

20030223

厚生労働科学研究補助金  
長寿科学総合研究事業

平成15年度 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16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 参事研究員)

## 目 次

### I. 総括・分担研究報告

1. 長寿マウスの作製 白澤卓二 東京都老人総合研究所
  1. インスリン受容体変異マウスにおけるカロリー制限の試み 1  
馬場智規 小河原緑 森泉栄子 清水孝彦 白澤卓二  
東京都老人総合研究所
  2. 膵臓β細胞特異的 MnSOD 特異的欠損マウスの解析 5  
川上哲 清水孝彦 白澤卓二 東京都老人総合研究所
  3. 寿命関連遺伝子 clk-1 欠損マウスにおけるアポトーシスの誘導 8  
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
2. Mn-SODによる寿命制御機構 11  
本田修二 本田陽子 東京都老人総合研究所
3. 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 14  
安井 明 東北大学加齢医学研究所
4. ポリコーム群タンパク複合体の構造と機能 18  
古関明彦 千葉大学大学院発生生物学
5. 長寿遺伝子探索のための遺伝子多型解析応用の検討 23  
村松正明 (東京医科歯科大学難治疾患研究所)

### II 研究成果の刊行に関する一覧表 25

## インスリン受容体変異マウスにおけるカロリー制限の試み

研究分担者 馬場智規 小河原緑 森泉栄子 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

カロリー制限は酸化防御能を増強し、個体寿命も延長させることが知られている。我々の作製したインスリン受容体変異マウスは、酸化ストレス耐性能を獲得し、脂肪が特異的に減少することで体重が減少していた。この特異的な脂肪減少は食餌制限による結果ではなかったため、インスリン受容体変異マウスにカロリー制限を行うことでインスリンシグナルとの作用機構にどのような交差性を認めるか検討した。前実験として、4匹飼育条件で間欠給餌による60%カロリー制限を開始した。その結果、雌では生育障害や競合もなくカロリー制限が可能であったが、雄で生存競争が起こり体の小さいインスリン受容体変異マウスが死亡し始めることが判明し、実験の継続が困難となった。これらの結果から雄の場合は単独飼育によるカロリー制限が必要であると結論された。

### A. 研究目的

我々の作製したインスリン受容体変異マウスは、酸化ストレス耐性能（高酸素負荷実験およびパラコート投与実験）を獲得していることが判明している。一方、カロリー制限によって酸化防御能が増強し、寿命が延長することが知られている。本研究では、インスリンシグナルとカロリー制限による寿命シグナルの間に交差性があるのか明らかにすることが目的である。

### B. 研究方法

#### 食餌摂取量

1ケージにつき1匹の16週齢のインスリン受容体変異マウスを飼育し、餌の摂取量を測定した。また、16週齢、50週齢、60週齢マウスを1ケージにつき4匹で飼育し、餌の摂取量を測定した。

#### カロリー制限

生後4週齢より遺伝子型に関わらず無作為に4匹飼いとし、16週齢よりカロリー制限(CR)を行った。カロリー制限開始1週間は、餌の自由摂取(AL)量の90%を与えた。それ以降、1週毎に10%ずつ給餌量を制限していき、4週後に給餌量をカロリー制限の設定値である60%とした。

最終的に自由摂取量の60%量に食餌制限されたマウス(60%カロリー制限群)について検討した。給餌は月曜日(2日分)、水曜日(2日分)、金曜日(3日分)の週3回行った。

#### 体重測定

生後4週より4週毎に体重測定を行った。カロリー制限による体重減少が、野生型マウスと比較してインスリン受容体変異マウスで、どのような変化を及ぼすか検討するため、カロリー制限群でも同様に4週毎に体重測定を行った。

### C. 研究結果および考察

#### インスリン受容体変異マウスは脂肪が特異的に減少している

インスリン受容体変異マウスは酸化ストレス耐性能を獲得していたので、カロリー制限や脂肪特異的インスリン受容体欠損マウスと同様に体重が減少している可能性がある。そこで体重および各臓器の重量を比較検討した(図1a)。その結果、インスリン受容体変異マウスは野生型マウスに比べて雌で9.9%、雄で10.0%体重が減少していた。各臓器で比較すると脂肪が特異的に減少していることが判明した(図1b)。

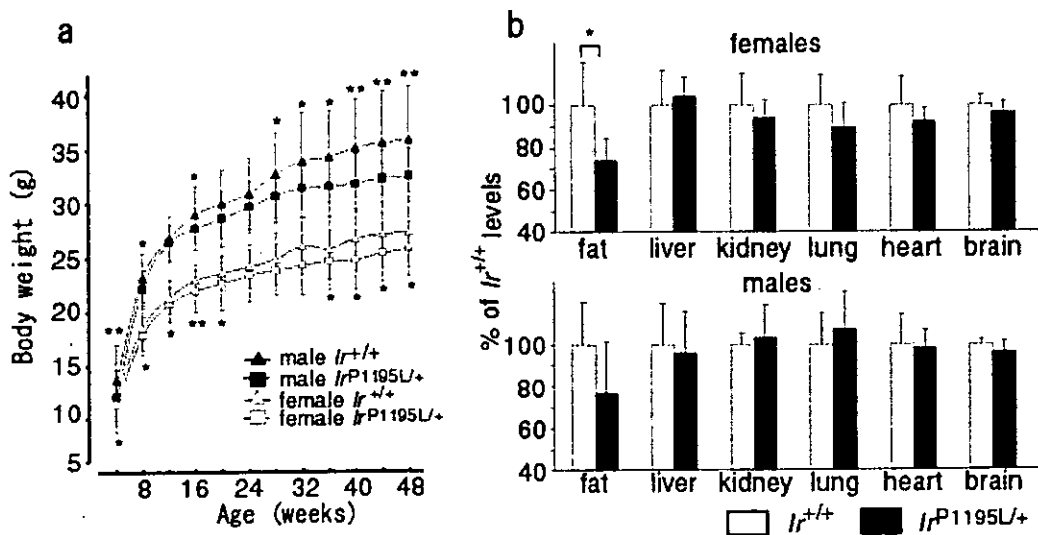


図1 体重と臓器別重量の比較

### インスリン受容体変異マウスの食餌摂取量は野生型マウスと変わらない

変異マウスにおいて、食餌摂取量の低下によって結果的にカロリー制限になっている可能性があるため、無作為に選んだ週齢のマウスで食餌摂取量の検討を行った。

1匹飼いの16週齢マウスにおける1日の食餌摂取量を比較した(図2a)。その結果、遺伝子型間および雌雄間に差は認めなかった(雌;インスリン受容体変異マウス:野生型マウス=3.45g:3.37g,雄;インスリン受容体変異マウス:野生型マウス=3.57g:3.54g)。一方、4匹飼いの16週齢マウスにおける1日の食餌摂取量は遺伝子間に差は認められなかったが、雄の方が多く摂取する傾向にあった(雌;インスリン受容体変異マウス:野生型マウス=3.21g:3.15g,雄;インスリン受容体変異マウス:野生型マウス=3.39g:3.29g,図2b)。このように遺伝子型間では食餌摂取量に差はなかったため、インスリン受容体変異マウスで観察された体重減少は食餌摂取量の減少によるものではないことが明らかとなった。また、4匹飼いをすると食餌摂取量は1匹飼いと比べて減少する傾向にあるが有意差は認めなかった。さらに、加齢によ

