

700400260 A

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

健康寿命延長に関する戦略的研究

平成16年度 総括研究報告書

主任研究者 本山 昇

平成17 (2005) 年 3月

## 目次

I. 総括研究報告書	1
健康寿命延長に関する戦略的研究	
本山 昇	
II. 分担研究報告書	8
1. 酸化ストレスに応答した FOXO 転写活性における SIRT1 の機能解析	9
本山 昇	
2. 早期老化症モデルマウス-ATM ノックアウトマウス-の骨粗鬆症病態に関する研究	18
渡辺 研	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	23

# 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書

健康寿命延長に関する戦略的研究

主任研究者

本山 昇

国立長寿医療センター・研究所・老年病研究部・早期老化症研究室・室長

研究要旨

国民の1/4が高齢者という超高齢化社会を世界に類を見ないスピードで迎えようとしており、今後も活力ある社会を保ち続けるためには高齢者が健康で生きがいをもって生活できるようにすることが大切である。しかしながら高齢化に伴い、がん・骨粗鬆症・動脈硬化等、種々の老年病を発症しそれが原因となり寝たきり等のQOLの低下を導いている。比較的若年期に種々の老年病を発症し老化症状を呈する早期老化症の原因遺伝子の同定により、ゲノムDNAの安定化機構の破綻が老化において重要な要因の一つであることが明らかになってきた。一方、興味深いことに酵母から哺乳類においてカロリー制限（CR）は、これらの老年病の発症を遅らせ健康寿命を延長することが明らかにされている。また、CRによって低下するIGF-Iによって負に制御されているフォークヘッド型転写因子FOXOが線虫の健康寿命の延長に必須である。CR及び長寿命の生物の変異体に共通しているのが活性酸素（ROS）等に対して耐性を示すことである。ROSはゲノムDNA障害等を引き起こすことが知られており、早期老化症を示すマウスにおいてROS負荷によって、その症状が増強する可能性が示唆されている。また、酵母や*Drosophila*においてCRによる寿命延長に重要なNAD依存性脱アセチル化酵素SIR2の哺乳類ホモログSIRT1が、物理的、機能的かつ生理学的にFOXOと相互作用することを明らかにした。さらに、SIRT1は酸化ストレスに応答してNAD依存的な脱アセチル化を介してFOXOの転写活性を制御していることを明らかにした。これらの結果から、FOXOファミリーとSIRT1は哺乳類におけるCRに応答した寿命延長において共同して作用していると示唆される。また、早期老化症モデルマウスであるATMノックアウトマウス(ATM KO)において、老年病の一種である骨粗鬆症の病態解析を行い、ATM KOにおける骨量減少が骨芽細胞系機能低下、とりわけ多分化能を有する骨髄間葉系細胞の増殖不全により引き起こされている可能性を明らかにし、この機能低下と酸化ストレスおよびIGF-Iシグナルカスケードとの関連について考察を加えた。

分担研究者

澤 洋文

北海道大学大学院・医学研究科・分子細胞病理学

神経病理学・助教授

大田 力

国立がんセンター・研究所・腫瘍ゲノム解析情報研究部・室長

渡辺 研

国立長寿医療センター・研究所・運動器疾患研究部・室長

### A. 研究目的

世界に類を見ないスピードで国民の高齢化が進み超高齢化社会を迎えようとしている。このような社会において高齢者の QOL を保つことが重要であるが、高齢化に伴いがん・骨粗鬆症・動脈硬化・白内障など種々の老年病を発症し、それが原因となり寝たきり等の QOL の低下をもたらすことが多い。哺乳類（ヒトにおいてはまだ正確なデータは出ていないが）においてカロリー制限（CR）は唯一、これら老年病の発症を遅延し健康寿命を延長することが明らかにされている。一方、比較的若年期に種々の老年病を発症する早期老化症の原因遺伝子の同定が進んできて、それら原因遺伝子がゲノム構造の維持に重要な役割を果たす遺伝子産物であることが明らかにされてきたが、CR による健康寿命の延長とゲノム DNA の安定化機構の関連は明らかにされていない。線虫やマウスにおいてインスリンシグナルと寿命制御の関連が明らかにされつつあり、線虫におい

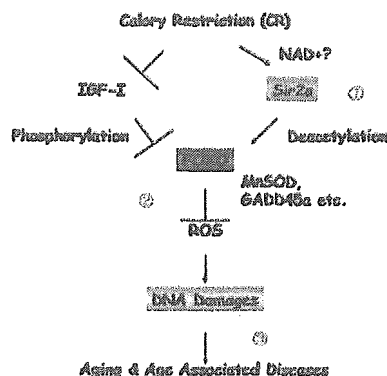


図1. カロリー制限による ROS・DNA ダメージを介して老化・老年病発症の制御メカニズム

てはインスリンシグナルによって負に制御されているフォークヘッド型転写因子 FOXO が重要な機能を果たしていることが明らかにされている。また、ある種の生物においては、CR による健康寿命の延長には、NAD+依存性脱アセチル化酵素 Sir2 が必須であり、インスリンシグナルに作用している可能性が示唆されている。CR によって健康寿命が延長したマウスや遺伝的変異により長寿命の表現型を示す生物は、活性酸素（ROS）等のストレスに対して抵抗性を示すことが明らかになってい

