

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005 ～ 2009
 課題番号：17054004
 研究課題名（和文） 転写修飾を介したホメオスタシスを制御する DECODE 回路の解明
 研究課題名（英文） **Elucidation of DECODE cycle that regulates homeostasis mediated by protein modification.**
 研究代表者
 深水 昭吉 (FUKAMIZU AKIYOSHI)
 筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授
 研究者番号：60199172

研究成果の概要（和文）：

我々は、Foxo1 が様々な翻訳後修飾を受け、その活性が制御されることを解明してきた。本研究では、アセチル化 Foxo1 の PKB によるリン酸化亢進、さらに、Foxo1 がアルギニンメチル化酵素・PRMT1 によってメチル化されるとリン酸化が阻害されることを示した。また、酸化ストレスによって PRMT1 が Foxo1 をメチル化し、アポトーシスが誘導されることを明らかにし、メチル化とリン酸化がクロストークする新しいアルギニンメチル化コードを提唱した。

研究成果の概要（英文）：

We have found the ubiquitin-dependent degradation of the forkhead transcription factor・Foxo1 coupled with the phosphorylation mediated *via* PKB that is activated by insulin-mediated signaling pathway and set out a new mode of insulin action that affects the fate of protein stabilization. We discovered the reduced affinity to the recognition DNA sequence of Foxo1 acetylated by CBP, leading to gene repression of the target genes and demolished the general concept that acetylation of transcription factors induces gene activation. We also demonstrated the re-activation of Foxo1 deacetylated by NAD⁺-dependent Sir2. In the present study, we revealed that acetylated Foxo1 is increasingly phosphorylated by PKB and that Foxo1 is methylated by protein arginine methyltransferase・PRMT1 and then the phosphorylation of Foxo1 by PKB is inhibited by the methylation. Furthermore, we illustrated the apoptosis induction mediated by the increased arginine methylation of Foxo1 by PRMT1 in response to H₂O₂ oxidative stress through the Bim gene activation and proposed a novel arginine methylation code as a cross-talk regulation between methylation and phosphorylation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	26,000,000	0	26,000,000
2006 年度	25,300,000	0	25,300,000
2007 年度	25,300,000	0	25,300,000
2008 年度	35,296,000	0	35,296,000
2009 年度	25,300,000	0	25,300,000
総計	137,196,000	0	137,196,000

研究分野： 農学

科研費の分科・細目： 境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：翻訳後修飾、フォークヘッド転写因子、リン酸化、アセチル化、ユビキチン化、アルギニンメチル化、アルギニンメチル化コード、食シグナル

1. 研究開始当初の背景

一元的に見えるゲノム情報から、多様な

環境刺激に対して細胞が応答する仕組みは、シグナルを細胞膜上または細胞内で感知・受容し、的確に核内に伝達し、統合されて初めて作動する。ゲノム情報に多様性を与えるには、クロマチン構造の変化に伴う転写活性化・抑制化の「場」の設定と、そこにアクセスする転写因子（共役因子）や複合体形成の選択的な作用が必要である。クロマチン構成因子の一つであるヒストンは、リン酸化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化等、多重に修飾されることは古くから知られていた。しかし、ごく最近、それらの修飾が（例えば、H3の9番目のリジンがメチル化を受けるとリジンはアセチル化を受けない；H3の9番目のリジンのアセチル化は10番目のリン酸化を亢進させる等）相互に影響しあい、クロマチン構造は動的に制御されていることが次々と明らかにされ、ヒストンコード仮説が提唱されている。

線虫などのモデル動物を用いた遺伝学的解析より、Foxo1が寿命の延長に関与することも示されていることから、唯一の寿命延長手段であるカロリー制限（すなわちインスリンシグナルレベルの低下）と、老化のメカニズムをつなぐkey factorとしてもFoxo1がクローズアップされてきた。実際、当研究室では、Foxo1/Sir2との転写レベルでの共役作用を発見し（*PNAS* 2004）、DECODE回路の生理的意義を提唱可能と考えた。

現在、寿命、糖尿病、細胞周期など様々な研究分野において、Foxo1の直接的な関わりが示されている。Foxo1のリン酸化による転写制御機構は、1999年に米国の複数の研究グループから報告された。その後、糖代謝（糖尿病）との関連については米国のAcciliらのグループ、また酸化ストレス制御（寿命）に関しては米国のFinkelらのグループが世界をリードしてきた。しかし、いずれもFoxo1のリン酸化のみに着目した研究成果であり、アセチル化、脱アセチル化、ユビキチン化といった多重修飾と恒常性維持を関連させ、高次の転写制御メカニズムを同定・解析しているグループは世界的にみても例が無かった。

