------------------	-------

IV. 研究成果の刊行物・別刷 (抜粋)	21-
----------------------	-----

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、Shc 系遺伝子を中心とした寿命制御の分子基盤を探る目的で、以下の研究を行った。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 の神経特異的分子 N-Shc に従来 Shc では知られていない新たなシグナル伝達経路があることを明らかにした。N-Shc が Grb2 以外に CrkII と結合し、アクチン骨格系の再編成を誘起することがわかった。また、このアクチン骨格再編成の誘導に係る新たな p250-Rho-GAP/Grit を発見した。さらに、N-Shc が脳海馬スライスあるいは培養神経細胞の酸化ストレス下に PKC delta と特異的に結合し、酸化ストレスを抑え、神経細胞をアポトーシスから保護することを明らかにした。一方、PKC 関連酵素である PKN はストレス応答シグナルの主流である p38-MAPK シグナル経路の分子群、即ち p38g, MKK6, MLTK を集約的に結合し、ストレスシグナルのスキヤフォールド（足場）蛋白質として機能することを明らかにした。また、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た寿命制御遺伝子の系統的な探索から得られた DPOSH について、その周辺で機能する分子を酵母ツーハイブリッド系を用いて検討した。その結果、ストレス応答反応で活性化される JNK/SAPK を活性化しうる ALG-2 と AIP1 が DPOSH と相互作用することを見いだした。以上の結果から、JNK、p38、Shc 系のストレス応答シグナルが哺乳動物や無脊椎動物での老化・寿命制御遺伝子として機能することを示唆した。

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

[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）

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。今年度は特に、N-Shc の新規シグナルルートの解析、N-Shc からアクチン骨格制御へのシグナル媒介分子の探索、N-Shc の神経保護作用の検討、PKC 関連分子 PKN の p38MAPK シグナルへの関与の検討、さらにショウジョウバエにおける寿命関連遺伝子 DPOSH の機能解析を行った。

B. 研究方法

主任研究者の森を中心として、N-Shc の CH1 ドメインのチロシンリン酸化部位をペプチドマッピング法により特定し、次いでホスホペプチドアフィニティー法によりその結合分子を究明する。また、N-Shc の機能ドメインをベイトにした酵母ツーハイブリッド系で得られていた N-Shc 制御候補分子 p250 についてその機能を明らかにする。昨年までに明らかにしていた N-Shc と PKC delta との結合が実際に神経組織の中で起こるかどうかが検討する。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 応答を引き続き検討する。分担研究者の小野は PKC 関連分子 PKN の機能探索を進める。相垣は、ショウジョウバエの寿命変異体スクリーニングで得られた DPOSH の機能解明を行う。

(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) N-Shc には Shc ないユニークなシグナルアウトプットがあり、特に、CH1 ドメインから CrkII を介して細胞内のアクチン骨格を制御するシグナルを流すことが示唆された。これは Shc 系分子について従来知られていない新たなシグナルルートを発見したことになる。

(2) N-Shc がアクチン骨格の再編を促すシグナル伝達の制御分子の候補として p250 kD の新規 Rho-GAP を同定し Grit と命名した。この Grit は N 末に GAP ドメインをもち、C 末で N-Shc ならびに NGF の受容体である TrkA と結合した。Grit の発現は脳神経系に強く、神経の活性化にともなう G 蛋白質の新たな制御因子として注目される。

(3) N-Shc は神経細胞の酸化ストレス下に PKC delta と結合し、細胞の酸素ラジカルレベルを下げ、細胞死を抑制することを明らかにした。これは、p66-Shc と同様、N-Shc も細胞のストレス応答に関係することを示したものであるが、作用の仕方が全く異なる。p66-Shc はストレス下に細胞死へ向かわせるが N-Shc はストレス下に細胞死を抑制する働きがある。今後、老化との関連で両者の違いを詳細に解明してゆくことが期待される。

(4) PKC 関連キナーゼである PKN について特にストレスシグナルとの関係を調べた。その結果、PKN は p38MAPK の上流にある MLTK α をリン酸化し、間接的に p38MAPK を活性化することがわかった。さらに PKN は MLTK から p38 に至る経路の他の分子とも結合することがわかり、PKN が p38 周辺ストレスシグナル応答分子群のスキャッフールド（足場）となっている可能性を示唆した。

(5) ショウジョウバエの寿命関連遺伝子

として昨年までに単離していた DPOSH がどのような分子と相互作用するかを検討した結果、アポトーシス関連遺伝子 ALG-2 および AIP1 と協調して、Eiger によって誘導される JNK 経路の活性化に関与していることが明らかになった。このことは、寿命とアポトーシスシグナリング経路の間に密接な関連があることを強く示唆した。