る食餌摂取量の変動を調べるために、4匹飼いの50週齢と60週齢のマウスに対して、1日の食餌摂取量を比較した(図2c)。その結果、50週齢マウス、60週齢マウスはともに雄の摂取量が多い傾向にあったが、16週齢マウスの摂取量とほぼ同量であった。つまり、16週齢から60週齢までの間は、食餌摂取量はほとんど変化せず、さらに、遺伝子型による差もないことが示唆された。

### カロリー制限

インスリン受容体変異マウスは食餌制限することなく、脂肪特異的に体重が減少していた。そのため、このマウスにカロリー制限をすることにより、体重減少の変化を検討した。一般に、マウスでは、カロリーを60%制限することにより寿命延長の効果が最大になることが知られているので、インスリン受容体変異マウスにおいてもそれに準じてカロリー制限を行った。また、餌の投与方法、何匹飼いが適当であるのか実際のところ不明な点が多かったため、2日に1度の給餌および4匹飼いで実験を行った。

60%カロリー制限(CR)した雌マウスの体重曲線を示す(図3a)。自由食群(AL)の体重と比較すると、インスリン受容体変異マウスの体重は、16.9%減少し、野生

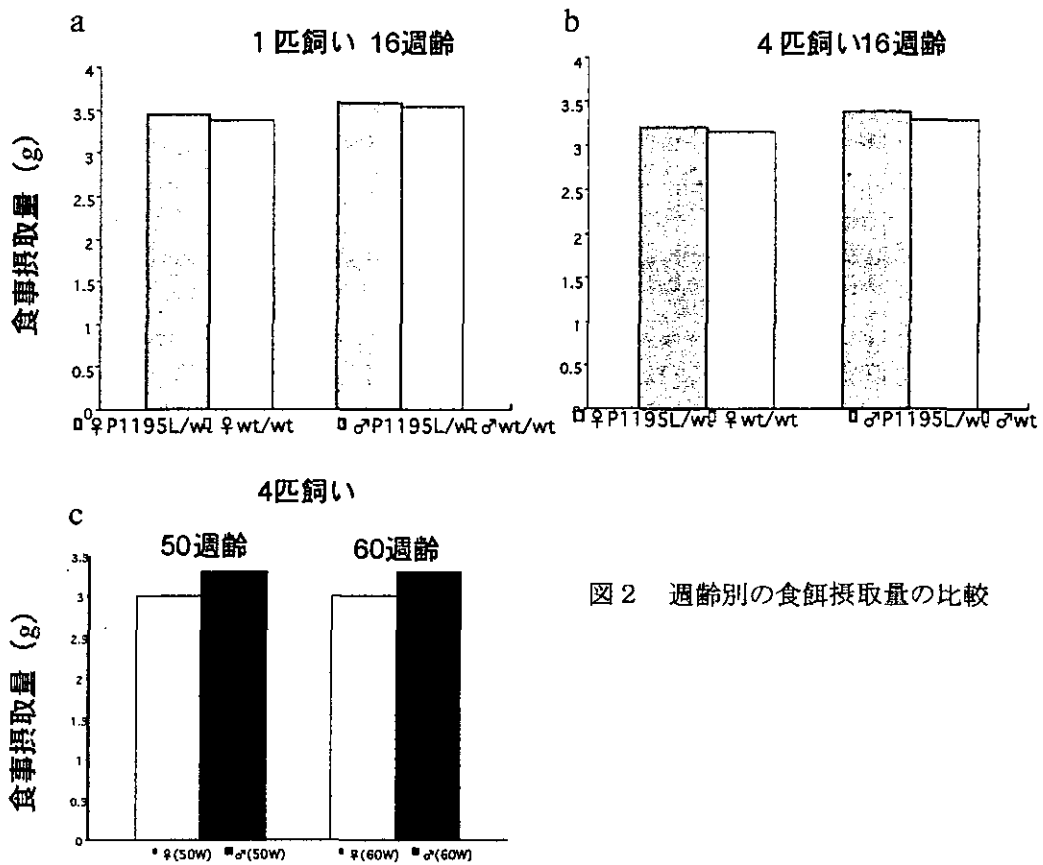


図2 週齢別の食餌摂取量の比較

型マウスは18.6%減少した。一方、60%カロリー制限した雄マウスでは、自由食群の体重と比較すると、インスリン受容体変異マウスの体重は、29.0%減少し、野生型マウスは25.3%減少した(図3b)。

しかしながら、雄でカロリー制限によって34匹中3匹が死亡した。その全てがインスリン受容体変異マウスであり、55週から60週にかけて急激に体重が減少し死亡していた。このことから、60%カ

