

平成 30 年 7 月 3 日現在

機関番号：33705

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26430072

研究課題名(和文) アセチル化修飾によるmTORシグナルを介した神経老化制御の解明

研究課題名(英文) Regulation of neuronal ageing through the mTOR signaling by acetylation

研究代表者

安田 邦彦 (YASUDA, KUNIHICO)

東海学院大学・健康福祉学部・准教授(移行)

研究者番号：50278446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：カロリー制限や抗酸化作用が老化と密接な関係にあることからインスリンシグナル系の制御に着目し、その中心となるAkt/PKA(Aキナーゼ)の新規の活性制御機構について研究を行った。通常細胞内シグナル系はリン酸化修飾によってタンパク質の活性が制御されているが、本研究ではこれまでにない全く新規な制御因子として脱アセチル化酵素であるHDAC6とN-アセチル化酵素のサブユニットであるMdm20がmTORの活性を介してAktの活性を制御することを突き止めた。今回の成果は長らく不明であった細胞質におけるアセチル化修飾の働きを明らかにすると共に、アンチエイジング(抗老化作用)への寄与が期待できるものでもある。

研究成果の概要(英文)：Akt/PKA (A kinase) is one of key molecules in insulin signaling, functions in various critical steps in signal transduction for maintaining cellular homeostasis, leading to cell survival and /or longevity. The Akt activity regulates through the phosphorylation by PDK1, under the insulin signaling, and mTORC2/PDK2. Interestingly, in this research, we identified HDAC6 (histone deacetylase) and Mdm20 (an auxiliary subunit of NatB) as the novel regulators of Akt activity. Furthermore, we found that Mdm20 regulates the expression levels of Rictor, one of components of mTORC2 and HDAC6 regulates interaction with each components of mTORC1 and mTORC2. These acetyl-related molecules break through the concept of acetyl modification function in cytoplasm and simultaneously hold promise for the effect of anti-ageing through the regulation of Akt activity under the insulin signaling by in the future.

研究分野：生化学・分子生物学・細胞生物学

キーワード：神経老化 HDAC6 Mdm20 分子シャペロン オートファジー mTOR Akt アセチル化修飾

1. 研究開始当初の背景

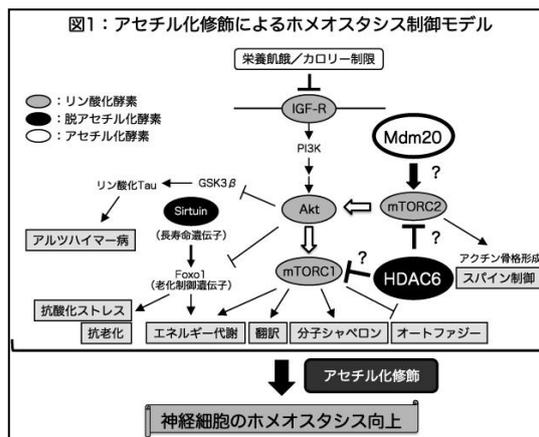
高齢化が進みアルツハイマー病など神経変性疾患を患う高齢者が増加しているが、その生理学的な根本原因は加齢に伴う神経細胞の全般的な機能低下及びホメオスタシスのバランスの崩壊である。したがって、いかに神経細胞機能を向上させるかが老化防止、さらには神経変性疾患予防への鍵となる。

(1) これまで酵母や線虫の研究からカロリー制限が寿命を延長させ抗老化作用を示すことが報告されている。その中心分子としてFOXOs 遺伝子 (抗酸化やエネルギー代謝系の遺伝子の転写活性化因子)、さらにFOXOsの活性を亢進させる Sirtuin (脱アセチル化酵素) が寿命制御遺伝子、老化制御遺伝子として同定され、老化生物学の主翼に位置づけられていた。一方で、mTOR シグナル系が老化現象と密接な関係があるという傍証が得られ始めた。mTORは2つの異なった複合体 mTORC1 と mTORC2 を形成するセリン/スレオニンキナーゼの一種で、各々細胞の成長と代謝制御を介して細胞内ホメオスタシス維持に作用し、老化との関係についても取り上げられている。mTORC1 は Raptor を含む複合体で、IGFR-PI3K-Akt の下流で活性化される。一方、mTORC2 は Rictor を含む複合体で、mTORC1 とは異なりその上流の活性制御機構については明らかになっていない。mTORC2 は mTORC1 の上流に位置する Akt をリン酸化活性化することで間接的に mTORC1 を活性化する。mTOR はタンパク質の合成・代謝及び分解、神経ストレス応答や細胞形態・運動など神経細胞のホメオスタシスを幅広く制御する中心システムを担うことが推察されるが、神経老化におけるこれらの制御機構及び寄与については明らかにされていない。