D. 考察

主任研究者を中心とした Shc 系分子について、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、昨年度までにモデル細胞系で N-Shc が PKC delta と特異的に結合し、PKC 活性を抑えることを知っていたが、これが実際に神経細胞の酸化ストレス下において、神経細胞のアポトーシス抑制にかかわる可能性を見いだした。また、N-Shc に特徴的なシグナルアウトプットを見だし、それに関与する新たな脳特異的なアクチン骨格再編の誘導分子 Grit を特定した。これらの結果は、従来 Shc について知られていた、いわゆる Ras-MAPK 経路の活性化因子としての役割意外に N-Shc は細胞のストレス応答や細胞骨格再編へ向けて多彩な機能をもつシグナルアダプターであることを示唆した。

また、PKC 関連分子として解析を進めた PKN とショウジョウバエの寿命関連遺伝子の探索から始めた DPOSH に関して進めた分担研究者の研究からも、意外にも両者ともス

トレス応答シグナルに関連することが判明した。このことは、老化や寿命の制御の中心に細胞のストレス応答シグナルがあることを示唆しているものと考えられる。

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見えてきた。本研究のゴールは、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確認された。

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として指摘された p66-Shc の神経特異的ホモログである N-Shc についても、神経細胞での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し、ストレス下に神経を保護することを見いだした。また PKN、POSH の研究からも再オプのストレス応答シグナルが老化・寿命制御に係わることが明かとなった。

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

N-Shc の新たなシグナルルートおよび
酸素ストレス下における神経保護の役割の解明

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）

これまでに我々はマウスの Shc, Sck, N-Shc の遺伝子を単離し、ゲノム構造の解析から N-Shc/Shc および Sck/ShcB の構造を明らかにしていた。今年度は N-Shc の機能面の解析に焦点をあてた。N-Shc のホスホチロシン結合ドメインである PTB と SH2 で挟まれた CH1 ドメイン中に従来知られていた Grb2 結合部位以外に CrkII に結合するホスホチロシンサイトがあることを見出した。これにより、N-Shc はアクチン骨格再編シグナルを流すことが明らかとなった。このアクチン骨格再編シグナルを誘導する制御分子として脳に発現の高い新規 Rho-GAP を見出し、Grit と命名した。これは、N 末に Rho-GAP ドメインをもつが、C 末で N-Shc に結合するとともに神経栄養因子である NGF の受容体 TrkA とも結合した。この Grit の部分ドメインを PC12 細胞へ注入すると、NGF 依存性突起伸張が阻害されることから、Grit は神経の発達時や成熟シナプスにおける可塑性時に機能し、神経終末でのアクチン骨格再編の制御分子である可能性が示唆された。また、Shc 系分子と PKC ファミリーとの機能連関を探る過程で、N-Shc が PKC delta と特異的に反応すること、それが酸化ストレス下に強化されることを昨年度までにみていたが、今年度は、この反応が実際に神経組織中でおこり、N-Shc が神経細胞の酸素ストレス下に神経をアポトーシスから保護する役割があることを見出した。以上の結果から N-Shc の成熟神経における多面的な機能性について考察を加えた。

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

神経特有な Shc 関連分子である N-Shc の機能特性を明らかにするとともに、老化制御への役割を探る。具体的には、まず、N-Shc のシグナルアウトプットとなる CH1 ドメイン中のホスホチロシン部位をすべて同定し、従来 Shc 分子に関して知られている Grb2 との結合サイトを特定するとともに、それ以外

のシグナルアウトプットの可能性を検討する。また、N-Shc と PKC の一部の機能連関に関する知見があるので、実際に神経細胞の酸素ストレス下に N-Shc が神経の死を促進するのか、逆に、神経の死を抑制し、神経保護を司るのかを明らかにする。また、種々の老化・寿命関連遺伝子の中での Shc 遺伝子の特性について考察する。

B. 研究方法

N-Shc の CH1 ドメインについてホスホペプチドマッピングを行い、ホスホチロシン部位を決定する。次いで、それぞれへの結合分子を特定する。N-Shc の各種ドメインをベイトにした酵母ツーハイブリッド法により結合分子を探索し、N-Shc との機能性について検討を加える。すでに COS 細胞への遺伝子導入実験で確認していた N-Shc と PKC delta の酸化ストレス下での結合に関して、実際の神経細胞中で同様なことが起こるかどうかが検討する。具体的にはラットの脳の海馬のスライス培養で過酸化水素を添加し、経時的に内在性の N-Shc と PKC delta の結合について調べる。また、神経系の細胞へ N-Shc を強制発現し、酸素ストレス下に神経細胞死を誘導するのか、あるいは、神経保護へ向かうのかを明らかにする。

