

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月25日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659163

研究課題名（和文）ハダカデバネズミの寿命はなぜ10倍長いのか？—抗酸化制御に関する遺伝子の単離—

研究課題名（英文）Identification of the genes related to longevity and cancer resistance in Naked mole-rats.

研究代表者

寺田 泰比古 (TERADA YASUHIKO)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：40212063

研究成果の概要（和文）：ハダカデバネズミ (*Hg*) のレトロウイルスcDNAライブラリーの作製し、マウス胎児繊維芽細胞(MEF)に遺伝子ライブラリーを導入し、クライシスを超えて増殖が停止せず増殖し続ける細胞コロニーを単離した。また、*Hg*は癌遺伝子に対して強い抵抗性を示すことから、*Hg*の癌抑制遺伝子を単離する目的で、癌遺伝子の*v-ras*で癌化したNIH3T3細胞に導入し、癌形質を消失させる遺伝子の単離を行った。これらの形質を変換させる候補遺伝子をクローニングし、機能解析を行った。

研究成果の概要（英文）：Naked mole-rats (*Hg*: *Heterocephalus glaber*) are extremely long-lived (30 years) mouse-sized rodents. In addition to its longevity, naked mole-rats have an extraordinary resistance to cancer as tumors have never been observed in these rodents. However, the mechanisms responsible for them were unknown at all.

In order to examine these mechanisms, we isolated several cDNAs responsible for the longevity and cancer resistance by expression cloning. For these purposes, we generated the retrovirus-based cDNA libraries from the livers of the Naked mole-rats, and infected MEF (mouse embryo fibroblasts) or *v-ras*-transformed NIH3T3 cells. Of several cDNAs, we found cDNA related to intermediate filament was linked to cancer resistance in the Naked mole-rats.

交付決定額

(金額単位：円)

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：抗老化遺伝子、発現クローニング、遺伝子ライブラリー、ハダカデバネズミ

### 1. 研究開始当初の背景

ハダカデバネズミ (*Hg*: *Heterocephalus glaber*) はアフリカ原産のデバネズミ科ハダカデバネズミ属に分類される齧歯類で、1970年頃から、哺乳類では数少ない真社会性の社会構造を持つことから社会生物学の研究対

象として注目された。しかし、2002年に Buffenstein らによって、齧歯類の中で飛び抜けて寿命が長い生物種であることが指摘されて以来、老化研究の分野で次第に注目されるようになった (O'Connor TP., et al., *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.*

133:835-42, 2002)。活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) の老化への関与は以前から指摘されているが、中でもそれらによって生じるフリーラジカル、過酸化脂質等の増加が老化の原因であるとする考え方が近年注目を集めている。*Hg* と実験マウスとを比較したところ、細胞の活性酸素の産生量や、カタラーゼやスーパーオキシドジスムターゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ等の抗酸化酵素には有意な差は見られなかった。

一方、活性酸素種による細胞内のダメージを、過酸化脂質、DNA の酸化的損傷、カルボニル化タンパク質を指標に調べたところ、実験マウスに比べていずれも顕著にレベルが高いことがわかった。さらに、過酸化水素を加えると、マウス由来線維芽細胞の致死量に比べて、10倍高濃度の過酸化水素に対しても耐性を示すことから、*Hg* は、細胞内の活性酸素量が低下しているのではなく、活性酸素に対する耐性を何らかの機構では獲得しているのではないかと考えられているが、その分子機構は現在のところわかっていない。

これまで老化や寿命が1つの遺伝子により制御されていることはない信じられてきたが、Johnston T. E. らは線虫から長寿を示す突然変異体を分離し、寿命決定に関わる遺伝子がインスリン・シグナル伝達経路の下流に位置することが遺伝学的な解析から明らかにした。これらの知見をもとにして、抗酸化酵素であるカタラーゼや Mn-SOD を過剰発現したマウスは長寿を示すことから、活性酸素の軽減が個体レベルの寿命の延長をもたらすことが示唆された。しかし、ハダカデバネズミは細胞の活性酸素の産生量や、抗酸化酵素には有意な差は見られず、活性酸素種に対して極めて高い耐性を示すことから、これまで知られている活性酸素耐性とは全く別のメカニズムが働いていて寿命が飛び抜けて長いのではないかと考えられている。

