

平成22年 5月25日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20780237

研究課題名 (和文) 転写因子 FOXO1 の翻訳後修飾と寿命決定メカニズムの解明

研究課題名 (英文) Analysis for regulation of transcription factor FOXO1 by post-translational modification and mechanism of determination of lifespan

研究代表者

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

研究成果の概要 (和文)：

転写因子 FOXO1 は酸化ストレスに応答して活性化し、標的遺伝子である活性酸素除去酵素の発現を促進する。またモデル生物を用いた研究から、FOXO1 が寿命の延長に必須な遺伝子であることが示されている。本研究で我々は FOXO1 の活性調節にタンパク質翻訳後修飾が重要な役割をしていることを明らかにした。さらに線虫の遺伝学的解析により、実際に FOXO1 のアルギニンメチル化制御が寿命の調節に深く関与することを解明した。

研究成果の概要 (英文)：

In response to oxidative stress, the Forkhead transcription factor FOXO1 is activated and thereby promotes the expression of anti-oxidant genes. Moreover, FOXO has been shown to act as lifespan modulator in model organisms. Here we have demonstrated that post-translational modification plays an important role in regulation of FOXO1 function. Furthermore, by using genetic experiments in *C. elegans*, we have revealed that arginine methylation of FOXO1 is involved in the regulation of lifespan.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：転写制御・翻訳後修飾・寿命・酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

FOXO1 は多細胞生物において高度に保存されたフォークヘッド型の転写因子ファミリーのひとつであり、インスリンシグナル依存

的に Akt キナーゼによってリン酸化されて核外に移行することで、転写活性が抑制されることが知られている。FOXO1 は哺乳動物において細胞周期や酸化ストレス応答、アポトー

シス、血糖値の維持などの多彩な生理機能に関わることが報告されている一方、線虫をモデルとした遺伝学的解析から、FOXO1 の線虫オルソログである DAF-16 とその上流のインスリンシグナルが寿命決定の主要な経路であることが示されている。これまで申請者らは FOXO1 の新たな分子制御機構の解明に取り組み、(1)リン酸化された FOXO1 がユビキチン化されて分解されること (PNAS 100, 11285-11290, 2003) (2)核内において転写コアクチベーターCBP/p300 によってアセチル化され、NAD<sup>+</sup>依存的に Sir2/SIRT1 による脱アセチル化制御を受けること (PNAS 101, 10042-10047, 2004) (3)アセチル化された FOXO は Akt によるリン酸化を受けやすくなること (PNAS 102, 11278-11283, 2005) を報告し、現在 FOXO1 をモデルとした「転写因子の多重修飾制御」という概念を提唱している。

## 2. 研究の目的

本研究は、転写因子 FOXO1 の新規翻訳後修飾による転写調節メカニズムを分子レベルで解明するとともに、我々がこれまでに明らかにした FOXO1 の多重修飾制御機構の個体レベルにおける役割を線虫の逆遺伝学的手法を駆使して検証することにより、種を超えて保存された寿命決定メカニズムの解明を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、我々が最近発見した FOXO1 の新規翻訳後修飾であるアルギニンメチル化と ADP-リボシル化について、その制御メカニズムを生化学的手法により解析する。具体的にはまずそれぞれの修飾部位を同定し、修飾を特異的に認識する抗体を作製するとともに、これらの修飾を誘導する仕組み (ストレス応答など) や修飾の結果引き起こされる FOXO1 の機能変化 (転写活性, 局在, 安定性など) について分子・細胞レベルで検討する。

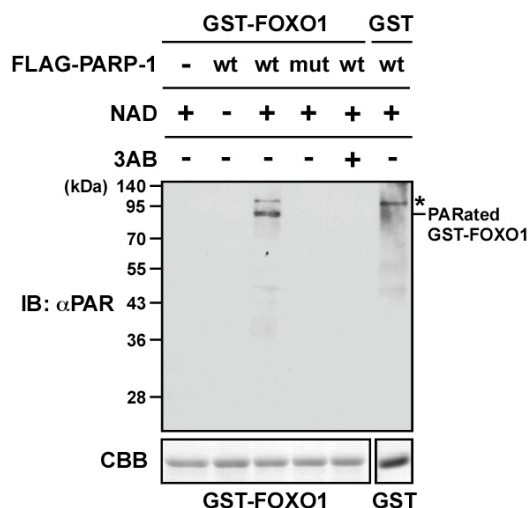
次に線虫をモデルとした逆遺伝学的手法を駆使して、寿命決定メカニズムにおける FOXO1 多重修飾制御機構の意義を検証する。具体的にはまず線虫の FOXO1 オルソログである DAF-16 の欠損変異体に対し、野生型および修飾部位変異型 FOXO1 の遺伝子導入によるレスキュー実験を行う。DAF-16 は線虫の寿命決定遺伝子のひとつであり、その活性は平均寿命と強く相関することから、各変異体の表現型は寿命の計測により定量的に評価できる。さらに *in vitro* において FOXO1 の転写活性を調節することが証明されている転写共役因子についても、遺伝子導入や RNAi 法