(倫理面への配慮)

試験管内実験、細胞へ遺伝子導入実験は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。動物実験については長寿医療研究センターの利用規定に準じて行った。

D. 結果

(1) 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 ヲ所の 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 に

結合するが、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(Nakamura et al., 2002a)。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予想された(Kojima et al., 投稿準備中)。

(2) 脳特異的新規 Rho-GAP/Grit の発見：酵母ツーハイブリッド系による探索から N-Shc に結合する 250 kD の Rho-GAP 分子を単離した。これは、脳での発現が高く、分子の N 末に Rho-GAP ドメインをもち、C 末で N-Shc および TrkA と特異的に結合した。TrkB や TrkC とは結合しなかった。GTPase Regulator Interacting with TrkA ということで、GRIT と命名した。全長の Grit を PC12 細胞で強制発現すると NGF 添加後の突起伸展が強化され、N 末や C 末の部分ドメインを強制発現すると突起伸展が阻害された。このことから、Grit は NGF 依存性の神経発達に関与し、特に、突起伸展時のアクチン骨格の再編の制御分子となると提唱した(Nakamura et al., 2002b)。

(3) N-Shc の酸素ストレス下における神経保護作用とその分子機構： われわれは、N-Shc に神経細胞保護作用があるかどうかを明らかにする目的で、神経活性化や神経細胞死のシグナル伝達に係わるプロテインキナーゼ C (PKC) との相互作用の可能性について探究した。その結果、N-Shc と PKC delta の発現が成熟脳で非常によく一致すること、また、N-Shc と PKC delta が酸化ストレス下に特異的に結合することを発見した(Ihara et al., 投稿中)。この N-Shc と PKC delta の相互作用はラット脳の海馬スライスを酸化ストレスにさらした場合にも確認された。N-

Shc が PKC delta に結合すると PKC 活性を抑える傾向があり、また、この状態では神経細胞の酸素ラジカルレベルを下げ、神経保護の方向へ流れているように見受けられた。この点が確定すれば、N-Shc は酸化ストレス下の「脳を守る」作用があると考えられた。N-Shc の全長構造を明らかにしてみると、p68-N-Shc にも p66-Shc と同様、リン酸化されうるセリンが散在し、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唆された(若尾、未発表)。N-Shc の生理機能を知るために、網膜視神経系の発達と視神経切断後の再生応答の過程での N-Shc の挙動を観察した。その結果、in vivo で神経栄養因子 BDNF 刺激下に N-Shc が活性化されることがわかった (Nakazawa et al., 2002)。この観察は、神経再生誘導時に in vivo で N-Shc シグナルが動くことを示した最初の発見である。

D. 考察

以上の結果から、N-Shc には Shc にはないユニークなシグナルアウトプットがあり CrkII に結合する事実からアクチン骨格再編に係わることが示唆されたが、p250 Rho-GAP/Grit の発見はそれを裏付け、N-Shc の細胞骨格制御においても機能することが確実になった。また、N-Shc が酸化ストレス下に神経細胞死から保護する作用があることもわかった。これらの発見は、N-Shc の新たな機能を示唆しただけでなく、Shc 関連分子が配列上は類似しているがそれぞれにしかないユニークな働きをすることを初めて示唆した点で重要である。

N-Shc はシグナルアダプターであるが、このように非常に広い範囲のシグナル伝達に

係わることが明かとなった。特に、細胞の酸化ストレス下には N-Shc が PKC delta を介して神経細胞死を阻止する働きがあることは、脳神経系の老化を考える上で重要な発見である。従って、今後、このような活性が脳の老化過程でどの程度維持されているかを見極めることが大事であろう。Shc 系分子の加齢変動とともに、このような N-Shc の機能活性を老化過程で比較検討することが次の課題であろう。

E. 結論

N-Shc は Shc にはないユニークなシグナルアウトプットがあり、神経骨格や神経細胞死の制御にも機能することが判明した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

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)

Ogawa E, Saito Y, Kuwahara K, Harada M, Miyamoto Y, Hamanaka I, Kajiyama N, Takahashi N, Izumi T, Kawakami R, Kishimoto I, Naruse Y, Mori N, and Nakao K Fibronectin signaling stimulates BNP gene transcription by inhibiting neuron-restrictive silencer element dependent repression. *Cardiovasc. Res.* 53 (2) 451-459 (2002)