(2) 神経細胞のホメオスタシスのバランスを維持する機能の一つにタンパク質品質管理機構 (Protein Quality control: PQC) があげられる。老化や神経変性疾患ではPQCの機能低下により異常タンパク質が細胞内に蓄積し、神経変性を誘発する一因となる (Jellinger KA., J Neural Transm. (2009))。そのためPQCの機能向上は神経老化のみならず神経変性疾患の予防・発症遅延・治療へと繋がる可能性が高く、特に最近では多くの研究者が神経変性疾患に対するオートファジーを介したタンパク質分解に着目している。細胞質に存在する脱アセチル化酵素 HDAC6 は HSP90 の脱アセチル化を介したシャペロン活性制御や、微小管を介してポリユビキチン化タンパク質をプロテアソームやオートファゴソーム、アグリソームへ運搬するなど、PQCに積極的に関わる機能側面が注目されている (Knaevelsrud H et al., FEBS Lett. (2010))。ポリグルタミン (polyQ) 病の一つハンチントン舞踏病の原因タンパク質ハンチンチンは polyQ が伸長し、タンパク質凝集

物を形成する。興味深いことに申請者は HDAC6 阻害剤 (NCT10b) が polyQ によるタンパク質凝集形成を増加させる原因が IGF-PI3K-Akt-mTORC1 シグナル上の Akt のリン酸化レベルを増加させ、オートファジー誘導を抑制することを突き止め、HDAC6 の PQC における全く新しい制御機構の存在を明らかにした。

(3) 申請者は polyQ 凝集体に結合しプロテアソームでの分解を促進する因子で知られる AAA ファミリータンパク質、VCP/p97 をアセチル化する制御分子として、N-アセチル化酵素 (Nat)B の補助サブユニット、Mdm20 を同定している。非常に興味深いことは、Mdm20 も mTORC2 の活性を介して Akt のリン酸化レベルを変化させ、オートファジー誘導を抑制し、polyQ による凝集体形成を変化させることである (図1、Yasuda K et al., PLoS One (2013)、Yasuda K et al., J Neutrition Health & Aging. (2013)、Ohyama K et al., Gene Expr Patterns. (2012))。以上の結果は mTORC1 及び mTORC2 はアセチル化修飾により活性制御され、延いては神経老化制御の要の分子制御機構として機能している可能性を示唆するものである。



2. 研究の目的

神経細胞は老化に伴いホメオスタシスのバランスが崩れ、エネルギー生産低下や酸化ストレス脆弱性が増し、変性・脱落が起こりやすくなる。最近、mTOR シグナルが神経老化を多方面から制御する重要なシグナル経路に介入する可能性が出てきた。一方、申請者らは、独自の研究からヒストン脱アセチル化酵素 HDAC6 や N-アセチル化酵素の補助サブユニット Mdm20 が mTOR シグナルの統括的制御に重要な役割を果たすことを示唆する結果を得ている。本研究では、HDAC6 や Mdm20 によるアセチル化修飾が mTOR シグナルを介して神経細胞のホメオスタシスや神経老化の統括的な制御機構であることを明らかにし、将来的には老化予防・遅延だけでなく神経変性疾患の治療へ繋げる分子基盤を確立することを目指す。

(1) HDAC6 及び Mdm20 が mTORC1/mTORC2 のシグナルの制御を担う鍵となる分子であることを証明するために、両アセチル修飾関連分子の直接の標的分子を同定し、アセチル化修飾による詳細なシグナルカスケード及び制御機構を明らかにする。また図 1 に示すようにアセチル化修飾が mTORC1/mTORC2 シグナルを介してエネルギー代謝や PQC などを制御し、抗神経老化作用を発揮できるかについて検証し、HDAC6 及び Mdm20 が老化制御因子であることを確立する。

(2) 分子シャペロンは細胞内ホメオスタシスの要ともいべき防御機能であり、神経変性疾患の予防や治療においても注目されている。申請者は HDAC6 が mTOR 関連分子以外にも HSC70 シャペロン複合体と結合し、この複合体が HDAC6 の脱アセチル化活性に依存することを見出している。そこで HSP70 のアセチル化の有無及びシャペロン活性に対する効果を polyQ 発現若齢・老齢初代培養神経細胞を用いて HSPs の発現誘導や *in vivo* シャペロン活性について比較検討する。HSP70 はシャペロン介在性オートファジー (CMA) 誘導に必須なタンパク質であるが、その制御機構については未知の部分が多い。そこで HDAC6 が HSP70 の活性を制御することで CMA を制御する可能性についても検証する。また申請者は HSP70 のシャペロン活性を抑制し、脳に顕著に発現する HSP105 ノックアウト (K/O) マウスを自ら作成しており (Nakamura J et al., Stroke (2008))、HDAC6 と mTOR シグナルとの関与以外にも神経老化における分子シャペロンの機能について HSP105 遺伝子欠損老齢マウス及び初代培養海馬神経細胞を用いて解析を行うことで、神経細胞のホメオスタシスにおける CMA 及び PQC 機能について検証する。

