

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K11726

研究課題名(和文) アセチル化修飾によるmTORシグナルの陰陽制御機構と老化制御

研究課題名(英文) The regulation of mTOR signaling and aging by the Yin and Yang effect of acetyl modification

研究代表者

安田 邦彦 (Yasuda, Kunihiko)

帝京大学・公私立大学の部局等・教授

研究者番号：50278446

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)：生体内老化におけるタンパク質の品質管理に対するアセチル化修飾因子の関与について検証し、HDAC6がHSP105の脱アセチル化を介してHSP70との相互作用を低下させ、HSP70の変性タンパク質との親和性を上げることが明らかになった。一方でNatBのauxiliary subunitのMdm20の発現を抑制すると炎症性サイトカイン合成酵素であるlipoxigenaseの発現が抑制されることを見出し、細胞老化で問題視されている慢性炎症との関係性を示唆する結果を得た。以上のことはHDAC6及びMdm20は老化の中心因子mTORの活性制御に加え、様々な生体内老化反応に密接に関与することを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会において健康長寿実現社会を目指す上で、加齢に伴う生体内変化及びその制御機構を解明することは極めて重要な課題といえる。しかしながら、老化による生命反応は多岐に亘っていることからその全容解明は困難を強いられている。本研究では、老化シグナルの中心的な役割を担うmTORをアセチル化修飾因子により制御することに加え、生体内老化に関連する生命反応にもアセチル化修飾が密接に関与することを明らかにしたものである。以上のことは、アセチル化修飾が生体老化全体を統括する重要な翻訳後修飾でありコア因子として機能する可能性を示唆するものである。

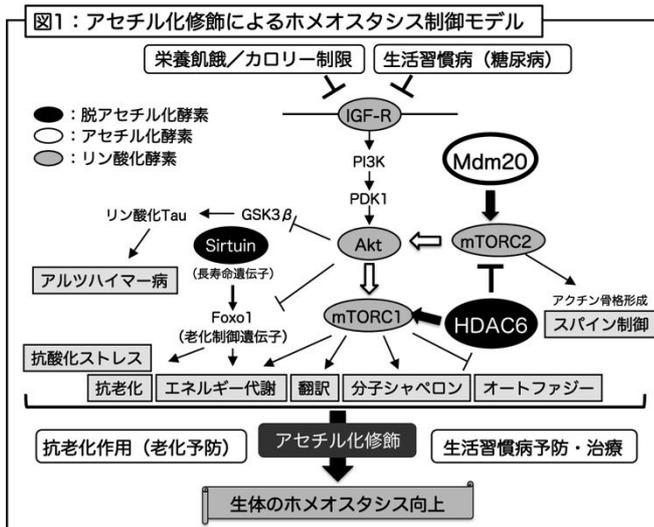
研究成果の概要(英文)：We investigated the involvement of acetylation modifiers in protein quality control during biological aging, and found that HDAC6 reduces the interaction with HSP70 and HSP105 through deacetylation of HSP105, thereby increasing the affinity of HSP70 for unfolded proteins. On the other hand, we found that the expression levels of lipoxigenase, an inflammatory cytokine synthesis enzyme were suppressed in Mdm20, auxiliary subunit of NatB, knock downed HEK293 cells, suggesting a relationship with chronic inflammation, which is considered a problem in cellular senescence. These results suggest that HDAC6 and Mdm20 are closely involved in various biological aging process, in addition to controlling the activity of mTOR, a central factor in aging.