る。ROS は DNA 障害を誘発することが知られており、これによりゲノムの安定性が失われることが老化・老年病発症の原因となると考えられる。

私たちは、哺乳類の FOXO 転写因子が酸化ストレス等のゲノム障害ストレスに応答して、DNA 修復・細胞周期チェックポイント・細胞死・酸化ストレス耐性に関与する遺伝子の転写制御を行っていることを明らかにしてきた。また、哺乳類の Sir2(SIRT1) が FOXO と直接相互作用することを見出してきた。これらの知見から、(図 1) のような仮説を提唱し、分子生物学・病理学・ゲノム科学さらに発生工学的手法により、分子レベルから個体レベルの研究を通して、CR による健康寿命の延長とゲノム DNA 安定化にいたるカスケードを明らかにすることを目的として研究を行った。

## B. 研究方法

種々の細胞に FOXO、FOXO 変異体および SIRT1、SIRT1 変異体を導入し、FOXO の転写活性における SIRT1 の機能を免疫沈降法、ウエスタンブロット解析、ルシフェラーゼリポーターアッセイなどによって解析した。また、ATM KO マウスの骨髄より細胞を調製し分化試験を行った。また、新生児の頭骸冠より骨芽細胞を調製し解析に用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験は、各研究実施研究機関の動物実験倫理委員会・実験動物委員会の承認を受け、

動物取り扱い規則に沿って実施した。

## C. 研究結果

線虫において寿命延長、ストレス抵抗性に必須な転写因子 DAF-16 の哺乳類ホモログであるフォークヘッド転写因子 FOXO ファミリー (FOXO1、FOXO3a、FOXO4) の標的遺伝子の同定を行い、FOXO が酸化ストレスに応答して細胞周期停止、アポトー

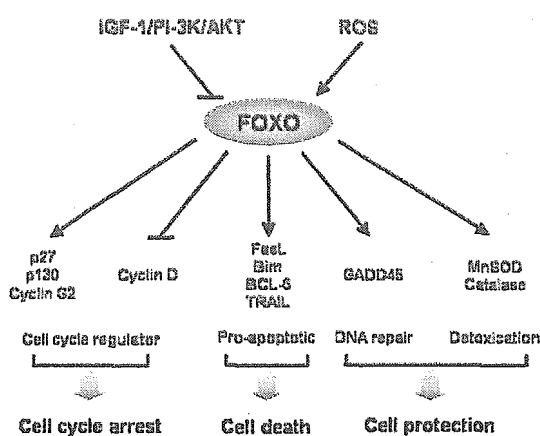


図 2. FOXO ファミリーのターゲット遺伝子

シス、DNA 修復に関与するストレス応答性遺伝子の転写制御を行っていることを明らかにした (Furukawa-Hibi Y, et al., *J Biol Chem*, 2002) (図 2)。今年度は、寿命延長

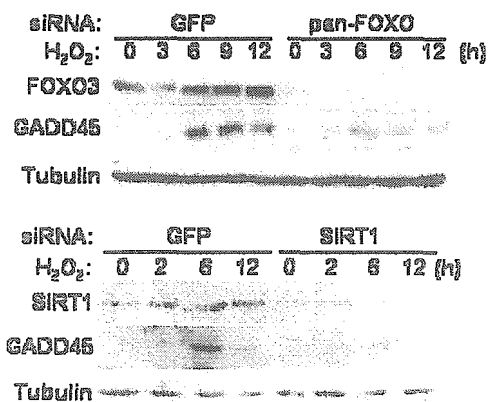


図 3. SIRT1 による酸化ストレスに応答した FOXO を介した GADD45 の発現誘導の制御

効果を持つ Sir2(SIRT1)と FOXO の関連に着目し、酸化ストレスによって核に移行した FOXO は転写共役因子ヒストンアセチル化酵素 p300 及び SIRT1 と相互作用し、アセチル化・脱アセチル化の制御を受け転写活性が制御されていることを見出した。酸化ストレスによる FOXO 依存的な GADD45 の発現誘導において SIRT1 は重要な機能を果たしていることを明らかにした (Kobayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Chen C, et al., submitted) (図 3)。また、FOXO 及び SIRT1 を siRNA により knockdown した細胞を用いて、酸化ストレスに応答した遺伝子発現の変化を検討している。さらに、早期老化症モデルマウス ATM KO マウスにおける骨粗鬆症について検討し、骨形成指標や骨吸収指標において顕著な低下が検出された。ATM KO における骨量減少が骨芽細胞系機能低下、とりわけ多分化能を有す

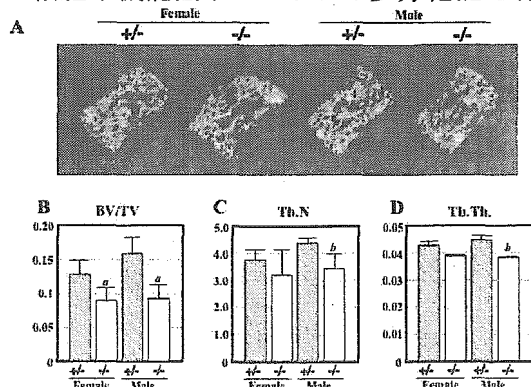


図 4. ATM ノックアウトマウスにおける骨量低下

る骨髄間葉系細胞の増殖不全により引き起こされている可能性を明らかにした (Hishiya A & Watanabe K. *J Bone Miner Metab* 22:399-403, 2004) (図 4)。

