

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450500

研究課題名(和文) 転写因子DAF-16/FOXOによる寿命延長機構のin vivoにおける解明

研究課題名(英文) In vivo analysis of longevity mechanism of transcription factor DAF-16/FOXO

研究代表者

大徳 浩照 (DAITOKU, Hiroaki)

筑波大学・生命領域学際研究センター・講師

研究者番号：30361314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：線虫の転写因子DAF-16は様々な長命変異体において寿命延長に必須であることから、長寿遺伝子と考えられている。しかしながらそれらの研究成果は遺伝学的解析に基づくものであり、実際に長命変異体でDAF-16の転写活性が亢進しているかについては不明であった。本研究は、新たに線虫のin vivo luc systemを確立することで、寿命延長とDAF-16の転写活性との間に正の相関があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Since transcription factor DAF-16 is required for lifespan extension in various long-lived mutants of the nematode *C. elegans*, it has been considered as a longevity gene. However, these results are based on genetic analysis and it is unclear whether transcriptional activity of DAF-16 is actually increased in long-lived mutants. Here we established novel in vivo luc system in *C. elegans* and demonstrated that there is a positive correlation between lifespan extension and DAF-16 activity.

研究分野：分子生物学

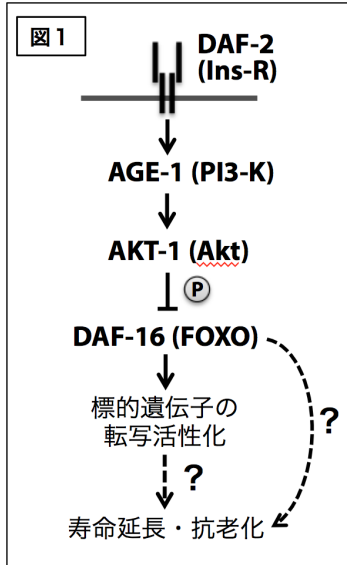
キーワード：転写因子

1. 研究開始当初の背景

かつて老化は「加齢に伴う不可逆的な自然崩壊現象」と捉えられ、発生や分化と異なり、その過程が遺伝子によって制御されるとは考えられていなかった。しかし 1993 年、多細胞モデル生物である線虫 (*C. elegans*) を用いた研究から、哺乳類のインスリン受容体のオルソログである *daf-2* 遺伝子の突然変異体が野生型の 2 倍以上の寿命を示すことが報告されると、その後もこのシグナル経路の構成因子が寿命調節に関わることが次々に解明された (*Nature*, 461-464, 1993)。さらに遺伝学的解析から、*daf-2* 経路の最下流に位置する転写因子 DAF-16 が、寿命の延長に必須であることが示された。一方で DAF-16 は、*daf-2* シグナル下流の AKT キナーゼによってリン酸化されて、その活性が抑制されることが知られていた。そのため *daf-2* 変異体でみられる寿命の延長は、DAF-16 の抑制の解除、すなわち活性亢進に起因すると考えられ、長寿遺伝子と予想される DAF-16 標的遺伝子の探索が世界中で行われてきた (図 1)。しかしながら、

これまでに同定された DAF-16 の新規標的遺伝子は、寿命への影響が小さいことなどから、DAF-16 と長寿を直接つなぐ答えには至っていないのが現状である。

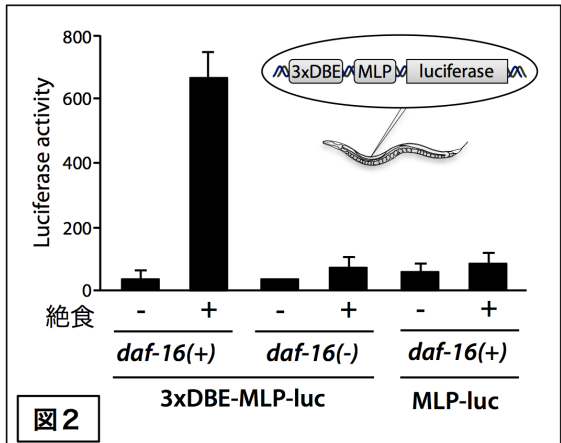
申請者は過去 10 年にわたり、DAF-16 の哺乳類オルソログである FOXO1 の転写制御機構を研究し、FOXO1 がリン酸化のみならずユビキチン化やアセチル化、メチル化など多様な翻訳後修飾によって多重的に制御されていることを明らかにしてきた。また線虫を用いた検証も行い、DAF-16 がアルギニンメチル化修飾を受けることで AKT リン酸化経路と拮抗し、寿命延長に寄与することを報告した。線虫において DAF-16 の活性を評価する場合、標的遺伝子の 1 つである活性酸素除去酵素 SOD-3 の mRNA の定量や、*sod-3* プロモーターに連結した GFP の発現量を蛍光で検出する方法がよく用いられる。しかしこれらの評価系は、*sod-3* のみに着目している点や、DAF-16 以外の転写因子の影響を排除できない点などの問題があった。また最近、*sod-3* が *daf-2* 変異体の長寿に必須ではないと報告されたことから、少なくとも寿命調節における DAF-16 の活性は、*sod-3* の転写量で判断す