研究分野：分子生物学

キーワード：mTOR アセチル化修飾 老化 HDAC6 Mdm20 シャペロン介在生オートファジー 炎症性サイトカイン HSP105

1. 研究開始当初の背景

我が国では少子高齢化が進み、高齢化に加え、糖尿病などの生活習慣病やアルツハイマー病が問題となっているが、その殆どは「老化」を起点とした日々の生活環境の変化や体内のホメオスタシスのバランスが崩れたことに起因している。そのため「健康長寿」を目指すには老化の分子メカニズムの解明が不可欠である。生体は老化に伴いエネルギー産生、代謝機能、タンパク質の品質管理機能 (**Protein Quality Control : PQC**) が低下し、さらにホメオスタシスのバランスが崩れると生活習慣病や老人性痴呆症、アルツハイマー病などの神経変性疾患を誘発する。老化の研究においては、「酸化ストレスの抑制」や「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おり、特にインスリンを起点とするシグナル系がその中心とされてきた。さらに、最近では老化シグナルの一つとして、**mTOR** シグナルが生体の代謝機能や **PQC** を介し老化を多方面から制御することで注目されているが、その活性制御機構については不明な部分が多い。**mTOR** はセリン/スレオニンキナーゼの1種で **Raptor** を含んだ **mTORC1** と **Rictor** を含んだ **mTORC2** の2つのリン酸化複合体を形成するが、互いの生体内機能だけでなく活性制御機構も大きく異なる。**mTORC1** はインスリンシグナル系の **Akt** の下流に位置するリン酸化酵素複合体でグルコースやアミノ酸飢餓時に **Akt** により活性化され、糖や脂質などのエネルギー代謝調節や翻訳開始因子を介した翻訳制御、熱ショック転写因子 (**HSF**) による分子シャペロン (**HSPs**) 遺伝子の転写活性化やオートファジー誘導を介した細胞内ホメオスタシスにも関与する。一方で、**mTORC2** に関してはインスリンシグナル系とは別に **Akt** をリン酸化する、**PKC** を介してアクチンのリモデリングを制御するなど **mTORC2** の下流に対する活性制御の報告はあるが、その上流の活性制御については殆ど明らかになっていなかった。しかしながら、我々はこのまでの研究で、**N**-アセチル化酵素 **NatB** の **auxiliary subunit** である **Mdm20** が **Rictor** の発現を制御することで **mTORC2** の活性を、さらにその下流にある **Akt** 及び **mTORC1** の活性に至るまで制御することを明らかにしており、**Mdm20** が **mTORC2** の上流の活性化制御因子であることを報告している (Ref.1, 2)。これはインスリンシグナル系に加え、**Mdm20** が **mTORC2** を介した新たな老化制御のキー分子であることを示唆している。さらに我々は、脱アセチル化酵素である **HDAC6** も **Akt** のリン酸化や **mTORC1** 及び **mTORC2** と相互作用することを見出しており (未発表)、以上の事象から **Mdm20** と **HDAC6** が逆相関の関係で **mTOR** シグナルを制御することが考えられる。本研究では、**Akt** や **mTOR** によるホメオスタシス維持を担う主たる制御機構の問いの答えとして、図1のようにアセチル化修飾関連酵素の関与を取り上げ、老化シグナル制御だけでなく生活習慣病や神経変性疾患の治療や予防への介入に至るまでの可能性を視野に入れている。



を介してアクチンのリモデリングを制御するなど **mTORC2** の下流に対する活性制御の報告はあるが、その上流の活性制御については殆ど明らかになっていなかった。しかしながら、我々はこのまでの研究で、**N**-アセチル化酵素 **NatB** の **auxiliary subunit** である **Mdm20** が **Rictor** の発現を制御することで **mTORC2** の活性を、さらにその下流にある **Akt** 及び **mTORC1** の活性に至るまで制御することを明らかにしており、**Mdm20** が **mTORC2** の上流の活性化制御因子であることを報告している (Ref.1, 2)。これはインスリンシグナル系に加え、**Mdm20** が **mTORC2** を介した新たな老化制御のキー分子であることを示唆している。さらに我々は、脱アセチル化酵素である **HDAC6** も **Akt** のリン酸化や **mTORC1** 及び **mTORC2** と相互作用することを見出しており (未発表)、以上の事象から **Mdm20** と **HDAC6** が逆相関の関係で **mTOR** シグナルを制御することが考えられる。本研究では、**Akt** や **mTOR** によるホメオスタシス維持を担う主たる制御機構の問いの答えとして、図1のようにアセチル化修飾関連酵素の関与を取り上げ、老化シグナル制御だけでなく生活習慣病や神経変性疾患の治療や予防への介入に至るまでの可能性を視野に入れている。

2. 研究の目的

Mdm20 及び **HDAC6** 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、これらアセチル化修飾分子の **mTOR** シグナル系における直接的な標的分子及び標的アミノ酸の同定、さらにアセチル化修飾が **mTORC1/mTORC2** シグナル系を介してエネルギー代謝や抗酸化ストレス作用、**PQC** (特に **HSP105** を介した **HSP70** の分子シャペロン活性及びシャペロン介在性オートファジー活性) を制御することで抗老化作用を發揮できるかについて検証する。一方で、**Mdm20** のパートナー分子である **Nat5** は本シグナル制御には関与しないことから、**Mdm20** の新規パートナー分子の同定を同定し、**mTORC2** の上流の制御機構の詳細な分子メカニズム解明の足掛かりを構築する。

(1) **Mdm20** はアセチル化活性を担う触媒サブユニットである **Nat5** と結合し、**NatB** として機能するが、**Nat5** による **mTORC2** 活性及び **Rictor** 発現制御に変化はみられなかった。そこで **Nat5** に代わる **Mdm20** と結合する新規アセチル化分子や相互作用する因子について同定し、**mTORC2** の上流の活性制御機構解明及び下流で影響を受ける老化現象への関与について検討する。

