

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17983

研究課題名（和文）長寿関連因子WDR6と抗酸化ストレス物質の相互作用の解析

研究課題名（英文）Analysis of interaction between longevity-related factor WDR6 and antioxidant stress substances

研究代表者

大畑 佳久（Ohata, Yoshihisa）

早稲田大学・人間科学学術院・その他（招聘研究員）

研究者番号：60779289

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：Insulin/IGF-Iシグナルや糖・脂質代謝は、老化および老化関連疾患の発症に重要な役割を担っている。WDR6はこのインスリンシグナルと深く関わるということが報告されている。本研究では、in vivoとin vitroの両面からWDR6の有する生理的機能の解析を行った。まず培養細胞を用いた研究において、WDR6の発現低下が糖・脂質代謝に大きな影響を与えることが示唆された。続いてマウスを用いた遺伝子解析の結果、WDR6の発現低下はカロリー制限状態の遺伝子発現状態を一部エミュレートすることが示された。これらの結果から、WDR6の発現低下が健康維持、延いてはCR模倣効果を有していることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究によって、WDR6の有する機能の一部が解明された。特に注目すべき点として、オートファジーに対する影響力とCR模倣効果である。特に注目したいのはCR模倣効果である。CRは寿命を延ばすのみならず、成人病の予防といった健康寿命の延伸にもかかわることが知られている。このCRの状態に至るには摂取カロリーを抑えた状態を長期間維持する必要がある。今回の実験結果から、WDR6の遺伝子発現を低下させることでCR状態を再現可能なことが示唆された。したがって、WDR6を標的とした薬剤等を開発することにより、高齢者の生活の質を改善することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Insulin / IGF-I signaling and glucose / lipid metabolism play important roles in the development of aging and aging-related diseases. WDR6 has been reported to be involved in this insulin signal pathway. In this study, we analyzed the physiological functions of WDR6 both in vivo and in vitro. First, in the studies using cultured cells, it was suggested that the decreased expression of WDR6 had a significant modulating effect on glucose and lipid metabolism. Subsequently, from the result of gene expression analysis using mice, it was shown that the decreased expression of WDR6 partially emulated the gene expression pattern of the calorie-restricted mice even under the ad libitum fed conditions. From these results, it is expected that the decreased expression of WDR6 has health benefits, which so-called calorie restriction mimetic effects.

研究分野：基礎老化学

キーワード：WDR6 老化 代謝 遺伝子発現解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

老化は全ての生物に共通する生命イベントであり、老化をいかに防ぐかということが科学の歴史の中で研究されてきた。現在では分子生物学的な手法により老化に関わる様々なイベントが解明されてきた。その一例として、がんや糖尿病といった日本人の直接的、間接的な死因の上位を占める病と老化が深い関係にあることが明らかにされてきた。これはなんらかの外的要因により老化を防ぐことで死因となりうる病に罹患するリスクを減少することが可能であることを意味している。これらの研究の中で様々な老化の要因が徐々に解明され、人類の永遠の夢とも言える健康的な長寿ひいては不老不死の実現に向けて着実にあゆみを進めていると言えるだろう。本研究はこの様に分子レベルでの老化のメカニズムと原因の解明を目的としている。老化関連因子の中で長寿命条件においてマウスの間脳視床下部にて WDR6 の発現が低下することが報告されている。この WDR6 はタンパク質間相互作用、細胞周期の制御、シグナルトランスダクション、アポトーシス、そして遺伝子発現制御といった様々な細胞プロセスにおいて重要な役割を担う WD-repeat モチーフを有していることが知られている(図 1)。しかしながらこの WDR6 の下流に存在する分子シグナルは予測されてはいるものの、解明されてはいない。また長寿命状態に至る有名な手法としてカロリー制限(CR)が挙げられる、CR とは摂取カロリーを制限することで生体内のイベントを制御し、オートファジーの活性化や抗酸化ストレス状態へ導く方法である。しかしながらこの CR の状態へと至るには長期にわたる食事制限などが必要であり、ヒトが行う事は非常に難しいと言われている。

