

果の社会還元の見点からデータベース(JG-SNP)を2003年4月よりインターネット公開を開始し内容を更新している。

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- #1. Kazama H, Hosoi T, Nakahara K, Murayama S, Saito Y, Kanemaru K, Nagura H, Arai T, Sawabe M, Toba K, Yamanouchi Y, Orimo H. Association between a promoter polymorphism of the paraoxonase PON1 gene and pathologically verified idiopathic Parkinson's disease. *Geriatrics and Gerontology International* 2002; 2: 91-9.
  - #2. Kazama H, Ruberu NN, Murayama S, Saito Y, Nakahara K, Kanemaru K, Nagura H, Arai T, Sawabe M, Yamanouchi H, Orimo H, Hosoi T. Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with neurofibrillary tangles. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2004; 18(2):145-50.
  - #3. Saito Y, Ruberu NN, Sawabe M, Arai T, Tanaka N, Kakuta Y, Yamanouchi H, Murayama S. Staging of argyrophilic grains: an age-associated tauopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63(9):911-8.
  - #4. Saito Y, Ruberu NN, Sawabe M, Arai T, Kazama H, Hosoi T, Yamanouchi H, Murayama S. Lewy body-related alpha-synucleinopathy in aging. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63(7):742-9.
  - #5. Sawabe M, Arai T, Kasahara I, Esaki Y, Nakahara K, Hosoi T, Orimo H, Takubo K, Murayama S, Tanaka N. Developments of geriatric autopsy database and Internet-based database of Japanese single nucleotide polymorphisms for geriatric research (JG-SNP). *Mech Ageing Dev* 125(8):547-52, 2004.
  - #6. Sawabe M, Takahashi R, Matsushita S, Ozawa T, Arai T, Hamamatsu A, Nakahara K, Chida K, Yamanouchi H, Murayama S, Tanaka N. Aortic pulse wave velocity and the degree of atherosclerosis in the elderly: a pathological study based on 304 autopsy cases. *Atherosclerosis* 179(2): 345-351, 2005
- ### 2. 学会発表
- #7. Sawabe M, Arai T, Hosoi T, Takubo K,

Tanaka N. Development and Application of Geriatric Autopsy Database and Internet-Based Database of Japanese Single Nucleotide Polymorphisms for Geriatric Research (JG-SNP). Presented at 2005 Annual Meeting, The United States and Canadian Academy of Pathology, held at San Antonio, TX on February 28, 2005.

- #8. Sawabe M, Arai T, Hamamatsu A, Chida K, Tanaka N. Sustained progression and loss of gender-related difference of the atherosclerosis in the very old: A pathological study of 1,074 consecutive autopsy cases. Presented at 2005 Annual Meeting, The United States and Canadian Academy of Pathology, held at San Antonio, TX on March 1, 2005.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
特になし.

# 高齢者における大腸腺腫とp53コドン72多型に関する研究

分担研究者 新井 富生 東京都老人医療センター・臨床病理科医長

## 研究要旨

【目的】 癌抑制遺伝子で「ゲノムの番人」と称され、細胞周期の制御やアポトーシスに関与するp53遺伝子のエクソン4のコドン72には、Arg (CGC)とPro (CCC) のアミノ酸変化を伴うsingle nucleotide polymorphism (SNP)が存在し、悪性腫瘍との関連が報告されている。ヒトで最も高頻度に発生する腫瘍である大腸腺腫は、p53蛋白発現の増加、アポトーシスの出現などp53との関連も示唆されている。本研究の主な目的は、p53コドン72多型の大腸腺腫発生への影響、高齢者でのp53遺伝子多型の分布を明らかにすることである。

【方法】 約7年間の連続剖検1334例（男性711例、女性623例、年齢中央値80歳、分布46-104歳）対象に、病理組織学的に腺腫と確認できた病変の個数・部位、p53遺伝子コドン72多型、臨床病理データ（生活歴として、喫煙歴、飲酒歴をむ）を統計学的に解析した。

【結果】 大腸の組織学的検索が可能であった1312例中915例（69.1%）に腺腫を認めた。女性では加齢に伴い腺腫を有する比率の増加傾向が認められた。腺腫数は加齢に伴い有意に増加した（ $P < 0.05$ ）。p53遺伝子多型は、腺腫数、腺腫の分布と有意な関連は認められなかった。男性では加齢に伴いPro/Pro型が減少する傾向にあったが、女性では明らかな変化は認められなかった。90歳以上のArg/Arg型の比率（38.9%）は他の年代より低い傾向にあった（46.2%）。喫煙は大腸腺腫の発生に強く関連した（ $P < 0.01$ ）。

【結論】 大腸腺腫は加齢に伴い増加した。p53遺伝子多型と大腸腺腫との関連は認められなかったが、大腸腺腫の発生は喫煙と強い関連が認められ、環境因子の関与が示唆された。また、超高齢者では遺伝子多型分布が若年と異なる可能性が示唆された。

## A. 研究目的

p53癌抑制遺伝子は染色体17p13 (17p13) に位置し、多くの悪性腫瘍で変異が認められる。また、p53は「ゲノムの番人」とも称され、wild-type p53蛋白は細胞周期の制御やアポトーシスに関与する機能も知られるようになってきた。このp53遺伝子のエクソン4に位置するコドン72には、Arg (CGC)とPro (CCC) のアミノ酸変化を伴うsingle nucleotide polymorphism (SNP)が存在し、現在まで、Pro/Pro型またはArg/Pro型が肺腺癌、乳癌、胃低分化腺癌のリスクを、Arg/Arg型が子宮頸部腺癌、扁平上皮癌、皮膚扁平上皮癌のリスクを高めるという報告がある。

今回我々はヒトで最も高頻度に発生する腫瘍である大腸腺腫に注目しp53遺伝子コドン72遺伝子多型を検討した。大腸腺腫ではp53遺伝子変異は低頻度であるが、wild-type p53蛋白の発現が増加する。また、大腸腺腫にはアポトーシスが多数みられ、p53との関連の可能性も示唆されている。本研究の主な目的は、p53コドン72多型の大腸腺腫発生への影響、高齢者でのp53遺伝子多型の分布を明らかにすることである。

## B. 研究方法

東京都老人医療センターで1995年1月-2001年10

月の6年10カ月に剖検された1334例（男性711例、女性623例、年齢中央値80歳、分布46-104歳）対象とした。

大腸腺腫に関しては、病理組織学的に腺腫と診断できた病変の肉眼型、大きさ、発生部位を記載した。

遺伝子検索に関しては、剖検時採取した腎組織からDNAを抽出し、鋳型として使用した。p53遺伝子コドン72多型はTaqManプローブを用い、Sequence Detection System (ABI PRISM 7000)で検出した。

統計学的解析は、臨床病理データ（生活歴として、喫煙歴、飲酒歴をむ）、p53コドン72 体型データをKuraskal-Wallis検定、 $\chi^2$ 検定し、 $P < 0.05$ を有意と判定した。

剖検材料を研究に使用するに当たってはご遺族から書面にて承諾を得た。また本研究は東京都老人医療センター倫理委員会で承認された。

## C. 研究結果

大腸の組織学的検索が可能であった1312例中915例（69.1%）に腺腫を認めた。腺腫を有するヒトにおける平均腺腫数は4.1個（1-44個）であった。腺腫数と症例数の関連は図1の通りであった。

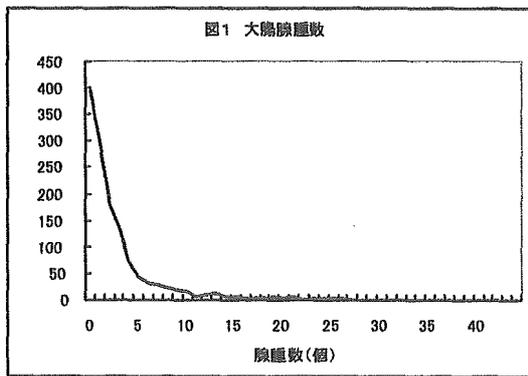
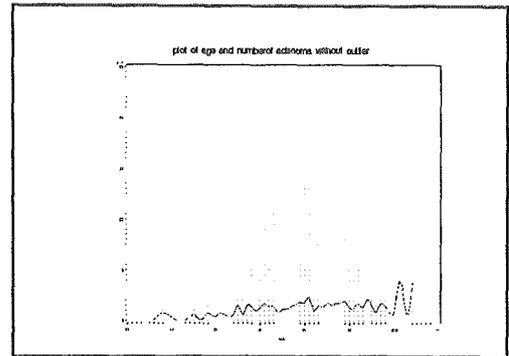