(2) **HDAC6** 及び **Mdm20** が **mTOR** シグナルを介した老化制御因子であることを証明するためには培養細胞レベルだけでなく、実際に生体モデルとしてマウスを用いて多角的に検証する必要がある。しかしながら、**Mdm20** 遺伝子破壊マウスは胎生致死のためか得ることができなかった。一方で **mTORC1** 及び **mTORC2** が精子形成の過程において精巣におけるセルトリ細胞と精子細胞の細胞接着能に対する拮抗作用を持つことが示されたことから (Ref.3) **Mdm20** の発現をノックアウトすることで正常な精子が形成されない可能性が考えられる。そこでまずは **mTOR** 及び **Mdm20** の精巣における発現パターンを検証し、**Mdm20** 及び **mTOR** の精子形成への影響について検討する。

(3) 我々はすでに **HDAC6** が **mTOR** 関連分子以外にも **HSC70** シャペロン複合体 (**HSP70/HSP40/HSP105**) と結合し、**HDAC6** の脱アセチル化活性により **HDAC6** と **HSP70** の複合体形成が抑制されることを見出している。一方で、**HSP105** は **HSP70** と結合し、シャペロン活性を抑制することも報告している。本研究では **HDAC6** が脱アセチル化活性を介して **HSP70** 及び **HSP105** の機能を制御するのか、さらに各分子のアセチル化修飾の有無及びアセチル化部位の同定を試みる。また **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 **HSP105** 及び **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討する。

3. 研究の方法

今回研究を開始するにあたり、世界的な新型コロナウイルスによるパンデミックや所属機関の異動により当初の研究計画の変更を余儀なくされた。以下については実際に今回行った研究方法と研究結果について記述することにする。

(1) RNASeq による遺伝子発現パターン解析

HEK293 細胞に **Mdm20** の siRNA を遺伝子導入した後、全 RNA を回収し、回収サンプルをマクロジェン社に受託依頼することで RNASeq を行い、発現量が増減する遺伝子群について解析を行った。発現量に変化が認められた遺伝子については **Mdm20** ノックダウン細胞を用いてリアルタイム PCR 法にて実際の発現量の変化を確認した。

(2) 精巣における発現パターンの確認について

51 日齢 (寿命は 2 年) の **C57BL/6** マウスの精巣からホルマリン固定パラフィン包埋切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色、**Anti-mTOR** 抗体あるいは **Anti-Mdm20** 抗体で免疫組織染色し **Fast-Red** で可視化した。

(3) HDAC6 によるシャペロン介在性オートファジーに対する活性制御への関与について

HEK293 細胞を用いて、**HDAC6**、**HSP70** 及び **HSP105** のそれぞれに対する相互作用について過剰発現ベクターを遺伝子導入し、免疫沈降法により検証を行った。また脱アセチル化活性についてはアセチル化リジン抗体を用い **HDAC6** の効果及びアセチル化部位の同定を行った。一方で、**HSP105** の 69 番目のリジンをアラニンに変えた変異体を用いて **HSP105** と **HDAC6** との関係性についても同時に検証を行った。

4. 研究成果

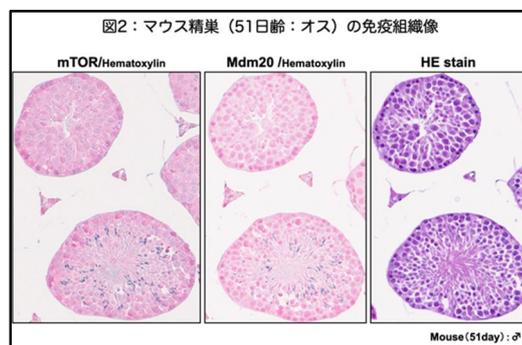
(1) RNASeq による遺伝子発現パターン解析

今回発現量が増加または低下した遺伝子群を検索した結果、アラキドン酸カスケードの上流に位置する **lipoygenase** 及び **phospholipaseA2** の発現量が低下しており、炎症性サイトカインの合成経路が影響を受けていることが示唆された。その後 **Mdm20** の発現を抑制した **HEK293** 細胞を用いてリアルタイム PCR 法により実際の細胞内でこれらの発現量が低下しているか確認したが、元々の発現量が少ないためか検出することができなかった。今後は炎症性サイトカインを高発現している細胞を用いるか、**LPS** 刺激など炎症を誘発する刺激を加えるなどした場合について検証を行う必要がある。

また、今回の結果からは **Nat5** に代わるパートナー分子となりうるような遺伝子については得られなかった。今後は免疫沈降法で **Mdm20** と共沈する分子についてプロテオーム解析を実施するなど、異なる実験系も並行しながら新規パートナー分子を探索する。

