

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 16～17 年度 総合研究報告書

主任研究者 本山 昇

平成 18 (2006) 年 3 月

目次

I. 総合研究報告書	1
健康寿命延長に関する戦略的研究	
本山 昇	
(資料)	9
1.平成16年度総括・分担研究報告書	10
2.平成17年度総括・分担研究報告書	36
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	56
III. 研究成果の刊行物・別刷	60

I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総合研究報告書

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及び酸化ストレス抵抗性獲得に必須である。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。平成16年度は、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。平成 17 年度は、FOXO が酸化ストレスに応答して迅速に核内に蓄積することを見出した。この応答は、IGF シグナルに拮抗するものであり、FOXO の活性は IGF シグナルと酸化ストレス応答シグナルのバランスによって制御されていると考えられた。また、酸化ストレスに応答して FOXO はユビキチンリガーゼ Murf1 や新規ユビキチン結合因子 ZNF216 の転写を介して筋萎縮を促進することを明らかにした。すなわち、老人性筋肉萎縮症や廃用性筋萎縮症における酸化ストレスと FOXO の関連が示唆された。

分担研究者

澤 洋文

北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター 分子病態・診断部門・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

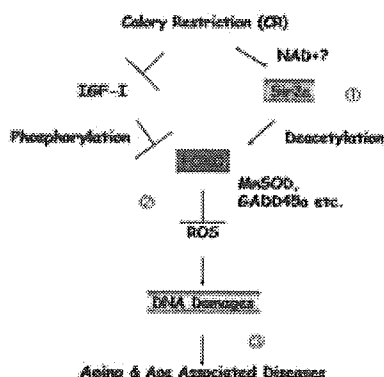


図1. カロリー制限による ROS・DNA ダメージを介して老化・老年病発症の制御メカニズム

では、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、FOXO が酸化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を制御していることを明らかにしてきた。また、哺乳類の Sir2 (Sir2 α) が FOXO の脱アセチル化を起こし、その転写活性を増大させることを示してきた。

これらの知見から、図に示したような仮説を立て、

1. CR による Sir2 α を介した FOXO 転写因子の活性化機構
2. 酸化ストレスに応答した FOXO の活性制御機構
3. 早期老化症モデルマウス (ATM KO) を用いた老年病 (骨粗鬆症等) 予防
4. 老人性筋肉萎縮症や廃用性筋萎縮症の発症機構

に関して重点的に解析を進め、哺乳類に置ける健康寿命延長を引き起こす CR によるゲノム DNA 安定化機構の制御メカニズムと老年病発症メカニズム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

具体的な研究方法については、資料の平成 16 年度・平成 17 年度総括・分担研究報告書を参照。

C. 研究結果と考察

研究結果と考察の詳細については、資料の平成 16 年度・平成 17 年度総括・分担研究報告書を参照。

D. 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。

3. FOXO ファミリーは、酸化ストレスに
応答してプロテインフォスファターゼ
PP2A に部位選択的に脱リン酸化され核内
に蓄積し、ターゲット遺伝子の発現制御を
行っている。

4. ZNF216 が実際に in vivo の筋萎縮時
に関与していることが明らかになり、老
人性筋肉萎縮症や廃用性筋萎縮の抑制の
創薬ターゲットとなる可能性が考えられ
る。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

書籍

仲 一仁、本山 昇. DNA 複製およびダメ
ージチェックポイント. 中山敬一編. キー
ワードで理解する細胞周期イラストマップ.
羊土社、東京. 2005 年. pp124-130.

Sawa H, Komagome R: The JC virus-like
particle overlay assay. In Lieberman PM
(ed) **Methods in Molecular Biology**.
Humana Press, Totowa, NJ
2004;292:175-186.

雑誌

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.

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* 7: 752-760, 2005.

Kobayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Chen C, Horio Y, Isobe K, Ikeda K, **Motoyama N.** SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress. *Int J Mol Med* 16: 237-243, 2005.

Chen C, Shimizu S, Tsujimoto Y, **Motoyama N.** Chk2 regulates transcription-independent p53-mediated apoptosis in response to DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 333: 427-431, 2005.