図3 大腸腺腫数の加齢による変化



腺腫有病率（男性71.9%、女性67.3%）、腺腫個数（男女とも平均4.1個）に性差は認められなかった。年齢別に腺腫有病率をみると、60代以上の男性では変化はみられないが、女性では加齢に伴い腺腫を有する比率の増加傾向が認められた（図2 a, b）。

p53コドン72多型に関しては、年齢別多型の分布を表1に示す。男性では加齢に伴いPro/Pro型が減少する傾向にあるが、女性では明らかな変化は認められなかった。

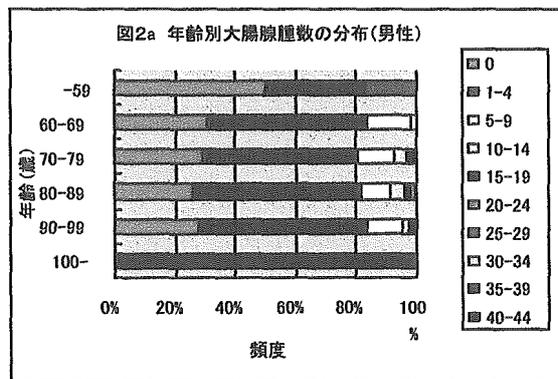
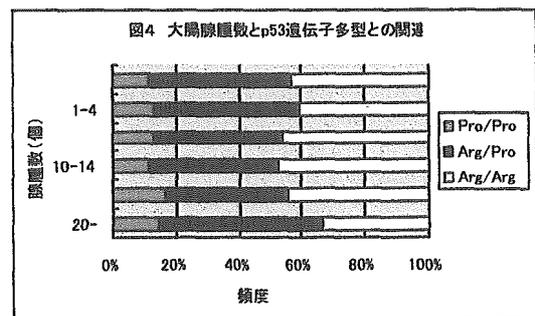
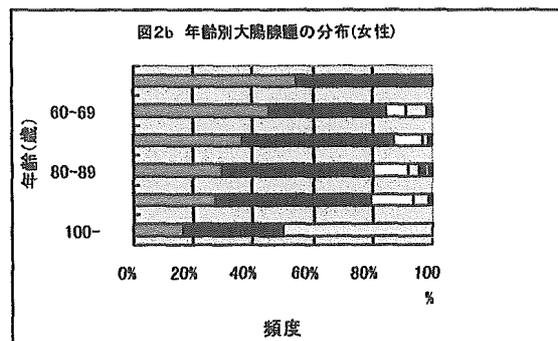


表1 年齢別のp53遺伝子多型分布 (%)

年齢(歳)	症例数	Pro/Pro	Arg/Pro	Arg/Arg
-59	16	25	37.5	37.5
60-69	123	14.6	42.3	43.1
70-79	459	11.3	44.2	44.4
80-89	502	12.7	45	42.2
90-99	195	10.8	49.7	39.5
100-	8	25	50	25

p53遺伝子多型は、腺腫数、腺腫の分布と有意な関連は認められなかった（図4）。喫煙はこの腫瘍の発生に強く関連した（ $P < 0.01$ ）。



腺腫数は加齢に伴い有意に増加し（ $P < 0.05$ ）、特に70-89歳で多かった（図3）。加齢による腺腫の占拠部位に変化はみられなかった。

p53コドン72多型に関しては、年齢別多型の分布を表1に示す。男性では加齢に伴いPro/Pro型が減少する傾向にあるが、女性では明らかな変化は認められなかった。

#### D. 考察

大腸腺腫は、他の悪性腫瘍と同様に加齢に伴い増加することが明らかになった。

大腸癌発生過程において、p53は大腸腺腫から癌にprogressionする時に変異が生じるとされている。一方、大腸腺腫においては異型度と蛋白発現との間に関連性が認められており、野生型p53蛋白が大腸腺腫細胞のアポトーシスに関与していることが推測される。したがって、Pro72蛋白に比べ、アポトーシス誘導、形質転換抑制効果が高いとされるArg72

蛋白をコードするアレルを有する個体の方が大腸腺腫の発生が少ないという仮説が想定される。しかし、今回大腸腺腫との関連を検討した結果p53遺伝子多型と大腸腺腫との関連は認められなかった。

このように遺伝子多型との関連が乏しいと推測される一方、大腸腺腫の発生は喫煙と強い関連が認められた。従って、大腸腺腫発生には環境因子の関与が大きいことが示唆された。

90歳以上のArg/Arg型の比率（38.9%）が、他の報告の対照群（61.6±10.9歳）のそれより低い傾向にあり（ $P = 0.06$ ）、高齢者では遺伝子多型分布が若年と異なる可能性が示唆された。Pro72蛋白に比べ、アポトーシス誘導、形質転換抑制効果が高いとされるArg72蛋白をコードするアレルを有する個体の方が、悪性腫瘍や自己免疫疾患においては標的細胞を除去する効果が高いと推測される。しかしながら、この作用はパーキンソン病、アルツハイマー病、心筋症など細胞消失が問題となる疾患においては生体にとって不都合に作用する可能性がある。従って、

超高齢者群でArg/Arg型が少ないことは高齢者に特有の疾患においては不利に働く可能性が考えられた。

#### E. 結論

大腸腺腫とp53コドン72多型との関連性は見られなかった。大腸腺腫は喫煙歴と強い関連があり、腺腫発生には環境要因の影響が示唆された。また、90歳以上の超高齢者群のp53コドン72多型分布が若年者と異なる可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

新井富生、沢辺元司、細井孝之、中原賢一、金沢暁太郎、笠原一郎、本間尚子、田久保海誉. 高齢者における大腸腺腫とp53コドン72遺伝子多型との関連. 第47回日本老年医学会学術集会 2005. 6. 15-17 (予定)

## 骨量決定遺伝子に関する検討

分担研究者 細井孝之 東京都老人医療センター内分泌科部長

### 研究要旨

骨粗鬆症の遺伝的素因を候補遺伝子の多型性を用いた連関解析を、とくに遺伝子産物の蛋白質構造の多様性に結びつく codingSNP(cSNP)について行った。今回我々は骨代謝において基幹的な役割を果たすと考えられる tissue-non-specific alkaline phosphatase (TNSALP)遺伝子を取りあげた。TNSALP は骨芽細胞の表面に存在し、石灰化部位へのリン酸、本遺伝子について、日本人集団における cSNP の探索、骨量との連関解析、遺伝子産物の機能解析をおこなった。

### A.研究目的

骨粗鬆症の発症には遺伝的素因と環境因子(生活習慣因子)の両方がかかわっている。我々は本疾患の遺伝的素因を候補遺伝子の多型性と臨床的指標との連関解析をおこなうことによって明らかにしようしてきた。遺伝子多型性にはいくつかの種類があるが、我々はとくに single nucleotide polymorphisms (SNPs)について検討している。なかでも、regulatory SNP(rSNP)と codingSNP(cSNP)は臨床に直結する生物学的意義を持つ可能性がある。rSNP は遺伝子の転写調節領域にあるもので、この多型性は転写量の多様性を介して、発現される蛋白質量の差をもたらす可能性がある。また、遺伝子産物中のアミノ置換をもたらす cSNP は蛋白質の質の差を介してその機能における多様性を発揮する可能性を秘めている。今回我々は骨代謝関連遺伝子のうち、 tissue-non-specific alkaline phosphatase (TNSALP)遺伝子を取りあげた。TNSALP は骨芽細胞の表面に存在し、石灰化部位へのリン酸、本遺伝子について、

日本人集団における cSNP の探索、骨量との連関解析、遺伝子産物の機能解析をおこなった。

### B.方法

- ① TNSALP 遺伝子内の SNP 検索：変性 HPLC法をもちいて TNSALP 遺伝子の 12エクソンすべてについて SNPs の検索を行った。
- ② 対象：日本国内のある地域において、検診を目的に独歩で集合した高齢女性を対象とした。書面によるインフォームド Consentを得たのち、DNAサンプルを目的とする採血を行った。
- ③ 骨量測定：骨量は dual energy X-ray absorptiometry (DXA)で前腕骨遠位端を測定した。
- ④ 遺伝子産物の酵素活性測定：TNSALP 遺伝子の多型性に対応する遺伝子産物を得るための発現ベクターを作成した。それぞれを COS 7 細胞に遺伝子導入し、発現させた後に形質膜分画を得た。このミクロゾームを用いて alkaline phosphatase 活性を測定した。

表1 日本人集団で認められたTNSALP遺伝子(NM 00478)のSNPs

Location	Nucleotide change	Amino acid substitution	Reference
Exon 5	330 (T>C)	Ser 93 Ser	Orimo et al.
Exon 6	534 (C>T)	Tyr 161 Tyr	In this study
Exon 7	787 (T>C)	Tyr 246 His	Henthom et al.
Exon 8	876 (A>G)	Pro 275 Pro	Henthom et al.
Intron	862+20 (G>T)		Orimo et al.
Intron	862+51 (G>A)		Orimo et al.
Intron	862+58 (C>T)		Orimo et al.
Intron	1308+46 (G>T)		Orimo et al.

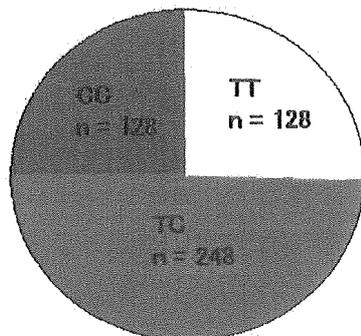
表2 連鎖不平衡の検討

787 C>T (Tyr246His)	876 A>G (Pro 275 Pro)
$D' = 1.0000, r^2 = 1.0000, \chi^2 = 1002.00, p < 0.001$	

### C.結果

TNSALP 遺伝子のエクソン内について SNP 検索を行った結果、4つの SNP が検出された(表1)。このうちエクソン7のもの(787C>T)は246番目のアミノ酸である Tyr が His に置換する non-synonymous SNP であった。また、787C>T とエクソン8の876A>G との間の連鎖不平衡係数は高く、完全に連鎖していることも明らかとなった(表2)。787C>T の遺伝子型分布はそれぞれのホモが全体の約4分の1を、ヘテロがほぼ半数を占めるかなり common な多型性である(図1)。