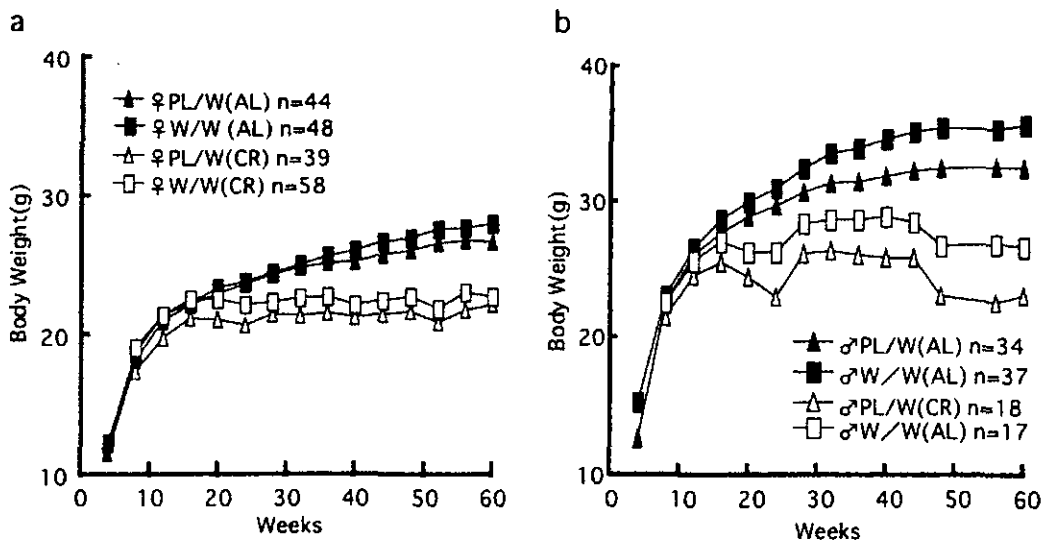


図3 60%カロリー制限の比較

カロリー制限下の厳しい状況の中では、体の小さいインスリン受容体変異マウスは4匹飼いの条件下では餌を他のマウスに奪われてしまい、必要量摂取できないことが推測された。実際に死亡したマウスと同ケージのマウスはカロリー制限しているにもかかわらず体重が増加していた(data not shown)。これらの結果から雄の場合、4匹飼いの厳しいカロリー制限下では、生存競争が発生してしまう為、実験の続行が困難であると考えられた。今後は、1匹飼いでカロリー制限を行う予定である。雌では、4匹で飼育することに現在のところ弊害はない。しかしながら、4匹飼いと1匹飼いの比較では自由食群において体重の増加に差が生じてしまい、4匹飼いでは1匹飼いよりも体重増加しないことが判明した。したがって4匹飼いで実験を進めた場合、1匹飼いに比べてカロリー制限の効果が低くなる可能性がある。最終的には雌でも1匹飼いでカロリー制限を行うことが理想的であると考えられた。

#### D. 今後の展開

4匹飼いにおいてはカロリー制限が雄で困難なことが判明したので、今後は1匹飼いで再度カロリー制限を行う。また、最終的に、酸化ストレスおよび寿命を検討することによりインスリンシグナルとカロリー制限の交差性を検討する。

#### E. 研究発表

馬場智規、清水孝彦、小河原緑、黒澤尚、白澤卓二：インスリンシグナルのおける性差。第26回日本分子生物学会、神戸、2003。

#### F. 知的所有権の取得

なし

## 膵臓β細胞特異的 MnSOD 特異的欠損マウスの解析

研究分担者 川上哲 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

個体の老化は、活性酸素によるタンパク質や DNA、脂質などの生体成分への酸化ストレスの蓄積の結果によるところが大きいと考えられている。特に糖尿病、動脈硬化、アルツハイマー病など加齢依存的に発症する疾患と活性酸素との関係が考察されている。MnSOD はミトコンドリアマトリクスに局在し、ATP の産生過程で漏れ出てくる活性酸素種の  $O_2^-$  を  $H_2O_2$  に変換する酵素である。我々は成体組織における  $O_2^-$  の影響を長期的に解析するために、Cre-loxp system を用いて組織特異的な MnSOD 欠損マウスを作製した。本研究ではラットインスリンプロモーターの制御下で Cre リコンビナーゼを膵臓β細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスと MnSOD flox マウスを交配することにより膵臓β細胞特異的 MnSOD 欠損マウス (βKO マウス) を作製し、活性酸素が糖尿病発症の原因因子となり得るかどうか検討を行った。

### A. 研究目的

2003 年 8 月、厚生労働省は日本における推定糖尿病罹患患者人口が 1600 万人を超えたと発表した。日本において糖尿病が急増した要因としては、食生活の欧米化、生活習慣の変化が第一に挙げられる。しかし日本人の糖尿病患者は欧米人の患者と比較して肥満度は有意に低い。またインスリン抵抗性を代償するインスリン分泌能力を障害されやすい遺伝的素因が存在していると考えられているが、その実体は明らかではない。加齢依存的に増加傾向を示すこの疾患は、現在の高齢社会を考えると、予防または治療法を確立することが急務となっている。

1956 年に D. Harman は老化は活性酸素による酸化ストレスが原因であるとする活性酸素説 (free radical theory of aging) を提唱した。これまでもいくつかこの仮説を支持する報告がなされている。また加齢依存的疾患についても活性酸素が原因であるとする説が提唱されており、これは酸化ストレスによるダメージの蓄積が組織、臓器を傷害し、生理

機能の低下を引き起こすという説である。加齢依存的疾患として、特に糖尿病、動脈硬化、アルツハイマー病などについて酸化ストレスとの関わりが考察されているが、個体レベルで実証されているものはない。

膵臓β細胞は MnSOD をはじめとして酸化酵素の発現、酵素活性が共に他の臓器と比べて低いことが報告されており、酸化ストレスに対する感受性が高いと考えられている。ヒトの mtDNA は 16569 bp から成り、37 遺伝子をコードしている。ヒトではミトコンドリアが糖尿病の原因となっている例で、β細胞やグルカゴンを分泌するα細胞の mtDNA の A3243G 点変異がよく知られている。また糖尿病モデルである GK ラットにおいて、酸化ストレスの指標である 8-OHdG が血中で増加してくるなど活性酸素との関連が示唆されている。しかしながら、これらはすでに糖尿病を発症したヒトやモデル動物の血中成分を調べた結果であって直接的に活性酸素の発生増加によるβ細胞の障害と糖尿病の発症を結びつける決定的な証

拠ではない。

そこで本研究では、活性酸素が糖尿病発症の原因因子となり得るかどうかを検討するために rat insulin II promoter (以下、RIP と省略) の制御下で Cre リコンビナーゼを膵臓β細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスと MnSOD flox マウスを交配し、膵臓β細胞特異的 MnSOD 欠損マウス (βKO マウス) の作製を試みた。

## B. 研究方法

Cre-loxp system を用いてβKO マウスを作製した。このマウスを用いて、糖負荷試験 (絶食 14 時間後、グルコースを 2g/kg の濃度で腹腔内投与し、投与後 0 分、15 分、30 分、60 分、120 分後の血糖を測定) 抗グルカゴン、抗インスリン抗体を用いての免疫組織化学染色、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 NADH oxidase、Succinate dehydrogenase (以下、SDH と省略)、Cytochrom c oxidase (以下、COX と省略) の活性染色を行った。また、デジタル顕微鏡を用いてランゲルハンス島の面積を測定した。

## C. 研究結果と考察

定常時における血糖値、血中インスリン濃度には、対照マウスと有意な差は見られなかった。抗インスリン抗体を用いた免疫組織化学染色によりβKO マウスのランゲルハンス島でインスリンが合成されていることが確認できた (図 1)。しかしグルコース負荷試験を行ったところ、βKO マウスでは血糖値の低下に遅延が認められ、潜伏期・境界型糖尿病状態であることが判明した (図 2)。