Hishiya A, Ito M, Aburatani H, **Motoyama N,** Ikeda K, **Watanabe K.** Ataxia telangiectasia mutated (Atm) knockout mice as a model of osteopenia due to impaired bone formation. *Bone* 37: 497-503, 2005.

Bergsmedh A, Ehnfors J, Kawane K, **Motoyama N,** Nagata S, Holmgren L. DNase II and the Chk2 DNA Damage Pathway Form a Genetic Barrier Blocking Replication of Horizontally Transferred

DNA. *Mol Cancer Res* 4: 187-195, 2006.

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.

Watanabe K and Hishiya A. Mouse models of senile osteoporosis. *Mol Aspects Med* 26: 221-231, 2005.

Sasaki A, Hinck L, **Watanabe K.** RunMAGE-D the members: Structure and Function of a New Adaptor Family of MAGE-D Proteins. *J Recept Signal Transduct Res* 25: 181-198, 2005.

Hishiya A, Ikeda K, **Watanabe K.** A RANKL-Inducible Gene Znf216 in Osteoclast Differentiation. *J Recept Signal Transduct Res* 25: 199-216, 2005.

Hishiya A, Iemura S, Natsume T, Takayama S, Ikeda K, **Watanabe K.** A novel ubiquitin-binding protein ZNF216 functioning in muscle atrophy. *EMBO J* 25: 554-564, 2006.

Orba Y, **Sawa H,** Iwata H, Tanaka S, Nagashima K: Inhibition of virus production in JC virus-infected cells by postinfection RNA interference. *J Virol* 78: 7270-7273, 2004.

Qu Q, Sawa H, Suzuki T, Semba S, Henmi C, Okada Y, Tsuda M, Tanaka S, Nagashima K: Nuclear entry mechanism of the human polyomavirus JC virus like particle: role of importins and the nuclear pore complex. *J Biol Chem* 279: 27735-27742, 2004.

Jin M, Sawa H, Suzuki T, Shimizu K, Makino Y, Tanaka S, Nojima T, Fujioka Y, Asamoto M, Suko N, Nagashima K: Investigation of simian virus 40 large T antigen in 18 autopsied malignant mesothelioma patients in Japan. *J Med Virol* 74: 668-676, 2004

Henmi C, Sawa H, Iwata H, Orba Y, Tanaka S, Nagashima K: Isolation of a monoclonal antibody recognizing a cell-surface molecule as a receptor for JC virus. *Biochem Biophys Res Commun.* 327: 242-251, 2005

Henmi C, Sawa H, Iwata H, Orba Y, Tanaka S, Nagashima K. Establishment of an immunoscreening system using recombinant VP1 protein for the isolation of a monoclonal antibody that blocks JC virus infection. *Biochem Biophys Res Commun* 327: 242-251, 2005.

Suzuki T, Okada Y, Semba S, Orba Y,

Yamanouchi S, Endo S, Tanaka S, Fujita T, Kuroda S, Nagashima K, Sawa H. Identification of FEZ1 as a Protein That Interacts with JC Virus Agnoprotein and Microtubules. *J Biol Chem* 280: 24948-24956, 2005.

Okada Y, Suzuki T, Sunden Y, Orba Y, Kose S, Imamoto N, Takahashi H, Tanaka S, Hall WW, Nagashima K, Sawa H. Dissociation of heterochromatin protein 1 from lamin B receptor induced by human polyomavirus agnoprotein: role in nuclear egress of viral particles. *EMBO Rep* 6: 452-457, 2005.

Ishida M, Tanaka S, Ohki M, Ohta T. BRM and BRG1 Negatively Regulate Transcriptional Activity of the Synovial Sarcoma Translocation Gene Product. *Genes Cells* 9: 419-428, 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.

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

Furukawa-Hibi Y, Iemura S, Natsume T, Watanabe K, Motoyama N. Nuclear accumulation of Foxo in response to oxidative stress is regulated by protein phosphatase 2A. Gordon Research Conferences on Biology of Aging, Ventura, CA, USA, Jan 29 – Feb 3, 2006.