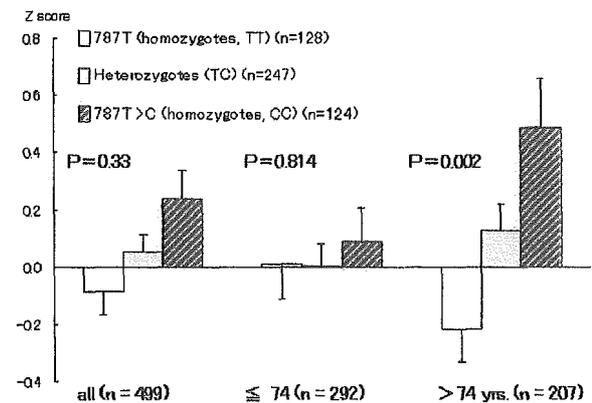
図1 TNSALP 787 C/T 遺伝型の分布



高齢女性集団(平均74才)において前腕骨

の骨量と 787C/T 多型性との関連を検討したところ、この集団全体では、CC群で骨量が高い傾向にあったが統計的に有意ではなかった(図2)。ところが、この集団の平均年齢である74才を境に年齢で層別した上で解析すると、74才以上の集団では遺伝子型間で有意な骨量の差が見出された( $p < 0.002$ )。これらのことから、この遺伝子多型性は後期高齢女性において影響を及ぼす遺伝的素因を反映していることが示唆された。

図2 TNSALP SNPs (787T, 787T>C)と高齢日本人女性の前腕骨骨量(Z score)との関連



787C または 787T の TNSALP 遺伝子について発現ベクターを作成し、COS7細胞に遺伝子導入した。遺伝子発現を確認した後、それぞれの細胞から plasma membrane 分画を調製した。これを酵素サンプルとし TNSALP の酵素活性を測定した。その結果、それぞれのサンプルがもつ Vmax には差がないものの、787C の、Km 値は 787T に比較して有意に低いことが分かった(表3)。

### D.考察

エクソン7の787T/C SNP はいわゆる機能的な SNP であり、その酵素としての特性

表3 787Tと787T>C TNSALP遺伝子を導入されたGOS-1細胞におけるALP活性のKm値 (基質にp-NPPを使用)

TNSALPs	n	Km (mM)
787T (Tyr246Tyr)	15	0.505 ± 0.064
787T>C (Tyr246His)	15	0.290 ± 0.002 **

\*\*p < 0.01

の差を通して、高齢女性の骨量における個人差をもたらしていることが示唆された。Km値が低いことは、より少ない基質においても効率よく反応が触媒されることを意味する。今回の結果は高齢女性の骨代謝におけるリン酸代謝の重要性を示唆するものでもあり、骨粗鬆症の予防と治療を目指した今後の研究に対して一つの方向性をしめすものとする。

#### E.謝辞

本研究は日本女子大学五関正江博士、東京都老人総合研究所鈴木隆雄博士、吉田英世博士、日本医科大学折茂英夫博士、健康科学大学折茂肇博士らとの共同研究によって行われた。

#### F.発表

1. Goseki-Sone M, Sogabe N, Fukushi-Irie M, Mizoi L, Hideo Orimo, Suzuki T, Nakamura H, Orimo H and Hosoi T  
Functional analysis of the single-nucleotide polymorphism (787T>C) in tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene associated with bone mineral density. *J Bone Miner Res* in press
2. Sawabe M, Arai T, Kasahara I, Esaki Y, Nakahara K, Hosoi T, Orimo H, Takubo K, Murayama S, Tanaka N; Tokyo Metropolitan Geriatric Medical Center; Japan Science and Technology Agency  
Developments of

geriatric autopsy database and Internet-based database of Japanese single nucleotide polymorphisms for geriatric research (JG-SNP). *Mech Ageing Dev.* 2004 Aug;125(8):547-52.

3. Saito Y, Ruberu NN, Sawabe M, Arai T, Kazama H, Hosoi T, Yamanouchi H, Murayama S. Lewy body-related alpha-synucleinopathy in aging. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004 Jul;63(7):742-9.
4. Ezura Y, Kajita M, Ishida R, Yoshida S, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Orimo H, Emi M. Association of multiple nucleotide variations in the pituitary glutaminy cyclase gene (QPCT) with low radial BMD in adult women. *J Bone Miner Res.* 2004 Aug;19(8):1296-301.
5. Urano T, Shiraki M, Ezura Y, Fujita M, Sekine E, Hoshino S, Hosoi T, Orimo H, Emi M, Ouchi Y, Inoue S. Association of a single-nucleotide polymorphism in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene with bone mineral density. *J Bone Miner Metab.* 2004;22(4):341-5.
6. Kazama H, Ruberu NN, Murayama S, Saito Y, Nakahara K, Kanemaru K, Nagura H, Arai T, Sawabe M, Yamanouchi H, Orimo H, Hosoi T. Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with neurofibrillary tangles. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2004;18(2):145-50.
7. Horiuchi T, Kazama H, Araki A, Inoue J, Hosoi T, Onouchi T, Mizuno S, Ito H, Orimo H. Impaired gamma carboxylation of

osteocalcin in elderly women with type II diabetes mellitus: relationship between increase in undercarboxylated osteocalcin levels and low bone mineral density. *J Bone Miner Metab.* 2004;22(3):236-40.

8. Fukunaga M, Nakamura T, Shiraki M, Kuroda T, Ohta H, Hosoi T, Orimo H. Absolute height reduction and percent height ratio of the vertebral body in incident fracture

in Japanese women. *J Bone Miner Metab.* 2004;22(2):104-10

9. Muraki S, Yamamoto S, Ishibashi H, Horiuchi T, Hosoi T, Orimo H, Nakamura K. Impact of degenerative spinal diseases on bone mineral density of the lumbar spine in elderly women. *Osteoporos Int.* 2004 Sep;15(9):724-8.

## 高齢者疾患における寿命老化制御遺伝子の多型解析

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、SNP 解析方法として融解曲線分析法を検討した。またこれを用いたハイスループット解析システムについても検討し、効率的に解析できるシステムを立ち上げた。

#### 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ために、SNP 解析法として融解曲線分析法を評価する。

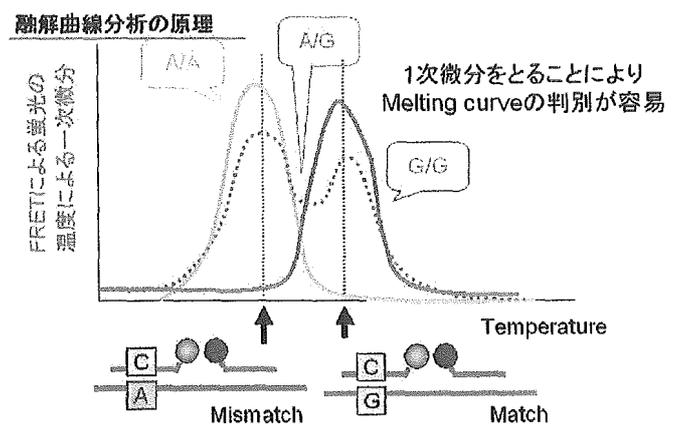
#### B. 研究方法

SNP の大量タイピングを行うための手法として、融解曲線分析法を検討した。機器・試薬としては、LightTyper および関連試薬を用いた。SNP 大量解析へ向けての一連の作業フローは自動分注機 BioMeck2000 を用い、大規模サンプルで行った。サンプルは老人医療センター病理部 沢辺博士から提供された、剖検例 DNA サンプル約 1000 例を用いた。本共同研究に関しては、老人医療センターおよび東京医科歯科大学の倫理委員会の承認を得た。ま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) を用いて行った。

#### C. 研究結果

選択した SNP はいずれも、高血圧、糖尿病等の代謝疾患、および老化関連の遺伝子から選択されたものであり、それぞれにつき 1-3 SNP を解析した。LightTyper 法の

SNP 検出の成功率および精度は 99.9% であった。大量サンプルおよび作業フローを管理し、タイピング結果の品質を維持する目的で、サンプルは全てバーコード化して解析を行った。Biomeck2000 を 1 台、PCR 機 ABI9700 2 台、および LightTyper 2 台を用いて 384 のマルチタイプレート系の系で、1 週間に 1500 サンプルにつき 10SNP のタイピングが可能となった。また連鎖不平衡およびハプロタイプ解析ソフトを用いて連鎖不平衡解析およびハプロタイプ解析を行った結果、LDSupport がすぐれている事が判った。



#### D. 考察

融解曲線分析法を用いたハイスループット SNP タイピング系は有効である。

E. 結論

SNP の大量解析に向けた方法として、融解曲線分析法を評価し、効率的に SNP のタイピング方法およびタイピング結果の解析を大規模にて行い検討し、その有効性を確認した。

F. 研究発表

原著論文

1. Araki, J., J. Ohashi, M. Muramatsu. Application of discordant sib-pair linkage analysis for mapping minor histocompatibility antigen loci in a novel graft-vs-host-disease model. *Tissue Antigens*. 2004. 64:243-50.

2. Oda, K., T. Kimura, Y. Matsuoka, A. Funahashi, M. Muramatsu, H. Kitano. Molecular Interaction Map of Macrophage. *AfCS Research Reports* [<http://www.signaling-gateway.org/report/>]. 2004.

3. Arai, M., O. Yokosuka, K. Fukai, F. Imazeki, T. Chiba, H. Sumi, M. Kato, M. Takiguchi, H. Saisho, M. Muramatsu, N. Seki. Gene expression profiles in liver regeneration with oval cell induction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004. 317:4:370-6.

4. Saito, T., G. Ji, H. Shinzawa, K. Okumoto, E. Hattori, T. Adachi, T. Takeda, K. Sugahara, J.I. Ito, H. Watanabe, K. Saito, H. Togashi, K. Ishii, T. Matsuura, K. Inageda, M. Muramatsu, S. Kawata. Genetic variations in humans associated with differences in the course of hepatitis C. *Biochem Biophys Res*

*Commun*. 2004. 317:335-41.

