

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月27日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22688029

研究課題名（和文） 寿命制御における転写因子 FOXO1 の DNA 損傷応答機構の解明

研究課題名（英文） Functional analysis of DNA damage response of transcription factor FOXO1 in lifespan regulation

研究代表者

大徳 浩照 (DAITOKU HIROAKI)

筑波大学・生命環境系・講師

研究者番号：30361314

研究成果の概要（和文）：転写因子 FOXO1 は寿命延長や抗老化に関与することが知られているが、その分子機構は不明である。本研究で我々は FOXO1 が紫外線に対する DNA 保護機構のひとつである損傷乗り越え DNA 複製に寄与することを見出した。さらに線虫を用いた解析の結果、この機能は発生段階の紫外線耐性に重要な役割を持つことが明らかとなった。本研究成果は FOXO1 の抗老化メカニズムの解明につながるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Transcription factor FOXO1 is known to be involved in lifespan extension and anti-aging; however, the molecular mechanism remains unclear. In this study, we found that FOXO1 contributes to translesion DNA synthesis, which serves as the DNA damage response against ultra violet (UV) irradiation. Furthermore, genetic analysis using *C. elegans* showed that FOXO1/DAF-16 plays a crucial role in UV resistance during larval development. Our finding will help to elucidate the anti-aging mechanism of FOXO1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
2011年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2012年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
年度			
年度			
総計	20,600,000	6,180,000	26,780,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：応用分子細胞生物学

キーワード：老化, 転写因子, 紫外線, DNA 損傷修復

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転写因子であり、糖代謝や細胞周期調節、アポトーシス誘導、酸化ストレス耐性、幹細胞能の維持など多彩な生理機能に関与することが知られている。またモデル生物である線虫の遺伝学的解析から、FOXO1 オルソログの DAF-16 が寿命の延長に寄与することが示されている。すなわち、

daf-2（インスリン受容体オルソログ）変異体を示す「長寿」という表現型が、*daf-16* との二重変異体で完全に消失することから、転写因子である DAF-16 は寿命の延長に関わる遺伝子の発現を活性化すること、一方で DAF-2 シグナルは DAF-16 の活性を負に制御することが示唆されていた。その後、哺乳類細胞を用いた生化学的解析から、インスリンシグナルが Akt キナーゼ依存的なリン酸化を介して FOXO1 の転写活性を抑制していることが明

らかになると、寿命調節メカニズム解明の突破口として、長寿遺伝子と予想される DAF-16/FOXO1 標的遺伝子の探索が世界中で始まった。これまでに線虫の *daf-2* 長寿変異体を用いたマイクロアレイや結合配列データベース解析、ChIP-on-Chip、トランスクリプトームなどが報告されており、DAF-16 の新規標的遺伝子が多数同定されてきたが、各々の結果が必ずしも重複しないこと、また候補遺伝子の変異体で期待したほど寿命に変化が見られないことから、DAF-16 と長寿をつなぐ答えは未だ見出されていない。さらに最近、DAF-16 標的遺伝子の中でも最も重要な長寿遺伝子と考えられていた活性酸素除去酵素遺伝子 *sod-3* が、*daf-2* 変異体の長寿形質と無関係であることが遺伝学的に示されたことで、寿命制御メカニズム解明に向けた FOXO1 研究は再び振り出しに戻った。

一方で我々は、これまで FOXO1 の翻訳後修飾による転写制御機構の研究を進めてきたが、タンパク質複合体精製法を用いて新規 FOXO1 結合タンパク質を探索していた過程で、意外なことに複数の DNA 損傷修復因子を同定した。この結果は、転写因子である FOXO1 が DNA 損傷応答機構の構成因子として機能する可能性を示唆していた。

2. 研究の目的

我々は、学術的背景や自らの実験結果から、DAF-16/FOXO1 を介した寿命延長・抗老化現象は、標的遺伝子の転写活性化ではなく、DNA 損傷応答・修復機構における DAF-16/FOXO1 の直接的な新規機能が重要ではないかという着想に至った。

そこで本研究では第一に、FOXO1 がどのような DNA 損傷応答経路に関与するのかを明らかにし、さらにその活性に必要な FOXO1 の機能 (DNA 結合能、タンパク質結合能、修飾酵素リクルート能など) を特定する。そして第二に、転写活性と独立した FOXO1 の DNA 損傷応答機能が、線虫 *daf-2* 長寿変異体における *daf-16* 依存性にどのような意義をもつか検証するために、*daf-2/daf-16* 二重変異体や RNAi 法、トランスジェニック技術を組み合わせた遺伝学的解析を行う。

