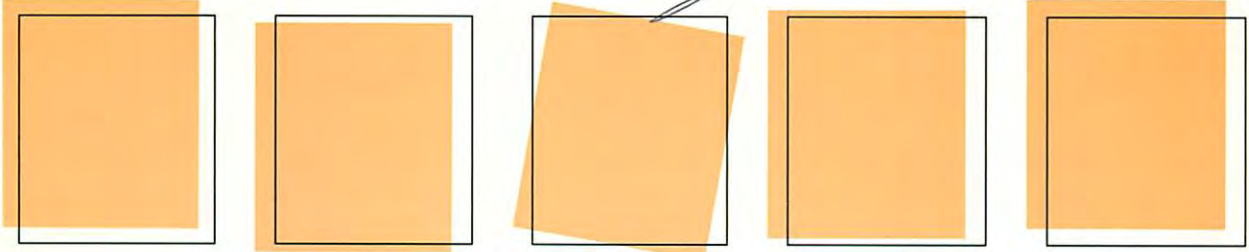
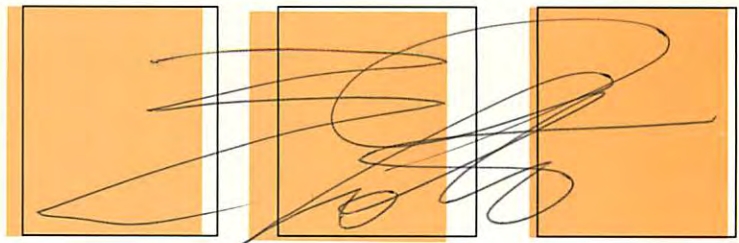


日本基礎老化学会  
第19回シンポジウム要旨掲載



21

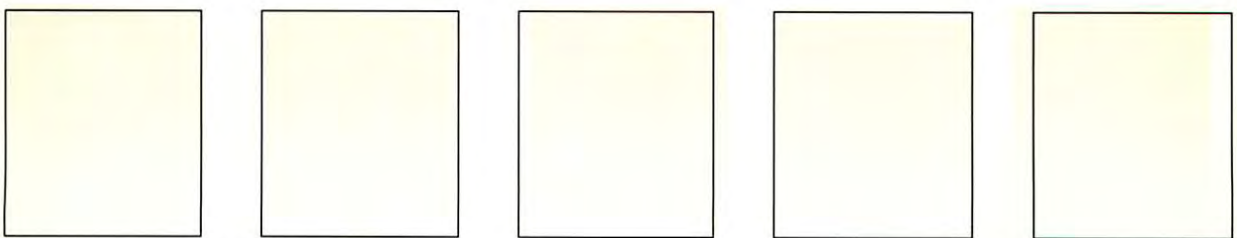
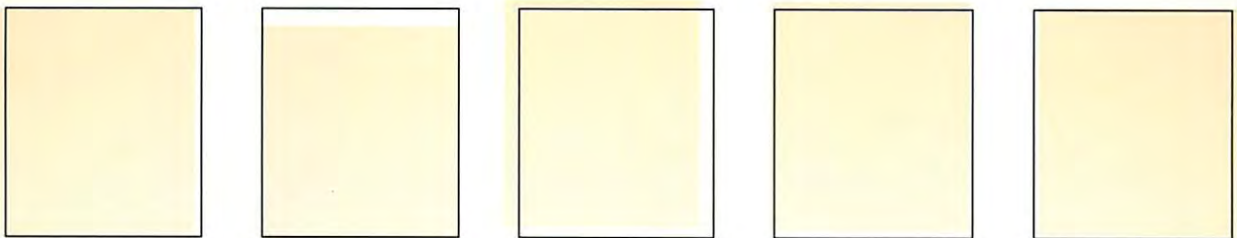
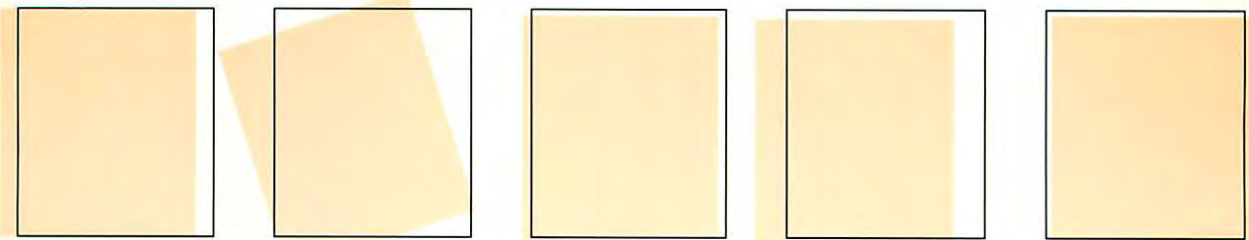
# 基礎老化研究

NO. 1

BIOMEDICAL

1997

GERONTOLOGY



日本基礎老化学会

Japan Society for Biomedical Gerontology

# 基礎老化研究第21巻第1号 1997年10月

## 寿命を制御する遺伝子

(第19回日本基礎老化学会シンポジウム)

1. イマチュリン：細胞老化と若返りの分子機構  
芳賀信幸 1
2. 酵母における時計関連遺伝子と寿命  
剣 邦夫 3
3. 遺伝子の異所発現系を用いたショウジョウバエ寿命変異体のスクリーニング  
相垣敏郎 6
4. 線虫、C.エレガンスの寿命を制御する遺伝子  
本田修二 9
5. 老化促進モデルマウス (SAM) の寿命・老化病態を制御する遺伝子の探索  
樋口京一 12
6. 細胞の寿命を制御する遺伝子；モータリンとp53の相互作用  
ワダワ・レヌ 16
7. Werner症候群と老化  
三木哲郎 22

## イマチユリン： ゾウリムシにおける細胞老化と 若返りの分子機構

芳賀 信幸  
(石巻専修大学理工学部)

Clonal aging and senescence of *Paramecium* have been characterized by various changes in cellular functions (1). *Paramecium* shows a change from sexual immaturity to maturity over the course of its life cycles (2). Sexual maturation is genetically controlled and the length of immaturity period is defined as a function of the number of cell divisions.

We have found that a cytoplasmic soluble protein, immaturin, represses sexual activity when injected into sexually mature cells (3). The retention of immaturin effect over the course of cell divisions after microinjection indicates that immaturin is diluted simply and distributed randomly in daughter cells.

The production of the immature-mature hybrid nucleus revealed that immature macronucleus is dominant over mature nucleus with the respect to the ability to express sexual activity (4). Our results suggest that the macronucleus determines ability to express sexual activity by counting post-conjugation cell divisions and keeping track of the age of the clone and immaturin act as a cytoplasmic signaling molecule to control the expression of sexual activity.

単細胞の真核生物であるゾウリムシは1940年代からClonal agingのモデル系として盛んに研究されるようになった。ゾウリムシのClonal agingは様々な細胞機能の変化を伴って起こる現象である。Smith-Sonnebornの "Age-related Changes in *Paramecium*" (1)によるとAgingの進行に伴って減少する主な細胞機能には、分裂速度、DNA及びRNA合成能、子孫の生存率、核の総DNA量などがあり、一方、Agingの進行に伴って増加するものには、紫外線感受性、Lysosomal activity、Cytoplasmic toxicityなどがある。最近、BlackbarnのグループはAgingの進行に伴ってテロメアの長さは変化しないが、染色体DNAが短くなると、報告している。

ゾウリムシ(*Paramecium caudatum*)は接合して、生殖核から新しい核を形成すると、ライフサイクルはリセットされた状態になり、細胞は零歳から再スタートする。有性生殖を行なう能力は初めの50 - 60回分裂の間は発現せず、未熟期と呼ばれている。その後、成熟期になると接合能力が発現する。接合能力は腹側の繊毛に局在する接合型物質の活性に依存しており、接合型物質の特異性は一組の対立遺伝子によって規定されている。

ゾウリムシの性的に成熟する過程は、分裂回数に依存した内因性のProgramed processである。未熟期の長さには少なくとも2組の対立遺伝子が関与していることが早熟突然変異体の解析によって明らかにされている。

我々は細胞質のMicroinjectionによって、未熟期の細胞の細胞質には接合活性の発現を

抑制するタンパク分子が存在することを見出し、これを精製してイマチュリン (immaturin) と名付けた。Clonal agingに伴うイマチュリン活性は、接合後、20回分裂から30回分裂にかけて高いレベルに達し、その後低下して成熟期に入ることが三輪によって明らかにされている。成熟期の細胞に対するイマチュリン効果の持続性を検討した結果、イマチュリンは細胞分裂に伴い娘細胞にランダムに分配され、単純希釈される、と仮定しても十分に説明がつくことが分かった。

次に、我々はゾウリムシがどのようにして分裂回数を計測し、その記録を蓄積しているのか、という問題を検討するために、"Macronuclear fusion-reorganization method"を開発し、Clonal agingに伴う大核のSexualityについて調べた。Clonal ageの異なる2つの大核を融合させ、再構成された大核のSexualityを接合活性の発現を目安にして調べたところ、未熟-成熟の組み合わせの融合核を持った細胞は常に未熟であることが明らかになった。従って、未熟期から成熟期へと移行する過程では、細胞分裂に伴って大核自身になんらかの変化が起こっており、この変化が分裂回数計測機構と密接な関係にあるのではないかと考えられる。

我々はイマチュリン活性の高い分画を用いてモノクローナル抗体を作成し、イマチュリン活性を阻害する抗体を得た。現在、この抗体を用いて未熟期の細胞から抗原を同定する実験を行なっている。

我々の結果を総合すると、ゾウリムシの性の成熟過程におけるClonal agingの機構は次のようになる。すなわち、大核は接合しからの分裂回数をカウントし、その情報を蓄積することによってイマチュリンの合成量を調節する。一方イマチュリンはシグナル分子として、細胞内の存在量に応じて接合型物質の発現を調節しているのであろう。最近、イマチュリン分画には強いDNase活性があることが分かった。現在、イマチュリン活性とDNase活性との関連についてモノクローナル抗体を用いて生化学的な解析を行なっているところである。

## References

1. Smith-Sonneborn, 1981. *Int. Rev. Cytol.* 73: 319-354.
2. Sonneborn, T.M. 1957. In *The Species Problem* (ed. E. Mayr), pp. 155-324. Washington, D.C.: Am. Ass. Adv. Sci.
3. Haga, N. & Hiwatashi, K. 1981. *Nature*, 289: 177-179.
4. Haga, N. 1995. *J. Cell Sci.* 108: 3671-3676.