- Tabuchi A, Yamada T, Sasagawa S, Naruse Y, Mori N, and Tsuda M REST4-mediated modulation of REST/NRSF silencing function during BDNF gene promoter activation. *Biochem. Biochim. Res. Commun.* 290, 415-420 (2002)
- Honma M, Namikawa K, Mansur K, Iwata T, Mori N, Iizuka H, and Kiyama H Developmental alteration of nerve injury induced glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) receptor expression is crucial for the determination of injured motoneuron fate. *J. Neurochem.* 82, 961-975 (2002).
- 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)
- 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.* 68, 668-680 (2002)
- Nakazawa T, Tamai M, and Mori N, Brain-derived neurotrophic factor protects axotomized retinal ganglion cell death via MAPK and PI3K signaling pathways, *Invest. Opth. Vis. Sci.*, 43 (10) 3319-3326 (2002)
- Nakamura T, Komiya M, Sone K, Hirose E, Gotoh N, Mori H, Ohta Y, and Mori N. Grit, a GTPase-activating protein for RhoA and Cdc42, regulates neurite extension through its association with TrkA receptor and N-Shc, CrkL/Crk adapter molecules. *Mol. Cell. Biol.* 22 (24) 8721-8734 (2002)
- Iwata T, Namikawa K, Honma M, Mori N, Yachiku S, and Kiyama H Increased expression of mRNAs for microtubule disassembly molecules during nerve regeneration. *Mol. Brain Res.* 102, 105-109 (2002)
- Honma M, Namikawa K, Mansur K, Iwata T, Mori N, Iizuka H, Kiyama H. Developmental alteration of nerve injury induced glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) receptor expression is crucial for the determination of injured motoneuron fate. *J. Neurochem* 82: 961-976 (2002)

総説

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 *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 *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 *実験医学* 20 (2) 367-375 (2002)

森 望：老化遺伝子 *医学のあゆみ* 200 (13) 1283-1284 (2002)

森 望：老化によるシグナル伝達異常：長寿命遺伝子 Shc の変異とその周辺機能 *生体の科学* 53 (5) 408-414 (2002)

Mori N and Morii H SCG10-related neuronal growth-associated proteins in neural development, plasticity, degeneration and aging. *J. Neurosci. Res.*, 70 (3) 264-273 (2002)

著書

森 望: 脳の老化と寿命制御 in 「老化研究がわかる」井出利憲 (編集) pp107-113 (羊土社) (2002)

Mori N: Neuronal gene regulation by the neural-restrictive silencer (NRS): Is catecholaminergic system excluded from the control by NRS? In *Catecholamine Research: From Molecular Insights to Clinical Medicine*, Nagatsu T and Nabeshima T eds., Kluwer Academic/Plenum Publishers, 205-208 (2002)

2. 学会発表 (抜粋)

N. Mori, From neuronal Shc to neuronal GAPs: Neural-specific signaling and growth components and their molecular interaction toward actin and microtubule dynamics. 第 25 回日本神経学会 (東京) 7 月 8 日 (2002)

森 望、Shc シグナリングによる神経分化、生存、再生応答と老化制御、山中湖カンファレンス、9 月 6—7 日 (2002)

森 望、Shc シグナルからみる老化と寿命制御、第 25 回日本分子生物学会 (横浜) 12 月 11—14 日 (2002)

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:

若尾りか (長寿科学振興財団/国立長寿医療研究センター/千葉大学医学部)

朱婉児 (長寿科学振興財団/国立長寿医療研究センター)

宮本嘉明 (長寿科学振興財団/国立長寿医療研究センター)

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

Shc と PKC シグナリングのクロストーク：
p38MAP キナーゼシグナリングにおける PKN の機能解析

小野功貴（神戸大学・バイオシグナル研究センター教授）

低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho の標的蛋白質の一つである蛋白質リン酸化酵素 PKN の p38 γ MAP キナーゼカスケードにおける役割を解析した。その結果、PKN は p38 γ MAP キナーゼの MAP キナーゼキナーゼキナーゼである MLTK を直接リン酸化し活性化するばかりでなく、p38 γ ・MKK6・MLTK のいずれにも結合し、このカスケードにおけるスキャフォールド蛋白質としても機能している可能性を示した。

キーワード： 蛋白質リン酸化酵素 PKN、MLTK、ストレス、p38MAP キナーゼ

A. 研究目的

最近、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 が、Rho の下流で細胞増殖制御に関する転写因子を p38MAP キナーゼを介して制御している可能性が示された。p38MAP キナーゼは、ストレス応答・細胞周期制御に関わっていることが知られており、また PKN もその制御に関連していることを報告している。そこで本研究では、どのような分子機構により PKN が p38MAP キナーゼ制御しているかについて解析することにより、PKN のストレス応答における生理的な機能解析の解明の一助にすることを目的とした。