私はカロリー制限や長寿命状態によって WDR6 の発現が低下することから、WDR6 の遺伝子発現がこれらの生命イベントのキーであると予想し、WDR6 の機能解析を行うことにした。本研究では長寿命状態の特徴であるオートファジー、mTORC1 経路の活性状態、そして遺伝子改変マウスを用いて WDR6 の機能の解析を行った。

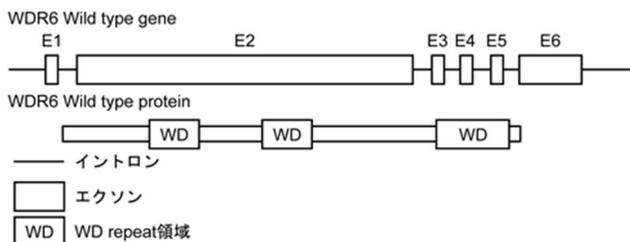


図1. 長寿因子WDR6の概略図

2. 研究の目的

老化および老化関連疾患の発症や発ガンに重要な役割を担っていることが多数報告されている。早稲田大学人間科学部の千葉卓哉研究室はこのインスリン/IGF-I シグナル関連分子として WDR6 (WD repeat-containing protein 6) を同定した。この WDR6 はタンパク質間相互作用、細胞周期の制御、シグナルトランスダクション、アポトーシス、そして遺伝子発現制御といった様々な細胞プロセスにおいて重要な役割を担う WD-repeat モチーフを有していることが知られている。当研究室では既に WDR6 が視床下部で高発現している IRS-4 (insulin receptor substrate-4) と結合して機能することを報告した(Chiba et al., 2009)。さらに長寿命ラットや食餌制限ラットの視床下部において発現が低下することが報告されている。またさまざまな生物において長寿命状態において酸化ストレスに対する耐性が通常状態よりも大幅に上昇していることが示唆されている。このことから WDR6 も酸化ストレス耐性に関与していることが予想される。

本研究では WDR6 がいかなる機構を通じて長寿を得ているのか、さらには代表的な老化関連

因子である TOR や SIRT1 といった因子との関連性を調査するという点について論文報告が無く、新規性が高い研究計画であることが言える。そしてこの中間点に存在する経路を明らかにすることで今後の老化における理解が一層深まって行くことが期待される。

3. 研究の方法

本研究では WDR6 の機能解析を行うために、培養細胞とマウスを用いて in vivo と in vitro の両面から研究を行った。培養細胞を用いた研究では HeLa 細胞と HepG2 細胞に対して WDR6 siRNA の遺伝子導入、WDR6 と長寿関連因子である TORC1 経路やオートファジー関連因子との関係性について Loss of function 型の機能解析を行った。さらにこれらの細胞から抽出した RNA を基に作成した cDNA をテンプレートに qPCR 法を用いて遺伝子発現解析を行った。続いてマウスを用いた解析では野生型-自由摂食マウス(WT/AL マウス)群、野生型-カロリー制限マウス(WT/CR)群、WDR6 KO 型-自由摂食マウス(KO/AL)群、そして WDR6 KO 型-カロリー制限マウス(KO/CR)群の 4 群を準備した。まずは WT/AL マウスを用い、組織特異的な WDR6 発現解析を行った。その結果非常に高い発現を示した脂肪組織を用いて次世代遺伝子解析を行った。WT/AL、WT/CR、KO/AL、そして WT/CR の 4 郡のマウスから脂肪組織を抽出し、RNA を抽出した。そしてこの RNA から cDNA を合成し、RNA-seq 法を用いた遺伝子発現比較を行った。