(2) 精巣における発現パターンの確認について

精子形成は、精細管の基底膜にある精原細胞が自己複製を繰り返す中、一部が精母細胞へと分化し、内腔に向かいながら減数分裂を2回繰り返すことで精子となる。**C57BL/6** マウスの精巣を用いて **mTOR** および **Mdm20** の発現部位を観察したところ、**mTOR** は主に基底膜周辺の精原細胞で高発現していた。すなわち **mTOR** は精原細胞の自己複製に関与すると考えられた。一方、**Mdm20** は精原細胞だけでなく、分化し内腔に移動した精母細胞および円形精子細胞においても発現が認められた。すなわち、**Mdm20** は精原細胞の維持と分化に関与すると考えられ、**mTOR** とは異なる経路・機序で精子形成を制御していることが推察された。



(3) HDAC6 によるシャペロン介在性オートファジーに対する活性制御への関与について

これまでの研究において **HDAC6** が **HSP70** 及び **HSP105** のそれぞれと相互作用することを明らかにしており、本研究では本システムにおける **HDAC6** の標的分子の絞り込みについて検証を行った。その結果、**HDAC6** 阻害剤で処理した場合、**HSP105** と **HSP70** との結合性が優位に低下することが明らかとなった。我々はすでに **HSP70** は **HDAC6** の基質でないことを確認しており、次に **HDAC6** の標的分子が **HSP105** である可能性について検証を行った。**HSP105** の 69 番目のリジンをアラニンに変更した変異体 (**HSP105K69A**) では **HSP70** のシャペロン活性が低下することを報告しており (Ref.4, 5)、今回 **HSP105K69A** では正常な **HSP105** に比べ **HSP70** との結合性も低下することを確認した。この結果は **HSP105** の 69 番目のリジンが **HDAC6** の脱アセチル化の標的部位である可能性が高いことを示唆していた。そこで **HDAC6** 阻害剤存在下で **HSP105** のアセチル化についてアセチル化リジン抗体で調べたが、**HSP105** がアセチル化されることは確認できたのに対し、**HDAC6** 阻害剤の有無による変化は認められなかった。**HSP70** をはじめ殆どの分子シャペロンは多くの **co-chaperone** と複合体を形成することから、**HSP105** 以外の分子が **HDAC6** の標的分子となっている可能性も考えられ、今後は他の **co-chaperone** との関係性についても調べる必要がある。一方で **HSP105** がアセチル化されることは確認できたことから、**HSP105** のアセチル化に関わるアセチル化修飾分子やアセチル化部位の同定、さらにアセチル化による **HSP105** の機能への影響についても検討していく予定である。

<引用文献>

1. **Mdm20 stimulates polyQ aggregation via inhibiting autophagy through pAkt^{Ser473} reduction.** Kunihiko Yasuda, Kyoji Ohyama, Kazuko Onga, Akira Kakizuka and Nozomu Mori: *PLoS One*, 8 (12): e82523, 2013
2. **Mdm20 Modulates Actin Remodeling through the mTORC2 Pathway via Its Effect on Rictor Expression.** Kunihiko Yasuda, Mayumi Takahashi and Nozomu Mori: *PLoS One* 10 (11): e0142943, 2015
3. **Regulation of Blood-Testis Barrier (BTB) Dynamics during Spermatogenesis via the “Yin” and “Yang” Effects of Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) and mTORC2.** Ka Wai Mok, Dolores D. Mruk and C. Yan Cheng: *Int Rev Cell Mol Biol* 301: 291-358, 2013
4. **Targeted Hsp110/105 Gene Knockout Decreases Infarct Volume After Focal Cerebral Ischemia in Mice.** Junji Nakamura, Motoaki Fujimoto, Kunihiko Yasuda, Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira, Takumi Hatayama, Yasushi Takagi, Kazuhiko Nozaki, Nobuko Hosokawa, and Kazuhiro Nagata: *Stroke* 39 (10): 2853-2859, 2008

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安田 邦彦
2. 発表標題 アセチル化修飾によるmTORを介した老化シグナル制御
3. 学会等名 第2回帝京大学研究交流シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安田 邦彦
2. 発表標題 アセチル化修飾による老化シグナルの統括的制御機構の構築
3. 学会等名 第3回帝京大学研究交流シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安田 邦彦
2. 発表標題 生体レジリエンスにおける老化統括制御分子の包括的解析
3. 学会等名 第6回帝京大学研究交流シンポジウム
4. 発表年 2023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
研究分担者	大山 恭司 (Ohyama Kyoji) (00255423)	東京医科大学・医学部・准教授 (32645)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------