また、多くの実験マウスが寿命期間中に、癌が多発するのに対して、ハダカデバネズミは、寿命期間中に癌で死亡するケースはほとんど報告されていない。実際に、皮膚由来の線維芽細胞を株化して、癌遺伝子 (*v-ras*, *V-src*) を導入しても、癌化に対して強い抵抗性を示すが、このメカニズムは現在のところ

明らかになっていない。

これらの事実は、ハダカデバネズミが、寿命のメカニズムだけではなく、癌抵抗性のメカニズム解明においても、優れたモデル生物であることを示唆している。

## 2. 研究の目的

齧歯類のマウスやラットの平均寿命は 2-3 年であるのに対して、同じ齧歯類のハダカデバネズミの寿命は 25-35 年と 10 倍長く老化研究のモデル動物として脚光を浴びつつある。

ハダカデバネズミの長寿の秘密を解明する目的で、組織から cDNA ライブラリー を作製し、マウス胎児繊維芽細胞に導入し、細胞増殖の延長と活性酸素耐性を指標にして、ハダカデバネズミの細胞の抗活性酸素調節に関わる遺伝子を発現クローニングの手法で単離、解析するのが本研究の目的である。

これまで老化促進モデルマウスなどが開発され、老化兆候の早期出現と寿命の短縮の側から老化研究は行われているが、逆に寿命を延長する遺伝子変異の研究は線虫を中心とした遺伝学的な解析が主流であり、寿命が 10 倍長い齧歯類の分子生物学的な研究から原因遺伝子が特定されれば、哺乳類の寿命制御を明らかにする上で、先駆的な研究となり新しい分野を開拓する一歩になると考えられる。

一方、癌抵抗性に関しては、既に *v-ras* によって癌化したマウス NIH3T3 に遺伝子ライブラリーを導入したとき、癌形質から正常細胞への変換 (フラット・リバージョン) が起きる細胞を選択し、原因遺伝子を探索する方法を採用した。

## 3. 研究の方法

新規の遺伝子を機能的に単離する上で、発現クローニングは最もパワフルな手法である。発現クローニングとは、cDNA ライブラリーを培養細胞に導入し、遺伝子の機能を指標にして老化制御や、細胞周期制御などの遺伝子をクローニングする方法である。申請者によって開発された発現クローニング技術は新領域の開拓において威力を発揮してきた。本研究では、この技術をフルに発揮して、ハ

ダカデバネズミの老化制御や癌遺伝子に対する抵抗性に関わる遺伝子を単離しようとするを目的として、ハダカデバネズミの臓器由来のRNAからレトロウイルスの発現型遺伝子ライブラリーを作製した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ハダカデバネズミ (*Hg*) のレトロウイルス cDNA ライブラリーの作製

- ① *Hg* の生後、1-2 週間後の個体から、脾臓、脳、を採取し、RNA を精製後、Oligo (dT) をアニールし逆転写酵素によって 1st strand cDNA を合成した。
- ② ターミナルトランスフェラーゼで 1st strand cDNA の 5' 端に CCC オーバーハングを付け、この部位にプライマーをアニールし、PCR 反応にて cDNA を合成した。
- ③ *in vivo* リコンビネーション反応によ