## Key words:

*Paramecium*, Cellular aging, Immaturin, Sexual rejuvenation

# 酵母における時計関連遺伝子と寿命

劔 邦夫

山梨医科大学学生化学2

## 1. はじめに

我々は数年前より、出芽酵母を用いて老化と生物リズムについて時間生物学的研究をすすめている。酵母は遺伝学的によく研究されており、遺伝子操作もやりやすいという一般的利点のほかは、時間生物学に用いる利点はあまりありません。細胞周期はふつう2時間くらいで非常に短く、概日リズムをしめす現象は知られていません。寿命は個々の細胞の分裂寿命であり、ポピュレーションとしての分裂寿命でないため同じ世代の細胞を量的に調整することが困難です。しかし、酵母では解糖系のウルトラリアリズムが知られ、他のウルトラリアリズムも見られるはずですし、細胞寿命の測定も面倒ながら可能です。今回は寿命そのものに関連する遺伝子ではありませんが、我々が単離した生物リズムに関連すると思われる遺伝子GTS1の機能の解析の結果から、生物リズムの制御と寿命との関連について示唆する結果が得られたので報告させていただきます。

## 2. 遺伝子GTS1について

GTS1は1994年当時単離されていた時計遺伝子、ショウジョウバエのPERIODとアカパンカビのFREQUENCYがGly-Thrリピ

ートをもち、その塩基配列をプローブとしてcDNAクローニングされたものです(1)。当初はシーケンスのミスからGTリピートと思われましたが、後にQAリピートであることが判明しました(2,3)。これはこの部位がグルタミン(Q)に富む領域に挟まれ、塩基配列上GCリッチでDNA鎖の圧縮がおこりやすいのが原因でした(3)。そのため、GTS1が時計関連遺伝子である根拠が薄れたのですが、酵母の全遺伝子のなかでCAGリッチな塩基配列でコードされるGTあるいはQAリピートは他にはなく、最近単離されたヒトやマウスのCLOCK遺伝子ではQQリピート(ポリQ配列)がありやはりCAGリッチであることから、アミノ酸レベルというよりは、DNAレベルでCAGリッチであることが必要な可能性があります。この点では、FREQUENCYでGTリピートを含むコーディング領域が、FREQUENCY転写の概日リズムに必要であるとの最近の報告(4)が注目されます。なおGTS1遺伝子産物(Gts1p)には高等生物の時計遺伝子などに見られるPASドメインは含まれていませんが、N末端側にGATA転写因子様ツィンクフィンガーが存在し(4)、ややC末端側に後述するホモダイマーおよびヘテロダイマー結合部位が存在します(5)。しかし、GATA転写因子様ツィンクフィンガーには塩基性アミノ酸がほとんど欠けており、DNAとの結合活性は見られませんでした。

## 3. GTS1の機能について

1) GTS1コピー数依存的に変化する表現型

GTS1の機能を調べるために、GTS1破壊株、GTS1多コピー株を作成し、コピー数に依存的な表現系への効果を調べました(1,6)。その結果、GTS1およびGts1pのコピー数に依存して、細胞周期の開始が遅れ、細胞サイズが大きくなり、胞子形成がおくれ、静止期における熱耐性が弱くなることがわかりました。これらは、他の生物種では時計遺伝子との関連がいられている生命現象であり、それらがGTS1コピー数に依存的に変わることがわかりました。

細胞周期のリズムに対するGTS1の効果について、Kippert（現在、ロンドン大学）が温度リズムによる同調で細胞分裂のウルトラリアンリズム(7)をみています。彼の分析では、野性株では30分、GTS1多コピー株では42分、破壊株では無リズム、ないし極端に短いリズムになっているとのことでした（私信）。しかし、この結果はわれわれの研究室では細胞周期の同調自体がうまくいかず追試できていません。

## 2) GTS1破壊株、多コピー株で共通して弱くなる表現型

酵母Two-hybrid分析の結果から、Gts1pはホモダイマーを形成するのですが、その結合部位はYCF1やMDR1などを含む一群のABCトランスポーターの細胞質部分とホモロジーがあり、Two-hybrid法では両者は結合することがわかりました(5)。これらのトランスポーターの基質となる薬剤のうち、カドミウム、シクロヘキシミド、ニトロベンゼン誘導体などに対する耐性は、

GTS1破壊株および多コピー株とも、ことに後者で、野性株に比較して減少しました(5)。同様のGTS1変異株における耐性の変化は過酸化水素やスーパーオキシドの誘発剤であるメナチオンに対してもみられました。また、細胞分裂寿命を野性株と比べてみると、GTS1破壊株ではわずかの短縮でしたが、多コピー株で著しい短縮がみられています(6)。

## 4. GTS1と解糖系リズム

酵母細胞の培養でグルコース消費後アルコールを使い始めて、ほぼ1時間後の細胞を用いると、シアン誘導性に解糖系のウルトラリアンリズムがNADHの量的振動として観察されます。この振動の速度は温度依存的に変化し、GTS1変異株では変化はほとんど見られませんでした。しかし、振動の振幅はGTS1コピー数に依存的に減少し、おそらくその結果として、振動の持続時間が減少しました(8)。すなわち、GTS1破壊株で振幅と持続時間が最大となり、多コピー株で最小となります。この結果はGts1pが解糖系のリズムに何らかの関与を伺わせるものと思われる。

また、酵母の持続培養を継続すると、ある時点から培地の溶存酸素濃度（＝細胞の酸素消費速度）の変化と細胞分裂の同調が見られるようになります。この系ではまだ野性株を用いた実験を進めているところですが、この同調は温度補償性のリズムをしめし、熱耐性、カドミウム、過酸化水素などに対する耐性も互いに異なる位相をもちながらも同調したり

ズムを示すことが分りました。

## 5. 考察

Gts1pが例えばショウジョウバエの PERIODのような時計遺伝子であるというような確証はありませんが、上述の変異体の表現型からみられた多面的効果、遺伝子コピー数依存性などのような所見から少なくとも時計関連遺伝子であることは言ってもよいのではないかと思います。熱耐性、薬物耐性、酸化剤耐性などがGts1pの発現レベルによって変化し、これらの活性が細胞の酸素消費速度（エネルギー代謝や酸化還元電位と関係していると思われる）の変化や細胞周期などと同調していることから、Gts1pがこれらのリズムの同調に関係し、細胞が最もダメージを受けないで、寿命が長く保てるように調節している可能性が考えられます。機構としては、Gts1pの発現レベルが同調するリズムの位相を調節しているのか、種々の耐性活性そのものを調節しているのか、2つの可能性が考えられますが、現在検討中です。

他の生物種では、ショウジョウバエの場合、PERIODの変異により、概日リズムが短周期のハエも、長周期になったハエも寿命は短縮することが報告されています(9)。一方、線虫では4種の時計関連遺伝子の変異ではむしろ寿命が延長することが報告されています(10)。しかし、これらの遺伝子はまだ本当に時計遺伝子である確証がなく、著者らもこれらの遺伝子の変異により代謝速度が遅れるのが原因ではないかと推論しています(10)。

## 6. 文献

1. Mitsui, K., Yaguchi, S. & Tsurugi, K. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14, 5569-5578.
2. Bossier, P., Goethals, P. & Rodrigues-Pousada, C. (1997) *Yeast*, 13, 717-725.
3. Yaguchi, S., Mitsui, K. & Tsurugi, K. (1997) *Biochem. Arch.* 13, 97-105.
4. Ireland, L. S., Johnston, G. C., Drebot, M. A., Dhillon, N., et al. (1994) *EMBO J.* 13, 3812-3821.
5. Kawabata, K., Mitsui, K. & Tsurugi, K. In submission.
6. Yaguchi, S., Mitsui, K., Kawabata, K., Xu, Z. & Tsurugi, K. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218, 234-237.
7. Kippert, F. & Lloyd, D. (1995) *Microbiology*, 141: 883-890.
8. Wang, J., Mitsui, K. & Tsurugi, K. In submission.
9. Ewer, J., Hambleton-Coyle, M., Rosbash, M. & Hall, J. C. (1990) *J. Neurogenet.* 7, 31-73.
10. Lakowski, B. & Hekimi, S. (1996) *Science*, 272, 1010-1013.

# 遺伝子強制発現系を用いたショウジョウバエ寿命変異体のスクリーニング

相垣敏郎

東京都立大学大学院・理学研究科  
科学技術振興事業団・さきがけ21

はじめに

寿命は成体の表現型の一つであり、突然変異体を分離して遺伝学的な解析を行うことが可能である。しかしながら、成体で発現される遺伝子の多くは発生過程においても発現されており、ある突然変異が寿命に影響を及ぼす場合に、それが成体における遺伝子の役割を反映しているのか、あるいは発生過程で起こった傷害の後遺症を観察しているのか定かではない。また、遺伝子ノックアウト個体が初期発生において致死になる場合、問題の遺伝子が成体の老化や寿命に及ぼす影響を及ぼすのかを知ることは不可能である。遺伝学的アプローチは初期発生の解析には極めて有効であるが、後期発生や成体での形質に関しては限界がある。著者らはこれらの短所を克服するものとして遺伝子の強制発現系を利用したショウジョウバエの変異体作成法を開発した。理論的にはゲノムに含まれる全ての遺伝子を対象として、成体に限定して異常を来す変異体、あるいは限定された組織において異常を示す変異体を作成すること

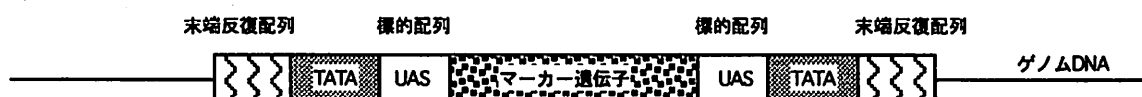
ができる。ここでは新しい変異体作成法の原理、およびこれを用いた寿命変異体のスクリーニングについて紹介する。

## 1. 強制発現による変異体作成法の原理

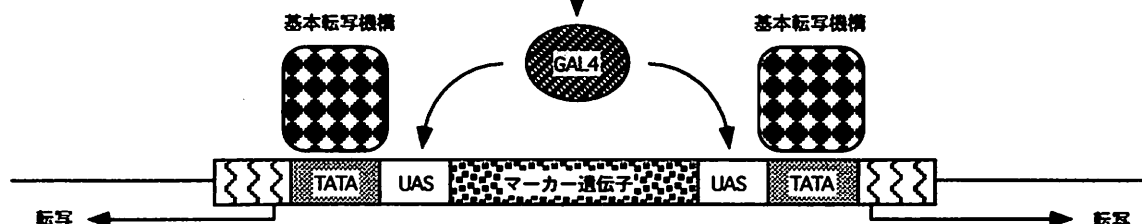
ショウジョウバエにおいては、酵母由来のGAL4転写因子とその標的配列であるUASエンハンサー（上流活性化配列）を組み合わせて遺伝子を異所発現させる方法が確立されている（文献1）。また、遺伝子の異所発現が機能獲得変異体としてしばしば劇的な表現型を示すことも明らかになった（文献2）。これらは既にクローン化された遺伝子を用いて試みられたものであるが、本研究ではゲノム中の遺伝子をランダムに異所発現させて特定の表現型を示す変異体をスクリーニングすることを目的とする。ショウジョウバエのトランスポゾンであるPエレメントを改造して、その内部にUAS及び基礎的プロモーター配列を導入したものを構築し、ゲノムへ導入した（図1a）。ベクターが挿入されたショウジョウバエの株とGAL4転写因子を発現する別の系統とを交配すると、その次代でベクター挿入地点下流の遺伝子がGAL4の発現パターンに従って強制発現される（図1b）。ベクター挿入位置が遺伝子の5'側ならば完全長mRNA、遺伝子内部ならばアンチセンスRNA及び不完全長のタンパク質をコードするmRNA、3'側ならばアンチセンスRNAの転写が起こる（図2）。これらの転写産物の生物学的作用が表現型として現れる。センス鎖が