βKO マウスの定常時における血中インスリン濃度は対照マウスと有意な差はなく、糖負荷試験を行うと血糖値低下に遅延が現れたことから、インスリン分泌に

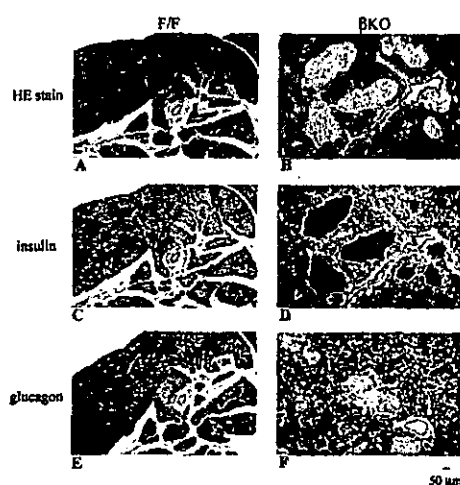


図 1 免疫組織化学染色  
上段: HE 染色 中段: インスリン 下段: グルカゴン。インスリン、グルカゴンの合成に障害なし

障害が出ていると考えられた。初期相インスリン分泌はβ細胞における糖代謝により合成された ATP が深く関係している。β細胞内で合成された ATP は ATP 依存のカリウムチャンネルを閉鎖し、細胞膜に脱分極を引き起こす。これにより電位依存的カルシウムチャンネルからカルシウムが細胞内に取り込まれ、インスリン分泌顆粒の開口放出が起きる。よって細胞内へ

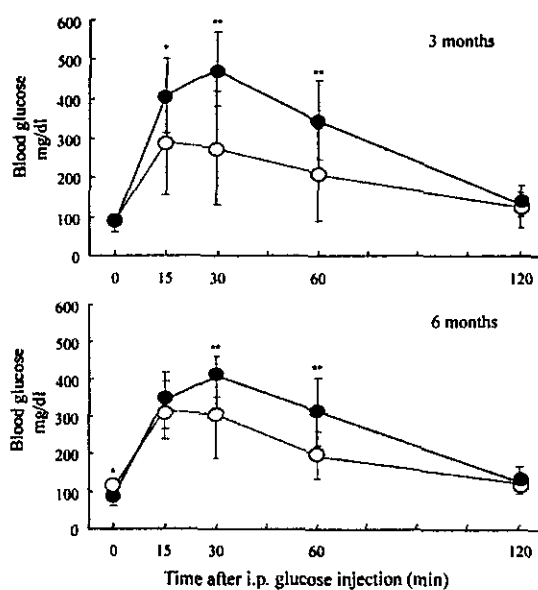


図 2 糖負荷試験  
上段: 3ヶ月齢 下段: 6ヶ月齢 両月齢において血糖低下に遅延が認められた \*p < 0.05  
\*\* p < 0.01



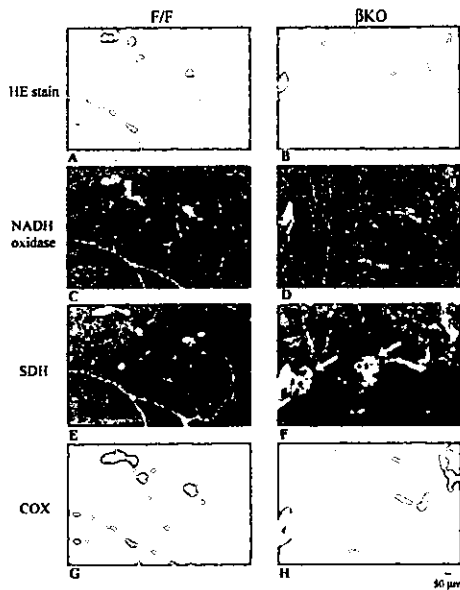


図3 呼吸鎖酵素複合体活性染色  
βKO マウスのランゲルハンス島において NADH oxidase、COX の活性はコントロールと比較して変化はなかったが、SDH 活性(矢印)が顕著に低下していた

のカルシウムの取り込みまでの経路に何かしらの障害がでていたことが示唆された。またミトコンドリア呼吸鎖複合体の活性染色を行ったところ、SDH の活性が顕著に低下していることが判明した(図3)。これらの結果は、MnSOD を欠損したことによりミトコンドリア呼吸鎖酵素複合体が酸化ストレスを受け、機能低下を起こしたものによると考えられた。またβKO マウスのランゲルハンス島は過形成しており、これは糖負荷時のインスリン分泌低下を代償するために起きたのではないかと考えられた(図4)。

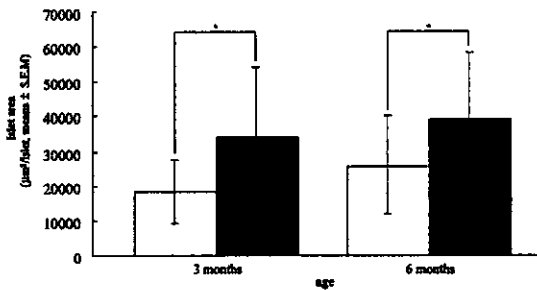


図4 ランゲルハンス島面積  
左: 3ヶ月齢 右: 6ヶ月齢 βKO マウスのランゲルハンス島は両月齢でコントロールと比較して約 1.5 倍過形成していた \*p < 0.01

以上のことから、MnSOD は糖尿病感受性遺伝子であり、β細胞において MnSOD を欠損すると、インスリン分泌に障害が生じることが示唆された。

#### D. 結論

膵臓β細胞特異的 MnSOD 欠損マウスを作製し、表現型の解析を行った。免疫組織化学染色の結果から、βKO マウスのランゲルハンス島では正常なインスリン、グルカゴンの合成が認められた。しかしながら、糖負荷試験を行うと血糖の低下に遅延が観察され、インスリンの分泌に障害が起きていることが示唆された。以上からβKO マウスは潜伏期・境界型糖尿病であることが判明した。またランゲルハンス島の SDH の活性が顕著に低下し、過形成をおこしていることも明らかとなった。

今後は糖負荷時のインスリン分泌についての詳細を明らかにすると共に、食事負荷実験(ショ糖負荷、高脂肪食負荷)を行い持続的に高血糖状態として糖尿病への移行が早まるか観察する必要がある。さらに SOD mimetics 化合物の投与により耐糖能異常、ミトコンドリア機能障害が治療、改善されるかどうか検討する予定である。

#### E. 研究発表

##### 学会発表

川上哲、清水孝彦、池上隆司、白澤卓二：  
膵臓β細胞特異的 MnSOD 欠損マウスの解析、第 26 回日本分子生物学会、神戸ポートアイランド、2003. 12. 10~13