当研究室では、1996年に転写制御因子・CBP（CREB-binding protein）の複合体因子の探索を開始し、多様な核内因子との相互作用を同定した。まず、核内受容体・HNF4（hepatocyte nuclear factor 4）の転写コアクチベーターとしてCBPが作用することを明らかにした（*BBRC* 1997）。次いで、転写制御因子としての β -カテニンに対しCBPが共役因子として作用（*JBC* 2000）することや、Nrf2（*Genes Cells* 2001）やユーイング肉腫の原因遺伝子産物・EWS（*JBC* 2003）のコファクターとして機能することを解明してきた。

2. 研究の目的

我々は、『フォークヘッド（FOXO）ファミリー転写因子・Foxo1がCBPと結合してアセチル化されることで、転写活性が抑制される』ことを発見し、【アセチル化＝転写活性化】という一般的定説を覆した（*PNAS* 2004）。さらに我々は、Foxo1がリン酸化と共役してユビキチン化される事を解明した（*PNAS* 2003）（下図）。また、当研究室のEWSの相互作用因子解析から、アルギニンメチル化酵素等が単離され、転写因子が多重修飾を受ける可能性を見出している。そこで、本研究は『転写修飾を介したホメオスタシスを制御するDECODE回路』の生物学的意義を明らかにし、転写制御メカニズムの新しいパラダイムの創出を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) アルギニンメチル化酵素活性の測定：
GST-PRMTタンパク質を大腸菌で産生し、精製することで酵素タンパクとした。標的タンパク質を細胞内で、または大腸菌で調整し、 ^3H ラベルされたメチル基供与体・S-adenosyl-L-methionine（SAM）を加えて反応させ、電気泳動後にオートラジオグラフィで感光させて検出した。
- (2) 転写活性の測定：luciferase（Luc）活性を指標に、目的プロモーターを含むプラスミドを培養細胞にトランスフェクションした。細胞抽出液を回収後、Luc活性を測定した。
- (3) タンパク質相互作用の検出：GST融合タンパク質を精製し、標的タンパク質の発現ベクターを細胞にトランスフェクションして細胞抽出液を調整した。GST沈降法によって、タンパク質間の親和性や結合領域を同定した。また、特異的抗体を作製し、免疫沈降法によって細胞内のタンパク質の相互作用を検証した。
- (4) タンパク質因子の細胞内局在の同定：
GFPやmCherry等の蛍光タンパク質のタグを標的タンパク質のN-末端またはC-末端に付加し、蛍光顕微鏡で観察して撮影した。
- (5) in vivo Luc アッセイ：プロモーター-Lucプラスミドをリンガー液に溶解し、麻酔下のマウス尾静脈に注入した。麻酔から覚醒後、絶食や摂食等を行い、in vivo imaging system（IVIS）で測定した。

4. 研究成果

- (1) **Foxo1** のアルギニンメチル化酵素

(PRMT) による機能制御に関する研究

CBP や HNF-4 に加えて、Foxo1 のコファクターである PGC1 α が、PRMT の基質としてアルギニンメチル化されることが報告されていた。そこで、Foxo1 も PRMT の基質になり、直接活性が制御されるのではないかという仮説を立て、*in vitro* や *in vivo* の結合実験を行った結果、Foxo1 と PRMT1 および PRMT6 が相互作用することが明らかになった。さらに、Foxo1 のアルギニンメチル化修飾を検討したところ、PRMT1 が特異的に Foxo1 をメチル化することが判明した。次いで、Foxo1 に存在するどのアルギニン残基がメチル化されるかを検討するため、種々の変異体を作製してメチル化アッセイを行った結果、PKB/Akt リン酸化コンセンサスモチーフと重複している RxR がメチル化された。

そこで我々は、RxR の 2 カ所のアルギニンのメチル化が、PKB/Akt によるリン酸化になんらかの影響を与えるのではないかと考え、248 番目と 250 番目のアルギニン残基をジメチル化した Foxo1 ペプチドを合成して PKB/Akt によるリン酸化の効率を検証した。その結果、非常に興味深いことに、メチル化させたペプチドでは PKB/Akt によるリン酸化がほぼ完全に阻害された。さらに、PRMT1 でメチル化させておいた GST-Foxo1 タンパク質を基質に用いて、リン酸化反応を行い検証したところ、PKB/Akt によるリン酸化は有意に抑制された。