べきではないと考えられる。すなわち現状では、DAF-16 の転写活性を *in vivo* で直接評価できる実験系は確立されていない。一方で培養細胞では、転写因子の活性を評価する方法として luciferase (*luc*) assay が一般的である。特に転写因子の結合配列と転写活性化最小単位であるコアプロモーターを *luc* 遺伝子に連結したモデルレポーターは、解析対象とする転写因子の活性が直接反映される上に、高感度で定量性も高い。そこで申請者は *luc* assay を線虫に導入して *in vivo* における DAF-16 の転写活性を正確に解析することで、DAF-16 による寿命延長機構の解明に近づけるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

申請者はすでに、DAF-16 の結合配列である DBE (DAF-16-Binding Element) をアデノウイルスの MLP (Major late promoter) 最小活性配列に連結した 3xDBE-MLP-*luc* を構築し、このトランスジェニック (Tg) 線虫において、DAF-16 の核移行を促進することが知られている飢餓条件下で、*luc* 活性が上昇することを見出している (図 2)。一方で、この線虫と *daf-16* 変異体との掛け合わせや 3xDBE 領域を欠失した MLP-*luc* 線虫では、飢餓に应答した *luc* 活性の上昇はみられなかった。以上の結果は、この実験系が *in vivo* における DAF-16 の転写活性を直接的に評価できることを示している。これを踏まえ、本研究期間内に以下の 3 点を明らかにする。



3. 研究の方法

(1) *daf-2* 長命変異体における DAF-16 の活性と寿命延長との相関の検証

daf-2 変異体では DAF-16 が核に局在することや DAF-16 標的遺伝子の発現が上昇していることから、転写活性化能が亢進していると考えられているが、実際に線虫個体内で内在性 DAF-16 の転写活性を測定する方法は存在しなかった。そこで上述した DBE-*luc* 線虫を *daf-2* 変異体と掛け合わせた系統を用いて

daf-2 シグナル制御下における DAF-16 活性調節機構を解明する。

(2) 様々な長寿シグナルにおける寿命調節転写因子の活性制御機構の解明

アミノ酸センサーとして知られる TOR シグナルも線虫の寿命延長に關与し、その下流では DAF-16 に加えて、転写因子である PHA-4 と SKN-1 の活性も必須であると報告されている。申請者はすでにそれぞれに対する luc レポーター Tg 線虫を樹立しており、これらを用いて転写活性化レベルを測定するとともに、寿命延長の唯一の方法とされるカロリー制限の本質の解明を試みる。

(3) *in vivo* における DAF-16 の翻訳後修飾の同定とその機能的意義の解析

申請者はこれまで培養細胞を用いて FOXO1 の多様な翻訳後修飾とその機能的意義を解明してきたが、個体レベルにおける重要性は検証できていない。そこで線虫を解析対象とし、まず様々な環境ストレス下における DAF-16 の翻訳後修飾を質量分析法によって同定し、修飾部位のアミノ酸を置換した *daf-16* 変異体線虫を作製することで、転写活性や寿命に与える影響を検証する。

4. 研究成果

本研究の主な成果は、以下の通りである。

(1) *daf-2* 長命変異体における DAF-16 の活性と寿命延長との相関の検証

DBE-luc 線虫と *daf-2* 変異体と掛け合わせた系統では、通常飼育下において野生型よりも高い luc 活性を示した。この時 luc 遺伝子の mRNA も顕著に上昇していた。