B. 研究方法

精製した p38MAP キナーゼシグナリングに参与する各分子に PKN を作用させることにより p38MAP キナーゼシグナリングにおける PKN の影響を検討する。また、培養

細胞に p38MAP キナーゼシグナリングに参与する各分子の発現プラスミドおよび活性型 PKN 発現プラスミドを導入することにより、p38MAP キナーゼシグナリングにおける PKN の影響を検討すると同時に各分子の相互作用を検討する。

（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 と p38 γ MAP キナーゼの発現プラスミドを 293T 細胞に導入後 p38 γ MAP キナーゼを免疫沈降し、p38 γ MAP キナーゼの活性を検討したところ、PKN の共発現により p38 γ MAP キナーゼ活性が有意に上昇していた。この効果は、不活性型 PKN を共発現させたときには見られなかったことから PKN のリン酸化活性により p38 γ MAP キナーゼシグナリングが活性化されたと考えられた。PKN は、*in vitro* の実験により直接

p38 γ MAP キナーゼを活性化・リン酸化しなかったため、p38 γ MAP キナーゼシグナリングにおける各上流因子 (MAPKK として MKK6 および MAPKKK として MLTK α) について PKN の影響を検討したところ、PKN は MLTK α を直接リン酸化・活性化することが明らかとなった。また、高浸透圧によるストレスで MLTK α は活性化することが知られているが、この反応を不活性型 PKN が阻害することも示された。さらに、発現プラスミドの細胞への導入実験により PKN は、p38 γ MAP キナーゼ・MKK6・MLTK α のいずれの分子とも結合することが明らかとなった。

D. 考察

MAP キナーゼファミリーの中で p38MAP キナーゼファミリーは、特にストレス応答・細胞周期制御に関わっていることが知られている。一方、PKC 関連蛋白質リン酸化酵素である PKN もアポトーシスや細胞周期における G2/M 期の進行制御に関連していることが報告されている。これらの分子が、クロストークしながら外界からの刺激に応答している可能性、さらに PKN 自身がこのシグナリングカスケードにおいてスキャフォールド蛋白質としても機能している可能性が示されたことは、細胞増殖制御における新しい制御機構の存在を示したものであると考えられる。今後、これらのカスケードが細胞内で生理的な反応として機能しているかの検証が重要な課題となると考えられる。

E. 結論

PKN は p38 γ MAP キナーゼの MAP キナーゼキナーゼキナーゼである MLTK を直

接リン酸化し活性化するばかりでなく、p38 γ ・MKK6・MLTK のいずれにも結合し、このカスケードにおけるスキャフォールド蛋白質としても機能している可能性を示した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Calautti, E., Grossi, M., Mammucari, C., Aoyama, Y., Pirro, M., Ono, Y., Li, J., and Dotto, GP. Fyn tyrosine kinase is a downstream mediator of Rho/PRK2 function in keratinocyte cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.*, **156**, 137-48 (2002)

Takahashi, M., Yamagiwa, A., Nishimura, T., Mukai, H., and Ono, Y. Centrosomal proteins CG-NAP and Kendrin provide microtubule nucleation sites by anchoring γ -tubulin ring complex. *Mol. Biol. Cell* **13**, 3246-3256 (2002)

Sillibourne, J. E., Milne, D. M., Takahashi, M., Ono, Y., and Meek, D. W. Centrosomal anchoring of the protein kinase CK1 δ mediated by attachment to the large, coiled-coil scaffolding protein CG-NAP/AKAP450. *J. Mol. Biol.*, **322**, 785-797 (2002)

Takahashi, M., Gotoh, Y., Isagawa, T., Nishimura, T., Goyama, E., Kim, H.-S., Mukai, H., and Ono, Y. Regulation of a mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MLTK by PKN. *J. Biochem.*, **133**, 181-187 (2003)

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：
POSH シグナリング経路の解明

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、DPOSH (*Drosophila* Plenty of SH3s) は JNK/SAPK の標的遺伝子 (*puc*) を活性化する。酵母 2 ハイブリッドシステムにより DPOSH と相互作用する遺伝子として、ALG-2 および AIP1 を同定した。これらの遺伝子の過剰発現は何れも JNK/SAPK を活性化した。一方、Eiger (ショウジョウバエ TNF- α) によって引き起こされる細胞死は POSH, ALG-2, および AIP1 の何れかの機能低下型突然変異により抑圧された。これらの結果は、JNK 経路が寿命制御シグナリングの重要な要素であることを示唆した。