5. Kitano, H., K. Oda, T. Kimura, Y. Matsuoka, M. Csete, J. Doyle, M. Muramatsu. Metabolic syndrome and robustness tradeoffs. *Diabetes*. 2004. 53 Suppl 3:S6-S15

学会発表

村松正明. 融解曲線分析を用いた SNP 解析による疾患関連遺伝子探索及び分子ハプロタイピング. 第 27 回分子生物学会年会「バイオテクノロジー・セミナー」. 2004.12.8. 神戸

G. 知的所有権の取得

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名、発表誌名、巻号、ページ、出版年
清水孝彦ほか	哺乳類におけるインスリンシグナルと寿命制御機構、基礎老化研究、28(3):19-23,2004
Nakai et al.	Coq7/clk-1 regulates mitochondrial respiration and the generation of reactive oxygen species via coenzyme Q. Aging Cell 3,pp273-281,2004
Sawabe et al.	Development of a geriatric autopsy database and Internet-based database of Japanese single nucleotide polymorphisms for geriatric research (JG-SNP). Mechanisms of Ageing and Development 125,547-552,2004

【研究報告】

哺乳類におけるインスリンシグナルと寿命制御機構

清水 孝彦、馬場 智規、白澤 卓二  
 東京都老人総合研究所 分子老化研究グループ

要約

線虫の長寿変異体daf-2の長寿変異と相同の変異を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、雌雄ともに酸化ストレス耐性能が亢進していたが、雌でより強い耐性を示した。さらに、抗酸化酵素であるMnSODの活性およびmRNAの発現が雌雄共に増強し、雌でより顕著であった。エストロゲン投与実験と卵巣摘出実験を行ったところ、エストロゲンがインスリン受容体変異マウスの抗酸化防御機構を調節していることが判明した。また、インスリン受容体変異マウスに対して食餌制限を行うと酸化ストレス耐性能が増強した。これらの結果は、哺乳類において、インスリン受容体を介したインスリンシグナルが酸化ストレス耐性を制御していることを示した。また、インスリン、エストロゲン及び食餌制限の3つのシグナルが協調して長寿シグナルを調節していることを示した。

キーワード：Insulin signaling, oxidative stress, estrogen, dietary restriction, longevity

はじめに

フリーラジカルによる酸化ストレスは老化の一因と考えられている[1]。モデル動物を用いた遺伝学的解析から、長寿変異体が単離され、変異体の多くで酸化ストレス耐性能が増強していることが明らかとなった[2]。線虫の長寿変異体daf-2[3]の分子生物学的解析の結果、インスリン受容体/インスリン様成長因子1受容体遺伝子に長寿遺伝子変異が発見された[4]。さらにdaf-2線虫はインスリン様シグナル伝達の異常により、MnSODの発現が増大していた[5]。一方、哺乳類においては、インスリン様成長因子1受容体欠損ヘテロ接合体マウスで酸化ストレス耐性と寿命延長が報告された[6]。このマウスは雌で寿命の延長を示し、インスリン様成長因子1シグナルが、性差によって調節されていることを示唆した。本研究の目的は、哺乳類においてインスリンシグナルが酸化ストレス耐性能を増強し、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、daf-2線虫の長寿変異と相同の変異を持つインスリン受容体ノックインマウスの作製に成功している（論文投稿中）。このマウスはインスリン受容体タンパク質1195番目のプロリン残基がロイシン残基に置換している。これまでの実験結果から、インスリン受容体変異ホモ接合体マウス(Ir<sup>P1195L/P1195L</sup>)は、生後約48時間以内に成長障害と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マウス(Ir<sup>-/-</sup>)と同じ表現型を示した[7]。ヘテロ接合体マウス(Ir<sup>P1195L/wt</sup>)は、インスリン受容体のチロ

シンキナーゼ活性が約20%に低下し（図1）、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を明らかにしている（未発表データ）。本研究では、インスリン受容体変異マウスの酸化ストレス耐性能を調べ、長寿形質を検討した。またその耐性が性ホルモンや食餌制限によって、どのように調節されるのかについて明らかにした。

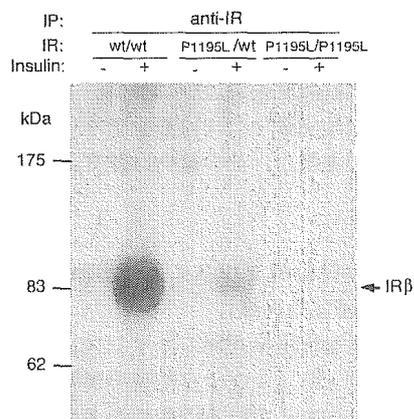


図1 インスリン受容体タンパク質の自己リン酸化能

野生型マウス、インスリン受容体変異ヘテロ接合体マウス、およびインスリン受容体変異ホモ接合体マウスの新生仔肝臓から抽出したインスリン受容体にインスリン刺激を加え、自己リン酸化能を調べた。抗インスリン受容体抗体による免疫沈降物のオートラジオグラム。

インスリン受容体変異マウスの酸化ストレス耐性能

4ヶ月齢マウスを80%酸素濃度チャンバー内で飼育し、酸化ストレス耐性能を調べた。その結果、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日数の延長を示した。マウスの半数が生存していた日数（50%生

連絡先：〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2  
 Tel:03-3964-3241  
 Fax:03-3579-4776  
 E-mail:shimizut@tmig.or.jp

存日数)を比較するとインスリン受容体変異雌マウスは8日に対して野生型( $I_r^{wt/wt}$ )雌マウス6日で、33.3%長く生存していた(図2 A)。一方、雄ではインスリン受容体変異マウスが6.5日に対して、野生型マウスは5.5日で、18.8%長く生存した(図2 B)。

次にパラコートを腹腔内に投与し、薬剤による酸化ストレス耐性を調べた。その結果、雌のインスリン受容体変異マウス、野生型マウスともに処理後48時間より死亡し始めた。しかし、72時間以降はインスリン受容体変異マウスが野生型マウスより多く生存していた(図2 C)。雄でも同様の傾向を示したが、その差は雌ほどではなかった(図2 D)。

これらの結果から、インスリン受容体変異マウスは雌雄ともに、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にも耐性を持つことが明らかとなった。さらに、酸化ストレスに対する耐性には雌雄差があることが判明し、性ホルモンの関与が示唆された。

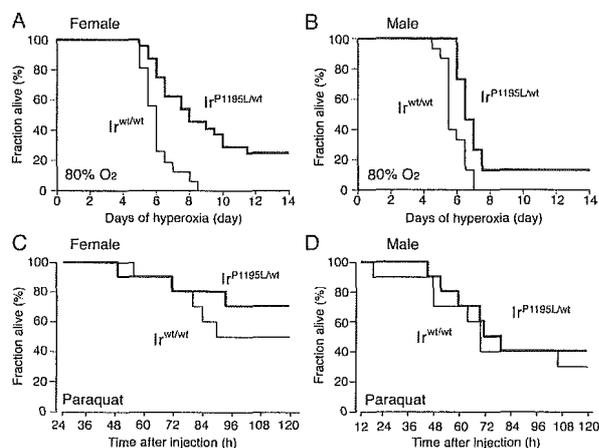


図2 80%酸素負荷実験およびパラコート投与実験  
インスリン受容体変異マウスは野生型マウスより酸化ストレス耐性を獲得し、その傾向は雌でより顕著であった。

### インスリン受容体変異マウスにおけるMnSOD活性、およびMnSOD遺伝子発現の亢進

酸化ストレス耐性を獲得したインスリン受容体変異マウスでは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亢進している可能性が考えられた。そこで、4ヶ月齢マウスの肝臓組織におけるMnSODとCu/ZnSOD活性およびmRNAの発現を調べた(図3)。その結果、インスリン受容体変異雌マウスの肝臓組織におけるMnSOD活性は野生型に比べて有意に39.9%上昇していた(図3 A)。インスリン受容体変異雄マウスのMnSOD活性も野生型マウスに比べて、上昇する傾向にあった(図3 B)。また、RT-PCR解析の結果、MnSODのmRNAの発現も、雌雄ともにインスリン受容体変異マウスで亢進していた(図3 E)。さらに肺組織においても、MnSOD mRNAの発現亢進が認められた(データは示さない)。一方、Cu/ZnSODの活性及び発現は雌雄ともに遺伝子型間に差は見られなかった(図3 C, 3 D)。

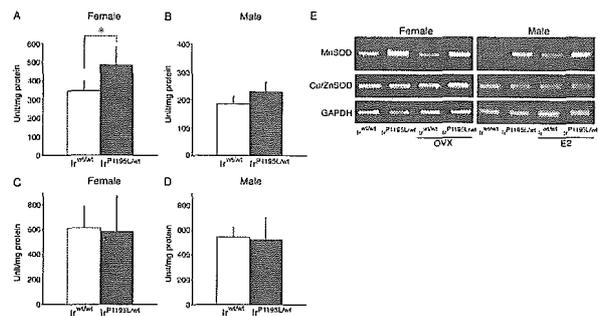


図3 MnSODおよびCu/ZnSODの活性とmRNA発現解析  
(A, B) MnSOD活性はインスリン受容体変異マウスで上昇し、その傾向は雌でより顕著であった。(C, D) Cu/ZnSOD活性の上昇は認めなかった。(E) RT-PCRによるmRNAレベルの遺伝子発現解析。OVX: 卵巣摘出、E2: エストロゲン投与。\*  $P < 0.05$

線虫やショウジョウバエのインスリン受容体/インスリン様成長因子1受容体変異体ではSOD活性が上昇することが報告されている[5, 8]。またCu/ZnSOD、またはMnSODを運動神経で強制発現させたトランスジェニックショウジョウバエは、寿命が30-40%延長することが報告されており、MnSODの増加が寿命延長に関わっていることが示唆されている[9, 10]。インスリン受容体変異マウスでもMnSOD活性および発現が増加していることから、寿命が延長する可能性が期待される。