Ohta K, Chen C, Kiyono T, Motoyama N.

Regulatory Pathway of DNA damage-induced premature senescence.

AACR Special Conference in Cancer Research on Cancer Susceptibility and Cancer Susceptibility Syndromes, Maui, HI, USA, March 1-5, 2006.

本山 昇、陳 、大田久美子. DNA 損傷チェックポイントによるがん抑制メカニズム、第 64 回日本癌学会学術総会 (シンポジウム)、2005 年 9 月 14 日、札幌

日比 (古川) 陽子、家村俊一郎、夏目 徹、渡辺 研、本山 昇. 酸化ストレスによる Forkhead 型転写因子 FOXO family の核移行メカニズム、第 28 回日本分子生物学会年会 (ワークショップ)、2005 年 12 月 8 日、福岡

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

(資料)

1. 平成 16 年度総括・分担研究報告書

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

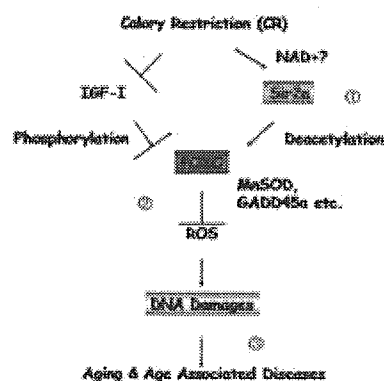


図1. カロリー制限による ROS・DNA ダメージを介して老化・老年病発症の制御メカニズム

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

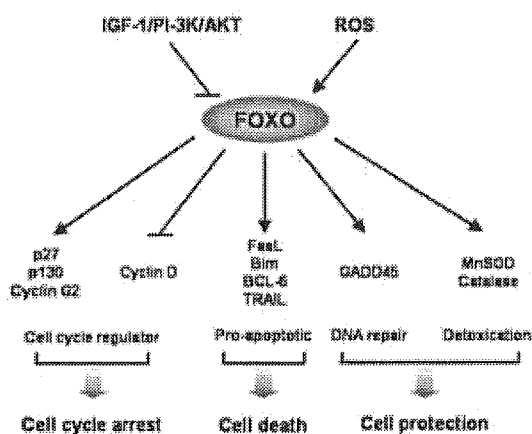


図2. FOXOファミリーのターゲット遺伝子

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

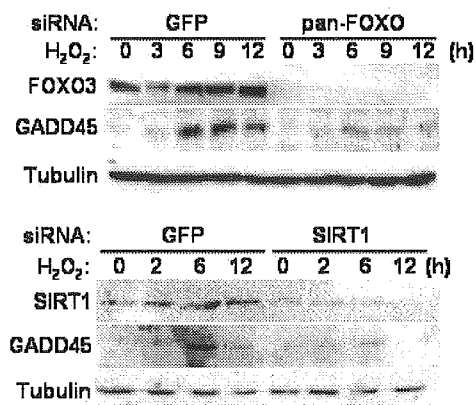


図3. SIRT1による酸化ストレスに応答したFOXOを介したGADD45の発現誘導の制御

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

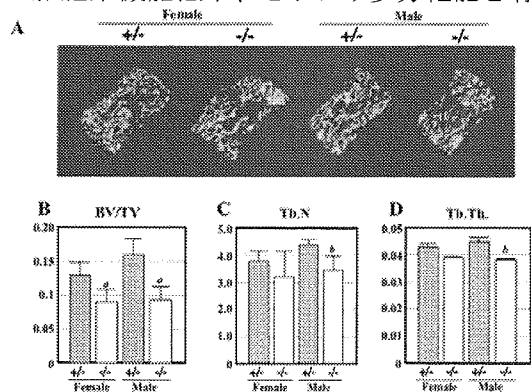


図 4. ATM ノックアウトマウスにおける骨量低下

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。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-1 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 農、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

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⁺-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⁺-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⁺-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

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

命制御研究における最も重要なモデル生物として知られるようになってきている。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) を活性化する。更に活性化した 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⁺-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⁺-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、SIRT2 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、