Foxo1 は PKB/Akt によってリン酸化されると細胞質に移行し、ポリユビキチン化されて 26S プロテオソームによって分解されることから、PRMT1 のノックダウンの実験等を用いてリン酸化以降の PRMT1 の役割を検討した。その結果、PRMT1 依存的なアルギニンメチル化は、Foxo1 の核外移行に伴うポリユビキチン化によるタンパク分解への一連の過程を抑制的に制御していることが明らかになった。さらに、Foxo1 のアルギニンメチル化による活性制御の生物学的意義について検証したところ、アルギニンメチル化による PKB/Akt リン酸化阻害を介した Foxo1 の活性制御が細胞の酸化ストレス応答機構の一端を担っていることが示唆された。

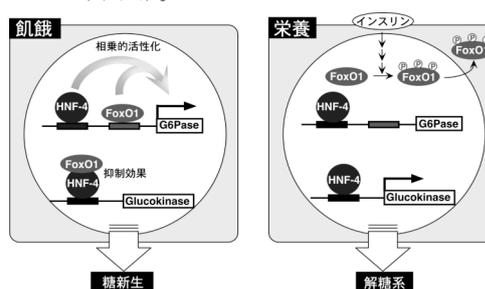
(2) 絶食・摂食による糖新生系遺伝子の発現制御

HNF4 は、糖新生律速酵素 (G6Pase) の転写を活性化する一方、解糖系酵素 (GK) の転写を活性化するという報告もある。糖新生 (糖合成経路) と解糖系 (糖分解経路) は逆の経路であり、糖新生の律速酵素・G6Pase 遺伝子の転写はインスリン非存在下 (絶食時) で活性化され、解糖系の律速酵素・GK 遺伝子の転写はインスリン存在下 (摂食時) で活性化される。我々は、一つの転写因子

(HNF4) が同時に活性化されない 2 つの遺伝子を活性化することに着目し、この制御機構を明らかにすることを目的に実験を行ってきた。そして、Foxo1 が HNF4 に対して遺伝子依存的に相反する効果を発揮することを見出した。すなわち、G6Pase 遺伝子において、Foxo1 と HNF4 の転写を相乗的に活性化し、反対に GK 遺伝子では HNF4 の転写を抑制する。また、これらの効果は、インスリン刺激による Foxo1 のリン酸化とそれに伴う細胞質移行を介して解除される。

さらに我々は、Foxo1 の効果を遺伝子依存的に変化させる要因を探索した。G6Pase 遺伝子プロモーターには Foxo1 と HNF4 の両因子の結合配列が存在している。しかし、GK 遺伝子プロモーターには HNF4 結合配列は存在するが、Foxo1 結合配列は存在しない。このことから、Foxo1 結合配列の有無が Foxo1 の効果を遺伝子依存的に変化させていると予想した。レポーターアッセイによる検証の結果、G6Pase 遺伝子プロモーターから Foxo1 結合配列を欠失させると、HNF4 転写活性に対する Foxo1 の効果が“活性化”から“抑制化”へと変化した。従って、Foxo1 は HNF4・Foxo1 結合配列のコンビネーションを認識してその活性を変化させている可能性が示唆された。これらの結果を、マウスを用いて絶食・摂食という『食シグナル』の影響を検証するため、Hydrodynamic 法による *in vivo* Luc アッセイを確立させた。この方法を利用し、上記の G6Pase 遺伝子プロモーターおよびプロモーター変異体プラスミドをマウスに導入して肝臓におけるプロモーター活性の変動を IVIS で測定した。その結果、絶食時には G6Pase 遺伝子プロモーターが活性化し、GK 遺伝子プロモーターが抑制されること、逆に摂食時には G6Pase 遺伝子プロモーターが抑制化され、GK 遺伝子プロモーターが活性化することが分かった。また、各転写因子結合配列変異レポーターでは、シグナル応答性が消失していた。このことから『食シグナル』への応答性がプロモーターの転写因子の結合性に大きく依存していることが明らかになった。

これら一連の実験から、我々は Foxo1 と HNF4 を中心とした糖代謝制御モデル提唱した (下図)。



(3) EWS の PRMT による機能制御に関する研究

ヒト EWS タンパク質は 656 アミノ酸から構成され、その C 末端側に RNA 結合タンパク質に特徴的な RNA 認識モチーフや 3 カ所の Arg-Gly-Gly 配列 (RGG box) を有する。一方、N 末端側は転写活性化因子に共通してみられるグルタミンに富む領域を有し、この領域だけでも強力な転写活性化を示す事が知られているが、EWS タンパク質本来の機能的役割は長らく不明であった。

我々は、これまでに EWS が転写制御の中核的因子である CBP/p300 や RNA pol II とその N 末端領域で相互作用することにより複合体を形成し、DNA 結合型転写因子 HNF4 を足場として CBP と協調的に転写を活性化する転写共役因子としての機能を有することを明らかにしてきた。