によってその生理的意義を検証する。

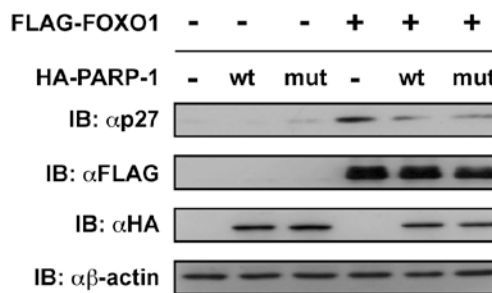
## 4. 研究成果

### (1) FOXO1 の ADP-リボシル化修飾制御機構

我々は、PARP-1 が FOXO1 に直接結合し、ポリ (ADP-リボシル) 化することを明らかにした。



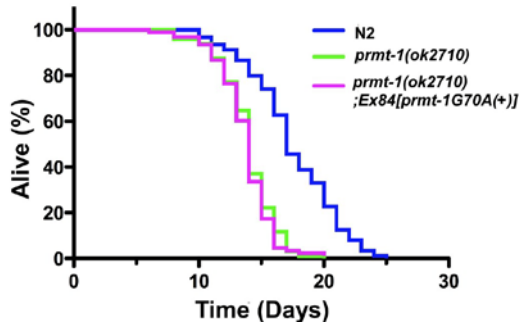
一方で、PARP-1 は FOXO1 標的遺伝子のプロモーター上で FOXO1 に結合することで、酵素活性非依存的に FOXO1 の転写活性化能を抑制した。その結果、FOXO1 の標的遺伝子で細胞周期の停止を誘導する p27/kip1 の発現が低下し、細胞増殖が亢進することを示した。



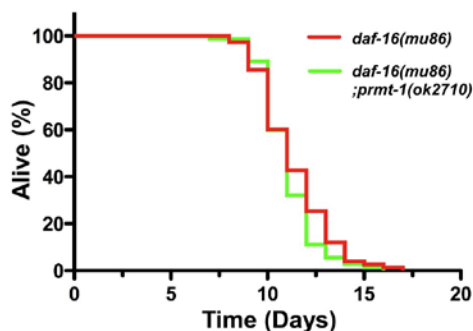
FOXO1 の機能はこれまで主に Akt によるリン酸化修飾で抑制されることが知られていたが、我々は新たに PARP-1 による抑制機構を明らかにし、これが細胞増殖に重要な役割を果たすことを明らかにした。また FOXO1 の新規翻訳後修飾としてポリ (ADP-リボシル) 化を見だし、FOXO1 の機能調節にポリ (ADP-リボシル) 化が関与する可能性を示唆した。

## (2) 線虫の寿命制御における FOXO1 の役割

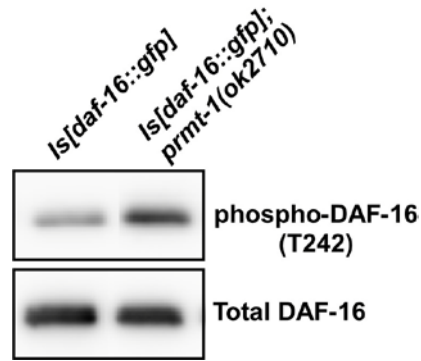
本研究において、我々は線虫 *C. elegans* を用いた遺伝学的な解析により、PRMT1 のオルソログである RMT-1 が線虫の寿命を制御することを見いだした。*prmt-1* 欠損変異体は野生型に比べ、寿命の短縮が見られ、その表現型は野生型 *prmt-1* の導入によりレスキューされたのに対し、酵素活性変異体 *prmt-1* ではレスキューされなかった。



*C. elegans* においては、転写因子 DAF-16 とそれを負に制御するインスリン/インスリン様成長因子シグナル経路が寿命を制御することが知られており、DAF-16 の活性化が寿命の延長をもたらすと考えられている。我々は、PRMT-1 の寿命制御機構は DAF-16 を介していると考え、*prmt-1*;*daf-16* 二重欠損変異体の寿命を測定した。その結果、二重欠損変異体の寿命は、*prmt-1* 変異体と同程度であり、*prmt-1* 欠損による寿命の短縮は DAF-16 を介していることが示された。



さらに、生化学的な解析により、PRMT-1 が DAF-16 をメチル化すること、そのメチル化が IIS 経路下流の AKT による DAF-16 のリン酸化を阻害することを見いだした。



これらの結果は、PRMT-1 が DAF-16 の活性化を介し寿命を制御するという仮説を支持するものであった。本研究はアルギニンメチル化の生理機能のひとつに寿命の調節があることを示す *in vivo* の新しい知見であると考えられる。

## 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 3 件)

1. Sakamaki, J., 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

2. Ito, Y., Daitoku, H. and Fukamizu, A. Foxo1 increases pro-inflammatory gene expression by inducing C/EBP  $\beta$  in TNF- $\alpha$ -treated adipocytes

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378, 290-295 (2008) 査読有

3. 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

〔学会発表〕（計4件）

1. Daitoku H, Yamagata K, Takahashi Y, Sakamaki JI, and Fukamizu A.  
Crosstalk regulation of arginine methylation and Akt-induced phosphorylation  
第82回 日本生化学会大会シンポジウム  
2009年10月21日 神戸
2. Daitoku H, Yoshimochi K, and Fukamizu A.  
DNA damage control by FOXO1 in response to UV irradiation  
第24回内藤コンファレンス「細胞核ダイナミクスとRNA [II]」  
2009年6月25日 札幌
3. 大徳浩照  
アルギニンメチル化による転写因子FOXO1の機能制御機構  
日本生化学会関東支部例会  
2009年6月20日 つくば
4. Daitoku H, Yamagata K, and Fukamizu A.  
Regulation of Foxo family by arginine methylation in response to oxidative stress  
Biochemistry and Molecular Biology (BMB2008) シンポジウム  
2008年12月12日 神戸

〔図書〕（計1件）

1. 大徳 浩照, 深水 昭吉  
メディカルビュー社  
FOXOとアンチエイジング医学  
アンチエイジング医学の基礎と臨床 改訂2版, 2008年 p40-42 (共著)

〔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

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