## 寿命関連遺伝子 clk-1 欠損マウスにおけるアポトーシスの誘導

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

### 研究要旨

clk-1 欠損マウスの胎生致死の原因がアポトーシスであるか検討した。

JC-1 による蛍光染色によりホモ欠損マウス由来細胞は、ミトコンドリアの膜電位を維持してはいるものの野生型に比べ有意に低いことがわかった。ホモ欠損マウス由来の細胞ではアポトーシスの指標であるチトクローム C の細胞質における局在と核の断片化が確認された。また胎児の組織切片においても、TUNEL陽性細胞が多数観察された。これらの結果から clk-1 欠損マウスはミトコンドリア機能低下に由来するアポトーシスが全身の細胞に誘導され、胎生致死となることが強く示唆された。

### A. 研究目的

線虫で発見された長寿命変異体の原因遺伝子 clk-1 が哺乳動物においても寿命に関与するか調べるために clk-1 欠損マウスを作製したところホモ欠損マウスは胎生致死であった。Clk-1 遺伝子産物がミトコンドリア電子伝達系のユビキノンの合成酵素であることから、胎生致死は細胞のアポトーシスが原因である可能性が示唆された。そこで哺乳動物において clk-1 遺伝子欠損がアポトーシスを誘導するか否かを明らかにする事を目的として研究を行った。

### B. 研究方法

ミトコンドリアの膜電位を測定する為、胎生 10.5 日の胎児の細胞を JC-1 (Molecular Probe 社製) で蛍光染色し、共焦点顕微鏡 (Zeiss 社製, Pascal) を用いて 590 nm (赤色蛍光, 膜電位 > 190 mV) と 530 nm (緑色蛍光, 膜電位 < 100 mV) の蛍光強度を測定し、両者の比 (590/530)

を求めて野生型マウスとホモ欠損マウスで比較した。

チトクローム C の細胞内局在は、抗チトクローム C 抗体による免疫細胞染色を行い、蛍光顕微鏡により観察した。

アポトーシスによる核の凝縮および断片化は E10.5 日の胎児の細胞をヘキストにより蛍光染色、染色体 DNA の断片化は胎児のパラフィン切片を TUNEL 法により染色することで調べた。

### C. 研究結果

E10.5 の胎児の細胞を JC1 染色した結果、ホモ欠損マウス由来の細胞は、主として緑に、野生型マウス由来細胞は赤に蛍光染色された (図 1)。蛍光強度の比を計算した結果、ホモマウス由来の細胞の膜電位は野生型マウス由来細胞に比べ有意に低かった (図 2)。

次にミトコンドリア由来のアポトーシスの可能性を検討する為、チトクローム C の細胞内局在を調べた結果、野生型の

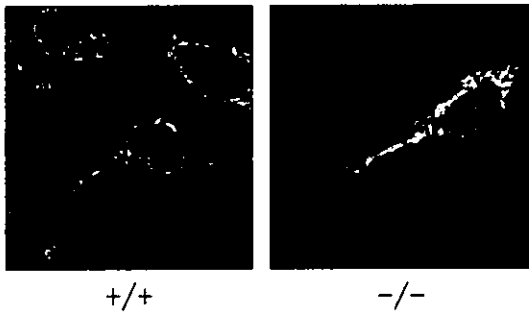


図1 JC-1による蛍光染色

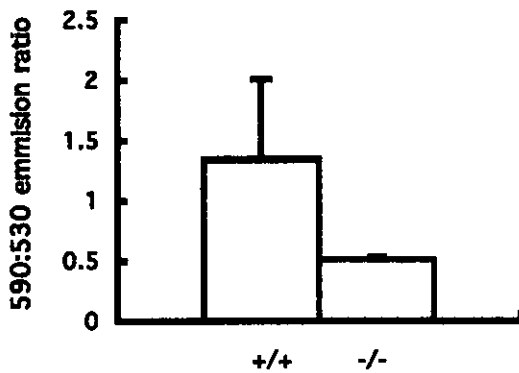


図2 whole embryonic cell の  
ミトコンドリア膜電位

細胞ではミトコンドリアパターンに染色されたのに対し、ホモ細胞では細胞質全体が染色された。さらにヘキストによる蛍光染色により、ホモ細胞ではアポトーシスに特徴的な歪で凝縮、断片化した核が多数認められた(図3)。またE10.5胎児の組織切片をTUNEL染色した結果、TUNEL陽性細胞が全身のあらゆる部位で観察された。

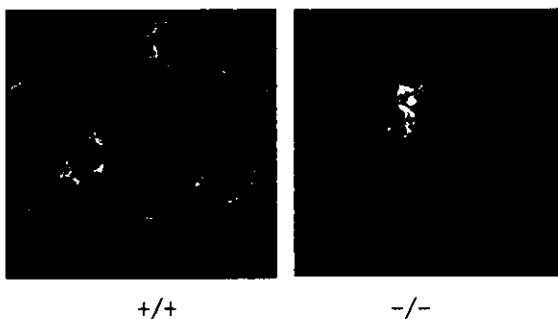


図3 チトクロームCの細胞内局在と核の断片化

#### D. 考察

clk-1 遺伝子はミトコンドリア電子伝達体であるユビキノンの合成酵素であり、clk-1 欠損マウスではユビキノンは全く合成されず、前駆体であるデメトキシユビキノンは存在している(前年度報告)。今回の研究によりデメトキシユビキノンのみならず電子伝達系が回っていることが、JC-1による蛍光染色で明らかになったが、正常な高い膜電位を維持するには不十分と考えられた。また、ヘキスト染色やTUNEL法による染色結果から、clk-1 欠損マウスでは、全身の細胞にアポトーシスが誘導されており、その直接原因が clk-1 欠損によるミトコンドリア膜電位の低下である可能性が示唆された。すなわち clk-1 欠損マウスの細胞では、ミトコンドリアの膜電位の低下が引き金となり、ミトコンドリアから細胞質へのチトクロームCの放出が起こり、全身にアポトーシスが誘導され、最終的に胎生致死になることが示唆された。

線虫ではユビキノンは欠失した大腸菌を餌として飼育した clk-1 変異線虫が、幼虫期に死ぬことから、哺乳動物だけでなく線虫でも、clk-1 遺伝子が発生初期に必須の遺伝子であると考えられる。反対に clk-1 変異線虫では正常な大腸菌を餌として飼育した場合、あるいは成虫になってからユビキノンを欠失した大腸菌を餌として飼育した場合には寿命の延長が見られる。従って哺乳動物における clk-1 遺伝子の寿命に対する役割を検討する為には、生後、遺伝子機能を喪失するように操作した clk-1 遺伝子をマウス