#### D. 考察

本研究において、哺乳類の SIRT1 は物理的、機能的かつ生理学的に FOXO と相互作用することを明らかにした。さらに、SIRT1 は酸化ストレスに応答して NAD 依存的に脱アセチル化を介して FOXO の転写活性を制御していることを明らかにした。最近、マウスにおいても CR によって SIRT1 の発現が増加していることが示された。CR した動物においてインスリンや IGF-1 のレベルは低下しているので、FOXO は核内に存在する割合が増加していると考えられる。これらの結果と本研究の結果から、FOXO ファミリーと SIRT1 は哺乳類における CR に応答した寿命延長において共同して作用していると示唆される。また、早期老化症モデルマウス ATM KO の病態解析を行い、ATM KO における骨量減少が骨芽細胞系機能低下、とりわけ多分化能を有する骨髄間葉系細胞の増殖不全により引き起こされている可能性を明らかにし、この機能低下と酸化ストレスおよび IGF-I シグナルカスケードとの関連が考えられるが、今後の検討課題である。

FOXO が酸化ストレスに応答して、核内に蓄積するメカニズムについて興味深い知見を得ている。また、早期老化症モデルマウス ATM および Ku80 ノックアウトマウスの早期老化症に発症における酸化ストレス抵抗性と FOXO 転写因子の関連を個体レベルで解析するための FOXO3/ATM、FOXO3/Ku80 DKO を樹立しており、これらについては、平成 17 年度に向けて研究を

進めている。

#### E. 結論

1. SIRT1 は NAD 依存性脱アセチル化活性を介して FOXO ファミリーの転写活性を制御していることが明らかになった。

2. ATMKO マウスは老人性骨粗鬆症様骨病態を呈し、間葉系幹細胞の増殖能低下による組織再生不良がその原因と考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Furukawa-Hibi Y, Kobayashi Y, Chen C, Motoyama N. FOXO Transcription Factors in Cell Cycle Regulation and the Response to Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.*, in press.

Motoyama N, Naka K. DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14: 11-16, 2004.

Asai S, Sato T, Tada T, Miyamoto T, Kimbara N, Motoyama N, Okada H, Okada N. Absence of Procarboxypeptidase R Induces Complement-Mediated Lethal Inflammation in

Lipopolysaccharide-Primed Mice. *J. Immunol.* 173: 4669-4674, 2004.

Furuyama T, Kitayama K, Shimoda Y, Ogawa M, Sone K, Yoshida-Araki K, Hisatsune H, Nishikawa S, Nakayama K, Nakayama K, Ikeda K, Motoyama N, Mori N. Abnormal angiogenesis in Foxo1 (FKHR)-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 279: 34741-34749, 2004.

Jack MT, Woo RA, Motoyama N, Takai H, Lee PWK. DNA-dependent protein kinase and Checkpoint kinase 2 synergistically activate a latent population of p53 upon DNA damage. *J. Biol. Chem.* 279: 15269-15273, 2004.

Naka K, Tachibana A, Ikeda K, Motoyama N. Stress-Induced Premature Senescence in hTERT-Expressing Ataxia Telangiectasia Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 279: 2030-2037, 2004.

Watanabe K and Hishiya A. Mouse models of senile osteoporosis. *Mol. Aspects Med.*, in press.

Sasaki A, Hinck L, Watanabe K. RumMAGE-D the members: Structure and Function of a New Adaptor Family of MAGE-D Proteins. *J. Recept. Signal. Transduct.*, in press.



Hishiya A and Watanabe K. Progeroid syndrome as a model for impaired bone formation in senile osteoporosis. *J. Bone Miner. Metab.* 22: 399-403, 2004.

仲 一仁、陳 晨、本山 昇. DNA ダメージチェックポイントとがん抑制メカニズム. *実験医学* 22: 1793-1799, 2004.

仲 一仁、本山 昇. 「DNA 複製およびダメージチェックポイント」キーワードで理解する細胞周期イラストマップ、羊土社、p124-130、2005

## 2. 学会発表

Furukawa-Hibi Y, Kobayashi Y, Ikeda K, Motoyama N. Oxidative stress activates the forkhead transcription factor, FOXO family. 2004 Annual Congress of Korean Society of Gerontology and the 4th Korea-Japan Gerontologist Joint Meeting. Chuncheon, Korea, Jun 24-26, 2004.

Furukawa-Hibi Y, Yoshida-Araki K, Ikeda K, Motoyama N. Forkhead transcription factor Foxo4 blocks differentiation and

induces atrophy of myotubes under the oxidative stress. Gordon Research Conferences on Biology of Aging. Aussois, France, September 12-17, 2004.

日比 (古川) 陽子、荒木 (吉田) 聖美、池田恭治、本山 昇. フォークヘッド型転写因子 Foxo4 は筋分化阻害と筋萎縮誘導を行う。第 77 回日本生化学会大会、2004 年 10 月 15 日、横浜

日比 (古川) 陽子、家村俊一郎、夏目 徹、渡辺 研、本山 昇. 酸化ストレスは長寿関連遺伝子 Forkhead 型転写因子 FOXO family を活性化する、第 27 回日本分子生物学会年会、2004 年 12 月 10 日、神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