### エストロゲンは酸化ストレス耐性を増強する

インスリン受容体変異マウスにおいて酸化ストレス耐性能、およびMnSOD活性に性差を認めたので性ホルモンの影響を調べた。3ヶ月齢のインスリン受容体変異雌マウスの卵巣を摘出し、4週間後に、80%酸素負荷実験およびMnSODの活性測定を行った。その結果、卵巣摘出によって、インスリン受容体変異マウスは、50%生存日数が8日から6.5日へ18.8%短縮した(図4 A)。野生型マウスも、50%生存日数が6日から5.5日へ8.3%短縮したが、インスリン受容体変異マウスほどの短縮は認めなかった(図4 C)。また、MnSOD活性は卵巣摘出によって野生型マウスは15.9%減少、インスリン受容体変異マウスは20.1%減少した(図5 A)。さらに卵巣摘出によって、MnSOD mRNA量が減少することから、MnSODの発現は転写レベルで制御されていることが判明した(図3 E)。

Strehlowらは、マウスの卵巣を摘出するとMnSOD活性が低下し、さらにエストロゲンを投与すると再度MnSOD活性は元のレベルに戻ることを報告している[11]。そこで、性ホルモンの中でエストロゲンに注目し、3ヶ月齢の雄マウスにエストロゲン(20mg/kg/week)を計4回投与し、80%酸素負荷実験およびMnSOD活性を測定した。その結果、エストロゲン投与により、50%生存日数がインスリン受容体変異マウスでは6.5日から8.5日へ30.8%延長、野生型マウスでは5.5日から6.5日へ18.2%延長した(図4 B, 4 D)。またMnSOD活性はエス

トログエン投与により、野生型マウスで10.8%増加、インスリン受容体変異マウスでは20.6%増加した(図5B)。RT-PCR解析より、エストロゲン投与によるMnSOD mRNAの発現亢進が確認された(図3E)。

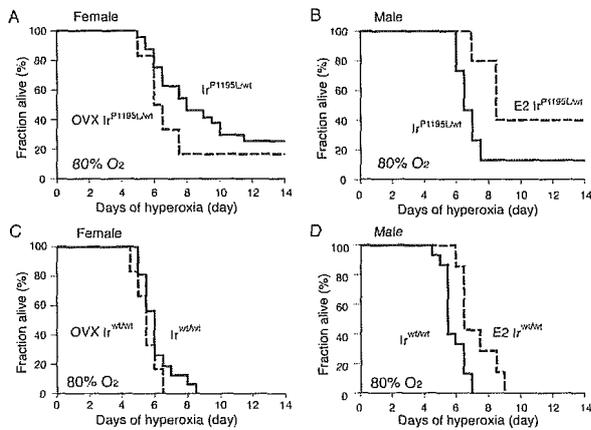


図4 エストロゲンは酸化ストレス耐性を増強する (A, C) 卵巣摘出雌マウスにおける80%酸素負荷実験。(B, D) エストロゲン投与した雄マウスにおける80%酸素負荷実験。OVX: 卵巣摘出、E2: エストロゲン投与。

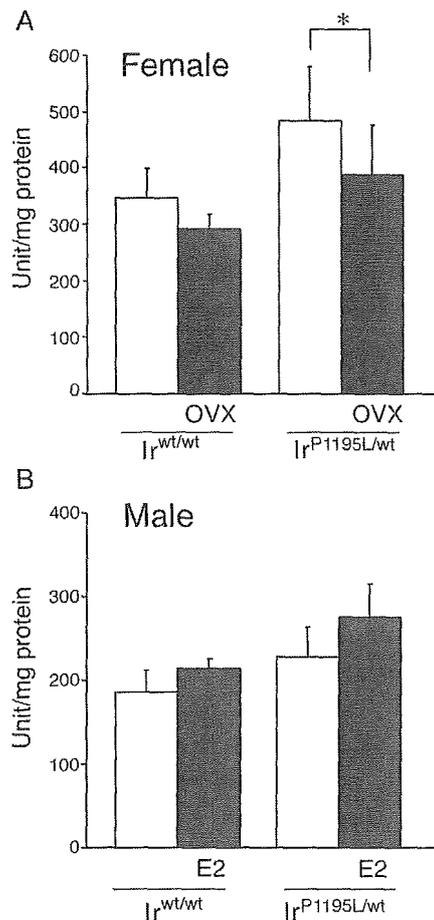


図5 エストロゲンはインスリン受容体変異マウスにおいて酸化ストレス耐性を増強する

A, 卵巣摘出雌マウスにおけるMnSOD活性。B, エストロゲン投与した雄マウスにおけるMnSOD活性。

\* $P < 0.05$

これらの結果から、エストロゲンがインスリン受容体変異マウスの抗酸化防御機構における性差を規定していることが判明した。興味深いことに高酸素負荷に対する50%生存日数およびMnSOD活性の増加率が、いずれもインスリン受容体変異マウスが野生型マウスより大きかった。このことは、エストロゲンが、インスリン受容体変異マウスでより大きな影響を及ぼしていることを示し、エストロゲンが直接的、もしくは間接的にインスリンシグナルに作用することで酸化ストレス耐性を増強することが示唆された。

#### カロリー制限によるインスリン受容体変異マウスの酸化ストレス耐性能

哺乳類においてカロリー制限は脂肪量低下による体重減、寿命延長、および酸化ストレス耐性の亢進をもたらすことが広く知られている。しかし、その分子メカニズムについては、不明な点が多い[12]。一方、脂肪特異的インスリン受容体欠損マウスでは、食餌摂取量が正常にもかかわらず脂肪が減少し、寿命が延長する。この脂肪減少が寿命延長に有利に働いていると考えられている[13]。インスリン受容体変異マウスは酸化ストレス耐性能が亢進し、脂肪細胞でもインスリンシグナルが変化しているため、体重減少の有無や食餌摂取量について検討した。その結果、食餌量は雌雄共に野生型マウスと比較して変わらなかったが(未発表データ)、雌雄共に体重が有意に減少していた(図6A, 6B)。各臓器を摘出し、重量を比較すると、脂肪が有意に減少していた(図6A, 6B)。他の臓器重量に明らかな差は認めなかったため、脂肪量の低下が体重減をもたらしたことが判明した。そこで、インスリン受容体変異マウスの脂肪減少とカロリー制限の間どのような関係があるかを調べるため、インスリン受容体変異マウスに食餌制限を行った。食餌制限群は4ヶ月齢から食餌を自由摂取量(自由食群)の65%に制限し、約40週間食餌制限を行った。その結果、自由食群の野生型マウスより、食餌制限群の野生型マウスで約40-60%脂肪が有意に減少していた(図6A, 6B)。さらにインスリン受容体変異マウスでも、自由食群の野生型マウスと比較すると約80-90%も脂肪が減少していた(図6A, 6B)。他臓器も食餌制限によって重量の減少を認めたが、脂肪ほどの減少は認めなかった。

さらに、興味深いことに80%酸素負荷実験では、食餌制限した野生型マウスは酸化ストレス耐性能が増加し、自由食群のインスリン受容体変異マウスと同程度まで生存した(図6C, 6D)。また、食餌制限したインスリン受容体変異マウスは、自由食群の変異マウスよりもさらに生存日数が延長した(図6C)。このことから、インスリンシグナルの低下と食餌制限は、お互いが相加的に脂肪減少と酸化ストレス耐性を増強させていることが示唆された。

おわりに

本研究から、哺乳類においてインスリン様成長因子1

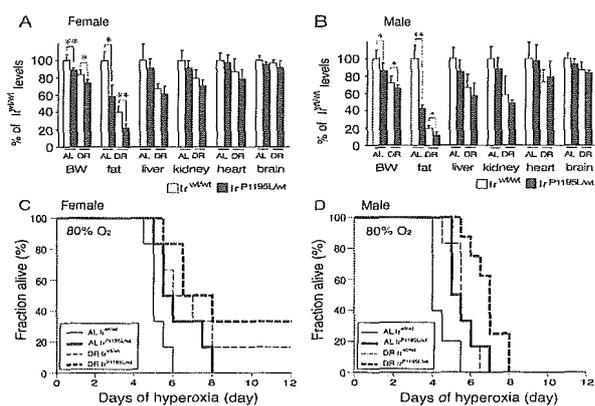


図6 カロリー制限は相加的にインスリン受容体変異マウスの酸化ストレス耐性を増強する

(A, B) 自由食群(AL)と食餌制限群(DR)の体重と主要臓器重量の比較。(A)雌、(B)雄。(C, D) 食餌制限による80%酸素負荷生存曲線。(C)雌、(D)雄。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

シグナルだけでなく、インスリンシグナルも抗酸化防御機構を調節し、長寿命形質を制御することが明らかになった。哺乳類においては、インスリンシグナルの伝達異常はインスリン抵抗性をもたらす糖尿病発症の要因となりうる。そのため、長寿命シグナルとしてのインスリンシグナルの存在は懐疑的に考えられていた。これまでの一連の研究は、インスリンシグナルの欠損は致死に至るが、シグナル伝達の減衰が長寿命形質を示すことを明らかにした。また性ホルモンがインスリンシグナルに直接的、または間接的に作用し、長寿命形質を増強することから、性ホルモンが寿命制御の一翼を担っていることが強く示唆された。女性が男性よりも長命な要因を説明する一助になると期待される。さらに、食餌制限はインスリンシグナルや性差とは独立したメカニズムで寿命を制御していることが示唆され、遺伝的要因だけでなく、環境要因によって寿命が制御できることを示唆した。

現在、インスリン受容体変異マウスの雌雄の個体寿命を解析している。変異マウスの寿命が野生型マウスより延長することが大いに期待される。また食餌制限による影響も併せて解析中であり、個体寿命におけるインスリンシグナル、性差、および食餌制限の影響を併せて考察していきたい。

#### 文献

1. Finkel T, Holbrook NJ, Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000;408:239-47.
2. Martin GM, Austad SN, Johnson TE, Genetic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nat Genet*. 1996;13:25-34.
3. Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R, A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*. 1993;366:461-4.

4. Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G, *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 1997;277:942-6.
5. 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*. 1999;13:1385-93.
6. 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*. 2003;421:182-7.
7. Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, Asico LD, Jose PA, Taylor SI, Westphal H, Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet*. 1996;12:106-9.
8. Clancy DJ, Gems D, Harshman LG, Oldham S, Stocker H, Hafén E, Leivers SJ, Partridge L, Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science*. 2001;292:104-6.
9. Parkes TL, Elia AJ, Dickinson D, Hilliker AJ, Phillips JP, Boulianne GL, Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons. *Nat Genet*. 1998;19:171-4.
10. Phillips JP, Parkes TL, Hilliker AJ, Targeted neuronal gene expression and longevity in *Drosophila*. *Exp Gerontol*. 2000;35:1157-64.
11. Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, Adam O, Grohe C, Laufs K, Böhm M, Nickenig G, Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res*. 2003;93:170-7.
12. Hamilton ML, Van Remmen H, Drake JA, Yang H, Guo ZM, Kewitt K, Walter CA, Richardson A, Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:10469-74.
13. Blüher M, Kahn BB, Kahn CR, Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science*. 2003;299:572-4.

# Insulin, estrogen, and dietary signals cooperatively regulate the longevity signals in mice.

Takahiko Shimizu, Tomonori Baba, Takuji Shirasawa

Department of Molecular Gerontology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

35-2 Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, JAPAN

## Summary

To investigate the biological significance of longevity mutation found in *daf-2* nematode, we generated the homologous murine model by replacing Pro-1195 of insulin receptors with Leu by targeted knock-in strategy. Under 80% oxygen, mutant female mice survived 33.3% longer than wild type female mice while mutant male mice survived 18.2% longer than wild type male mice. These results suggested that mutant mice acquired more resistance to oxidative stress, but the benefit of longevity mutation was more pronounced in females than males. Manganese superoxide dismutase activity in mutant mice was significantly up-regulated, suggesting that the suppressed insulin signaling induces an enhanced antioxidant defense system. To analyze the molecular bases of gender difference, we administered estrogen to mutant male mice. The result showed the extended survival of male mice under 80% oxygen. On the contrary, mutant and wild type female mice failed to show enhanced survivals when their ovaries were removed, suggesting that estrogen modulate insulin signaling to attribute to the longevity phenotypes. Furthermore, we showed the additional extension of survival rate in oxidative condition when their diet was restricted. Collectively, we show that 3 distinct signals: insulin, estrogen, and dietary signals work in independent and cooperative way to enhance the resistance for oxidative stress in mice.

Key words: Insulin signaling, oxidative stress, estrogen, dietary restriction, longevity

# coq7/clk-1 regulates mitochondrial respiration and the generation of reactive oxygen species via coenzyme Q

Daisuke Nakai,<sup>1,2</sup> Takahiko Shimizu,<sup>1</sup> Hidetoshi Nojiri,<sup>1</sup> Satoshi Uchiyama,<sup>1</sup> Hideo Koike,<sup>1</sup> Mayumi Takahashi,<sup>1</sup> Katsui Hirokawa<sup>2</sup> and Takuji Shirasawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Gerontology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Itabashi-ku, Tokyo, 173-0015, Japan

<sup>2</sup>Department of Pathology and Immunology, Aging and Developmental Science, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8519, Japan

## Summary

*coq7/clk-1* was isolated from a long-lived mutant of *Caenorhabditis elegans*, and shows sluggish behaviours and an extended lifespan. In *C. elegans* and *Saccharomyces cerevisiae*, *coq7/clk-1* is required for the biosynthesis of coenzyme Q (CoQ), an essential co-factor in mitochondrial respiration. The *clk-1* mutant contains dietary CoQ<sub>8</sub> from *Escherichia coli* and demethoxyubiquinone 9 (DMQ9) instead of CoQ<sub>9</sub>. In a previous study, we generated COQ7-deficient mice by targeted disruption of the *coq7* gene and reported that mouse *coq7/clk-1* is also essential for CoQ synthesis, maintenance of mitochondrial integrity and neurogenesis. In the present study, we rescued COQ7-deficient mice from embryonic lethality and established a mouse model with decreased CoQ level by transgene expression of COQ7/CLK-1. A biochemical analysis showed a concomitant decrease in CoQ<sub>9</sub>, mitochondrial respiratory enzyme activity and the generation of reactive oxygen species (ROS) in the mitochondria of CoQ-insufficient mice. This implied that the depressed activity of respiratory enzymes and the depressed production of ROS may play a physiological role in the control of lifespan in mammalian species and of *C. elegans*.

**Key words:** *coq7/clk-1*, coenzyme Q, mitochondrial respiration, reactive oxygen species.

## Introduction

*clk-1* is one of the longevity mutants discovered in *Caenorhabditis elegans*. This mutant shows an extended lifespan, delayed embryonic and postnatal development, and slow behaviours such as retarded defecation, swimming and pharyngeal pumping

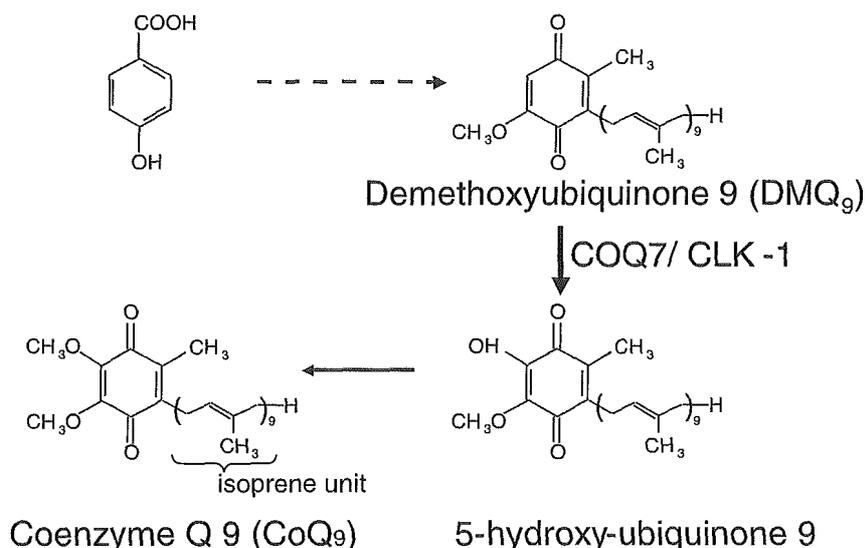
(Wong *et al.*, 1995; Lakowski & Hekimi, 1996). The primary sequence of the causal gene, *clk-1*, is conserved through evolution among various species ranging from yeast to mammals (Asami *et al.*, 1999; Ewbank *et al.*, 1997; Vajo *et al.*, 1999). Sequence homology showed that *clk-1* is the mammalian orthologue of yeast *coq7/cat5* and this plays an essential role in the biosynthesis of coenzyme Q (ubiquinone, CoQ) (Fig. 1) (Marbois & Clarke, 1996). CoQ transfers electrons from complex I to complex III, or complex II to complex III, in the mitochondrial inner membrane (Do *et al.*, 1996). Previous studies demonstrated that the majority of superoxide (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) is generated at the CoQ site in the mitochondrial respiratory chain (Lass *et al.*, 1997). Reactive oxygen species (ROS) such as O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, OH<sup>•</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ONOO<sup>-</sup> are endogenous substances harmful to macromolecules such as DNA, lipids and proteins, damage to which eventually limits the lifespan of animals (Sohal & Weindruch, 1996). CoQ presents the characteristic structure of a redox-active quinone with a variable number of isoprene units, ranging from seven to 12 depending on the animal species. For example, in *C. elegans* and rodents, CoQ<sub>9</sub> is the dominant form, whereas CoQ<sub>10</sub> is the dominant form in other mammals such as bovines and humans (Lass *et al.*, 1997; Jonassen *et al.*, 2001) showed that *clk-1* mutant worms failed to produce endogenous CoQ<sub>9</sub>, but instead absorbed exogenous CoQ<sub>8</sub> from dietary *E. coli* *Clk-1* mutant worms, and then accumulated demethoxyubiquinone 9 (DMQ<sub>9</sub>), the precursor of CoQ<sub>9</sub>, because the mutants cannot catalyse the conversion from DMQ<sub>9</sub> to CoQ<sub>9</sub> (Fig. 1). Therefore, it is not surprising that the *clk-1* mutant fails to develop when dietary CoQ<sub>8</sub> was removed by supplying them with CoQ-deficient *E. coli* (Jonassen *et al.*, 2001). In this context, the deficiency of CoQ<sub>9</sub> confers extended lifespan to *C. elegans* under conditions where the dietary CoQ<sub>8</sub> is just sufficient for the worm's development and survival. It is interesting, then, to note that COQ7-deficient mice, which exhibited an abnormal accumulation of DMQ<sub>9</sub>, fail to grow beyond embryonic day 10.5 (Nakai *et al.*, 2001). Overall, the data provide only limited support for the possibility that DMQ<sub>9</sub> functions as an electron messenger to support the development and survival in *C. elegans* and mice. Conversely, wild-type *C. elegans* showed an extended lifespan when dietary CoQ<sub>8</sub> was removed (Larsen & Clarke, 2002). Therefore, a reduced level of CoQ in mitochondria may extend the lifespan of *C. elegans*.