に導入し、検討する必要があると考える。

#### E. 結論

Clk-1 欠損マウスではミトコンドリア膜電位の低下に起因する全身細胞でのアポトーシスが直接原因となって、胎生致死にいたることが示唆された。

#### F. 学会発表

高橋真由美、中井大輔、野尻英俊、小池秀雄、森泉栄子、白沢卓二：哺乳動物における Coq7/clk-1 遺伝子の生物学的機能、日本分子生物学会第 26 回大会

## 研究課題名： Mn-SODによる寿命制御機構

本田修二、東京都老人総合研究所アイソトープ部門、研究員  
本田陽子、東京都老人総合研究所、流動研究員

### 研究要旨

線虫*C. elegans*の長寿命変異体*daf-2*（インスリン受容体ファミリー）の長寿の機構にMn-SODが関与する可能性を確かめるために、2つのMn-SODアイソフォーム（*sod-2*、*sod-3*）の遺伝子欠損変異体および両者の二重変異体を作製し、*daf-2*変異体と二重及び三重変異体にし、酸化ストレス感受性、老化速度および寿命、耐性幼虫形成等の表現形質の解析を行った。さらに*sod-2*と*sod-3*遺伝子産物の発現部位を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、*daf-2*と*sod-2*及び*sod-3*の二重変異体の酸化ストレス感受性は、それぞれ*daf-2*変異体に比べて大きく変化せず、*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すこと、*sod-2*；*daf-2*変異体の寿命は*daf-2*変異体の寿命よりも短縮し、*daf-2*；*sod-3*変異体、及び*sod-2*；*daf-2*；*sod-3*変異体の寿命は*daf-2*変異体の寿命よりも延長すること、これらの表現型は*sod-2*と*sod-3*遺伝子の導入により回復することがわかった。また長寿命変異体*daf-2*における長寿命や耐性幼虫形成の亢進という表現型において、これらのSOD遺伝子の欠損は*sod-2*は抑制し、*sod-3*は促進するという相反する反対の作用を示すことが明らかになった。以上より*daf-2*変異体における寿命の表現型は酸化ストレス耐性の表現型と一致せず、酸化ストレスに弱い変異体でも長寿命の表現型を示す場合があること、線虫の*sod-2*と*sod-3*遺伝子はそれぞれ頭部の異なる神経細胞で発現して協同作業により酸化ストレスの防御にあたっており、両者は酸化ストレス耐性の決定に重要な役割を持つことが示された。

### A. 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。

### B. 研究方法

長寿命変異体*daf-2*の長寿の機構にMn-SODが関与する可能性を確かめるために、以下の実験を行った。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。それらを*daf-2*（インスリン受容体ファミリー）変異体と二重及び三重変異体にし、酸化ストレス感受性、老化速度および寿命、耐性幼虫形成等の表現形質の解析を行った。さらにそれぞれの二重変異体に*sod-2*と*sod-3*遺伝子を微量注入法により導入して過剰発現させ、表現型の回復が認められるか検討した。さらに比較のため、Mn-SOD変異体以外の酸化ストレス高感受性である*mev-1*（チトクロームbサブユニット）及び*mek-1*（MAPKKホモログ）変異体と*daf-2*変異体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た。発現調節領域を含む*sod-2*と*sod-3*ゲノム遺伝子の下流にマーカータンパク質RFP（赤色蛍光タンパク質）とGFP（緑色蛍光タンパク質）をそれぞれ結合させて線虫に遺伝子導入し、融合タンパク質の発現部位を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

### C. 結果

長寿命変異体 *daf-2* と *sod-2* 及び *sod-3* の二重変異体の酸化ストレス感受性は、それぞれ *daf-2* 変異体に比べて大きく変化しなかった。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。これに対し *sod-2*; *daf-2* 変異体の寿命は *daf-2* 変異体の寿命よりも短縮し、*daf-2*; *sod-3* 変異体、及び *sod-2*; *daf-2*; *sod-3* 変異体の寿命は *daf-2* 変異体の寿命よりも延長した。これらの表現型は *sod-2* と *sod-3* 遺伝子の導入により回復した。これらの結果から *daf-2* 変異体における寿命の表現型は酸化ストレス耐性の表現型と一致せず、酸化ストレスに弱い変異体でも長寿命の表現型を示す場合があることがわかった。同様の結果が *daf-2*; *mev-1* 変異体、及び *daf-2*; *mek-1* 変異体においても認められた。一方耐性幼虫形成は *daf-2* 変異体のほぼ50%が耐性幼虫となる条件下で、*sod-2*; *daf-2* 変異体ではほぼ100%が成虫になった。また同条件下で、*daf-2*; *sod-3* 変異体及び *sod-2*; *daf-2*; *sod-3* 変異体はほぼ100%が耐性幼虫となった。このことから寿命の表現型は耐性幼虫形成の表現型と共通した変化を示し、酸化ストレス耐性の変化とは一致しないことがわかった。線虫の *sod-2* と *sod-3* 遺伝子はそれぞれ頭部の異なる神経細胞で発現していた。

### D. 考察

線虫のMn-SODの二つのアイソフォームが欠損した *sod-2*; *sod-3* 二重欠損変異体は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。これらの遺伝子はそれぞれ頭部の異なる神経細胞で発現しており、*daf-2* 変異体の寿命と耐性幼虫形成の表現型に及ぼす影響がまったく異なることから、線虫においてはMn-SODの二つのアイソフォームを発現する細胞が別々に存在すること、およびこれらの細胞間では活性酸素をシグナルとした情報伝達が行われていることが示唆された。一方 *sod-2*; *daf-2*; *sod-3* 変異体において酸化ストレス耐性が弱いにも関わらず、寿

命が長いという表現型が認められたことで、*daf-2* の持つ長寿命の表現型が必ずしも酸化ストレスに強いことから生じたものではないことがわかった。

### E. 結論

線虫では頭部の異なる神経細胞で二つのMn-SODアイソフォームが発現して協同作業により酸化ストレスの防御にあたっており、両者は酸化ストレス耐性の決定に重要な役割を持つことが示された。長寿命変異体 *daf-2* における長寿命や耐性幼虫形成の亢進という表現型において、これらのSOD遺伝子の欠損は *sod-2* は抑制し、*sod-3* は促進するという相反する反対の作用を示すことが明らかになった。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Honda, Y. and Honda, S.: Oxidative stress, gene expression and lifespan. In: G.H. Rimbach & L. Packer, eds. *Nutrigenomics: The Role of Oxidants and Antioxidants in Gene Expression.*, New York: Marcel Dekker, Inc. 2004 (in press)
- 2) Honda, Y. and Honda, S.: The insulin/IGF-I receptor mutations display changes in diapause and longevity through redox signaling in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Trends in Comparative Endocrinology* 2004, T. Oishi eds., p570
- 3) Morio, H., Honda, Y., Toyoda, H., Nakajima, M., Kurosawa, H. and Shirasawa, T.: EXT gene family member *rib-2* is essential for embryonic development and heparan sulfate biosynthesis in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun.* 301:317-23, 2003.