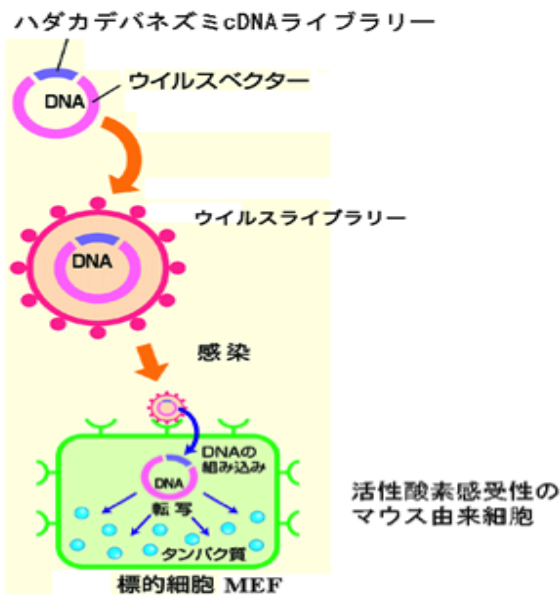


図 3：抗活性酸素抵抗調節遺伝子の単離

って、PMXs レトロウイルスベクターに cDNA を挿入し、大腸菌に形質転換し、cDNA ライブラリーを作製した (図 2)。

- ④ 作製した cDNA ライブラリーを、レトロウイルス産生細胞である Plat-E 細胞に遺伝子導入し、2 日後に培養上清を採取しライブラリーをレトロウイルス化し

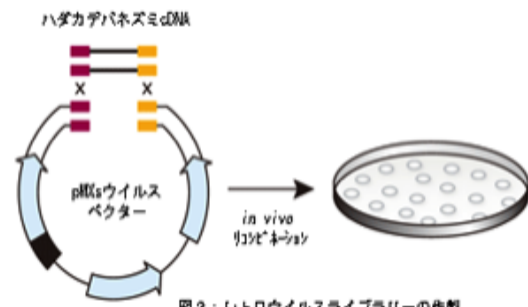


図 2：レトロウイルスライブラリーの作製

た (図 3)。

- ⑤ ライブラリーは、Complexity (複雑度) が  $10^7$  個のスケールで、cDNA の挿入領域が空 (empty) のものは、10% 以下であった。また、20 以上の cDNA をシークエンスで確認し、ホモロジーサーチにて配列の確認をしたところ、ほとんどの cDNA が全長を有していた。

##### (2) *Hg* のレトロウイルスライブラリーを用いた発現クローニング

- ① 培養上清を活性酸素感受性のマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) に感染によって導入し、ピューロマイシン薬剤耐性で cDNA が導入された細胞を選択しクライシスを超えて増殖が停止せず増殖し続ける細胞コロニーを単離した。

- ② *Hg* は癌遺伝子に対して強い抵抗性を示すことから、*Hg* の癌抑制遺伝子を単離する目的で、*v-ras* で癌化した NIH3T3 細胞に導入し、癌形質を消失させる遺伝子の単離を行った。

- ③ Cre-loxP システムで、Cre 遺伝子を細胞に導入することによって、非特異的な細胞株を排除した。これらの細胞クローンからゲノムを回収し、PCR 法にて、cDNA を増幅し遺伝子配列を決定した。

- ④ 上記③から、①の細胞老化を抑制する *Hg* 由来の遺伝子は現在のところ単離されていないが、②の癌形質を強く抑制する遺伝子が単離され、そのうちの 1 つはホモロジー検索から *Hg* の Vimentin ファミリーであることがわかった。また、比較的発現レベルの低いプロモーターである SV40 promoter で、Vimentin を発現させても、*v-ras* でトランスフォームした NIH3T3 細胞に対して、強い癌抑制効果が認められたことから、*Hg* 由来の Vimentin が過剰に発現することに

よって癌抵抗性がもたらされたのではないことが示唆された。さらに、マウス由来のVimentinを単離し、同じ条件下で、軟寒天培地でのコロニー形成能を比較したところ、*Hg*由来のVimentinのみ、コロニー形成能を強く抑制する活性があった。このことは、同じ齧歯類であるが、ハダカデバネズミだけが、進化上、何らかの変異を獲得し、Vimentinが新たな機能を獲得したことを示唆している。

現在、マウス由来のVimentinと*Hg*由来Vimentinとの間で、ドメイン解析を行うことで、どの部位の構造変化が癌抵抗性に関係しているのかを明らかにしている。

Vimentinは間葉系に特異的な中間径フィラメントであるが、マウス由来のVimentinと比較し、なぜ、*Hg*のVimentinが強い癌抑制効果を持つのかを今後、その機能を明らかにしていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem.waseda.ac.jp/terada/research.html>

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者: 寺田泰比古 (Terada Yasuhiko)  
早稲田大学・先進理工学部・教授  
研究者番号: 40212063