キーワード： 寿命遺伝子、TNF- α /Eiger、POSH、ALG-2、AIP1、JNK 経路

A. 研究目的

ショウジョウバエ長寿命変異体の原因遺伝子寿命決定機構を解明する手がかりとなる。強制発現スクリーニングによって長寿命を示した変異体の原因遺伝子 POSH 遺伝子と相互作用する遺伝子を探索し、寿命決定に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

遺伝子強制発現システムを用いて同定した長寿命変異体の原因遺伝子 DPOSH と相互作用する遺伝子を探索するために、酵母 2-ハイブリッドシステム (Clontech, USA) を用いた。ショウジョウバエ成虫 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、陽性クローンについて、cDNA の塩基配列を決定した。

相互作用する候補遺伝子 ALG-2 および AIP1 については、ゲノム配列に基づいて、それぞれの ORF 全長を含む cDNA を RT-PCR 法によりクローニングした。それぞれの 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。成虫複眼原基特異的に GAL4 を発現する GMR-GAL4 系統、あるいは翅原基の一部で GAL4 を発現する *ptc*-GAL4 系統と交配し、F1 個体における細胞死誘導効果を調べた。また、JNK 経路を活性化して細胞死を誘導する Eiger (ショウジョウバエ TNF- α) との相互作用を調べるために、発生過程の複眼原基 (GMR-GAL4)、または翅原基 (*ptc*-GAL4) における細胞死に及ぼす POSH, ALG2, および AIP1 の機能低下変異の影響を調べた。POSH の変異体としては、遺伝子の

一部を欠失させたもの、ALG-2は2重鎖RNA法を用いて機能低下させたもの、AIP1については両者の方法を用いて変異体を作製した。

(倫理面への配慮)

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

酵母 2-ハイブリッドシステムにおいて、陽性となったクローンの塩基配列を決定したところ、哺乳類の ALG-2 (Apoptosis-linked gene 2) と相同の配列であった。ALG-2 は T 細胞の細胞死を誘導する経路に必要な遺伝子の一つとして同定されている。EF ハンドをもつカルシウム結合タンパク質であり、AIP1 (ALG-2 interacting protein) とカルシウム依存的に結合することが知られている。AIP1 は SH3 ドメインに親和性をもつプロリンリッチ領域を有することから、4つの SH3 ドメインをもつ POSH は AIP1 を介して ALG-2 と相互作用する可能性を強く示唆した。このことを確認するために、ショウジョウバエ ALG-2、および AIP1 の cDNA をクローニングした。両遺伝子は発生過程を通して、広範囲に発現していた。培養細胞を用いたトランスフェクション実験により、POSH と ALG-2 はそれぞれ AIP1 のプロリンリッチ領域を介して結合することが確認された。生物学的な関連性を明らかにするために、UAS-ALG2, UAS-AIP1 を作製し、成虫複眼原基で発現させるところ、POSH の過剰発現と同様に細胞死を誘導した。また、これらの遺伝子の機能を低下させると、JNK 経路を活性化して細胞死を誘導する Eiger (ショウジョウバエ TNF- α) の

作用を抑圧することが示された。これらのことは、DPOSH は ALG-2 および AIP1 と協調して JNK 経路の活性化に関与していることを示唆した。

D. 考察

ショウジョウバエの POSH を成虫で強制発現させると寿命延長効果があるが、発生段階での強制発現はさまざまな形態学的異常を引き起こす。JNK 経路の突然変異体では、これらの作用が抑圧されることから、JNK 経路に関わっていることが示唆されていたが、その作用機構についてはほとんど不明であった。本研究では、まず酵母 2 ハイブリッドシステムを使って、POSH と相互作用する因子として ALG-2 を同定した。さらに、AIP1 が ALG-2、および POSH と相互作用することを確認した。

これら3つの遺伝子はいずれも強制発現によって、JNK 経路を活性化する。一方、先に GS システムを使った細胞死誘導因子のスクリーニングによって、ショウジョウバエ TNF- α ホモログである Eiger を同定した。Eiger の強制発現により、JNK 経路が強く活性化されて細胞死を引き起こす。POSH、ALG-2、AIP1 のいずれかの発現レベルを低下させることにより、Eiger による細胞死を有意に抑圧することは、これらの因子が Eiger と JNK 経路の間に存在することを強く示唆した。

E. 結論

ショウジョウバエの POSH 遺伝子産物はアポトーシス関連遺伝子 ALG-2 および AIP1 と協調して、Eiger によって誘導される JNK 経路の活性化に関与していることが明らかになった。このことは、寿命とアポトー