#### 2. 学会発表

- 1) Honda, Y. and Honda, S.: The insulin/IGF-I receptor mutations display changes in diapause and longevity through redox signaling in

- the nematode *Caenorhabditis elegans*.  
The Fifth Congress of AOSCE in  
Conjunction with the annual Meeting of  
JSCE, March 26-30, 2004, Nara, Japan
- 2) 本田修二：活性酸素と老化制御、冬の学  
術シンポジウム「寿命と老化研究のフロン  
ティア」、2004年1月23日、飯田橋プ  
ラザ、東京
- 3) Honda, Y. and Honda, S.: Effects of the  
gene disruption of Mn-SOD on oxidative  
stress sensitivity and lifespan in the  
nematode *Caenorhabditis elegans*. 第23  
回日本老年学会(第26回日本基礎老化学  
会)大会、口頭発表、名古屋
- 4) Honda, Y. and Honda, S.: Effects of the  
gene disruption of Mn-SOD on oxidative  
stress sensitivity and lifespan in the  
nematode *Caenorhabditis elegans*. 第23  
回日本老年学会(第26回日本基礎老化学  
会)大会、ポスター発表、名古屋
- 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

## 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 東北大学教授

**研究要旨** 古くから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と DNA の単鎖切断であり、これらの蓄積と細胞の機能障害の関係が注目されてきたがまだ直接の証明はされていない。DNA の単鎖切断に対するヒト細胞応答の解析のために、局所的に損傷を作り出し、単鎖切断に対してリアルタイムで修復蛋白質の挙動を解明する実験手法を開発した。この方法により、単鎖切断が修復される経路を初めて明らかにすることができた。今後、この修復経路に関わるプロテオームを解明し、その機能を明らかにすることにより、実際の細胞の中で起きている事象を理解し、細胞老化との関係を明らかにすることが可能となる。

### 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 DNA 損傷のうち、発生頻度のもっとも高い損傷で、転写を阻害し、複製に際しては致命的あるいはゲノム再編成の原因となる単鎖切断に注目して新しい実験方法を開発し、ヒト細胞がどのように応答するかを解析する実験系を開発し、初めてその細胞応答をリアルタイムで明らかにした。DNA 単鎖切断の修復についてはこれまで余り理解されていなかったが、その理由は、細胞内で単鎖切断のみを作り出すことが難しかったからである。我々は、ヒト細胞に紫外線損傷を切る微生物由来の UV-エンドヌクレアーゼ (UVDE) 遺伝子を発現させ、紫外線を核内の局所に当てて出来た損傷に UVDE を働かせて単鎖切断を作り解析する方法を開発し、実際のヒト細胞中で、単鎖切断による PARP の活性化により XRCC1 がリクルートされる機構を始めで示した (*Mol. Cell. Biol.* 23, 3974-3981,

2003)。我々はさらに最近、UV-A レーザーをコンフォーカルレーザー顕微鏡のレンズから哺乳動物細胞の核の一部に照射し、レーザー強度や波長の変化、或いは光増感剤の添加により、活性酸素による種々の DNA 損傷 (単鎖切断、二重鎖切断、塩基損傷) を局所的に作らせる実験方法を開発した。それを用いて、単鎖切断や塩基損傷にどのように細胞が応答するかを修復蛋白質の抗体や GFP に融合蛋白質を細胞に導入してリアルタイムで解析した。その結果と今後の研究の展望について述べる。

### B. 研究方法

単鎖切断に対するヒト細胞応答の解析：我々は以前に種々の紫外線損傷を見つけてその直ぐ 5'側に 3'-OH を生み出すニックを入れる遺伝子 UVDE を分裂酵母などから単離したが、この遺伝子を発現したヒト細胞を作成し、その細胞に 3mm の小さな直径の多数の孔を持つフィルターを通して紫外線を照射し、UVDE の働きによって直ちに生じる単鎖切断に集積する蛋白質をリアルタイムで解析した。

レーザーを用いた実験について；

細胞：ヒト細胞としては HeLa 細胞を用いた。塩基損傷と単鎖切断の細胞応答の解析には、マウス PARP1<sup>-/-</sup>と polβ<sup>-/-</sup>細胞及び CHO



の XRCC1 欠損細胞 (EM9) とそれらの野性型細胞をコントロールに用いた。

導入した遺伝子：遺伝子を N 端或いは C 端に GFP のタグを付け、CMV プロモーターで発現させた。導入した遺伝子はすべてヒト由来のもので、蛋白質の活性により影響を与えない側に GFP を融合した。種々の GFP 融合遺伝子を実験の 2 日前に細胞に導入した

コンフォーカルレーザー顕微鏡のレンズを通して 365 nm のレーザー光を核の一部に当て修復蛋白に対する抗体や GFP の蛍光をリアルタイムで観察して定量した。

### C. 研究結果と考察

単鎖切断の細胞応答の研究では、紫外線を照射した核内の部位にポリ ADP リボースの集積が直ちに見られた。これまで、生化学的に単鎖切断に伴いポリ ADP リボースが同定されて来たが、それが局所的なものであることが明らかとなった。

この方法では、紫外線損傷を 5'末端にもつ単鎖切断しか出来ない為、自然に生じる損傷との違いや同時に出来る紫外線損傷の影響などの問題があった。そこで偶然発見したことは、レーザー光をレンズを通して細胞核に照射することにより種々の活性酸素による DNA 損傷をレーザー強度依存的に局所的に作成出来ることである。これにより；

- 1) レーザー照射はレンズの前に透過フィルターを置き強度 (あるいはパルス当たりの線量) を調節するが、ポリ ADP リボース (単鎖切断で活性化された PARP により損傷の場の近辺のヒストンや PARP 自身にポリ ADP リボシル化を起こす)、 $\gamma$ H2AX (二重鎖切断によりその場に生じるリン酸化ヒストン H2AX) 及び 8-oxo-guanine に対する抗体で、これらが強度の弱い順に、単鎖切断、二重鎖切断、塩

基損傷が生じることが分かった。また、単鎖切断の強度のパルスを複数回与えることで二重鎖切断が生じること、光増感剤を前もって加えることで塩基損傷がより多くできる方法を開発した。