In this study, we successfully rescued COQ7-deficient mice from embryonic lethality by exogenous expression of *clk-1* in transgenic mice. Interestingly, the rescued COQ7-deficient mice showed a decreased level of CoQ in the kidney, and we further showed a significant correlation between the mitochondrial enzyme activities and ROS production in the model mice. The results imply that this model system may shed light on the biochemistry of lifespan in mammals.

## Correspondence

Dr Takuji Shirasawa, Department of Molecular Gerontology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, Japan. Tel.: +813 3964 3241; fax: +813 3579 4776; e-mail: shirasawa@tmig.or.jp

Accepted for publication 25 June 2004



**Fig. 1** Pathway for the biosynthesis of CoQ<sub>9</sub>. The proposed pathway for CoQ<sub>9</sub> biosynthesis in eukaryotes is as previously described (Marbois & Clarke, 1996). COQ7/CLK-1 is essential for the step in which demethoxyubiquinone 9 (DMQ<sub>9</sub>) is hydroxylated at the 5-position and converted to 5-hydroxy-ubiquinone.

## Results

### COQ7-transgene rescues the embryonic lethality of COQ7-deficient mice

To rescue the embryonic lethality of COQ7-deficient mice, we generated prion promoter-driven COQ7/CLK-1 transgenic mice (Fig. 2A). This prion promoter is capable of driving low levels of transgene expression in various tissues, with the highest expression occurring in the brain and heart (Borchelt *et al.*, 1996). We therefore assumed that the brain and heart were essential to the rescue from embryonic lethality.

To generate Tg mice with a *coq7*<sup>-/-</sup> background, we crossed *coq7*<sup>+/-</sup> mice with COQ7 Tg mice. Subsequently, *coq7*<sup>+/-</sup> mice expressing the COQ7 transgene were crossed with *coq7*<sup>+/-</sup> mice (Fig. 2B). COQ7-deficient mice were successfully rescued from embryonic lethality by intercrossing with two independent transgene lines, Tg23 and Tg96. COQ7-deficient mice were born following Mendelian rules and grew without obvious abnormalities; there were no differences in body weight at the age of 8 weeks among *coq7*<sup>+/+</sup> mice with COQ7 Tg, *coq7*<sup>-/-</sup> mice with COQ7 Tg and wild-type mice (data not shown). Western blot analysis indicated that Tg23 exhibited a lower COQ7 expression and Tg96 exhibited a higher COQ7 expression in various tissues (Fig. 2C). Immunohistochemical studies also indicated that transgenic COQ7 expression in the kidneys of Tg96 mice was comparable with that of endogenous COQ7 in the kidneys of wild-type mice. Although COQ7 Tg expression in the kidney is controlled by the prion promoter, the localization of transgenic COQ7 is indistinguishable from that of endogenous COQ7 (data not shown).

### Rescued mice showed decreased CoQ<sub>9</sub>

To investigate whether COQ7 transgene expression rescues CoQ<sub>9</sub> deficiency in COQ7-deficient mice, we measured the amount of CoQ<sub>9</sub>, CoQ<sub>10</sub> and DMQ<sub>9</sub> (hereafter called quinones)

**Table 1** Quantities of quinones in the kidneys and liver of Tg96 and Tg23 mice

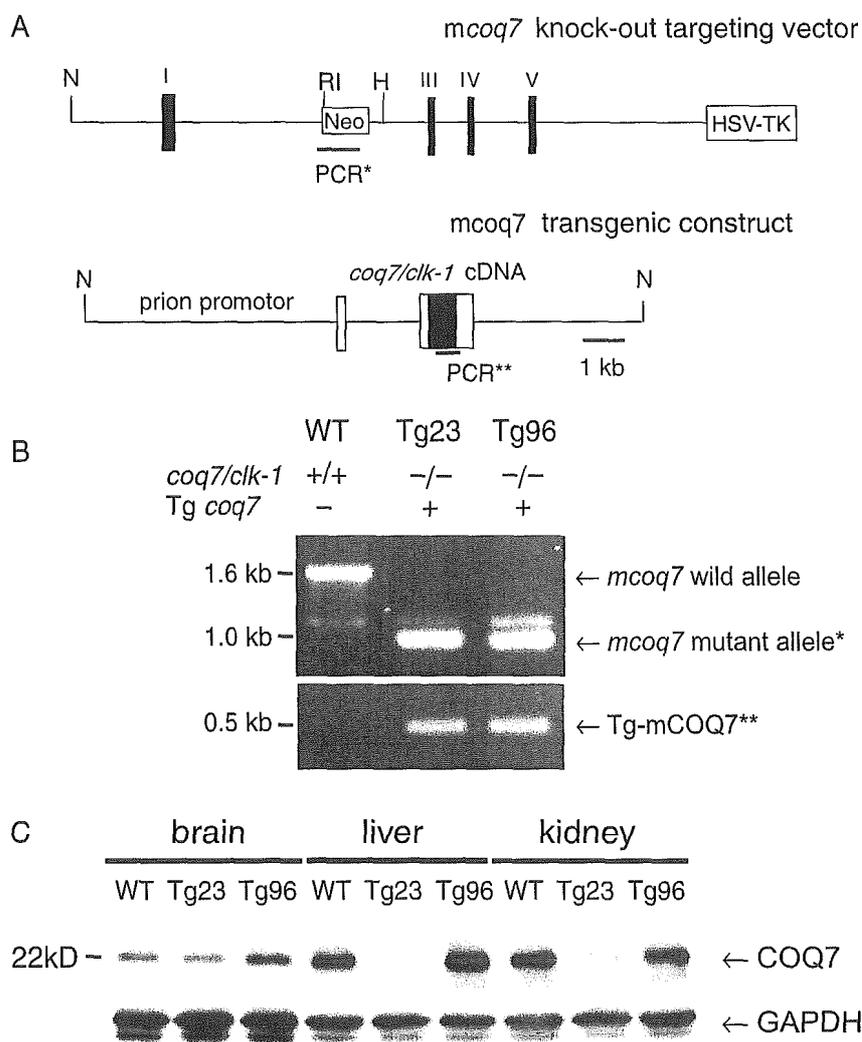
	<i>n</i>	CoQ <sub>9</sub>	DMQ <sub>9</sub>	CoQ <sub>10</sub>
Kidney				
WT	4	3.04 ± 0.24	n.d.	0.51 ± 0.13
Tg96	4	1.81 ± 0.44*	0.60 ± 0.23	0.41 ± 0.11
WT	4	2.72 ± 0.62	n.d.	0.46 ± 0.14
Tg23	3	2.10 ± 0.34	0.36 ± 0.20	0.30 ± 0.11
Liver				
WT	4	0.59 ± 0.14	n.d.	0.015 ± 0.004
Tg96	4	0.52 ± 0.05	n.d.	0.014 ± 0.002
WT	4	0.44 ± 0.13	n.d.	0.015 ± 0.009
Tg23	4	0.42 ± 0.16	0.021 ± 0.016	0.013 ± 0.006

Values indicate nmol (mg protein)<sup>-1</sup>. The standard deviation represents differences between analytical mice.

\**P* < 0.05 when compared with wild-type mice; n.d., not determined.

in various tissue homogenates of Tg23 and Tg96 mice using HPLC. In reverse-phase HPLC of quinones from kidney mitochondria, extracts from Tg23 and Tg96 mice, as well as wild-type mice, yielded a major peak at 16.1 min and a minor peak at 23.2 min, corresponding to CoQ<sub>9</sub> and CoQ<sub>10</sub>, respectively (Fig. 3).

In total homogenates from the kidneys of Tg96 mice, the amount of CoQ<sub>9</sub> (1.81 ± 0.44 nmol mg<sup>-1</sup> protein) was significantly depressed by 60% compared with wild-type mice (3.04 ± 0.24 nmol mg<sup>-1</sup> protein), and the amount of CoQ<sub>10</sub> was slightly depressed (0.41 ± 0.11 vs. 0.51 ± 0.13 nmol mg<sup>-1</sup> protein) (Table 1). Although the precise validation of the quantified CoQ<sub>9</sub> would need the internal standard in the extraction process as described previously (Jonassen *et al.*, 2001), the standard deviation observed among samples from wild-type animals (Table 1) suggested negligible variations in the recovery of CoQ<sub>9</sub> in this assay. In the kidneys of Tg23, the amounts of CoQ<sub>9</sub> or CoQ<sub>10</sub> in the mutant mice were not significantly different as



**Fig. 2** Generation of COQ7 transgenic mice. (A) Schematic presentation of the mouse *coq7* knock-out targeting vector and mouse *coq7* transgenic construct. In the targeting vector, exons from the *coq7* genome are indicated by closed boxes, and the open boxes indicate the neomycin resistance cassette (Neo) and HSV-TK gene. The bar (\*) indicates the fragment of *coq7* mutant allele used for PCR amplification. In the transgenic construct, mouse *coq7* cDNA was cloned into the mouse prion promoter construct (Borchelt *et al.*, 1996). Closed boxes represent mouse COQ7 cDNA, and open boxes are exon sequences of the prion. The bar (\*\*) indicates the fragment used for PCR amplification. N; *NotI*. (B) Genotypic analysis of COQ7-deficient mice with the COQ7 transgene. The genotypes of *coq7/clk-1* were confirmed by PCR (upper panel) (Nakai *et al.*, 2001). The COQ7 transgene was confirmed by PCR with the COQ7-transgene-specific primers (lower panel) as described in the Experimental procedures. (C) Western blot analysis of COQ7-deficient mice with the COQ7 transgene. Tissue extracts (40 µg) were separated on 15% polyacrylamide-gel and COQ7 proteins were analysed by anti-mouse *coq7/clk-1* antibody. The 22-kDa molecule is recognized by anti-mouse *coq7/clk-1* antibody. Rescued COQ7-deficient mice showed detectable COQ7 expression in the brain, liver and kidneys.