3. 研究の方法

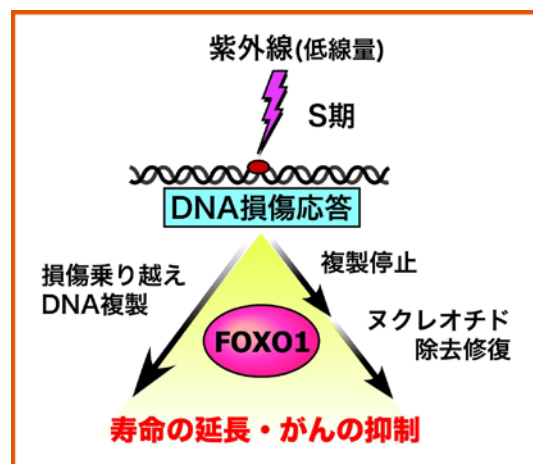
本研究は、以下の2点に焦点を絞って解析を行う。

(1) DNA 損傷応答機構における FOXO1 の役割と分子メカニズムの解明

主に培養細胞を用いた生化学的・分子生物学的手法により、FOXO1 が関与する DNA 損傷経路の特定と、その経路における FOXO1 の機能を解明する。その際、FOXO1 に結合する DNA 損傷応答因子の同定を解析の足がかりとする。

(2) DAF-16 の DNA 損傷応答機能と寿命延長・抗老化との関連性の検証

寿命測定および抗老化活性の評価は、線虫の変異体や RNAi ノックダウン、およびトランスジェニック技術を組み合わせた遺伝学を中心に進める。また体細胞分裂が盛んな幼虫期と、体細胞分裂が停止した成虫期の双方で DNA 損傷耐性を調べることで、様々な DNA 損傷応答経路に適応した評価系を確立する。



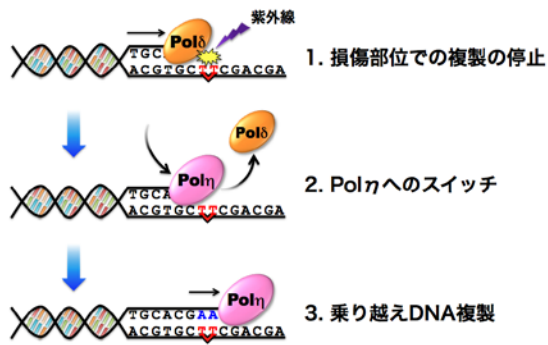
4. 研究成果

本研究の主な成果は、以下の通りである。

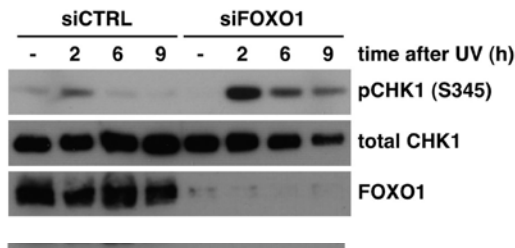
(1) DNA 損傷応答機構における FOXO1 の役割と分子メカニズムの解明

① FOXO1 ノックダウン細胞に、様々な DNA 損傷刺激を与えたところ、紫外線照射においてのみ感受性の亢進が認められた。またこの現象は同じ FOXO ファミリーである FOXO3a のノックダウン細胞ではみられなかった。

② 紫外線に対する DNA 損傷応答機構として、ヌクレオチド除去修復 (NER) と損傷乗り越え複製 (TLS) の2つが存在する。FOXO1 がどちらに関与するか検証するため、チミンダイマーの検出や各細胞周期の紫外線感受性を調べたところ、FOXO1 は TLS (次ページ図) に関与することが示唆された。



③ FOXO1 が TLS に関与するならば、FOXO1 ノックダウン細胞で紫外線照射後に ATR-Chk1 シグナル経路が亢進することが予測される。これを検証した結果、実際に ATR 活性化の指標である Chk1 の Ser-345 のリン酸化の亢進が認められた（下図）。



④ 細胞において TLS 活性を評価する方法として、TLS の責任酵素である DNA ポリメラーゼ η (*pol η*) の核内 foci 形成やクランプタンパク質である PCNA のユビキチン化がある。FOXO1 ノックダウン細胞でこれらを検証したところ、有意な変化はみられなかったことから、FOXO1 は TLS の他のプロセスに関与している可能性を示唆された。

⑤ FOXO1 と TLS 関連因子の相互作用を調べたところ、1 本鎖 DNA 結合タンパク質である RPA1 との結合が見いだされた。またこの結合がフォークヘッドドメインを介すること、FOXO3a は RPA1 と結合しないことが明らかになった。