# 分 担 研 究 報 告 書

分担研究報告書

酸化ストレスに応答した FOXO 転写活性における SIRT1 の機能解析

主任研究者

本山 昇

国立長寿医療センター・研究所・老年病研究部・早期老化症研究室・室長

研究要旨

線虫においてフォークヘッド型転写因子である Daf-16 が老化関連遺伝子及び生体ストレス抵抗性に関与する遺伝子の発現を制御し、寿命を延長していることが明らかになっている。私たちのグループは Daf-16 の哺乳類ホモログである FOXO が直接 GADD45 などのストレス応答遺伝子群を転写し、細胞周期停止・DNA 修復を誘導し細胞を保護していることが見出ししてきた。酵母において、NAD<sup>+</sup>-依存的脱アセチル化酵素 SIR2 はカロリー制限による寿命延長を制御する遺伝子であることが知られている。線虫においても Sir2.1 が DAF-16 シグナルカスケードを介して寿命を延長していることが明らかになっている。そこで、私たちは、SIR2 の哺乳類ホモログである脱アセチル化酵素 SIRT1 と FOXO の関連について調べた。SIRT1 は生理的状态下において FOXO と結合することを示した。FOXO4 は転写共役因子 p300 によるアセチル化され、転写活性が抑制される。一方、SIRT1 も FOXO4 と結合し、さらに NAD<sup>+</sup>-依存的に FOXO4 を脱アセチル化し、その転写活性を増大することを示した。また、FOXO4 の転写活性は SIRT1 の inhibitor である nicotinamide によって抑制されるが、SIRT1 の activator である resveratrol によって促進された。酸化ストレスは速やかに FOXO を核蓄積させて GADD45 プロモーター活性を増大させることが明らかになっている。内在性 SIRT1 の発現を siRNA 導入によって抑制すると、酸化ストレス処理による FOXO を介した GADD45 の誘導は阻害された。これらの結果から、酸化ストレスに応答して、SIRT1 が NAD<sup>+</sup>-依存的に FOXO を脱アセチル化することによってその転写活性を促進し、ストレス抵抗性獲得や寿命延長に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

命制御研究における最も重要なモデル生物

*C. elegans* においては単一遺伝子の寿命  
変異体 *age-1* や *daf-2* が同定され、老化、寿

として知られるようになっている。これら  
の変異体は寿命の延長とともに、酸化スト

レス、UV などのストレスに強い耐性を示している。またこの寿命延長効果およびストレス抵抗性には DAF-2、AGE-1 シグナルカスケードの下流で作用する転写因子 DAF-16 が必須である。DAF-16 はストレス抵抗性に関連する遺伝子の転写を制御することが示唆される。このシグナルカスケードは哺乳類においても保存されている。哺乳類においてはインスリン・IGF-I/IGF-I 受容体 (DAF-2) は PI-3K をリン酸化し、PI-3K は PKB (AKT) を活性化し、更に活性化された PKB は FOXO をリン酸化し、この転写因子を核外に排出させることによって転写活性を抑制する。また哺乳類においても FOXO ファミリーのメンバーである FOXO3 や FOXO4 はストレス抵抗性関連遺伝子である GADD45 や MnSOD を直接転写することが明らかになっている。よって、FOXO は哺乳類においても寿命制御に関与している可能性が考えられる。

酵母においては NAD<sup>+</sup>-依存的脱アセチル化酵素 SIR2 は寿命延長に大きく関与していることが知られている。哺乳類においても酵素 SIR2 のホモログ SIRT1 は NAD<sup>+</sup>-依存的にヒストンや転写因子 p53 を脱アセチル化する。また、*C. elegans* において、SIR2 のホモログ Sir2.1 の過剰発現が寿命延長効果を持つことが知られており、その効果は Daf-2・Age-1・Daf-16 シグナルカスケードと関連していると考えられている。哺乳類においも、SIRT1 は FOXO の活性を直接制御しているかどうかを明らかにするために、酸化ストレスによる SIRT1 と FOXO の関連

を検討した。

## B. 研究方法

### 1. プラスミド

マウス SIRT1 及び SIRT3 の cDNA は、北海道大学の堀尾博士より供与された。脱アセチル化活性欠損 SIRT1-HY は QuickChange mutagenesis kit を用いて、His355 を Tyr に置換した。また、Myc-FOXO4-TM の Lys(K) を Arg(R)に置換し、発現ベクター pCXN2 および pMX-puro、pMX-neo に組み換えた。

### 2. 細胞、トランスフェクション及びインフェクション

293T、Cos7、HCT-116、Saos2、MEF および NIH3T3 細胞は DMEM (10% FBS) 培地で、また、Jurkat 細胞は RPMI(10% FBS)培地で培養した。種々の発現ベクターのトランスフェクションは、FuGENE6 を用いて行った。FLAG-FOXO4、FLAG-FOXO4-TM、FLAG-SIRT1 と FLAG-SIRT1-HY を発現するレトロウイルスは、PLAT-E パッケージング細胞にトランスフェクションすることで産生し、NIH-3T3 および MEF に感染させ、puromycin および neomycin を含む選択培地で培養した。

### 3. 免疫沈降とウエスタンブロット解析

細胞は細胞溶解液で溶解し、免疫沈降反応を行った。アセチル化 FOXO4 の検出には、trichostatin A 及び nicotinamide を含む細胞溶解液を用いた。この研究で用いた一次抗体は、抗 FLAG (M2 および M5)、抗 Myc、

抗 HA、抗 His6、抗 SIRT1、抗 p27、抗 FOXO3、抗 FOXO4、抗アセチル化リジンおよび抗  $\alpha$ -tubulin である。免疫複合体は ECL Plus で検出した。

#### 4. 脱アセチル化反応

pcDNA3、pcDNA3-FLAG-SIRT1 もしくは pcDNA3-FLAG-SIRT1-HY をトランスフェクションした 293T 細胞を抗 FLAG と Protein G 結合マグネットビーズを用いて免疫沈降し、その免疫沈降物を脱アセチル化反応に用いた。アセチル化 FOXO3a および FOXO4 は、Myc-FOXO3a-TM もしくは Myc-FOXO4-TM と HA-p300 を 293T 細胞に共発現させることによって調製した。アセチル化 FOXO3a もしくは FOXO4 を含む細胞溶解液を免疫沈降した SIRT1 と HDAC バッファー中で、NAD、trichostatin A、nicotinamide を存在化・非存在化において 30℃で 2 時間反応させた。反応液から FOXO3a もしくは FOXO4 を免疫沈降し、抗アセチル化リジン抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。