我々は、酵母 two-hybrid スクリーニング法により EWS に相互作用する分子として PRMT1 を同定し、*in vitro* で EWS の RGG box が PRMT1 によりメチル化されることを確認した。次いで、EWS の持つ転写活性化に対する PRMT1 の影響を調べたところ、PRMT1 の共発現により EWS のコアクチベーター活性が抑制された。EWS は通常核内に局在するが、PRMT1 の共発現により細胞質内にも局在する現象が観察された。この局在変化は、メチル化阻害剤である MTA の添加、及び PRMT1 触媒ドメイン内の SAM 結合配列を置換した不活性変異体の共発現により抑制された。即ち EWS は、PRMT1 によるメチル化修飾が引き金となって、その細胞内局在を変化させたために、自身のコアクチベーター活性が抑制されたと示唆された。また、PRMT 遺伝子ファミリーの一つである膜接合型 PRMT8 が、EWS を *in vitro* でメチル化することが判明した。

我々が明らかにしたアルギニンメチル化による Foxo1 のリン酸化阻害機構は、新しい制御メカニズムとして大きな役割を果たす可能性がある。PKB/Akt は生理学的に重要な多数のタンパク質を基質として、リン酸化によって、細胞増殖をはじめとした機能をコントロールしているため、Foxo1 のみならず、RxRxxS/T モチーフをもつ全ての Akt 基質タンパク質に適用されるポテンシャルを秘めている。さらに、PKB/Akt リン酸化コンセンサス配列にアルギニンメチル化部位が重複していることから、アルギニンメチル化-リン酸化制御が新しい機能コードとしての役割を果たしているのではないかと考えている。特に、非対称型アルギニンメチル化と PKB/Akt リン酸化された部位において、脱リン酸化後の再リン酸化は生じない可能性があり、シグナルの“メモリー”として機能す

ることが予想される。

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)

[雑誌論文] (計 32 件)

- ① Yoshimochi K, Daitoku H, and Fukamizu A. PCAF represses transactivation function of FOXO1 in an acetyltransferase-independent manner. **J. Recept. Transduc. Res.** 30, 43-49 (2010) 査読有
- ② Sakamaki JI, Daitoku H, Yoshimochi K, Miwa M, and Fukamizu A. Regulation of FOXO1-mediated transcription and cell proliferation by PARP-1. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 382, 497-502 (2009) 査読有
- ③ Sako K, Fukuhara S, Minami T, Hamakubo T, Song H, Kodama T, Fukamizu A, Gutkind JS, Koh GY, and Mochizuki N. Angiopoietin-1 induces Kruppel-like factor 2 expression through a phosphoinositide 3-kinase/AKT-dependent activation of myocyte enhancer factor 2. **J. Biol. Chem.** 284, 5592-5601 (2009) 査読有
- ④ Ito Y, Daitoku H, and Fukamizu A. Foxo1 increases pro-inflammatory gene expression by inducing C/EBPbeta in TNF-alpha-treated adipocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 378, 290-295 (2009) 査読有
- ⑤ Yamagata K, Daitoku H, Takahashi Y, Namiki K, Hisatake K, Kako K, Mukai H, Kasuya Y, and Fukamizu A. Arginine methylation of FOXO transcription factors inhibits their phosphorylation by Akt. **Mol. Cell** 32, 221-231 (2008) 査読有
- ⑥ Hirota K, Sakamaki JI, Ishida J, Shimamoto Y, Nishihara S, Kodama N, Ohta K, Yamamoto M, Tanimoto K, and Fukamizu A. A combination of HNF-4 and Foxo1 is required for reciprocal transcriptional regulation of glucokinase and glucose-6-phosphatase genes in response to fasting and feeding. **J. Biol. Chem.** 283, 32432-32441 (2008) 査読有
- ⑦ Murayama A, Ohmori K, Fujimura A, Minami H, Yasuzawa-Tanaka K, Kuroda T, Oie S, Daitoku H, Okuwaki M, Nagata K, Fukamizu A, Kimura K, Shimizu T, and Yanagisawa J.

- Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. *Cell* 133, 627-639 (2008) 査読有
- ⑧ Kim JD, Kako K, Kakiuchi M, Park GG, and Fukamizu A. EWS is a substrate of type I protein arginine methyltransferase, PRMT8. *Int. J. Mol. Med.* 22, 309-315 (2008)
- ⑨ Daitoku H, and Fukamizu A. FOXO transcription factors in the regulatory networks of longevity. *J. Biochem.* 141, 769-774 (2007) (review)
- ⑩ Sekine K, Chen YR, Kojima N, Ogata K, Fukamizu A, and Miyajima A. Foxo1 links insulin signaling to C/EBPalpha and regulates gluconeogenesis during liver development. *EMBO J.* 15, 3607-3615 (2007) 査読有
- ⑪ Fan W, Yanase T, Morinaga H, Okabe T, Nomura M, Daitoku H, Fukamizu A, Kato S, Takayanagi R, and Nawata H. Insulin-like growth factor 1/insulin signaling activates androgen signaling through direct interactions of Foxo1 with androgen receptor. *J. Biol. Chem.* 282, 7329-7338 (2007) 査読有
- ⑫ Asada S, Daitoku H, Matsuzaki H, Saito T, Sudo T, Mukai H, Iwashita S, Kako K, Kishi T, Kasuya Y, and Fukamizu A. Mitogen-activated protein kinases, Erk and p38, phosphorylate and regulate Foxo1. *Cell Signal.* 19, 519-527 (2007) 査読有
- ⑬ Yamagata K, Yoshimochi K, Daitoku H, Hirota K, and Fukamizu A. Bile acid represses the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 promoter activity in a small heterodimer partner-dependent manner. *Int. J. Mol. Med.* 19, 751-756 (2007) 査読有
- ⑭ Nakae J, Cao Y, Daitoku H, Fukamizu A, Ogawa W, Yano Y, and Hayashi Y. The LXXLL motif of murine forkhead transcription factor FoxO1 mediates Sirt1-dependent transcriptional activity. *J. Clin. Invest.* 116, 2473-2483 (2006) 査読有
- ⑮ Marchetti V, Menghini R, Rizza S, Vivanti A, Feccia T, Lauro D, Fukamizu A, Lauro R, and Federici M. Benfotiamine counteracts glucose toxicity effects on endothelial progenitor cell differentiation via Akt/FoxO signaling. *Diabetes* 55, 2231-2237 (2006) 査読有
- ⑯ Inoue Y, Itoh Y, Abe K, Okamoto T, Daitoku H, Fukamizu A, Onozaki K, and Hayashi H. Smad3 is acetylated by p300/CBP to regulate its transactivation activity. *Oncogene* 26, 500-508 (2006) 査読有
- ⑰ Aoyama H, Daitoku H, and Fukamizu A. Nutrient control of phosphorylation and translocation of Foxo1 in C57BL/6 and db/db mice. *Int. J. Mol. Med.* 18, 433-439 (2006) 査読有
- ⑱ Nakahara M, Furuya N, Takagi K, Sugaya T, Hirota K, Fukamizu A, Kanda T, Fujii H, and Sato R. Ileal bile acid-binding protein, functionally associated with the farnesoid X receptor or the ileal bile acid transporter, regulates bile acid activity in the small intestine. *J. Biol. Chem.* 280, 42283-42289 (2005) 査読有
- ⑲ Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Aoyama H, Yoshimochi K, and Fukamizu A. Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 11278-11283 (2005) 査読有
- ⑳ Dateki M, Horii T, Kasuya Y, Mochizuki R, Nagao Y, Ishida J, Sugiyama F, Tanimoto K, Yagami K, Imai H, and Fukamizu A. *J. Biol. Chem.* 280, 20503-20508 (2005) 査読有
- ㉑ Hirota K, Aoyama H, and Fukamizu A. Mutation analysis of HNF-4 binding sites in the human glucose-6-phosphatase promoter. *Int. J. Mol. Med.* 15, 487-490 (2005) 査読有
- ㉒ Shimizu T, Oishi T, Omori A, Sugiura A, Hirota K, Aoyama H, Saito T, Sugaya T, Kon Y, Engel JD, Fukamizu A, and Tanimoto K. Identification of cis-regulatory sequences in the human angiotensinogen gene by transgene coplacement and site-specific recombination. *Mol. Cell. Biol.* 25, 2938-2945 (2005) 査読有
- ㉓ Araya N, Hiraga H, Kako K, Arai Y, Kato S, and Fukamizu A. Transcriptional down-regulation through nuclear exclusion of EWS methylated by PRMT1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329, 653-660 (2005) 査読有

[学会発表] (計 51 件)

[その他]
ホームページ等

<http://akif2.tara.tsukuba.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深水 昭吉 (FUKAMIZU AKIYOSHI)
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・
教授
研究者番号：60199172

(2) 研究分担者

大徳 浩照 (DAITOKU HIROAKI)
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・
講師
研究者番号：30361314

廣田 恵子 (HIROTA KEIKO)
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・
助手
研究者番号：00375370
(H18→H20)