図1. 強制発現ベクターの構造とGAL4転写因子による活性化

a) ゲノムに挿入された状態の強制発現ベクター（転写不活性）



b) GAL4存在下での転写活性化





転写された場合には翻訳産物の異所発現による機能獲得型、アンチセンスRNAの場合には野生型産物の翻訳阻害による機能喪失型の表現型を示す。また、部分的に欠失したタンパク質が産生された場合には、構成的活性(constitutive active)型や優性的不活性(dominant negative)型の変異となりうる。ベクターを導入したトランスジェニック系統を一旦樹立すれば、それをPエレメントの転移を触媒するトランスポゼースを発現する系統に交配して、ゲノム内の新しい位置にベクターが挿入された株を多数樹立することができる。(文献3)。挿入されるベクターの数は基本的に株当たり1個であり、交配後は新たに挿入された位置に安定に保持される。強制発現が起こる部位や時期はGAL4の発現特異性によって規定される。基本的には発現パターンが既知の遺伝子プロモーターとGAL4の融合遺伝子を導入したトランスジェニック系統を用いる。

## 2. 原因遺伝子の同定法

本システムの利点は挿入されたベクターに隣接する遺伝子を迅速に同定できることである。強制転写はベクター内部のプロモーター下流から始まり、ベクター末端の反復配列を通してゲノムDNAへと進行し、ポリA付加シグナルに遭遇するまで続く。転写産物の5'領域はベクター末端部の配列を含み、3'端にはpoly(A)鎖が付加されている。これらの既知配列に対応するプライマーを用いてRT-PCRを行うことに

より転写産物のcDNAを増幅し、塩基配列を直ちに決定することができる。特定の表現型を示したものからRNAを抽出してcDNAの塩基配列決定まで約3日で完了する。

## 3. 寿命変異体のスクリーニング

強制発現系を利用した変異体作成法では、適切なGAL4発現系統を選択することにより、発現時期や組織を制御することができる。成体における強制発現の影響を検索するために、熱ショックで発現を誘導できるhsp70遺伝子のプロモーターとGAL4融合遺伝子(hs-GAL4)をもつ系統を用いて寿命変異体のスクリーニングを行っている。

ベクター挿入系統にhs-GAL4系統を交配して、そのF<sub>1</sub>成虫の寿命を測定した。発生過程での影響を最小限にするために、幼虫および蛹の期間は25℃で飼育し、成体になった後は30℃(熱ショックプロモーターが低いレベルで活性化される)で飼育した。10%グルコースを含む標準培地の飼育瓶に雄のみを20個体入れ、3日ごとに培地を交換し、生存個体数を記録した。各ベクター挿入系統/hs-GAL4のF<sub>1</sub>につき2本の飼育瓶(合計40個体)で実験を行った。図3にスクリーニング結果の一部を示す。30℃で測定した100系統のF<sub>1</sub>平均寿命は約22日であった。系統間で顕著な差が認められ、最長のものは約35日の平均寿命を示した。現在のところ飛び抜けて長命の系統は得られていないが、比較的長命なものについては、寿命

図2. 強制発現ベクターによる転写産物の効果

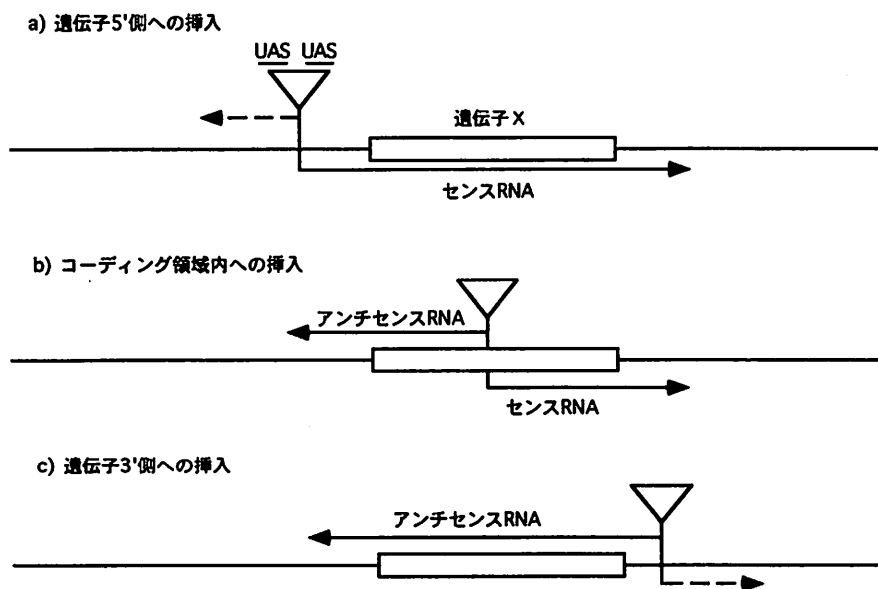
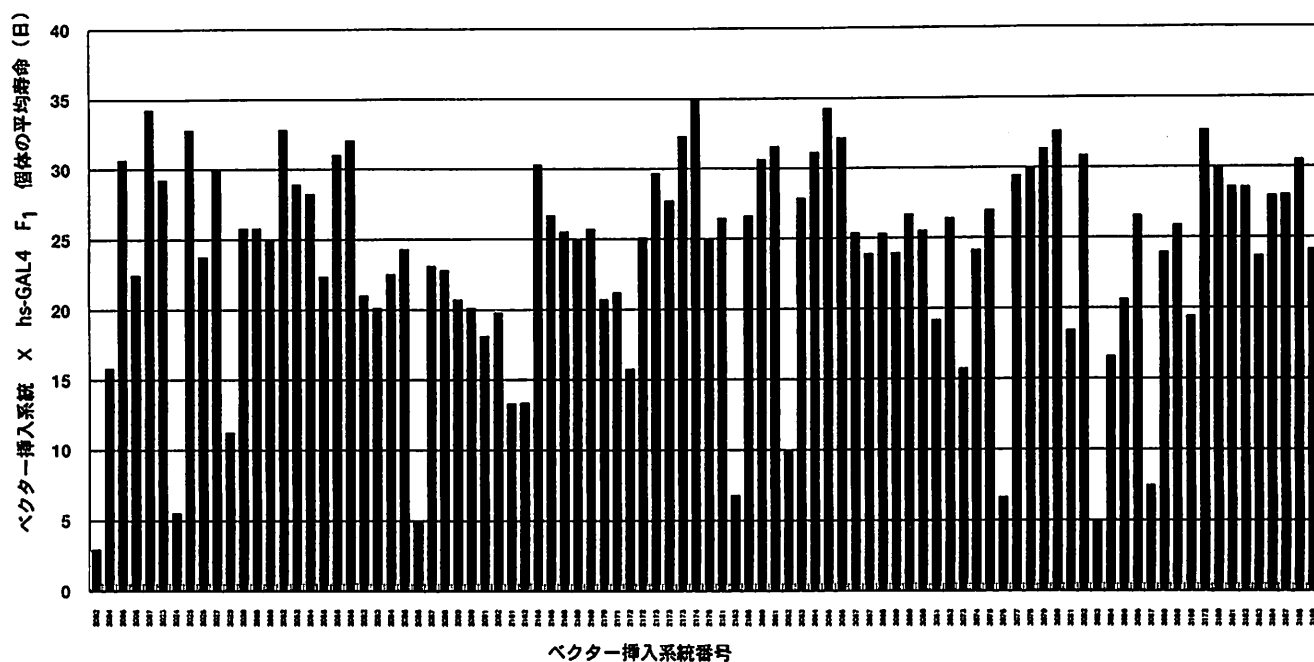


図3. 遺伝子強制発現による寿命変異体のスクリーニング



延長効果を有する遺伝子が強制発現されている可能性がある。一方、幾つかの系統は10日以内の短命であった。短命になった株では個体の生存に必須の遺伝子が影響を受けているものと考えられる。分子解析を行ったところ、その中の一つはヒストン2Av遺伝子内に挿入されていることが判明した。幼虫期に発現を誘導すると、成長が停止して長期間幼虫の形態のままで長期間生存した。ヒストン2Av遺伝子の機能喪失変異体は胚期に致死になることが知られているが、具体的な機能についてはほとんど不明である。強制発現による変異体はその手がかりを与えてくれるものと期待される。

文献

- 1) Brand, A and Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- 2) Halder G. et al. (1995) Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Science* 267, 1788-1792.
- 3) Robertson, H. M. et al. (1988) A stable genomic source of *P* element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 118, 461-470.

## 線虫C. エレガンスの寿命を制御する遺伝子

本田修二

東京都老人総合研究所・アイソトープ部門

### The Gerontogene in the nematode *Caenorhabditis elegans*

Shuji Honda

Department of Biochemistry and Isotopes  
Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

#### はじめに

ヒトの最大寿命が約120歳であるように、動物の最大寿命は種によって厳密に決まっている。また動物種に固有で、遺伝的支配を受けていると考えられる脳重量や性成熟年齢がその種の最大寿命と密接に関係していることも知られている。これらは個体の老化速度や寿命が、種々の環境の影響を受けるにしても、遺伝的な支配を受けていること、すなわち、寿命を決定する遺伝子(群)が存在していることを示唆している<sup>1)</sup>。

寿命を決定する遺伝子を明らかにするためには、遺伝子変異やノックアウトなど遺伝子機能を修飾した個体の寿命を調べることが有効である。そのためには個体の寿命が容易に測定できることや分子遺伝学的手法が用いられることが重要である。線虫は体長約1mm、全細胞数約1000個のシンプルな動物であるが、早期発症型アルツハイマー病の原因遺伝子プレセニリンなどのように、ヒト遺伝病の原因遺伝子の多くがこの線虫に相同遺伝子として見出され、注目されている。約3週間の寿命を持ち、産卵期を越すと、動きや外からの刺激に対する反応が加齢に伴って鈍くなり、体内に老化色素が蓄積する。また死亡率が加齢に伴い指数関数的に増大するいわゆるゴンペルツ則を示すなどヒトの老化の過程に似た面も持つ。そして多細胞動物の中で最もゲノムプロジェクトが進展しており、間もなく全遺伝子配列が明らかになる予定である。寿命を制御する遺伝子(すなわちその遺伝子の変異や過剰発現などにより寿命に変化が起き、通常老化速度や寿命決定を支配していると考えられる遺伝子)を明らかにするために有用なモデル動物であり、これらの遺伝子ネットワークの全体像を明らかにしようとする研究が始まっている。