#### 5. ルシフェラーゼアッセイ

pGL-6xDBE もしくは pG45-817 リポータープラスミドと phRG-TK および FOXO4 と SIRT1 の発現ベクターを細胞に導入し、resveratrol および nicotinamide の存在化・非存在化で培養した後、溶解し Dual-Luciferase Reporter Assay System を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。トランスフェクションの効率は、phRG-TK に

由来する Renilla ルシフェラーゼ活性で補正した。

#### 6. RNA 干渉

FOXO および SIRT1 に対する 2 塩基の overhang を含む 21-bp siRNA の配列は、それぞれ、5'-GGUAUAGGGCGACAGCAACTT-3' と 5'-CUUGUACGACGAAGACGACTT-3' である。GFP siRNA はコントロールとして用いた。siRNA の導入は Oligofectamine を用いた。

### **C. 研究結果**

#### 1. p300 による FOXO4 のアセチル化は転写活性を減少させる

試験管内で FOXO3 と FOXO1 は p300 によってアセチル化されることが報告されているが、その生理学的重要性は明らかにされていない。まず、FOXO3 と FOXO4 が細胞内で p300 によってアセチル化されるかどうかを検討した。293T 細胞に HA-p300 と FOXO3-TM および FOXO4-TM (3 箇所の PKB によるリン酸化部位を Ala に置換したマウス FOXO3 および FOXO4 変異体で、恒常的に核内に局在し活性化されている) の発現ベクターを導入した。免疫沈降およびウエスタンブロット解析により FOXO3-TM および FOXO4-TM は p300 との共発現によってアセチル化されることが明らかになった (Fig. 1A, B)。FOXO4 は、Lys (K) 186、189 と 408 が転写共役因子 CBP によってアセチル化されると報告されてい

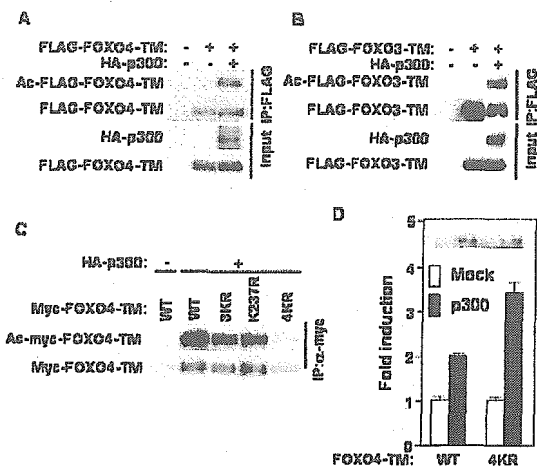


図1. FOXOのアセチル化とp300による転写活性の抑制

たが、FOXO4-TM-3KR (K186、189と408をArg (R)に置換)はまだp300によってアセチル化された。そこで、FOXO4のアセチル化部位を決定するために、K186、189と408に加えて種々のLysをArgに置換した変異体を作成し、293T細胞にp300と共発現させた。種々の変異体のうち、FOXO4-TM-3KRのK237置換体(FOXO4-TM-4KR)のみがp300によるアセチル化が著しく減少した。これらのことからFOXO4はp300によって、189、237と408がアセチル化されることが示唆された(Fig. 1C)。

FOXO4のアセチル化の機能を明らかにするために、pGL-6xDBE (FOXO DNA結合配列を6個含む)ルシフェラーゼリポータープラスミドとFOXO4-TMもしくはFOXO4-TM-4KRをp300の存在化・非存在化でCos7細胞に導入した。p300の共発現はFOXO4-TMおよびFOXO4-TM-4KRの転写活性を増加させたが、p300のFOXO4-TM-4KRに対する効果は、

FOXO4-TMと比較して著しかった(Fig. 1D)。即ち、p300は転写共役因子として基本転写因子複合体をリクルートすることによってFOXOの転写活性化に関与するが、p300によるFOXO4のアセチル化は転写活性に対して抑制的に作用する。

## 2. SIRT1はFOXO4と相互作用し脱アセチル化する

SIRT1はNAD依存的脱アセチル化酵素として作用することを考慮すると、SIRT1はp300によるFOXO4の転写活性の抑制に対して反対に作用する可能性が考えられる。この可能性を検討するために、FLAG-SIRT1とMyc-FOXO4-TMを293T細胞に導入し、免疫沈降およびウエスタンブロット解析を行い、SIRT1はFOXO4-TMと共免疫沈降することを明らかにした(Fig. 2A, B)。内在性のFOXO4およびFOXO3aとSIRT1の生理学的な相互作用を確認するために、FOXO4の核内蓄積を誘導するPI-3Kの阻害剤LY294002で処理したJurkat細胞および核内に蓄積したFOXO3aをもったconfluent HeLa細胞の細胞溶解液を免疫沈降した結果、FOXO4およびFOXO3aとSIRT1の相互作用が認められた(Fig. 2C, D)。これらの結果は、FOXO4およびFOXO3aは哺乳類の細胞において核内でSIRT1と相互作用することを示している。次に、SIRT1はFOXO4を細胞内で脱アセチル化するかどうかを検討した。Myc-FOXO-TM、HA-p300、FLAG-SIRT1および不活性型FLAG-SIRT1-HYを種々の組み合わせで