アポトーシス関連遺伝子 ALG-2 および AIP1 と協調して、Eiger によって誘導される JNK 経路の活性化に関与していることが明らかになった。このことは、寿命とアポトーシスシグナリング経路の間に密接な関連があることを強く示唆した。今後、アポトーシスシグナルにかかわる遺伝子に注目した寿命制御機構の研究への展開が期待される。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kaneuchi, T., Togawa, T., Matsuo, T., Fuyama, Y. and Aigaki, T. (2003) Efficient method for measurement of H₂O₂ resistance in *Drosophila*. *Biogerontology* (in press)

Fujise, M., Takeo, S., Kamimura, K., Matsuo, T., Aigaki, T., Izumi, S. and Nakato, H. (2003) Dally regulates Dpp morphogen gradient formation in the *Drosophila* wing. *Development* (in press)

Takehana, A., Katsuyama, T., Tamaki, Y., Oshima, Y., Takada, H., Aigaki, T. and Kurata, S. (2002): Overexpression of a pattern-recognition receptor, peptidoglycan-recognition protein-LE, activates imd/relish-mediated antibacterial defense and prophenoloxidase cascade in *Drosophila* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99: 13705-13710.

Aigaki, T., Seong, K.H., Matsuo, T. (2002): Longevity determination genes in *Drosophila*

melanogaster. *Mech.Age.Dev.* 123: 1531-1541.

Igaki, T., Kanda, H., Goto, Y., Kanuka, H., Kuranaga, E. Aigaki, T. and Miura, M. (2002): Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *EMBO J.* 21: 3009-3018.

Umemiya, T., Takasu, E., Takeichi, M., Aigaki, T. and Nose, A. (2002): Forked end: a novel transmembrane protein involved in neuromuscular specificity in *drosophila* identified by gain-of-function screening. *J. Neurobiol.*, 51: 205-214.

相垣敏郎 (2002) ポストゲノムのショウジョウバエ遺伝学, 生体の科学 53: 543 - 550.

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.

Toshiro Aigaki, Takumi Ogashiwa, Kihyeon Seong, Takashi Matsuo (2002): Molecular and genetic analysis of *Drosophila* thioredoxin mutants. *XIth Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International*. Paris, France July 16-20.

Togawa, T., Kaneuchi, Matsuo, Fuyama (2002) An efficient method for measurement of

oxidative stress resistance in *Drosophila*. XIth Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International, Paris, France July 16-20.

相垣敏郎 (2002) ショウジョウバエのゲノミクスと寿命研究 基礎老化学会シンポジウム講演 日本基礎老化学会第 25 回大会, つくば市

相垣敏郎 (2002) *Drosophila* Gene Search Project: 表現型情報のデータベース化と機能関連遺伝子探索ツールの開発. 日本発牛生物学会第 35 回大会, シンポジウム講演, 横浜

相垣敏郎 (2002) ショウジョウバエを用いた抗老化遺伝子の探索 日本分子生物学会第 25 回大会, 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-」講演, 横浜

13. 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

森 望 (主任研究者)

原著論文

- 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)
- Ogawa E, Saito Y, Kuwahara K, Harada M, Miyamoto Y, Hamanaka I, Kajiyama N, Takahashi N, Izumi T, Kawakami R, Kishimoto I, Naruse Y, Mori N, and Nakao K Fibronectin signaling stimulates BNP gene transcription by inhibiting neuron-restrictive silencer element dependent repression. *Cardiovasc. Res.* 53 (2) 451-459 (2002)
- Tabuchi A, Yamada T, Sasagawa S, Naruse Y, Mori N, and Tsuda M REST4-mediated modulation of REST/NRSF silencing function during BDNF gene promoter activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 415-420 (2002)
- Honma M, Namikawa K, Mansur K, Iwata T, Mori N, Iizuka H, and Kiyama H Developmental alteration of nerve injury induced glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) receptor expression is crucial for the determination of injured motoneuron fate. *J. Neurochem.* 82, 961-975 (2002).
- 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)
- 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.* 68, 668-680 (2002)
- Nakazawa T, Tamai M, and Mori N. Brain-derived neurotrophic factor protects axotomized retinal ganglion cell death via MAPK and PI3K signaling pathways. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, 43(10)3319-3326 (2002)
- Nakamura T, Komiya M, Sone K, Hirose E, Gotoh N, Morii H, Ohta Y, and Mori N. Grit, a GTPase-activating protein for RhoA and Cdc42, regulates neurite extension through its association with TrkA receptor and N-Shc, CrkL/Crk adapter molecules. *Mol. Cell. Biol.* 22 (24) 8721-8734 (2002)
- Iwata T, Namikawa K, Honma M, Mori N, Yachiku S, and Kiyama H Increased expression of mRNAs for microtubule disassembly molecules during nerve regeneration. *Mol. Brain Res.* 102, 105-109 (2002)
- Honma M, Namikawa K, Mansur K, Iwata T, Mori N, Iizuka H, Kiyama H. Developmental alteration of nerve injury induced glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) receptor expression is crucial for

the determination of injured motoneuron fate. *J Neurochem* 82: 961-976 (2002)