## 線虫の長寿命突然変異体

線虫の長寿命突然変異体(寿命が1.1~2.7倍)が次々に発見され(表1)、その遺伝子が同定されてきた<sup>2)</sup>。長寿命突然変異体の単離は主に次の2つの方法による。一つは線虫の集団に突然変異を起こさせ、その中から長寿の表現形質を指標に単離するものである。突然変異はethylmethanesulfonate(EMS)などの突然変異剤や放射線をはじめ、トランスポゾンが頻繁に転移するミューテーターを用いて起こすことができる。もう一つは既に単離されている長寿命以外の他の表現形質を示す突然変異体から長寿命突然変異体を探すことである。またWerner症の原因遺伝子などヒト遺伝子と相同の遺伝子などのノックアウトや過剰発現の線虫の寿命への影響を調べる試みも始まっている。

表1 線虫の長寿命突然変異体

変異体	比(変異体/野生体)	
	平均寿命	最大寿命
<i>age-1</i>	1.7 ~ 2.7	2.1 ~ 2.7
<i>daf-2</i>	2.4	2.6
<i>daf-28</i>	1.1	1.2
<i>clk-1</i>	1.3	
<i>clk-2</i>	1.1	
<i>clk-3</i>	1.2	
<i>gro-1</i>	1.2	
<i>spe-26</i>	1.7	1.3
<i>daf-2; daf-12</i>	3.7	3.9
<i>daf-2; clk-1</i>	5.8	5.7

#### 長寿命形質を持つ突然変異体の単離

Klassは線虫の集団にEMSを処理し8000匹のF2を用いて、それぞれの子(F3)の一部の寿命を測定し長寿命を示すものを見出し、もとのstockよりクローンを単離した<sup>3)</sup>。その後Johnsonらはこの突然変異体の詳細な遺伝学的解析を行い、*age-1*遺伝子の変異が平均(1.7倍)及び最大寿命(2.7倍)を延長させ、Gompertz定数でみた老化速度、種々の老化指標の変化を遅延させることを明らかにした<sup>4)</sup>。Morrisらはこの原因遺伝子が耐性幼虫形成に関与する遺伝子*daf-23*(後述)と同じものでありphosphatidylinositol-3-OH kinase(PI-3K)遺伝子であるとした<sup>5)</sup>。しかしJohnsonらは現在なお異を唱えている。現在いくつかの研究室でさらに長寿命変異体の単離が試みられている。

## 種々の表現形質を持つ突然変異体より 長寿命変異体の検索

### 耐性幼虫形成遺伝子変異

幼虫期に密集・飢餓状態におくと発育を中断し長期間生存する耐性幼虫となるが、耐性幼虫の形成に異常を起こす変異体 (*daf*: dauer larva formation abnormal) の中に、野生体に比べて成虫の寿命が長いものが見出された。*daf-2*変異体は耐性幼虫ができない条件において成虫の平均寿命が野生体に比べて2.4倍及び最大寿命が2.6倍を示す<sup>6)</sup>。この変異と*daf-12*遺伝子変異を共に持つ2重変異体は平均及び最大寿命が野生体の約4倍となる<sup>7)</sup>。ただし*daf-12*変異体自体の寿命は野生体と変わらない。*daf-12*は哺乳動物のステロイドホルモン核受容体に相同な遺伝子であり、TGF- $\beta$ スーパーファミリーやその受容体、及びその下流のSmadなどの一連のシグナル伝達を受け、またサイクリックGMPに関係するシグナルの伝達も受けている。*daf-16* (転写因子の相同遺伝子 (Ogg S et al 私信)) や*daf-18*遺伝子変異体と*daf-2*変異体の2重変異体は野生体と同じ寿命を持つことから*daf-2*遺伝子は*daf-16*や*daf-18*遺伝子の上流にあってその発現や機能を制御し、それらが長寿命を引き起こす経路を構成していると考えられている。木村らは*daf-2*がヒトのインスリン受容体の相同遺伝子であることを明らかにした<sup>8)</sup>。*daf-23*変異体は平均・最大寿命が野生体に比べて2.7倍を示す。*daf-16*変異体との2重変異では野生体と同じ寿命を示すが、*daf-18*変異体との2重変異体では長寿命のままであり、*daf-16*は*daf-23*の下流にあるが*daf-18*は下流にないと考えられた<sup>7)</sup>。一方、*age-1*変異体と*daf-16*及び*daf-18*変異体との2重変異体はそれぞれ野生体と同様の寿命を持つことから*age-1*は*daf-16*と*daf-18*の上流にあると考えられた<sup>9)</sup>。*age-1*変異は*daf-23*変異で相補されないことから同一遺伝子と考えられたが<sup>10)</sup>、*age-1*変異体のゲノム*daf-23*遺伝子 (PI-3K) 中に変異が見出されないなど、いくつかの矛盾点もある。また*daf-28*変異体もわずかながら長寿命を示した<sup>10)</sup>。

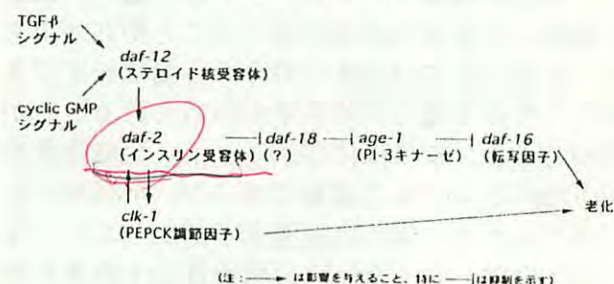
### 計時遺伝子変異

計時遺伝子変異体 (*clk*; *clock*, biological timing abnormal) は発生リズムなど種々の過程がゆっくり進行するもので、*clk-1*、*clk-2*、*clk-3*、*gro-1*変異体は野生体に比べて長寿命を示す<sup>11)</sup>。*clk-1*は遺伝子配列が酵母からヒトまで保存されている糖新生の律速に関わるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) の調節因子の相同遺伝子である<sup>12)</sup>。*clk-1*変異は*daf-2*変異との2重変異にすると寿命は野生体の約6倍に達し<sup>11)</sup>*daf*遺伝子群との相互作用が考えられるが、*daf-2*や*daf-23*と異なり*daf-16*との2重変異でも長寿命のままであり、*daf*とは異なる経路を経て長寿を起こすと考えられた。

### 精子形成遺伝子変異

*spe-26* 遺伝子変異体 (*spe*; spermatogenesis abnormal) は精子形成異常を示すもので成虫の平均寿命は野生体の1.7倍、最大寿命は1.3倍となる<sup>13)</sup>。*spe-26*遺伝子は *scruin/kelch*配列の5回繰り返しとアクチン結合領域を持つ<sup>14)</sup>。

図1 線虫における老化遺伝子ネットワーク



### 長寿命のメカニズム

このように寿命を制御する遺伝子ネットワークが明らかになってきているが、それがいかに寿命を制御しているかはよくわかっていない。我々はこれらの長寿命変異体の中に活性酸素に対する防御機構が昂進して通常生成される活性酸素の濃度が低いために活性酸素による傷害が少なく、そのために長寿命になるものがないかと考え、酸化ストレス感受性を調べた。

計時変異体 (*clk-1*) や精子形成変異体 (*spe-26*) は野生体と同じ酸化ストレス感受性を示したが、耐性幼虫形成変異体で長寿命を示

シマツキエビの寿命と酸化ストレス耐性 4-16日  
GPRX gene



す daf-2, daf-23は酸化ストレスに強い耐性を示した。また age-1 変異体も野生体に比べて耐性を示した。daf-2 の ts 変異体で長寿命を示す非許容温度では酸化ストレスに耐性であり、長寿命を示さない許容温度では酸化ストレスに感受性であり長寿命と酸化ストレス耐性に相関が見られた。

酸化ストレス耐性が長寿命表現形質の遺伝経路と同一かどうかを明らかにするため2重変異体を調べた。daf-2 変異と daf-16 または daf-18 変異の2重変異体は酸化ストレス感受性を示し、長寿命の遺伝経路と同一であった。daf-23 変異と daf-16 変異の2重変異は酸化ストレス感受性であるが、daf-18 変異との2重変異は酸化ストレス耐性であり、やはり長寿命の遺伝経路と同一であった。age-1 変異と daf-16 及び daf-18 変異との2重変異体は酸化ストレス感受性を示し、やはり長寿命と同一であった。これらの結果は daf-2 から daf-16 に至る同じ遺伝経路が酸化ストレス耐性と長寿命の両形質を与えることを示し、因果関係を示唆した。

daf-2 経路が酸化ストレス耐性を与える機構を明らかにするために、種々の長寿命変異体やそれらの2重変異体について抗酸化防御に関わる酵素の遺伝子発現をノザン解析やRT-PCRにより調べた。daf-2 変異体では Mn-スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) の一つの遺伝子発現が増大していた。daf-16 との2重変異ではこの増大がみられないことから daf-2 遺伝経路が SOD 遺伝子発現に関与し、それらが酸化ストレス耐性さらに長寿命に関わっていることを示唆した。

インスリン受容体 (daf-2) と PI-3 キナーゼ (age-1) がいかに抗酸化防御に関わり老化を制御しているのだろうか。哺乳動物においてはインスリン受容体は細胞外のインスリンと結合することによりインスリン受容体基質 (IRS-1) をリン酸化する。リン酸化された IRS-1 に、SH2 領域を持つ PI-3 キナーゼや Ash/Grb-2-Sos 複合体などの情報伝達因子が結合する。これらの情報伝達因子はそれぞれの経路でシグナルを伝達する<sup>15)</sup>。糖尿病と酸化ストレスとの関係が示唆されてきているが<sup>16)</sup>、インスリンと抗酸化防御との関わりの詳細はわかっていない。線虫においては現在までインスリンはみつからないがこれらの長寿命変異体はインスリンシグナル伝達と抗酸化防御そして寿命制御の関わりを明らかにするモデルとなると考えられる。

#### 参考文献

- 1) Jazwinski SM: Longevity, genes, and aging. *Science*, 273: 54-59, 1996
- 2) Kenyon C: Environmental factors and gene activities that influence life span. *C. elegans II* (ed by Riddle DL et al), pp791-813, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1997
- 3) Klass MR: A method for the isolation of longevity mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* and initial results. *Mech. Age. Devel.* 22: 279-286, 1983
- 4) Friedman DB and Johnson TE: A mutation in the age-1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics*, 118: 75-86, 1988
- 5) Morris JZ et al: A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 382: 536-539, 1996
- 6) Kenyon C et al: A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*, 366: 461-464, 1993
- 7) Larsen PL et al: Genes that regulate both development and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 139: 1567-1583, 1995
- 8) Kimura K et al: daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 277: 942-946, 1997
- 9) Dorman JB et al: The age-1 and daf-2 genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 141: 1399-1406, 1995
- 10) Malone EA et al: Genetic analysis of the roles of daf-28 and age-1 in regulating *Caenorhabditis elegans* dauer formation. *Genetics*, 143: 1193-1205, 1995
- 11) Lakowski B and Hekimi S: Determination of life-span in *Caenorhabditis elegans* by four clock genes. *Science*, 272: 1010-1013, 1996
- 12) Ewbank JJ et al: Structural and functional conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene dk-1. *Science*, 275: 980-983, 1997
- 13) Van Voorhies WA: Production of sperm reduces nematode lifespan. *Nature*, 360: 456-458, 1992
- 14) Varkey JP et al: The *Caenorhabditis elegans spe-26* gene is necessary to form spermatids and encodes a protein similar to the actin-associated proteins kelch and scruin. *Genes Dev*, 9: 1074-1086, 1995
- 15) Myers Jr MG and White MF: Insulin signal transduction and the IRS proteins. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 36: 615-658, 1996
- 16) Oberley LW: Free radicals and diabetes. *Free Rad Biol Med*, 5: 113-124, 1988