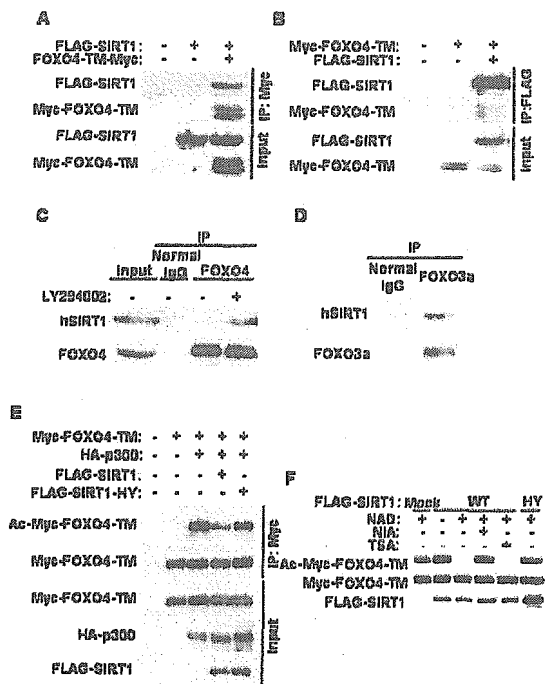


図2. SIRT1とFOXO4の相互作用とSIRT1によるFOXO4の脱アセチル化

293T細胞に導入した。p300を共発現する細胞で認められたFOXO4-TMのアセチル化はSIRT1の共発現で減少したが、SIRT1-HYでは減少しなかった (Fig. 2E)。p300によるFOXO3aのアセチル化も同様であった (data not shown)。さらに、SIRT1がFOXO4を直接脱アセチル化するかどうかをin vitroで検討した。HA-p300を共発現した293T細胞由来のアセチル化FOXO4-TMを293T細胞より免疫沈降したFLAG-SIRT1およびFLAG-SIRT1-HYと反応させた。免疫沈降したSIRT1はNAD依存性的にアセチル化FOXO4-TMを脱アセチル化したが、SIRT1-HYは脱アセチル化しなかった (Fig. 2F)。また、SIRT1によるFOXO4-TMの脱アセチル化はSIRT1の特異的阻害剤であるnicotinamideによって阻害されたが、一般的なヒストン脱アセチル化

酵素 (HDAC) の阻害剤 trichostatin A では影響を受けなかった。

### 3. SIRT1はFOXOの転写活性をNAD依存的に増大させる

SIRT1によるFOXO4の脱アセチル化がp300を介したアセチル化によるFOXO4の転写活性の抑制的制御に対して反対に作用するかどうかを検討した。pGL-6xDBEリポータープラスミドとFOXO4-TMをHCT116細胞に導入し、SIRT1のNAD依存的脱アセチル化活性を増加させる植物ポリフェノールの一種であるresveratrolの存在化・非存在化で培養した。FOXO4-TMの転写活性は濃度依存的にresveratrolによって増加し

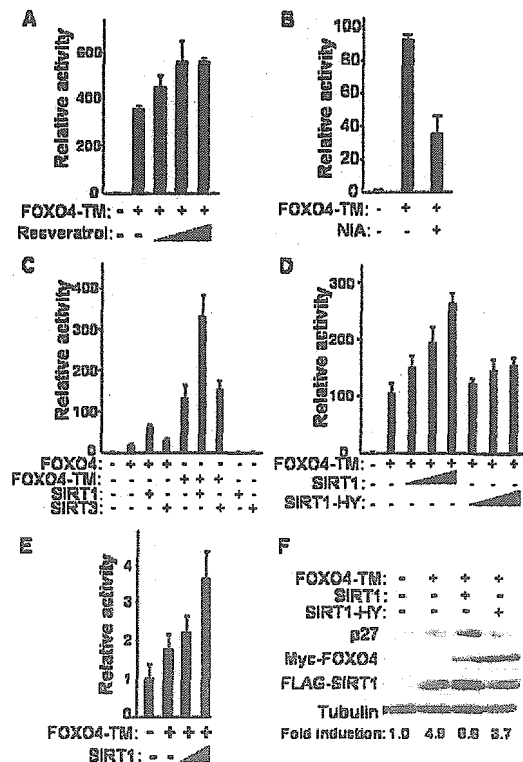


図3. SIRT1による脱アセチル化を介してFOXO4の転写活性の増大

た (Fig. 3A)。一方、細胞をnicotinamideで処理するとFOXO4-TMの転写活性は抑

制された (Fig. 3B)。FOXO4 および FOXO4-TM の転写活性は、濃度依存的に SIRT1 の共発現によって増加したが、SIRT1-HY もしくはミトコンドリアに局在する Sir2 ファミリーの SIRT3 の共発現では影響を受けなかった (Fig. 3C, D)。また、SIRT1 による FOXO4-TM の転写活性の増加は、ヒト GADD45 プロモータによって制御されるルシフェラーゼリポータープラスミドにおいても認められた (Fig. 3E)。レトロウイルスによる FOXO4-TM の導入は p27 の蓄積を誘導するが、FOXO4-TM と SIRT1 を導入すると p27 の蓄積は増加したが、SIRT1-HY では認められなかった。これらの結果は、SIRT1 は FOXO4 の転写活性を NAD 依存的脱アセチル化活性を介して増加させていることを示している。

#### 4. SIRT1 は酸化ストレスにตอบสนองした FOXO による GADD45 の発現誘導に必須である

私たちは FOXO が酸化ストレスにตอบสนองして GADD45 のプロモータを活性化することを見出してきた。FOXO は 14-3-3 と CRM1 によって媒介される核排出機構を誘導する PKB によるリン酸化によって通常血清培地では細胞質に局在している。それ故、FOXO は転写因子として遺伝子発現を活性化するためには核に蓄積する必要がある。レトロウイルスによって FOXO4 を導入した NIH-FOXO4 細胞を LY294002 で処理すると FOXO4 は核内に蓄積した。酸化ストレスにตอบสนองして、FOXO4 は迅速に核内に蓄積した (Fig. 4A)。酸化ストレスにตอบสนองして