3. 研究の方法

(1) Mdm20-ノックダウン細胞で mTORC2 のキー分子である Rictor の発現量が顕著に低下することから、Rictor の発現量低下が転写、翻訳、分解いずれの過程で影響を受けているのかを検証した。転写レベルについては定量的 PCR 法を用いて、タンパク質の安定性についてはプロテアーゼ阻害剤を用いて各関連因子の発現量の変化について調べた。

(2) 神経老化の過程において HDAC6 や Mdm20、mTORC1/mTORC2 関連分子及び下流の基質の発現量及び活性化状態の変化を長期培養系の初代培養海馬神経細胞と若齢から老齢マウスの各生体脳を用いて比較検討する。さらに神経老化に伴う HDAC6 や Mdm20 と mTOR 複合体との親和性を調べるため、Flag タグをつけた HDAC6 や Mdm20 (Flag-HDAC6, Flag-Mdm20) のレンチウイルスを作成する。作成後はこれ

らのウイルスを初代培養海馬神経細胞での発現チェックを行った後、マウスの生体脳に過剰発現させ、HDAC6 や Mdm20 と結合する因子群について免疫沈降法や組織学的手法を用いて検証する。

(3) 酸化ストレスからの神経保護は抗老化における重要課題の一つである。本研究では中でも mTORC2 の基質である Akt の下流で制御される FOXOs に着目した。なかでも FOXO1 は GADD45 α など抗酸化遺伝子の発現を制御する転写因子であり、Akt によりリン酸化され核外に移行することで転写活性が抑制される。そこで今回は足掛かり実験として HEK293 細胞を用いて FOXO1 のリン酸化状態、細胞内局在、レポーター遺伝子を用いた転写活性化能及びアポトーシス誘導による細胞死アッセイを行い、Mdm20 及び mTORC2 による FOXO1 に対する効果について検証した。

(4) mTORC2 の下流で PKC α を介したアクチン制御はシナプス形成に対するスパインの形態や数に影響を及ぼし、重大な神経機能である学習や記憶に直結する。そのため本研究では Mdm20 遺伝子破壊マウスを用いてスパイン形成に対する Mdm20 の効果について検証した。正常マウスと Mdm20 遺伝子破壊マウスの胎児の大脳皮質神経細胞を初代培養し、神経細胞の樹状突起に焦点を絞り観察を行った。

(5) HDAC6 と相互作用する因子の一つに HSP70 を同定したことから、HEK293 細胞を用いて HDAC6 の HSP70 に対する作用について検証を行った。HSP70 の基質として細胞内にタンパク質凝集を形成する GFP-polyQ を発現させた HEK293 細胞に HDAC6 や HSP70 を過剰発現させた場合と、HDAC6 に特異的な阻害剤を用いるなどして凝集形成能について検討した。さらに HDAC6 の HSP70 のシャペロン活性に対する効果について調べるために HSP70 の機能を制御する補因子や基質との親和性について検証した。

4. 研究成果

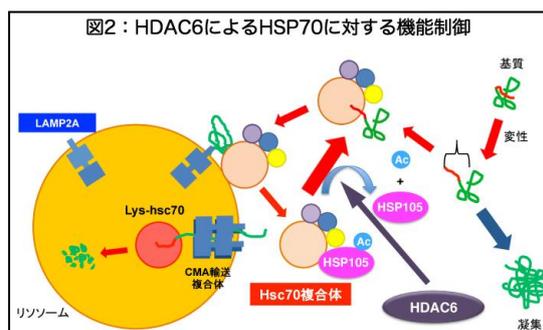
(1) Mdm20 の Rictor の発現制御について検証した結果、プロテアーゼ阻害剤によるタンパク質分解においては各関連分子の発現量は Mdm20 による影響は認められずタンパク質の安定性への関与はないと考えられた。またリアルタイム PCR 法で定量的に mRNA の発現量についても検証したが、各関連分子の mRNA 特にレベルでの発現量に変化は認められなかった。以上の結果から Mdm20 による Rictor の発現量への影響についてはタンパク質の翻訳レベルにおいて制御されている可能性が示唆された。

(2) 神経老化の過程における HDAC6 及び Mdm20、mTORC1/mTORC2 関連分子について検証するためにレンチウイルスでの発現系を確立させるための準備を行った。現時点では発現ベクターを構築した段階までで、今後ウイルスを作成し、初代培養海馬神経細胞やマウスの生体脳に過剰発現させ神経老化への影響について検証していく予定。