**Table 2** Quantities of quinones in the kidneys and liver mitochondria of Tg96 and Tg23 mice

	<i>n</i>	CoQ <sub>9</sub>	DMQ <sub>9</sub>	CoQ <sub>10</sub>
<b>Kidney</b>				
WT	5	4.39 ± 0.80	n.d.	0.80 ± 0.10
Tg96	5	2.29 ± 0.79*	1.16 ± 0.49	0.55 ± 0.25
WT	3	4.77 ± 0.19	n.d.	0.88 ± 0.17
Tg23	3	4.65 ± 1.01	1.24 ± 0.18	0.93 ± 0.21
<b>Liver</b>				
WT	10	1.24 ± 0.19	n.d.	0.04 ± 0.01
Tg96	10	0.95 ± 0.37**	n.d.	0.03 ± 0.01

Values indicate nmol (mg mitochondrial protein)<sup>-1</sup>. The standard deviation represents differences between analytical mice.

\**P* < 0.005, \*\**P* < 0.05; n.d., not determined

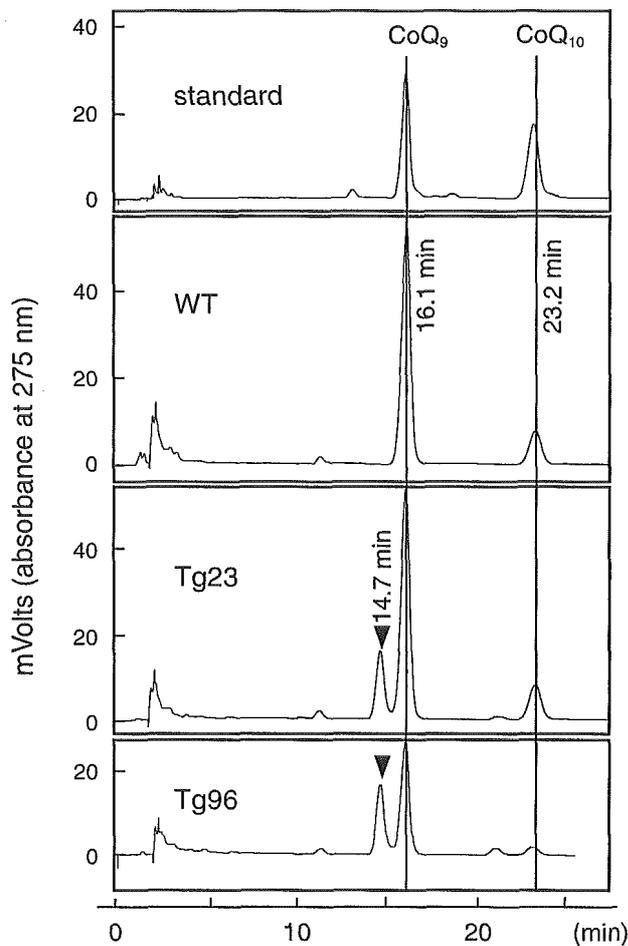
compared with wild-type mice (Table 1). In the liver of Tg96 and Tg23 mice, the amounts of CoQ<sub>9</sub> or CoQ<sub>10</sub> were not significantly different as compared with wild-type mice (Table 1).

We next measured the amounts of quinones in the kidney and liver mitochondria of Tg23 and Tg96 mice (Table 2). In

mitochondria from the kidney of Tg96 mice, the amount of CoQ<sub>9</sub> (2.29 ± 0.79 nmol mg<sup>-1</sup> protein) was significantly depressed by 52% compared with the wild-type (4.39 ± 0.80 nmol mg<sup>-1</sup> protein), and the amount of CoQ<sub>10</sub> was slightly depressed (0.55 ± 0.25 vs. 0.80 ± 0.10 nmol mg<sup>-1</sup> protein) (Table 2). In the mitochondria of kidney from Tg23 mice, the amount of CoQ<sub>9</sub> or CoQ<sub>10</sub> was not significantly different (Table 2). In the mitochondria of liver from Tg96 mice, the amount of CoQ<sub>9</sub> was significantly depressed (0.95 ± 0.37 vs. 1.25 ± 0.19 nmol mg<sup>-1</sup> protein), but the amount of CoQ<sub>10</sub> was not significantly different (Table 2). These data indicate that the transgenic expression of COQ7 rescues CoQ<sub>9</sub> deficiency in mitochondria, but only partly rescues that found in the kidney and liver of Tg96 mice.

#### Accumulation of DMQ<sub>9</sub> in rescued COQ-deficient mice

We previously reported that COQ7-deficient mice fail to synthesize CoQ<sub>9</sub>, but instead yield DMQ<sub>9</sub> (Nakai *et al.*, 2001). In HPLC, the mitochondrial fraction from the kidneys of Tg23 and Tg96 mice yielded additional peaks at 14.7 min (Fig. 3, Table 2). Mass spectrometric analysis of these peaks revealed that they

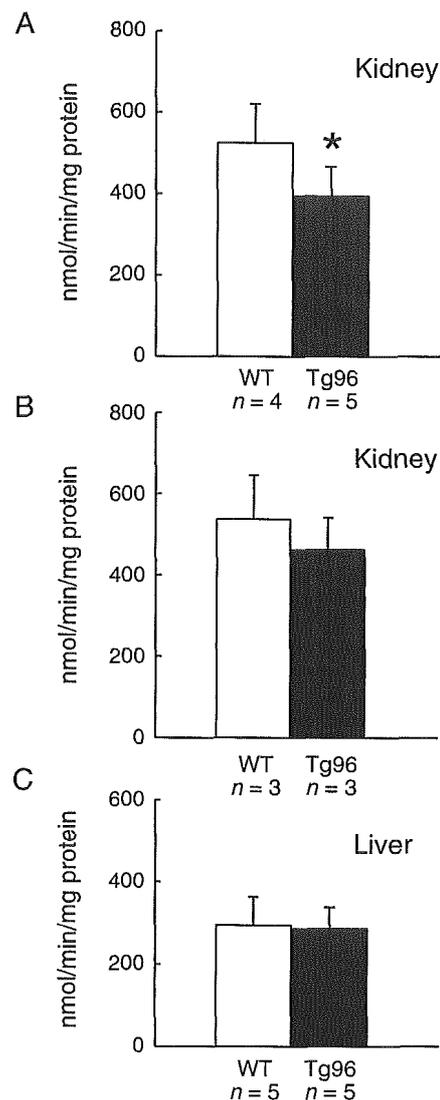


**Fig. 3** Reverse-phase HPLC of CoQ from kidney mitochondria of Tg23, Tg96 and wild-type mice. The standards, CoQ<sub>9</sub> and CoQ<sub>10</sub>, are shown in the upper panel. The two peaks, from Tg23 or Tg96 mice, appeared 1.4 min earlier than that for CoQ<sub>9</sub>. Using mass spectrometric analysis, this additional peak at 14.7 min (arrowhead) was found to be identical to DMQ<sub>9</sub> (Nakai *et al.*, 2001). The CoQ<sub>9</sub> peak area in Tg96 is less than that of wild-type and Tg23 mice. One hundred micrograms of mitochondrial protein was used in each experiment.

represent DMQ<sub>9</sub> (Nakai *et al.*, 2001). Liver homogenates of Tg23 also demonstrated this peak, although that of Tg96 did not (Table 1). In mitochondria from Tg96 and Tg23 kidneys, a large amount of DMQ<sub>9</sub> was present, whereas in mitochondria from the liver of Tg96 DMQ<sub>9</sub> was not found (Table 2). These results indicate that DMQ<sub>9</sub> accumulated in mitochondria of rescued COQ7-deficient mice.

#### Rescued mice with a depressed CoQ<sub>9</sub> content show lower mitochondrial respiratory activities

To investigate whether transgene expression of COQ7 rescues mitochondrial functions in COQ7-deficient mice, mitochondrial enzyme activities requiring CoQ as an electron transporter (CoQ-responsive respiratory enzyme) were assayed in Tg23 and Tg96 mice. The enzyme is succinate-cytochrome *c* reductase (complex II + III), which uses succinate as a substrate. Succinate-



**Fig. 4** Enzymatic activities of mitochondria in rescued mice. (A) Activities of respiratory chain enzymes in the kidneys of Tg96 mice. Enzyme activities are shown as nmol of the electron acceptor (cytochrome *c*) min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> mitochondrial protein. Succinate-cytochrome *c* reductase activities in the kidneys of Tg96 mice decreased significantly (\**P* < 0.05). Error bars represent the standard deviation. (B) Activities of succinate-cytochrome *c* reductase in the kidneys of Tg23 mice. There was no significant change in enzyme activities. (C) Activities of succinate-cytochrome *c* reductase in the liver of Tg96 mice. There was no significant change in enzyme activities.

cytochrome *c* reductase activity in the kidneys of Tg96 mice was significantly depressed compared with that of wild-type mice ( $533.9 \pm 82.0$  vs.  $396.8 \pm 62.3$  nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein) (Fig. 4A). Mitochondria from the kidneys of Tg23 mice showed no changes in enzyme activity (Fig. 4B). Mitochondria from the liver of Tg96 mice also showed no changes in enzyme activity (Fig. 4C). These results suggest that kidney mitochondria with a lower CoQ<sub>9</sub> content exhibit reduced succinate-cytochrome *c* reductase activity.

To understand further the relationship between quinones and respiratory chain enzyme activity, we evaluated the correlation