核内に蓄積した FOXO4 が SIRT1 と相互作用するかどうか検討してところ、FOXO4 と SIRT1 は酸化ストレスにตอบสนองして核内で相互作用することが明らかになった (Fig. 4B)。内在性の SIRT1 活性を nicotinamide で阻害すると、LY294002 処理および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によってアセチル化 FOXO4 のレベルの上昇が認められた (Fig. 4C)。trichostatin A も FOXO4 のアセチル化を上昇させたが、nicotinamide と trichostatin A の両方の処理は、相乗的に FOXO4 のアセチル化を上昇させた。これらの結果は、FOXO4 のアセチル化・脱アセチル化は生理的な現象で、

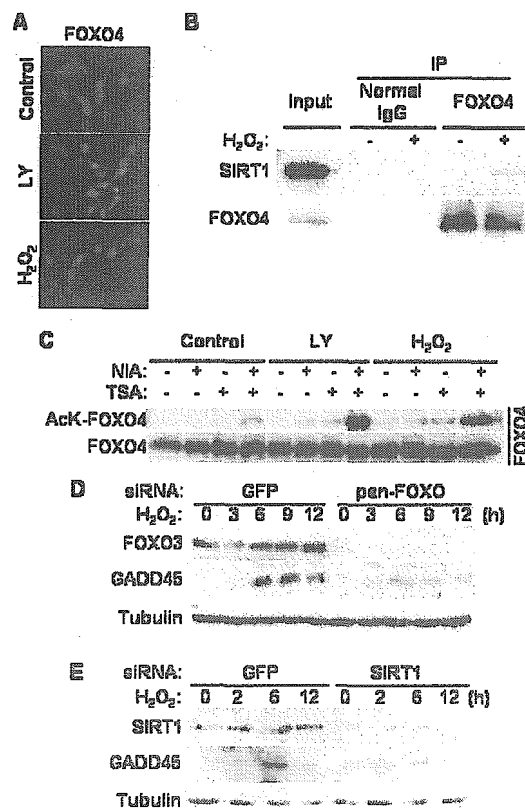


図4. 酸化ストレスにตอบสนองした FOXO による GADD45 の発現における SIRT1 の機能

FOXO4 の脱アセチル化は SIRT ファミリー



および HDAC によって制御されていることを示している。

酸化ストレスに応答した GADD45 の発現誘導において FOXO の寄与を検討するために、pan-FOXO に対する siRNA を Saos2 細胞に導入し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理を行った。コントロールとして GFP siRNA を導入した細胞と比較して pan-FOXO siRNA を導入した細胞では FOXO3 の発現が著しく抑制されていた。コントロールの細胞においては、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に応答して GADD45 の発現誘導が認められたが、FOXO を欠損した細胞においては GADD45 の発現誘導が著しく抑制された。この結果は、Saos2 細胞において FOXO は酸化ストレスに応答した GADD45 の発現誘導に重要であることをしめしている (Fig. 4D)。酸化ストレスに応答した FOXO による GADD45 の発現誘導における内在性の SIRT1 の機能を明らかにするために、コントロールおよび SIRT1 の発現を siRNA で抑制した細胞を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理し、GADD45 の発現を検討した結果、SIRT1 の発現を抑制した細胞においては GADD45 の発現誘導が著しく減少した (Fig. 4E)。これらの結果は、SIRT1 は酸化ストレスに応答した FOXO による GADD45 の発現誘導に必須であることを示している。

#### D. 考察

本研究において、哺乳類の SIRT1 は物理的、機能的かつ生理学的に FOXO と相互作用することを明らかにした。さらに、SIRT1 は酸化ストレスに応答して NAD 依存的に

脱アセチル化を介して FOXO の転写活性を制御していることを明らかにした。Motta らは SIRT1 は FOXO 活性を抑制すると報告したが、Brunet らは脱アセチル化の効果はターゲット遺伝子特異的で、pro-apoptotic な遺伝子の発現は抑制し、細胞周期および酸化ストレス抵抗性を制御するような遺伝子の発現は増加させるということを提唱している。本研究は、Brunet らの仮説を支持している。

ヒストン脱アセチル化酵素はヒストンや転写因子を脱アセチル化することによって遺伝子発現を抑制すると考えられてきた。しかし、酵母のヒストン脱アセチル化酵素 Rpd3 が酸化ストレスに応答した遺伝子発現に少なくともヒストンや未同定のたんぱく質の脱アセチル化を介して作用していることが報告された。本研究において、FOXO4 のアセチル化は転写活性を抑制し、SIRT1 による FOXO4 の脱アセチル化はアセチル化による転写活性の抑制に対して反対の作用を示すことを明らかにした。即ち、酸化ストレスは FOXO ファミリーの核局在を促進し、FOXO と SIRT1 の相互作用を誘導することによって、FOXO の脱アセチル化を介して GADD45 の発現の活性化を行っていると考えられる。

カロリー制限 (CR) は、哺乳類を含む種々の生物において寿命延長効果が認められている。酵母において、SIR2 の NAD 依存的活性はこの効果に必須であることが示されている。即ち、CR は NAD もしくは nicotinamide の細胞内濃度を変化させるこ