総説

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
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
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 *実験医学* 20 (2) 367-375 (2002)

森 望：老化遺伝子 *医学のあゆみ* 200 (13) 1283-1284 (2002)

森 望：老化によるシグナル伝達異常：長寿命遺伝子 Shc の変異とその周辺機能 *生体の科学* 53
(5) 408-414 (2002)

Mori N and Morii H SCG10-related neuronal growth-associated proteins in neural development, plasticity,
degeneration and aging. *J. Neurosci. Res.*, 70 (3) 264-273 (2002)

著書

森 望：脳の老化と寿命制御 in 「老化研究がわかる」井出利憲 (編集) pp107-113 (羊土社)
(2002)

Mori N: Neuronal gene regulation by the neural-restrictive silencer (NRS): Is catecholaminergic system
excluded from the control by NRS? In **Catecholamine Research: From Molecular
Insights to Clinical Medicine**, Nagatsu T and Nabeshima T eds., Kluwer Academic/Plenum
Publishers, 205-208 (2002)

小野功貢 (分担研究者)

原著論文

Calautti, E., Grossi, M., Mammucari, C., Aoyama, Y., Pirro, M., Ono, Y., Li, J., and Dotto, GP. Fyn
tyrosine kinase is a downstream mediator of Rho/PRK2 function in keratinocyte cell-cell adhesion.
J. Cell Biol., 156, 137-48 (2002)

Takahashi, M., Yamagiwa, A., Nishimura, T., Mukai, H., and Ono, Y. Centrosomal proteins CG-NAP
and Kendrin provide microtubule nucleation sites by anchoring g-tubulin ring complex. *Mol.
Biol. Cell*, 13, 3246-3256 (2002)

Sillibourne, J. E., Milne, D. M., Takahashi, M., Ono, Y., and Meek, D. W. Centrosomal anchoring of
the protein kinase CK1d mediated by attachment to the large, coiled-coil scaffolding protein CG-
NAP/AKAP450. *J. Mol. Biol.*, 322, 785-797 (2002)

Takahashi, M., Gotoh, Y., Isagawa, T., Nishimura, T., Goyama, E., Kim, H.-S., Mukai, H., and Ono, Y.
Regulation of a mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MLTK by PKN. *J. Biochem.*, 133,
181-187 (2003)

相垣敏郎 (分担研究者)

原著論文

Kaneuchi, T., Togawa, T., Matsuo, T., Fuyama, Y. and Aigaki, T. (2003) Efficient method for
measurement of H₂O₂ resistance in *Drosophila*. *Biogerontology* (in press)

Fujise, M., Takeo, S., Kamimura, K., Matsuo, T., Aigaki, T., Izumi, S. and Nakato, H. (2003) Daily
regulates Dpp morphogen gradient formation in the *Drosophila* wing. *Development* (in press)

Takehana, A., Katsuyama, T., Tamaki, Y., Oshima, Y., Takada, H., Aigaki, T. and Kurata, S. (2002):
Overexpression of a pattern-recognition receptor, peptidoglycan-recognition protein-LE, activates
imd/relish-mediated antibacterial defense and prophenoloxidase cascade in *Drosophila* larvae. *Proc.*
Natl. Acad. Sci., 99: 13705-13710.

Igaki, T., Kanda, H., Goto, Y., Kanuka, H., Kuranaga, E., Aigaki, T. and Miura, M. (2002): Eiger, a TNF
superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *EMBO J.* 21: 3009-3018.

Umemiya, T., Takasu, E., Takeichi, M., Aigaki, T. and Nose, A. (2002): Forked end, a novel
transmembrane protein involved in neuromuscular specificity in *Drosophila* identified by gain-of-
function screening. *J. Neurobiol.*, 51: 205-214.

総説

Aigaki, T., Seong, K.H., Matsuo, T. (2002): Longevity determination genes in *Drosophila melanogaster*.
Mech.Age.Dev. 123: 1531-1541.

相垣敏郎 (2002) ポストゲノムのショウジョウバエ遺伝学, 生体の科学 53: 543-550.