(3) Mdm20 及び mTORC2 による FOXO1 に対する影響を調べるために低血清刺激をした HEK293 細胞を用いたところ、FOXO1 はコントロール細胞では低血清刺激後はリン酸化レベルが減少し、その後インスリン刺激を加えると優位にリン酸化レベルが増加した。しかしながら、Mdm20 核内にノックダウン細胞ではインスリン刺激によるリン酸化の回復は認められず、Akt による FOXO1 に対するリン酸化活性は Mdm20 の依存的であることが明らかとなった。また細胞内局在においても FOXO1 は正常細胞では核内に局在したのに対し、Mdm20 ノックダウン細胞では FOXO1 は核内ではなく細胞質に局在していた。以上のことから Mdm20 は FOXO1 を介した酸化ストレス作用に関しても効果を持つことが示唆された。今後は酸化ストレス時の影響も加えてさらに詳細に検討していく予定。

(4) 正常マウスと Mdm20 遺伝子破壊マウスの胎児から単離した初代培養大脳皮質神経細胞の樹状突起について観察した結果、樹状突起の伸長過程については大きな変化は認められなかった。しかしながら、Mdm20 遺伝子破壊マウスの神経細胞では正常マウスに比べ樹状突起上にスパインが過剰に形成されていることが観察できた。その詳細なメカニズムについては今後も引き続き検討していく。また発生過程だけでなく若齢及び老齢のマウス脳での神経細胞の形態と神経のネットワーク構築を組織解剖的に検証すると共に成体マウスにおいては短期記憶、長期記憶についても検証していく予定。

(5) 細胞内でタンパク質凝集を形成する GFP-polyQ 発現 HEK293 細胞を用いて、HDAC6 と HSP70 によるタンパク質凝集体形成抑制効果について検証した。その結果、HDAC6 が HSP70 によるタンパク質凝集抑制効果を増強することを確認した。HSP70 は多くの補因子と結合しシャペロン活性が制御されているが、今回の検証で HDAC6 は HSP70 と結合する補因子の中でも HSP105 との親和性を低下させることを突き止めた。HSP105 は HSP70 のシャペロン活性を抑制するが、HDAC6 の作用により HSP105 と HSP70 の親和性が低下することで HSP70 が基質との親和性が増加することが明らかとなった (図2)。



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 1件)

- ① Kunihiko Yasuda, Mayumi Takahashi, Nozomu Mori, Mdm20 modulates actin remodeling through the mTORC2 pathway via its effect on rictor expression.、PLOS ONE、査読有、vol. 10、2015、e0142943、<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0142943>

[学会発表] (計 7件)

- ① 安田 邦彦、廣瀬 翔、斎藤 洋平、森 望、中山 祐治、HDAC6 による HSP105 との結合を介した HSP70 の機能制御、2107 年度生命科学系学会合同年次大会、2017. 12. 7、神戸ポートアイランド (兵庫県)
- ② 安田 邦彦、森 望、Mdm20 による mTORC2 シグナル制御機構、BMB2015、2015. 12. 3、神戸ポートアイランド (兵庫県)
- ③ 安田 邦彦、森 望、Mdm20 による mTORC2 を介した老化作用への効果について、第 38 回日本基礎老化学会大会、2015. 6. 13、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ④ Kunihiko Yasuda, Nozomu Mori, The poly-glutamine aggregates clearance by acetyl-modification molecules through the pAkt signaling.、Asian Aging 2015: International Symposium "Asian Aging Core for Longevity (AACL) 2006-2015, 10 years and Beyond"、2015. 3. 11、大阪大学中之島センター (大阪府)
- ⑤ Kunihiko Yasuda, Mdm20, a potential regulator or for neuronal proteostasis controls mTORC2 activity.、2015. 2. 6、長崎大学・ポンペ会館 (長崎県)
- ⑥ 安田 邦彦、森 望、初代培養海馬神経細胞における HDAC6 による mTOR を介したオートファジー誘導シグナル制御機構について、第 37 回日本分子生物学会年会、2014. 11. 26.、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑦ 安田 邦彦、森 望、N-アセチル化制御関連分子 Mdm20 による mTORC2 活性制御機構、第 87 回日本生化学会大会、2014. 10. 16.、国立京都国際会館 (京都府)

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 邦彦 (YASUDA, Kunihiko)
東海学院大学・健康福祉学部・
管理栄養学科・准教授
研究者番号：50278446

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

永田 和宏 (NAGATA, Kazuhiro)
京都産業大学・総合生命科学部
生命システム学科・客員教授
タンパク質動態研究所所長
研究者番号：50127114

大山 恭司 (OHYAMA, Kyoji)
東京医科大学・大学院医学研究科
准教授
研究者番号：00255423

(4) 研究協力者

中山 祐治 (NAKAYAMA, Yuji)
京都薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：10280918

齊藤 洋平 (SAITO, Yohei)
京都薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：90411032

森 望 (MORI, Nozomu)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：00130394