## 老化促進モデルマウス(SAM)の寿命・老化病態を制御する遺伝子の探索

樋口京一

(京都大・胸部研・老化生物)

### (ABSTRACT)

The Senescence-Accelerated Mouse (SAM) strains are unique model for genetic studies on aging because the SAMP strains have an "accelerated senescence" phenotype for which the SAMR strains are control and SAMP strain has a strain specific age-associated disorder. There are now 11 SAMP strains and 3 SAMR strains descended from the progenitor litters. We tried to find by comparing the genome maps of all the SAM strains, genetic markers linked to particular alleles which either contribute to or prevent acceleration of senescence. The detailed maps were made using single sequence length polymorphism (SSLP) of microsatellite markers. Gene typing are done by PCR amplification of microsatellite markers. We tested over 500 primer pairs for polymorphic bands among SAM strains and the original AKR/J strain. About 40 % of primer pairs were found to be polymorphic among strains. Comparisons of the distribution of makers in the SAMP and SAMR series revealed significant difference in *D14Mit92*, *D16Mit30* and *D17Mit176*. To confirm the possibility that these sites (or regions) might have linkage with the genes of accelerated senescence in SAMP series, we are making the congenic mouse using SAMP1 and SAMR1 as parent strains.

Genetic analysis using SAMP strains identified the genes or chromosome regions controlling the age-associated disease, senile amyloidosis, impaired immune response, and osteoporosis.

### はじめに

老化学の最終目標は健康で活動的な人生の間を可能な限り延長する事であろう。そのためには適切なモデル動物を用いて、①「老化」とその結果と考えられる「寿命」の基本的メカニズムの解明、②老化に伴い発症するさまざまな老化病態の発症機序の解明と治療、予防法の開発、を目指した研究が重要であることは明らかである。老化促進モデルマウス(SAM)は京都大学胸部疾患研究所の竹田らによって開発された純系マウス系統群で、各系統が促進老化、短寿命という共通した遺伝的形質を示すと同時に、それぞれの系統に特有な老化病態を示す<sup>1,2)</sup>。従って上記の①、②のどちらにも研究においても広く用いらてきたモデルマウスであるが、残念ながら

その原因と考えられる遺伝子(群)はいまだ明らかにされていない。今回は老化促進モデルマウス(SAM)の寿命と老化病態を制御する遺伝子の探索の試みについて概観する。

### 老化促進モデルマウス(SAM)

竹田らは京都大学胸部疾患研究所で継代維持していた AKR/J マウスコロニー中に活動性の低下、脱毛、皮毛光沢の減退消失、皮毛粗雑、眼周囲病変、脊椎前後彎増強、寿命短縮などの老化現象が比較的若齢より出現するが、AKR/Jに必発する胸腺腫を発症しないコロニーを発見した。以後兄妹、選抜交配を繰り返し短寿命、「促進老化」を特徴的形質とする、SAMPシリーズ; SAMP1, SAMP2, SAMP3, SAMP6, SAMP7, SAMP8, SAMP9, SAMP10, SAMP11 と対照として長寿命、「正常老化」を示すSAMRシリーズ; SAMR1, SAMR4, SAMR5 の計12の純系統マウスの開発に成功した。これらの系統群を総称して老化促進モデルマウス: Senescence-Accelerated Mouse (SAM) と呼んでいる。最近の SAMP1 と SAMR1 系統の生存率曲線とゴンベルツ関数(月齢ごとの死亡率の対数のプロット)を図1に示す。回帰直線の傾きは老化の進行速度を表すとされているが SAMP1 の傾きは SAMR1 よりも大きく老化速度が早いことを示している。我々の飼育環境で SAMP 群と SAMR 群の平均寿命(中央値)はそれぞれ 9.7 と 16.3 ヶ月である。成長曲線、老化度評点の増加曲線、斃死マウスの病理所見などから SAMP 群の老化は正常な発生・成長過程の後に急速に進展する促進老化であると考えられている<sup>3)</sup>。表1に示したように SAMP 各系統にはそれぞれに特徴的な老化病態が促進されて発症してくる。SAMP 各系統に共通する促進老化の原因遺伝子はなんなのか? 各老化病態を発症させる遺伝子との関係はどのようなのだろうか?

### 促進老化遺伝子の探索

SAMP と SAMR 系統の交配実験の結果は促進老化は単一遺伝子により規定されているものではないことを示唆している<sup>4)</sup>。生化学や provirus-マーカーを用いた SAM の遺伝的解析の結果、SAM は AKR/J マウスと未知の系統との交雑とそれに続く、選抜交配で確立された系統群であることが明らかになった<sup>2,5)</sup>。AKR/J と未知の系統に由来する二つ以上の遺伝子の組み合わせにより、SAMP 各系統に共通した促進老化が引き起こされると仮定し、Y 染色体を除く全ての染色体上に散在する (CA)<sub>n</sub> の反復数の多形に基づいた 581 のマイクロサテライトマーカーを用いて SAM 各系統のゲノムマッピングを行ない、その結果より促進老化と連鎖する染色体上の領域

を明らかにしようとした。

581の内、237のマーカーについてSAM各系統間に多形(PCR産物のバンド長)が確認された。ほとんどのlocusでは2種の多形が観察されたが一部では3種の多形が存在した。第14染色体の中央部の2つのマーカー-D14Mit7, D14Mit92では全てのSAMP系が同一のしかもSAMR各系統とは異なる多形を示した。さらに第17番染色体上のD17Mit62, D17Mit176も同様な結果を示した。また、第16染色体上のD16Mit30, D16Mit64ではSAMP11を除いてSAMPとSAMR系統マウスで明らかに異なる多形を示した。

これらの結果は促進老化との関与が示唆される候補領域として第14, 16, 17染色体上の3領域をあげることが出来る。これらの領域の促進老化への関与の確認や、さらにこれらの領域の機能を明らかにするために現在SAMP1とSAMR1マウスを用いてコンジュニックマウスを作成中である。

### SAMに発症する老化病態の遺伝子の探索

促進老化はSAMP各系統に共通する形質であるが、老化アミロイドーシス、骨粗鬆症、学習記憶障害、免疫機能不全等の老化病態は各系統毎に特徴的に現れる形質である(表1)。これらの病態を規定する遺伝子を探索し、促進老化や寿命との関連を明らかにすることが重要である。

#### 1) 老化アミロイドーシス

マウスでは血清高密度リポ蛋白質(HDL)のアポ蛋白質であるapoA-IIが加齢に伴い微細なアミロイド線維蛋白(AApoAII)に重合し全身に沈着する。AApoAIIは若齢より重篤なアミロイドーシスを発症するSAMP1から初めて単離されたアミロイド蛋白であり<sup>6)</sup>、老化アミロイドーシスの早期発症はSAMP1, SAMP2, SAMP7, SAMP9, SAMP10, SAMP11の特徴的の老化病態である<sup>7)</sup>。老化アミロイドーシスの発症を規定する最も重要な遺伝的要因はapoA-II蛋白の一次構造であり、重篤なアミロイド沈着は第一染色体上のC型のapoA-II遺伝子(Apoa2<sup>c</sup>)と連鎖し、遺伝子量効果の大きい常染色体劣性遺伝をする<sup>8,9)</sup>。Apoa2<sup>c</sup>をSAMR1マウスに導入したコンジュニックマウスを用いた研究より、Apoa2<sup>c</sup>によって促進、重篤化された老化アミロイドーシスはSAMR1の老化度評点の加齢に伴う増大を亢進し、寿命を約20%短縮するが老化の速度は加速しない事が示された<sup>10)</sup>。逆にSAMP1にB型のapoA-II遺伝子(Apoa2<sup>b</sup>)を導入したコンジュニックマウスではアミロイドーシスはほぼ完全に抑制されたが、老化の進行の抑制や寿命の延長は観察されず、老化が著しく亢進しているような状況では老化病態を一つ改善しても老化、寿命にはほとんど

ど変化が起こらないようであった。これらの結果は特定の老化病態の発症を抑制することは寿命(平均寿命)を延長するが、生物種固有の老化速度は変化させないと言う仮説<sup>11)</sup>とよく一致する。

#### 2) 免疫機能不全

SAMP1ではいくつかの免疫機能不全が発症する<sup>12)</sup>。SAMP1系統の羊赤血球への抗体産成能低下に関する詳細な交配実験は、2~3の少数の遺伝子が関与し、その内の一つが第7番染色体のセントロメア側に存在する事を示唆されている<sup>13)</sup>。この遺伝子の本体や機能、老化との関連についてはまだにも判っていないが、十一、細野らは、B10BR-マウス(免疫機能正常, Apoa2<sup>a</sup>)とSAMP1との交配実験で、ある遺伝的環境下では免疫機能低下、アミロイドーシス発症、寿命が互いに関連していることを示唆している<sup>14)</sup>。

#### 3) SAMP6の低骨量を規定する遺伝子

マウスの大腿骨骨量の加齢変化は生後4-5ヶ月齢でピーク値に達しその後漸減する。SAMP6ではこのピーク値が他の系統に比較して低く、高月齢マウスでまれにはあるが自然骨折が観察される。SAMP6乾燥骨重量当りのミネラル、コラーゲン量は他系統と差がなく形態学的な検討からもSAMP6は骨粗鬆症のモデルマウスとされている<sup>15)</sup>。SAMの中で最も骨量が高いSAMP2とSAMP6系との交配実験はピーク値骨量は2-3の遺伝子に制御された量的形質であることを示唆している<sup>16)</sup>。現在、SAMP2とSAMP6間のF2マウスを用いてQTL解析が進められているが、3ヶ所の染色体領域が高いLOD値を示しており、今後の解析が期待されている。