⑥ FOXO1 は通常の培養下においては細胞質に局在するが、紫外線照射後 30 分程度で FOXO1 が核に移行することを見出した。また FOXO1 ノックダウン細胞では、RPA と TLS 補助因子である CTF18 の紫外線依存的な結合が抑制されることが明らかになった。

(2) DAF-16 の DNA 損傷応答機能と寿命延長・抗老化との関連性の検証

① 線虫は孵化後 4 段階の幼虫期を経て成虫となり、この間の活発な細胞分裂 (DNA 複製) 時に紫外線を照射することで、TLS を評価することができる。解析の結果、*daf-16* 変異体は *pol η* 変異体と同様に成長が遅延することを明らかにした。

② 野生型、*daf-16* 変異体、および *pol η* 変異体を用いて、成虫期の紫外線耐性を検証した結果、全てにおいて有意な耐性の差は見られなかった。一方、NER の責任遺伝子である *xpa-1* の変異体では、顕著な紫外線感受性が認められた。

③ *daf-2* 変異体において上記の 2 つの実験を行ったところ、共に野生型と差がなかったことから、DAF-16 の Akt によるリン酸化制御は紫外線耐性には関与しないことが示唆された。

④ *daf-16* 変異体に野生型 *daf-16*、および転写活性を欠失した *daf-16ΔAD* を発現させたトランスジェニックレスキュー系統を樹立し、幼虫期の紫外線感受性を調べたところ、野生型のみならず、*daf-16ΔAD* でも同様に成長の遅延がレスキューされた。この結果は、DAF-16 の TLS 活性に転写活性化能が必要でないことを示している。

⑤ 上記のトランスジェニック線虫を用いて、寿命を測定した結果、*daf-16ΔAD* では寿命はレスキューできないことが明らかになった。この結果は、DAF-16 の寿命延長活性に転写活性化能が必要であることを示している。

以上の結果は、転写因子である FOXO1 が培養細胞のみならず、線虫個体においても損傷乗り越え DNA 複製に寄与することを示している。紫外線が老化の一因であることを考えると、本研究成果は FOXO1 の抗老化メカニズムの一端の解明につながるものと考えられる。

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 6 件)

① Sakamaki JI, Daitoku H, Kaneko Y, Hagiwara A, Ueno K, Fukamizu A. GSK3β regulates gluconeogenic gene expression through HNF4α and FOXO1 J. Recept. Signal Transduct., 査読有, 32,

2012, 96-1011
DOI: 10.3109/10799893.2012.660531

② Takahashi Y, Daitoku H, Hirota K, Tamiya H, Yokoyama A, Kako K, Nagashima Y, Nakamura A, Shimada, T, Watanabe S, Yamagata K, Yasuda K, Ishii N, Fukamizu A. Asymmetric arginine dimethylation determines life span in *C. elegans* by regulating forkhead transcription factor DAF-16
Cell Metab., 査読有, 13, 2011, 505-516
DOI: 10.1016/j.cmet.2011.03.017

③ Sakamaki JI, Daitoku H, Ueno K, Hagiwara A, Yamagata K, Fukamizu A. Arginine methylation of BCL-2 antagonist of cell death (BAD) counteracts its phosphorylation and inactivation by Akt
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 査読有, 108, 2011, 6085-6090
DOI: 10.1073/pnas.1015328108

④ Daitoku H, Sakamaki JI, Fukamizu A. Regulation of FoxO transcription factors by acetylation and protein-protein interactions
Biochem. Biophys. Acta, 査読有, 1813, 2011, 1954-1960
DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.03.001

⑤ Takahashi Y, Daitoku H, Yokoyama A, Nakayama K, Kim JD, Fukamizu A. The *C. elegans* PRMT-3 possesses a type III protein arginine methyltransferases activity
J. Recept. Signal Transduct., 査読有, 31, 2011, 168-172
DOI: 10.3109/10799893.2011.555768

[学会発表] (計6件)

① 金子悠太、大徳浩照、深水昭吉、転写因子 FOXO1 は紫外線 DNA 損傷応答に関与する、若手ワークショップ@鬼怒川、2013年1月24日、栃木県日光市

② 金子悠太、大徳浩照、深水昭吉、転写因子 Foxo1 は紫外線 DNA 損傷応答に関与する、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日、福岡国際会議場

③ 金子悠太、大徳浩照、深水昭吉、転写因子 Foxo1 は紫外線 DNA 損傷応答に関与する、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月14日、パシフィコ横浜

④ 松本佳保里、大徳浩照、深水昭吉、フォークヘッド転写因子 DAF-16 は線虫の損傷乗り越え複製に関与する、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月14日、パシフィコ横浜

[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・生命環境系・講師
研究者番号：30361314