- 2) XRCC1, LIGASEIII, PCNA, CAF1-p150 に対する抗体を用いて、照射後ただちにこれらの修復蛋白が照射部位に集積すること、30分以内には抗体で検出できなくなることが分かり、単鎖切断や塩基損傷の修復が、これまで考えられていたよりも極めて早いプロセスであることを明らかにした。
- 3) GFP に融合した修復蛋白を用いて集積・解離のプロセスを解析し、種々のグリコシラーゼや上記の蛋白が集積、解離するのは、早い、順序だったプロセスであることが確認できた。
- 4) PARP の阻害剤、PARP1-/-細胞、XRCC1 の欠損細胞を用いて解析したところ、単鎖切断の修復は PARP の活性化に 100%依存して XRCC1 が集まり、XRCC1 に依存して polymerase $\beta$  と PCNA が集積し、それぞれ short patch と long patch (polymerase  $\delta/\epsilon$ ) の修復経路につながっていることが分かった。
- 5) XRCC1 の欠損細胞で光増感剤を加えて照射し、塩基損傷を増やすことにより、塩基損傷の修復に関わっている経路が明らかになった。塩基損傷には polymerase $\beta$  は N-端の 8-kDa のみで集積する (単鎖切断には、C-端の 31 kDa で集積する事も明らかになった) が、集積はグリコシラーゼの集積と比較して極めて僅かで、塩基損傷とりわけこのレーザーでより多く生じるピリミジン塩基の損傷が polymerase $\beta$  に依存しない long patch の修復が中心であることを示唆している。

6) PCNA の集積が XRCC1 の欠損細胞で光増感剤を加えて照射し、塩基損傷を増やすことにより増加することが分かり、in vivo での polymerase  $\delta/\epsilon$  に依存した long patch の修復の存在が示された。

今後は、この方法を種々の損傷の修復機構（二重鎖切断、組換え修復など）の解析に適用して、これまでの in vitro で得られた修復モデルの in vivo での検証を行う。さらに、細胞内でしか調べることのできない損傷応答プロセス（すなわち、クロマチンでの損傷応答、複製、転写での損傷応答、M 期での損傷応答、損傷のシグナル伝達など）の解析を行っていく。

#### D. 結論

新しい実験方法の開発により、活性酸素による DNA 損傷の細胞応答の機構が試験管での研究から細胞での in vivo の研究が可能になって来た。今後これらの機構を詳細に解明して、細胞老化に関わる新しい認識が得られることが期待される。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Li L, Hayashi<sup>1</sup> T, Rokshana M, R, Nakajima S, Kanno S, Takao M, Matsunaga T, Yoshino M, Ichikawa M, te Riele H, Tsuchiya S, Tanaka K, and Yasui A. Functional and physical Interactions between ERCC1 and MSH2 complexes for resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) in mammalian cells. *DNA Repair* 3: 135-143, 2004.
- (2) Fitch ME, Nakajima S, Yasui A, and Ford JM. In vivo recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product. *J. Biol. Chem.* 278, 46906-46910, 2003
- (3) 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.* 23: 3974-3981, 2003.
- (4) 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 1 gene is expressed in a circadian rhythmic manner in the suprachiasmatic nucleus. *Mol. Brain Res.* 110, 1-6, 2003.
- (5) 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.
- (6) 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.
- (7) 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.
- (8) 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.
- (9) 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.
- (10) 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.
- (11) 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 (2002-2003 年)

### (国際会議での招待講演)

- 1) Gordon Conference on Genetic Toxicology 2003 年 8 月 10-15 日 招待講演 (イギリス・オックスフォード)
- 2) 2nd Genome Maintenance Meeting 2003 年 9 月 6-9 日 招待講演 (ノルウェイ・オスロ)
- 3) Graduiertenkolleg symposium "Protein Function at the Atomic Level", 2003 年 10 月 10-12 日 (ドイツ・マルブルク) 基調講演
- 4) 4th International 3R Symposium, 2003 年 11 月 9-13 日 淡路夢舞台・日本・招待講演
- 5) 1st Japan—USA DNA Repair Meeting, 2002 年 10 月 27-31 日、仙台・日本・会議主催
- 6) International Symposium on DNA Repair in the Twenty-first Century. 招待講演. October 07, 2002, Erasmus Medical Center, Rotterdam, The Netherlands.
- 7) 1st Asian Conference on Photobiology, 2002 年 6 月 26-28 日、淡路夢舞台・日本、招待講演

### (国内学会でのシンポジウム)

- 1) 安井 明、活性酸素による DNA 損傷に対する細胞応答のリアルタイム解析、シンポジウム「DNA 損傷応答の分子メカニズム」。第 26 回日本分子生物学会。2003 年 12 月 10-13 日。神戸。
- 2) 安井 明、塩基損傷と単鎖切断の細胞応答。シンポジウム「DNA ダメージレスポンスの分子機構」。第 62 回日本癌学

会総会。2003 年 9 月 25—27 日、名古屋。

- 3) 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。
- 4) 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。
- 5) 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
- 6) 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「ポストゲノムシーケ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
- 7) 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

## 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

HoxB8 遺伝子座において、Edr1 (Rae28/Mph1) と Cbx2 (M33) は、転写の状態に関わりなく構成的に結合しているのに対し、Rnf2 (Ring1B) と Ring1 (Ring1A) の結合は、転写が抑制されている領域に強く見られることから、より完全な形のポリコーム群の結合が転写抑制を維持するには必要であることが示された。また、ポリコーム群の HoxB8 遺伝子座への結合は、発生段階にしたがって変化する。一方、Hoxb8/LacZ トランスジーンを用いた解析は、ポリコーム群の転写が活性化された領域への結合は、転写にコンピテントなクロマチン構造を維持するのに必要であることを示唆した。

### 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、ポリコーム群の標的と考えられている Hox 複合体や Ink4a 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

ほ乳類ポリコーム群タンパクは、ショウジョウバエにおけると同様にホメオボックス (Hox) 遺伝子座の転写制御に強いインパクトを与える。しかしながら、その作用機序につい

て多くのことは明らかにされていない。そのために、Hox 遺伝子座、特に、HoxB8 遺伝子に焦点を絞って、ポリコーム群タンパクの結合パターンを、染色体免疫沈降法を用いて系統的に解析する。また、ポリコーム群の結合の転写への意義を、Hoxb8/LacZ トランスジーンをリポーターとして明らかにする。

### C. 結果と考察

HoxB8 遺伝子に焦点を絞って、ポリコーム群タンパクの結合パターンの染色体免疫沈降法を用いた解析を行った。Rnf2 (Ring1B), Edr1 (Rae28/Mph1), Ring1 (Ring1A) と Cbx2 (M33) に対する抗体を用いて、HoxB7 から HoxB9 にわたる領域を解析した結果、Edr1 と Cbx2 は転写の状態に関係なく結合していたが、Rnf2 と Rnig1 は転写が抑制されている場合に、その転写調節領域に強く結合していることが示された。このことは、ポリコーム群は、転写の状態に