### まとめ

老化促進モデルマウス(SAM)は祖先系であるAKR/Jと未知の系統マウスとの交雑と、選抜交配の結果得られた、一群の純系統マウスであり、それぞれの系統が独自の遺伝的構成と特徴的の形質を持つ。現在のところ我々はAKR/Jマウスに生じた突然変異でSAMが出現したとは考えず、老化を促進あるいは抑制する少数の遺伝子の組み合わせがSAMPの促進老化を規定していると考えている。SAMP各系統は促進老化という共通した遺伝的形質を持つと同時に老化アミロイドーシス、免疫機能不全や骨粗鬆症のような系統に特異的な病態を示す。この二面性が、SAMのモデルマウスとしての長所であると同時に、遺伝的解析をはじめとした様々な研究での解析を複雑にするという欠点でもある。ここでも示したようにSAMPで発症する老化アミロイドーシスや免疫不全、骨量を制御する遺伝子(群)はそれぞれ異なり、おそらく促進老化

を制御する遺伝子（群）とも異なるはずであるが、SAMPの老化、寿命と複雑に関与していると考えられる。多遺伝子に制御された寿命のような量的形質の原因遺伝子を同定することはなかなか困難であるが、近い将来に促進老化遺伝子が同定されることを期待している。

マウスのような高等動物において「老化」や「寿命」は様々な遺伝的、環境的要因の支配を受けていると考えられる。しかしヒトでのウエルナー症候群、毛細血管拡張性アタキシア、コケイン症候群等の遺伝性早老症の原因遺伝子、線虫での*age-1*や*clk-1*遺伝子、酵母での*sgs1*遺伝子等、老化、寿命に関係する遺伝子の同定が続いており、その機能はDNAヘリケース、転写因子、カイネース等であるとされている<sup>17-20</sup>。生命現象のほとんど全てに関与するような基本的な機能異常が老化や寿命に大きな影響を与えることは理解に難くはない。現在のところ、老化や寿命を統一的に説明する有力な機構として、酸化的ストレスによる傷害が注目されている<sup>21</sup>。SAMP各系統でも様々な酸化的傷害の亢進が報告されている。SAMPではどのような遺伝的要因が働き、酸化的傷害への感受性を高める等の機構を通して、老化を促進し、寿命を短縮するのであろうか。その解明が老化研究に多大な貢献をすると期待している。

## 文献

- 1) Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K: Senescence-Accelerated Mouse (SAM); A new murine model of accelerated senescence. *J Am Geriatr Soc* 39: 911-9, 1991
- 2) Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K: Senescence-Accelerated Mouse (SAM); A novel murine model of aging. *The SAM Model of Senescence*, Takeda T (ed), Excerpta Medica, Amsterdam, 15-22, 1994
- 3) Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, et al: A new murine model of accelerated senescence. *Mech Aging Dev* 17: 183-94, 1981
- 4) Naiki H, Higuchi K, Shimada A, et al: Genetic analysis of murine senile amyloidosis. *Lab Invest* 68: 332-7, 1993
- 5) Kitado H, Higuchi K, Takeda T: Molecular genetic characterization of the senescence-accelerated mouse (SAM) strains. *J Gerontol* 49: B247-54, 1994
- 6) Higuchi K, Yonezu T, Kogishi K, et al: Purification and characterization of a senile amyloid-related antigenic substance (apoSAS<sub>SAM</sub>) from mouse serum. *J Biol Chem* 261: 12834-40, 1986
- 7) Higuchi K: Genetic characterization of Senescence-Accelerated Mouse (SAM). *Exp. Gerontol.* 32: 129-38, 1997
- 8) Higuchi K, Kitagawa K, Naiki H, et al: Polymorphism of apolipoprotein A-II (apoA-II) among inbred strains of mice. Relationship between the molecular type of apoA-II and mouse senile amyloidosis. *Biochem J* 279: 427-33, 1991
- 9) Higuchi K, Naiki H, Kitagawa K, et al. Apolipoprotein A-II gene and development of amyloidosis and senescence in a congenic strain of mice carrying amyloidogenic ApoA-II. *Lab Invest* 72: 75-82, 1995;
- 10) Higuchi K, Wang, J, Kitagawa K, et al: Accelerated senile amyloidosis induced by amyloidogenic apoA-II gene shortens the life span of mice but does not accelerate the rate of senescence. *J Gerontol* 51A: B295-302, 1996
- 11) Finch CE: *Longevity, Senescence, and the Genome*. The University of Chicago Press, Chicago, 1990.
- 12) Hosono M, Hanada K, Toichi E, et al.: Immune abnormality in relation to nonimmune disease in SAM mice. *Exp Gerontol* 32: 181-95, 1997
- 13) Hanada K, Katoh H, Hosokawa T, et al : Immune responses in newly developed short-lived SAM mice IV; chromosomal location of a gene controlling defective helper T-cell activity. *Immunology* 74: 160-4, 1991
- 14) 十一英子、細野正道、細川友秀、他：SAMマウスにみられる免疫能低下と老化病態、アミロイドーシス発症及び寿命との関連性について。基礎老化研究、20: 55, 1997
- 15) Matsushita M, Tsuboyama T, Kasai R. et al: Age-related changes in bone mass in the Senescence Accelerated Mouse (SAM). *Am J Pathol* 125: 276-83, 1986
- 16) Tsuboyama T, Takahashi K, Yamamuro T, et al: Cross-mating study on bone mass in the spontaneously osteoporotic mouse (SAM-P/6). *Bone Miner* 23: 57-64, 1993
- 17) 名倉潤：ウエルナー症候群原因遺伝子がクローニングされた。江島洋介：抹消血管拡張性アタキシアの原因遺伝子と老化。田中亀代次：基本転写とDNA修復機構に以上を持つ疾患。実験医学 15: 220-237, 1997
- 18) Morris JZ, Tissenbaum HA, Ruvkun G: A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 382: 536-9, 1996
- 19) Ewbank JJ, Barnes TM, Lakowski B, et al: Structural and functional conservation of the *Caenorhabditis*



CR2 amyloidosis  
high level

*elegans* timing gene *clk-1*. Science 275: 980-3, 1997

20) Sinclair DA, Mills K, Guarente L: Accelerated aging and nuclear fragmentation in Yeast *sgs-1* mutants. Science 277:1313-6, 1997.

21) Martin GM, Austed SN, Johnson TE.: Genetic analysis of aging: role of oxidative damage and environmental stresses. Nature Genet 13: 25-34, 1996

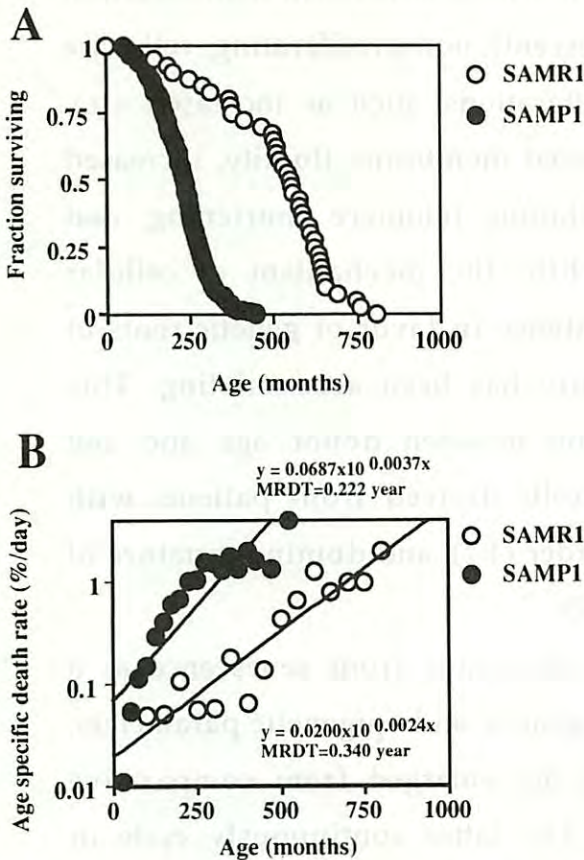


表1 SAM各系統にみられる老化諸病態

SAM	SAMP1	老化アミロイド症、免疫機能不全、聴覚障害、老年性肺過膨張	
	SAMP2	老化アミロイド症、免疫機能不全	
	SAMP3	顎関節の変形性関節症	
	SAMP6	老年性骨粗鬆症	
	SAMP7	老化アミロイド症、胸腺腫	
	SAMP8	学習・記憶障害	
	SAMP9	白内障	
	SAMP10	脳萎縮を伴う学習・記憶障害	
	SAMP11	老化アミロイド症、腎萎縮	
	SAMR	SAMR1	非胸腺性リンパ腫、組織球性腫瘍
		SAMR4	非胸腺性リンパ腫、組織球性腫瘍
SAMR5		学習・記憶障害	

ch. 14, 16, 17

図1 SAMP1とSAMR1のA, 生存曲線とB, ゴンペルツ関数。SAMP1の生存曲線はSAMR1と比較すると短寿命側(左)へシフトしており、ゴンペルツ関数の傾きは有意に大きく、死亡率倍加時間(MRDT)も短縮している。

# **Mortalin, a hsp70 family member: its involvement in cellular mortality, immortalization and interactions with tumor suppressor protein, p53**

Renu Wadhwa<sup>1,2</sup>, Shinichi Takano<sup>2</sup>, Martin Robert<sup>1</sup>, Sunil C. Kaul<sup>2</sup> and Youji Mitsui<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>*Chugai Research Institute for Molecular Medicine, 153-2 Nagai, Niihari, Ibaraki 300-41, Japan;* <sup>2</sup>*National Institute of Bioscience and Human-Technology, AIST, 1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan*

## ***Cellular mortality and immortalization***

The restricted replicative capacity of normal somatic cells that confers them with a mortal divisional phenotype is a most consistent manifestation of cellular aging. The late passage (senescent) non-proliferating cells are characterized by several morphological alterations, such as increased size, more flattened and irregular shape, decreased membrane fluidity, increased protein oxidation, decreased DNA methylation, telomere shortening, and defects in mitogenic signaling (1-3). While the mechanism of cellular senescence remains largely unknown, evidence in favor of genetic roots of fixed replicative capacity of cells in culture has been accumulating. This includes species specific life-span, relation between donor age and cell replicative potential, fewer divisions of cells derived from patients with Werner syndrome, a premature aging disorder (4-7), and dominant nature of cellular senescence over immortalization (2).

Cellular immortalization involves an escape from senescence as a result of multiple mechanisms involving genetic and epigenetic parameters. A lot of understanding on cellular aging has emerged from comparative studies on normal and cancerous cells. The latter continuously cycle in culture and can be maintained indefinitely and therefore have immortal divisional phenotype. Spontaneous immortalization of murine cells in culture has been frequently observed in sharp contrast to normal human cells that rarely, if ever, become immortalized spontaneously *in vitro*. Oncogenes

of certain DNA tumor viruses can result in life-span extension by 20-30 population doublings (8). Life-span extended cells still enter crisis phase which is characterized by no net growth of the culture. Immortal clone may arise from crisis cells with a low frequency of approximately  $10^{-5}$ (8). The genetic events that drive the cells from crisis to immortal phenotype remain unknown although the immortal clones exhibit telomere maintenance in contrast to the senescing cells that undergo telomere shortening.