一方で熱ストレスや飢餓に対する DAF-16 の応答能は、*DBE-luc; daf-2* 変異体は野生型に比べて低下していた。

上記の *DBE-luc; daf-2* 変異体における luc 活性と DAF-16 の Akt 依存的なリン酸化との間に相関関係が認められた。

(2) 様々な長寿シグナルにおける寿命調節転写因子の活性制御機構の解明

飢餓応答に關わる TOR シグナル経路や AMPK 経路の構成因子を *DBE-luc* 線虫でノックダウンした結果、luc 活性の低下が認められた。

食餌制限によっても、*DBE-luc* 線虫で luc 活性の上昇が見られたが、食餌制限を模倣した *eat-2* との二重変異体では、有意な差は見られなかった。

(3) *in vivo* における DAF-16 の翻訳後修飾の

同定とその機能的意義の解析

個体における DAF-16 翻訳後修飾の生理的な意義を解析するため、FLAG タグを N 末端側に付加した DAF-16 を発現する Tg 線虫を樹立し、免疫沈降による精製方法を確立した。

質量分析装置を用いて、DAF-16 の翻訳後修飾を解析する技術を確立した。特にリン酸化に関しては、リン酸化ペプチドを特異的に濃縮するステップを加えることで、高感度に検出することが可能になった。現在、熱ストレス条件下における DAF-16 のリン酸化の変化を解析している。

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4件)

Hirota K, Shigekawa C, Araoi S, Sha L, Inagawa T, Kanou A, Kako K, Daitoku H, Fukamizu A.

Simultaneous ablation of *prmt-1* and *prmt-5* abolishes asymmetric and symmetric arginine dimethylations in *Caenorhabditis elegans*

J. Biochem., 査読有, 161, 2017, 521-527
DOI: 10.1093/jb/mvw101

Sha L, Daitoku H, Araoi S, Kaneko Y, Takahashi Y, Kako K, Fukamizu A.
Asymmetric arginine dimethylation modulates mitochondrial energy metabolism and homeostasis in *Caenorhabditis elegans*
Mol. Cell. Biol., 査読有, 37, 2017, e00504-e00516
DOI: 10.1128/MCB.00504-16

Daitoku H, Kaneko Y, Yoshimochi K, Matsumoto K, Araoi S, Sakamaki J, Takahashi Y, Fukamizu A.
Non-transcriptional function of FOXO1/DAF-16 contributes to translesion DNA synthesis
Mol. Cell. Biol., 査読有, 36, 2016, 2755-2766
DOI: 10.1128/MCB.00265-16

Kaneko Y, Daitoku H, Komeno C, Fukamizu A.
CTF18 interacts with replication protein A in response to replication stress
Mol. Med. Rep., 査読有, 14, 2016, 367-372
DOI: 10.3389/mmr.2016.5262

[学会発表](計5件)

大徳浩照, 小沼久里子, 平田優介, 新生翔, 深水昭吉, 線虫を用いた転写因子 FOXO1 の翻訳後修飾機構の *in vivo* 解析, Front

Runner of Future Diabetes Research 第 5
回研究発表会、2016 年 7 月 23 日、ホテル椿
山荘東京（東京都・文京区）

新生翔、大徳浩照、深水昭吉、ゲノム編
集技術を用いた転写因子 DAF-16 の寿命制御
機構の解明、冬の若手ワークショップ、2016
年 2 月 5 日、山中湖ホテル清溪（山梨県・山
中湖）

新生翔、大徳浩照、深水昭吉、線虫にお
ける CRISPR/cas9 ゲノム編集技術を用いた転
写因子 DAF-16 の転写活性化能欠失変異体の
樹立、BMB2015、2015 年 12 月 1 日、神戸国際
会議場（兵庫県・神戸市）

新生翔、大徳浩照、金子悠太、廣田恵子、
深水昭吉、長寿変異体における転写因子
DAF-16 の転写活性化能の評価、冬の若手ワ
ークショップ、2015 年 2 月 6 日、ホテル松本楼
（群馬県・渋川市）

米野千尋、新生翔、大徳浩照、金子悠太、
深水昭吉、長寿転写因子 DAF-16 の in vivo
における制御機構の解明、第 87 回日本生
化学会年会、2014 年 10 月 17 日、京都国際会館
（京都市・左京区）

〔その他〕

ホームページ等

<http://aki f2.tara.tsukuba.ac.jp>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大徳 浩照 (DAITOKU HIROAKI)

筑波大学・生命領域学際研究センター・講
師

研究者番号：3 0 3 6 1 3 1 4