4. 研究成果

2018年度は HeLa 細胞に対して siRNA を用いて WDR6 をノックダウンし、Western Blotting 法を用いて LC3 タンパク質発現解析を行った。その結果、通常型の HeLa 細胞と Co siRNA を導入した細胞では LC3-I、LC3-II のタンパク質発現に大きな変化は見られなかった。しかし siRNA によって WDR6 をノックダウンした HeLa 細胞では前 2 種の細胞と比較して LC3-I、LC3-II の発現がともに上昇した(図 2)。続いてこれらの細胞から RNA を抽出し、cDNA を合成し、qPCR 法を用いて WDR6 の遺伝子発現量の解析を行った。通常型の HeLa 細胞と Co siRNA を導入した細胞と比較して WDR6 siRNA を導入した細胞では WDR6 mRNA の発現が有意に低下した(図 2)。これらの結果から、WDR6 がオートファジーに影響を与えることが示唆された。

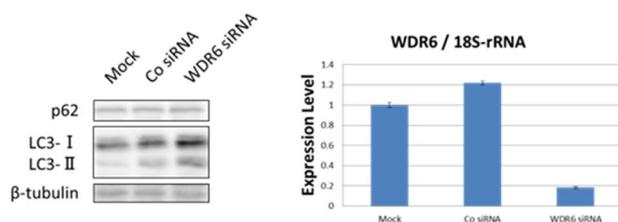


図2. WDR6のKDとLC3の発現解析
Mock: 未処理細胞
Co siRNA: Co siRNA導入細胞
WDR6 siRNA: WDR6 siRNA導入細胞

続いて WDR6 とオートファジーの関係性を調べるためにフラックスアッセイによるオートファジーの進行状況の解析を行った。Co siRNA と WDR6 siRNA を遺伝子導入した HeLa 細胞を 2 時間飢餓培地で処理した。その際にリソソーム阻害剤である BafilomycinA1 を加え、LC3- を蓄積させることでオートファジーの進行状況を可視化した。その結果、Co siRNA 導入細胞ではバフィロマイシン処理によって LC3- の分解が阻害され、飢餓処理+バフィロマイシン処理ではバフィロマイシン処理単独と比較して LC3- の蓄積が減少し、LC3- の蓄積が上昇した(図 3)。これは飢餓処理によってオートファジーが促進されていることを示している。その一

方で WDR6 siRNA 導入細胞ではバフィロマイシン単独処理と飢餓処理+バフィロマイシン処理を比較すると LC3-I、LC3-II の両方の蓄積が確認された。LC3- のみではなく、LC3-I、LC3-II の両方が蓄積されたことからこれはオートファジーの進行とは言えない状態である(図 3)。

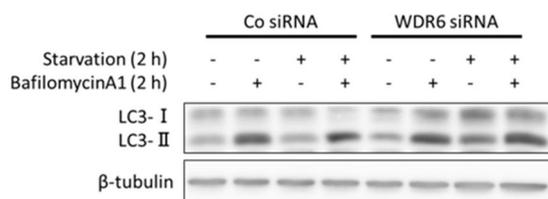


図3. WDR6のKDとフラックスアッセイ
Starvation: 飢餓培地で培養
BafilomycinA1:

そこで WDR6 がオートファジーにどのような影響を与えているのか解析するために、オートファジーの上流因子の中でも有名な mTORC1 の活性に注目した。mTORC1 は老化関連因子やがん関連因子としても知られており、我々の研究室では WDR6 シグナルに関わっていると予想していた。Co siRNA と WDR6 siRNA 導入 HeLa 細胞を飢餓培地で 2 時間処理した後、通常の培地で 30 分培養して栄養応答状況の解析を行った。その結果、Co siRNA 導入細胞と比較して WDR6 siRNA 導入 HeLa 細胞では飢餓状態における mTOR のリン酸化が減少し、不活性化状態にあることが示された。さらに上流から mTORC1 経路を負に制御している AMPK の活性化(リン酸化)に加え mTORC1 の直接的な下流である p70S6K の不活性化も確認された。飢餓処理後に 30 分の通常培地で培養する栄養応答解析においても Co siRNA 導入細胞に比較して WDR6 siRNA 導入細胞では p70S6K のリン酸化レベルが減少した。これは mTORC1 経路が WDR6 によって制御されていることを示している(図 4)。