The period of extended life-span is often characterized frequently by loss of p53 and pRb function, genes that frequently suffer a loss-of function mutation in tumors. Human fibroblasts grown in the presence of antisense oligonucleotides (oligos) that inhibit the expression of pRb and p53 behave very similar to cells expressing SV40 T antigen (9). While it remains controversial as to whether the level of p53 protein changes as cells enter senescence (3), both the transcriptional activation and the DNA binding activities of the protein increase as cells approach senescence (10, 11). p53 regulated inhibitor of cyclin-dependent kinase, p21, has been detected as upregulated in senescent cells (12) and disruption of p21 gene in normal diploid human fibroblasts results in extended population doubling as compared to their normal controls (13). Such studies have assigned senescent determining roles to p53 and its down stream effector, p21 (12-14). In addition, pRB is found in hypophosphorylated form in senescent cells (15). Although it appears that inactivation of both pRb and p53 is essential in order for cells to circumvent the normal proliferative constraints imposed by replicative senescence, there are many transformed cell lines that retain normal p53 and/ pRB status.

***Mortality is dominant over immortalization:***

Cell hybrids between immortal and normal cells have mortal phenotype showing that immortalization is recessive (16). Pereira-Smith and Smith (17) have shown that pairwise cell hybrids between different tumor cell lines demonstrate four complementation groups (A-D) of immortality.

Sandhu *et al.* (1994) have found that reintroduction of a normal chromosome 6 or 6q into the SV40-transformed immortal cells of complementation group 'A' results in growth inhibition and reappearance of a senescent-like morphology (18). Other chromosomes (1, 4, 7) have been reported to have similar effects on immortal cells of the B-D complementation groups (19-23). Although multiple parameters of cellular senescence have to be assessed, such genetic studies support a model that inactivation of a limited number of loci "encoding growth suppressors" are responsible for immortalization.

### *Mortalin during cellular mortality and immortalization*

Mouse fibroblasts show frequent spontaneous immortalization in culture. This ability varies with strain of mouse from which the cells are isolated and culture conditions such as cell densities and volume of the culture medium used (24, 25). We and others have reported that murine cells do show normal senescence and crisis phases (24-27) and their immortalization is a multistep process (28, 29).

We have previously identified a 66-kDa protein present in cytoplasmic fractions of mouse cells with mortal (normal as well as conditional, hybrids between normal and immortal cells) phenotype (25, 30). It was, therefore, named mortalin and characterized as a new member of hsp70 family of proteins. The microinjection of anti-mortalin antibody to senescent mouse cells led to the transient stimulation of cell division consistent with its antiproliferative function in normal cells. Immunofluorescence studies revealed that the protein was not absent but localized to a different niche in immortal cells (31). Whereas the normal cells exhibit widely distributed protein in the cytoplasm (pancytosolic), the immortal cells harbor it in perinuclear locale. Mortalin cDNA cloned from immortal cells, *mot-2*, differs from the clone isolated from normal cells, *mot-1*, by only 2 base pairs in the open reading frame (G1949A and G1959C) corresponding to two amino acid changes (V618M and R624G) near the carboxy-terminus of the protein. The transfection of *mot-1* cDNA induced mortal phenotype in NIH 3T3 cells (32)

whereas a higher level of expression of mot-2 induced malignant transformation (unpublished observations). *In vivo* studies by Northern blot, RNA *in situ* hybridization, and immunohistochemistry in normal rat tissues have shown a high level of expression in brain, heart, and skeletal muscle that coordinates with the antiproliferative function of mortalin in normal cells. However, a deregulation of the expression was observed in rat brain tumor along with the detection of nonpancytosolic mortalin in rat glioma cell line, C6 (33) indicating that the nonpancytosolic mortalin may have role in tumorigenesis. Furthermore, mortalin expression is found to be upregulated during malignant progression of human brain tumors (34). From these results it is conceivable that mot-2 protein has pro-proliferative function that adjoins with loss of mot-1 expression during cellular immortalization.

In attempts to understand the mechanism of mot-2 induced malignant transformation of NIH 3T3 cells, we have identified interactions between mortalin and the tumor suppressor protein, p53. Mortalin and p53 interactions and the functional inactivation of the latter has been detected in malignantly transformed NIH 3T3 cells (unpublished observations). Such inactivation of wild type p53 function may lead, at least in part, to the malignant transformation of NIH 3T3 cells.

We have reported that none of the mouse or human cell lines are seen to have uniform cytoplasmic distribution of mortalin supporting the concept that the loss of cytoplasmic form is essential or is tightly linked with the loss of cellular mortal phenotype. The cellular distribution of mortalin has been shown to serve as a reliable marker of mortal or immortal state in the same cells (22, 23).

Independent studies by Domanico *et al.* (1993) have identified mortalin from B cells as an antigen binding protein and have named it PBP72/74 (35). It was detected in a variety of cell lines wherein the cell surface expression was found to be restricted to B cell only. Fibroblasts were seen to have protein in cytoplasmic vesicles, ER, golgi, and plasma membrane. Some

studies have shown the protein to reside in mitochondria (36-38). Recently, a mortalin homologue was isolated from Chinese hamster ovary cells and was shown to localize in mitochondria, plasma membrane and cytoplasmic vesicles (39). Dynamic cellular localization of mortalin/grp75 can lead to speculation of its multiple functions, including chaperoning of proteins and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in mitochondria. In addition, its similarity to DnaK suggests its function in DNA replication. Further studies are required to unravel functional mechanism of mortalins in cellular mortality and immortalization.

## References

1. R. Wadhwa *et al.*, *Cell Struct. Funct.* **19**, 1-10 (1994).
2. J. R. Smith and O. M. Pereira-Smith, *Science* **273**, 63-67 (1996).
3. H. Vaziri and S. Benchimol, *Exp. Gerontol.* **31**, 295-301 (1996).
4. E. L. Schneider and Y. Mitsui, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 3584-3588 (1976).
5. S. M. Jazwinski, *Science* **273**, 54-59 (1996).
6. H. Rubin, *Mech. Ageing Develop.* **98**, 1-35 (1997).
7. Murano *et al.*, *Mol. Cell Biol.* **11**, 3905-3914 (1991)
8. J. W. Shay and W. E. Wright, *Biochem. Biophys. Acta* **1072**, 1- 6 (1991).
9. E. Hara, H. Tsuru, S. Shinozaki and K. Oda, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 528-532 (1991).
10. J.A. Bond *et al.*, *Cancer Res.* **55**, 2404-2409 (1995).
11. P. Atadja *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **92**, 8348-8352 (1995).
12. A. Noda *et al.*, *Exp. Cell Res.* **211**, 90-98 (1994).
13. J. P. Brown *et al.*, *Science* **277**: 831-834, 1997.
14. J.A. Bond *et al.*, *Oncogene* **9**, 1885-1889 (1994).
15. G. P. Dimri and J. Campisi, *In The molecular genetics of cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 67-73 (1994).
16. O. M. Pereira-Smith and J. R. Smith, *Science* **221**, 964-966 (1983).
17. O. M. Pereira-Smith and J. R. Smith, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 6042-6046 (1988).
18. A. K. Sandhu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 5498-5502 (1994).
19. O. Sugawara *et al.*, *Science* **247**, 707-710 (1990).

20. Y. Ning *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 5635-5639 (1991).
21. T. Ogata *et al.*, *Mol. Cell Biol.* **13**, 6036-6043 (1993).
22. M. Fujii *et al.*, *Oncogene* **11**, 627-634 (1995).
23. T. Nakabayashi *et al.*, *Exp. Cell Res.* **235**, 345-353 (1997).
24. R. Wadhwa *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**, 269-275 (1991).
25. R. Wadhwa *et al.*, *Mutat. Res.* **256**, 243-254 (1991).
26. V. Paffenholz, *Mech. Ageing Dev.* **7**, 131-150 (1978).
27. I. Palmero *et al.*, *Oncogene* **15**, 495-503 (1997).
28. S. C. Kaul *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1201**, 389-396 (1994).
29. T. Sugihara *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta* **1224**, 365-370 (1994).
30. R. Wadhwa *et al.*, *J. Biol. Chem.* **268**, 6615-6621 (1993).
31. R. Wadhwa *et al.*, *Exp. Cell Res.* **207**, 442-448 (1993).
32. R. Wadhwa *et al.*, *J. Biol. Chem.* **268**, 22239-22242 (1993).
33. S. C. Kaul *et al.*, *Exp. Cell Res.* **232**, 56-63 (1997).
34. S. Takano *et al.*, *Exp. Cell Res.* (in press) (1997).
35. S. Z. Domanico *et al.*, *Mol. Cell Biol.* **13**, 3598-3610 (1993).
36. Y. Michikawa *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 223-232 (1993).
37. T. Bhattacharyya *et al.*, *J. Biol. Chem.* **270**, 1705-1710 (1995).
38. J. N. Dahlseid *et al.*, *Mol. Biol. Cell* **5**, 1265-1275 (1994).
39. B. Singh *et al.*, *Exp. Cell Res.* **234**, 205-216 (1997).

## ウェルナー症候群と老化

三木哲郎、名倉 潤

大阪大学医学部 加齢医学講座

「はじめに」

ウェルナー症候群 (WS) は遺伝的早期老化症候群 (早老症) の代表的疾患であり、種々の老化関連症状を若年期より発現する常染色体劣性遺伝病である。白髪、白内障、低身長、強皮症様の皮膚変化、耐糖能異常、性腺機能低下などの徴候・症状を、20-30歳台より呈する。平均寿命は50歳前後であり、死因は併発する悪性腫瘍と動脈硬化性疾患である。多くの臨床的、細胞生物学的研究にもかかわらずWSの本態は捕らえきれなかったが、近年急速に進歩してきたポジショナルクローニングの手法がWSにも応用できることが示唆され、1989年より遺伝子工学的手法によるWS原因遺伝子(WRN)単離同定に向けた研究が開始された。具体的には近親婚由来の患者DNAを全ゲノムに分布する多型性DNAマーカーでタイピングし、ホモ接合性マッピングによる連鎖解析を行った。この結果1992年にWRNは第8染色体短腕p11.2-12領域に存在することが明らかにされた [1, 2]。その後さらにいくつかのグループがWRN単離同定を視野に入れた研究を開始し、すでに8p11.2-12領域にマップされていた候補遺伝子はすべて否定された。そこでWRNの存在する領域周辺の多型性DNAマーカーが多数単離され、ホモ接合性マッピング、拡張ホモ接合性マッピング、連鎖不平衡解析、ハプロタイプ解析の併用によってWRN領域をさらに絞り込むとともに、同領域はYACおよびP1ファージによって隣接地図が作成され [3-8]、幾つかの候補遺伝子の中からWRNそのものが単離同定された [9, 10]。図1にポジシ

ナルクローニングの方法を示す。

今回、日本人患者について、WRNの遺伝子変異の部位とその臨床症状・徴候、創始者効果の有無などについて検討した。WRNの発見によりWSの病態解明は遺伝子レベルで急速にしかも確実に進み始めており、ヒト老化機構解明においても新たな展開が期待される。