とによって SIR2 の活性を制御している可能性を示唆している。実際、nicotinamide のデアミ化を行いその濃度を減少させることによって SIR2 の活性化を行う pyrazinamidase/nicotinamidase 1 (PNC1) の発現増加は、CR による酵母の寿命延長の必要十分条件となることが示されている。さらに、Drosophila において寿命延長を示す CR もしくは Rpd3 変異体において Sir2 の発現が 2 倍に上昇していることが示されている。最近、マウスにおいても CR によって SIRT1 の発現が増加していることが示された。CR した動物においてインスリンや IGF-1 のレベルは低下しているため、FOXO は核内に存在する割合が増加していると考えられる。これらの結果と本研究の結果から、FOXO ファミリーと SIRT1 は哺乳類における CR に応答した寿命延長において共同して作用していると示唆される。

## E. 結論

SIRT1 は NAD 依存性脱アセチル化活性を介して FOXO ファミリーの転写活性を制御していることが明らかになった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Furukawa-Hibi Y, Kobayashi Y, Chen C, **Motoyama N**. FOXO Transcription Factors in Cell Cycle Regulation and the Response to Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.*, in press.

**Motoyama N**, Naka K. DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**: 11-16, 2004.

Asai S, Sato T, Tada T, Miyamoto T, Kimbara N, **Motoyama N**, Okada H, Okada N. Absence of Procarboxypeptidase R Induces Complement-Mediated Lethal Inflammation in Lipopolysaccharide-Primed Mice. *J. Immunol.* **173**: 4669-4674, 2004.

Furuyama T, Kitayama K, Shimoda Y, Ogawa M, Sone K, Yoshida-Araki K, Hisatsune H, Nishikawa S, Nakayama K, Nakayama K, Ikeda K, **Motoyama N**, Mori N. Abnormal angiogenesis in Foxo1 (FKHR)-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **279**: 34741-34749, 2004.

Jack MT, Woo RA, **Motoyama N**, Takai H, Lee PWK. DNA-dependent protein kinase and Checkpoint kinase 2 synergistically activate a latent population of p53 upon DNA damage. *J. Biol. Chem.* **279**: 15269-15273, 2004.

Naka K, Tachibana A, Ikeda K, **Motoyama N**. Stress-Induced Premature Senescence in hTERT-Expressing Ataxia Telangiectasia Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **279**: 2030-2037,

2004.

2. 学会発表

Furukawa-Hibi Y, Kobayashi Y, Ikeda K, Motoyama N. Oxidative stress activates the forkhead transcription factor, FOXO family. 2004 Annual Congress of Korean Society of Gerontology and the 4th Korea-Japan Gerontologist Joint Meeting. Chuncheon, Korea, Jun 24-26, 2004.

Furukawa-Hibi Y, Yoshida-Araki K, Ikeda K, Motoyama N. Forkhead transcription factor Foxo4 blocks differentiation and induces atrophy of myotubes under the oxidative stress. Gordon Research Conferences on Biology of Aging. Aussois, France, September 12-17, 2004.

日比（古川）陽子、荒木（吉田）聖美、池田恭治、本山 昇. フォークヘッド型転写

因子 Foxo4 は筋分化阻害と筋萎縮誘導を行う。第 77 回日本生化学会大会、2004 年 10 月 15 日、横浜

日比（古川）陽子、家村俊一郎、夏目 徹、渡辺 研、本山 昇. 酸化ストレスは長寿関連遺伝子 Forkhead 型転写因子 FOXO family を活性化する、第 27 回日本分子生物学会年会、2004 年 12 月 10 日、神戸

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

早期老化症モデルマウス-ATM ノックアウトマウス-の骨粗鬆症病態に関する研究

分担研究者 渡辺 研

国立長寿医療センター・研究所

運動器疾患研究部・骨機能再建研究室長

研究要旨

早期老化症の一つとして考えられる毛細管性運動失調症 ataxia telangiectasia のモデルマウス、ATM ノックアウトマウスの骨解析を行った。同ノックアウトマウスでは成長障害が認められるものの、その体重差が顕著でない10週齢マウスにおいてすでに骨粗鬆症様病態を有していることを見いだした。この病態は主に骨形成系の異常が原因となっており、とりわけその幹細胞群の増殖能の低下が原因である組織再生不良に陥っていることを見いだした。

A. 研究目的

健康寿命延長をめざす中で、各老年病を克服することは命題のひとつである。老年病の中でも、高齢者のQOLを著しく損なう運動器疾患である骨折の一因として、骨粗鬆症が挙げられる。骨粗鬆症等に見られる加齢に伴う骨量現象は、ヒトに限らず各哺乳動物でも知られており、老化の度合いや早期老化症における重要なパラメータのひとつであり、最近になり病態解析も進みつつある。本分担研究課題では、早期老化症モデルマウスのひとつとして、ATM (ataxia telangiectasia mutated) ノックアウトマウスを用い、その骨解析を通して、老人性骨粗鬆症の病態解析の知見を得ることを目的とする。

B. 研究方法

ATM のヘテロ接合体(+/-)同士の交配より、野生型(WT)、ヘテロ型(He)、ノックアウト(KO)の産仔を得て、骨解析ならびに、主に10週齢マウス骨髄より細胞を調製し分化試験を行った。また、新生児の頭骸冠より骨芽細胞を調製し解析に用いた。骨芽細胞はALP陽性細胞として同定した。各分子の発現ならびに活性化については、抗ABL抗体、抗IGF1R抗体、抗リン酸化チロシン抗体、抗p53抗体などによるウエスタンブロット法により解析を行った。

(倫理面への配慮)

当該分担研究課題では、ヒトゲノム・遺伝子解析を対象としておらず、また、材料採