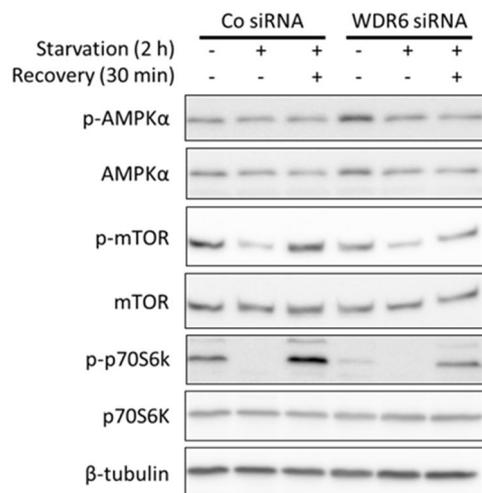


図4. WDR6とTORC1シグナル

最後に HeLa 細胞と HepG2 細胞に対して Co siRNA と WDR6 siRNA 遺伝子導入し、WDR6 と関連があると考えられる遺伝子発現の変化について qPCR 法で確認した。興味深いことに、HeLa 細胞において WDR6 の発現低下によって糖代謝、脂質代謝、そして腫瘍抑制因子の発現が有意に低下することが示された。そして HepG2 細胞では糖代謝、脂質代謝、そして DNA の修復に関わる遺伝子の発現が有意に上昇した。さらに脂質代謝、ミトコンドリア生合成、腫瘍抑制因子の遺伝子発現が有意に低下することが示された。

培養細胞を用いた解析結果から、WDR6 は mTORC1 活性とオートファジー制御に影響を与えると同時に、糖・脂質代謝に大きな影響を与えることが示唆された。興味深いことに、WDR6 の発現低下は mTORC1 の活性を抑制し、LC3 の発現を上昇させるが、必ずしもオートファジーの活性化を引き起こさない可能性が示唆された。

2019 年度はマウスを用いた解析を行った。野生型マウスから組織を摘出し、RNA を抽出し

て cDNA を合成した。この cDNA に対して qPCR 法を用い各組織における WDR6 の遺伝子発現レベルの解析を行った。その結果、脳、副腎、そして脂肪組織に強く発現していることが示された(図 5)。この結果に対し、培養細胞における WDR6 の発現低下によって脂質代謝遺伝子の発現が変化する点、マウスやラットの研究からカロリー制限(CR)において白色脂肪組織の脂質代謝が亢進する点、そして CR によって WDR6 の発現が低下するという関係性から WDR6 が脂質代謝に深く関わると予測した。そこで脂肪組織に注目し、白色脂肪組織における WDR6 の機能を解析するために網羅的な遺伝子発現解析を行うことにした。