「本文」

WS患者の診断は、厚生省特定疾患研究「ホルモン受容体異常症」班作成のウェルナー症候群の診断基準を利用した。解析には、16家系の白血球由来の高分子量を用いた。うち15家系は、イトコ婚を中心とした近親婚患者であった。16家系について、それぞれの患者の遺伝子変異部位は、リンパ芽球由来のcDNAや胎児型の高分子量DNAを、SSCP法と直接塩基配列決定法を組み合わせることにより同定した。

図2に示すように、遺伝子変異#5はヘリカーゼドメインの5'側で蛋白の翻訳が停止し、368個のアミノ酸よりなる産物ができる。遺伝子変異#7と#4は、スプライシング部位の変異で、それぞれヘリカーゼドメインの中と3'側で停止コドンが出現し、760個と、1060個よりなるアミノ酸からなる蛋白産物ができる。遺伝子変異#11、#2、#1はWRNの3'側の変異で、特に#1は6種の変異の中で最も3'側に位置し、1304のアミノ酸より短いWRN産物ができる。

図1の中では、臨床症状などの情報の得られた家系について、遺伝子型と表現型の相関関係を調べた。最上段には、遺伝子変異#4から順に#1まで、WRNの5'から3'へ順に対応する。徴候1から5までの主症状は全患者で認められた。尿ヒアルロン酸の測定は施行していない例が多かった。副症状



である糖尿病は、7例中の6例で認められた。この頻度は、これまでの報告に比べ高いが、今回の例に偏りがある可能性は否定できない。悪性腫瘍は1例に認められた。遺伝子変異#4は、日本人に最も頻度が高い変異であったが、8例間の比較では、大きな相違は認められなかった。また、異なった部位由来の6種の変異間にも、徴候に大きな相違は認められなかった。最も、C末端に位置する遺伝子変異#1の徴候は、他の遺伝子変異のそれとは大差なく、WRN蛋白のC末端には、重要な活性部位がある可能性とC末端が3次元構造の維持に重要である可能性が考えられた。

#### 「考察」

WRNは、ノザン-プロットの結果約5.8 kbの大きさであることが判明したが、cDNAとしては5'末端の欠けた約5.2 kbしか単離されていない。コーディング領域は約5.2 kbのcDNAの中にすべて含まれており、翻訳された蛋白(162 kD)は1432個のアミノ酸から成るpI値が6.0の酸性蛋白であった。またWRN蛋白は多くのDNAヘリカーゼと高い相同性が存在し、ヘリカーゼのアミノ酸配列に共通に保存されている7つの配列(I, Ia, II, III, IV, V, VI;ヘリカーゼモチーフ)を中央約1/3の部分に保持していたためWRN蛋白はDNAヘリカーゼの一つと考えられている。WRNに対する配列上の大腸菌および酵母ホモログはそれぞれRecQとSgs1であるが、RecQとSgs1に対する配列上のヒトホモログはすでに2種類(Q1とBLM)単離されており、RecQとSgs1に対する機能上でのヒトホモログがWRNかQ1かBLMかは今後の課題である。mRNAレベルの発現は調べられたすべての組織で認められ、特に膵臓、胎盤、筋肉、

心臓で多くみられる。

今回の解析では、日本人患者において、6種の異なる遺伝子変異がヘリカーゼドメインの前後で見つけ出されたが、いずれも蛋白の翻訳が途中でとまる変異であった。各遺伝子変異をもつ患者の間には、臨床症状、徴候に差異を認めなかったことより、C末端側に活性か構造において重要な部分があると推測される。約50%の患者で見出された1種の変異は、前後の遺伝子多型から作成したハプロタイプの解析から、共通の創始者をもつ可能性のあることが示唆された。各遺伝子変異をもつ患者の間には、臨床症状、徴候に差異を認めなかったことより、WRN蛋白の機能消失により、WSが発症すると考えられた。今後症例数を増やして検討する予定である。さらに不可解な表現形質として細胞融合の実験結果がある。すなわちWSは劣性遺伝をするにもかかわらずWS細胞と正常細胞との細胞融合の結果はWS細胞の表現形質を示し、WSの表現形質は優性であった。この解釈として、WRNが細胞増殖阻害因子のリプレッサーであると考えられている。ここでもDNAヘリカーゼの一つであるKuが転写因子機能を持っていることは示唆的であろう。したがってWRNに関する今後の研究として、ヘリカーゼ活性の有無およびその特質についての様々な角度からの検討とともにWRNと相互作用をする核酸や蛋白についての検討は重要と考えられる。

#### 「文献」

- 1) Goto M, Rubenstein M, Weber J et al.: Genetic linkage of Werner's syndrome to five markers on chromosome 8. Nature, 355:735-737, 1992
- 2) Schellenberg GD, Martin GM, Wijsman, E.M. et al.: Homozygosity mapping and Werner's

syndrome. Lancet, 339:1002,1992

3) Goddard KAB, Yu C-E, Oshima J, et al.:  
Towards localization of the Werner's syndrome  
gene by linkage disequilibrium an ancestral  
haplotyping: lessons learned from analysis of 35  
chromosome 8p11.1-21.1 markers. Am. J. Hum.  
Genet. 58: 1286-1302,1996.

4) Ye L, Nakura J, Mitsuda N, et al.: Two  
dinucleotide repeat polymorphisms at the  
D8S1218 and D8S1219 loci. Jpn. J. Hum. Genet.  
41:257-259,1996.

5) Nakura J, Ye L, Takahashi-Fujii A, et al.: Two  
dinucleotide repeat polymorphisms at the  
D8S1444 and D8S1445 loci. Jpn. J. Hum. Genet.  
41:261-263,1996.

6) Mitsuda N, Nakura J, Ye L, et al.:  
Dinucleotide repeat polymorphism at  
D8S1223 locus. Jpn. J. Hum. Genet. 41:265-  
266,1996.

7) Nakura J, Miki T, Ye L, et al.: Narrowing the  
position of the Werner syndrome locus by  
homozygosity analysis - Extension of  
homozygosity analysis. Genomics 36:130-  
141,1996.

8) Ye L, Nakura J, Kihara K, et al.: Molecular  
genetic analysis of Werner syndrome. Hong  
Kong J. Gerontology 10 (suppl) 472-475,1996.

9) Yu C-E., Oshima J, Fu Y-H, et al.: Positional  
cloning of the Werner's syndrome gene. Science  
272:258-262,1996.

10) Oshima J, Yu C-E, Puissan C, et al.:  
Homozygous and compound heterozygous  
mutations at the Werner locus. Hum. Mol.  
Genet. 5:1909-1913,1996.

Key words

Werner syndrome, Progeroid syndrome,  
Heliase, Aging

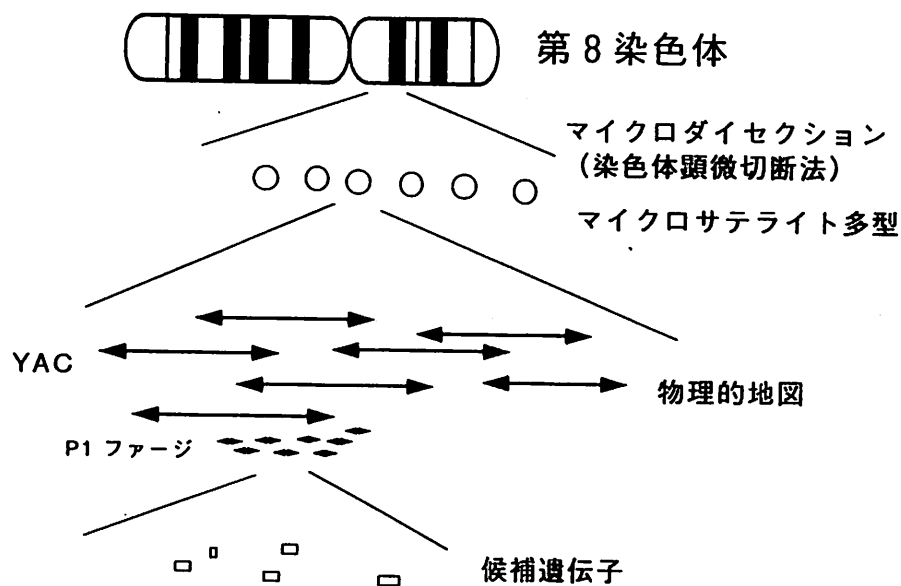


図1. ウェルナー症候群の原因遺伝子単離・同定に向けた  
ポジショナルクローニングの方法

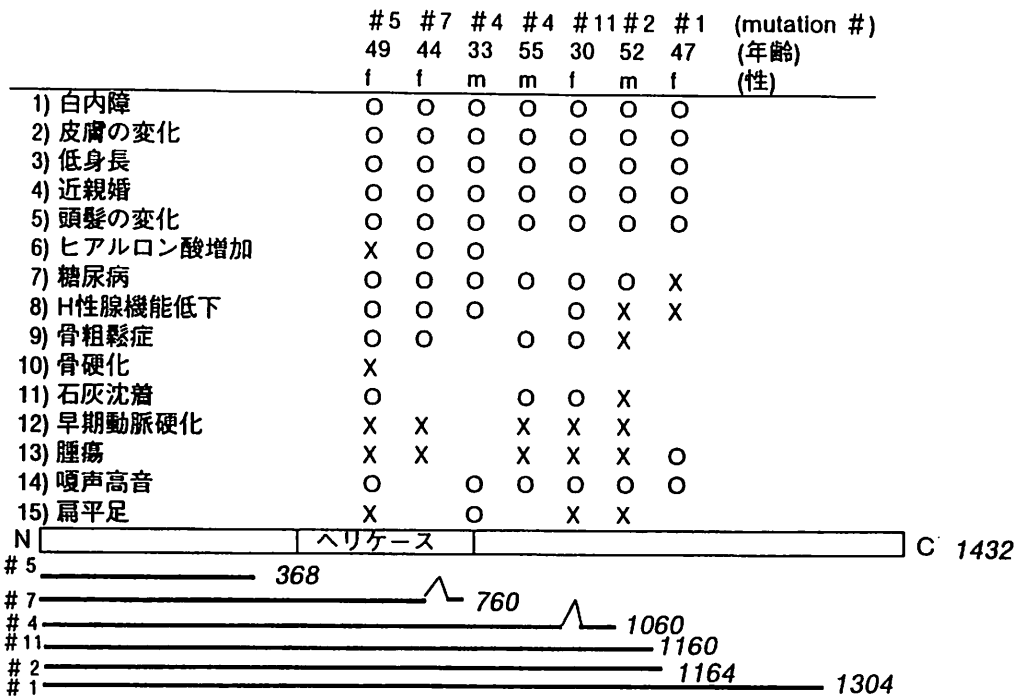


図2. ウェルナー症候群の遺伝子変異部位と臨床症状の比較。  
 ウェルナー症候群遺伝子産物と、これまで発見された  
 遺伝子変異の遺伝子上の座位