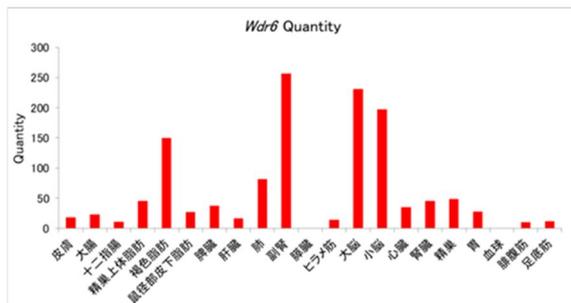


図5. 各組織におけるWDR6の発現

そこで野生型-自由摂食マウス(WT/AL マウス)群、野生型-カロリー制限マウス(WT/CR) 群、WDR6 KO 型-自由摂食マウス(KO/AL) 群、そして WDR6 KO 型-カロリー制限マウス(KO/CR)群の 4 群を準備した。これらのマウスから皮下脂肪由来の白色脂肪組織から RNA を抽出し二分した。この抽出した RNA を用いて RNA-seq を行った。RNA-seq の解析結果から、WT-AL と比較して WT-CR、KO-AL、そして KO-CR の 3 群では様々な遺伝子に発現変化が確認された。そしてそれらの遺伝子に対して qPCR を行い RNA-seq のデータに対する信頼性の確認を行った。RNA-seq と qPCR の結果について信頼性が高い遺伝子をピックアップした結果、脂質代謝関連遺伝子、糖・脂質代謝関連遺伝子、糖代謝関連遺伝子、栄養シグナル関連遺伝子、そして炎症関連遺伝子の 13 種の遺伝子発現が共通して変化していた(図 6)。これらの 13 種の遺伝子は WT-AL を基準として考えた場合において WT-CR、KO-AL、そして KO-CR の 3 群において同様の遺伝子発現変化を生じていることを示している。これらの結果から、カロリー制限による脂質代謝の向上、糖代謝の改善、そして抗炎症効果という健康効果は WDR6 を介して制御されている可能性を強く支持することを意味している。

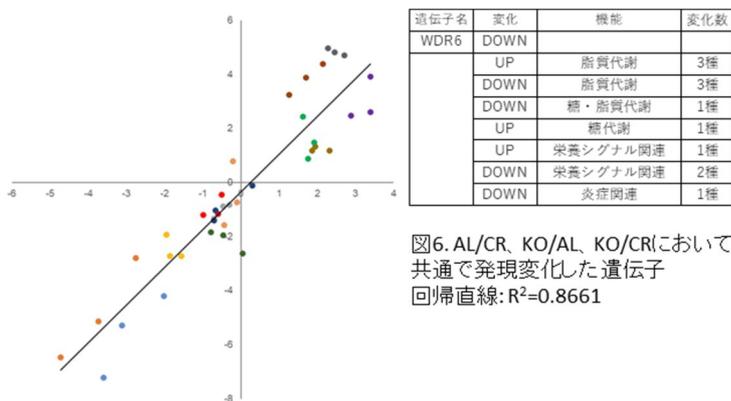


図6. AL/CR, KO/AL, KO/CRにおいて共通で発現変化した遺伝子
回帰直線: R²=0.8661

これらの結果から、WDR6 の遺伝子発現を負に制御することで食事制限をすることなく、カロリー制限と同様の健康増進効果を得られる可能性を示している。この研究を続けていくことで、今後の日本や世界が直面していくであろう高齢化社会やそれに伴う健康・医療問題に対する解決策の一助となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大畑佳久、王 梓、渡辺由香里、エン イチブン、小松利光、原 太一、下川 功、千葉卓哉
2. 発表標題 WD repeat containing protein 6はmTORC1を介した栄養センシングに関連している
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大畑佳久、王梓、渡辺由香里、エンイチブン、小松利光、原 太一、下川 功、千葉卓哉
2. 発表標題 インスリンシグナル関連分子WDR6はmTORC1経路を介してオートファジーの制御に関与する
3. 学会等名 第19回日本抗加齢医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大畑佳久、王梓、渡辺由香里、エンイチブン、小松利光、原 太一、下川 功、千葉卓哉
2. 発表標題 WD repeat-containing protein 6はmTORC1経路を介してオートファジー制御に関与する
3. 学会等名 第108回日本病理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大畑佳久、王梓、渡辺由香里、西園祥子、小松利光、下川功、千葉卓哉
2. 発表標題 新規インスリン関連分子WDR6がオートファジー経路に与える影響の解析
3. 学会等名 第18回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshihisa OHATA, ZI WANG, Yukari WATANABE, Shoko NISHIZONO, Toshimitsu KOMATSU, Isao SHIMOKAWA, Takuya CHIBA
2. 発表標題 WDR6 knock down affects LC3 expression in mammalian cell: possible involvement in the autophagy pathway
3. 学会等名 第41回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----