

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、これからの知見から、(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

細胞に過酸化水素処理、グルコース除去培地処理により酸化ストレスを与え、FOXO の局在、転写活性などを免疫染色、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、定量的 RT-PCR などによって解析した。また、ZNK216 ノックアウトマウスを樹立し、坐骨神経切除による筋萎縮モデル実験を行った。

(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

線虫において酸化ストレスなどのストレス抵抗性獲得に必須な転写因子 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) が酸化ストレスに応答して活性化され、GADD45 などのストレス応答性遺伝子の発現を制御することを見出してきた (Furukawa-Hibi Y, et al. *J. Biol. Chem.*, 2002)。今年、酸化ストレスに応答して FOXO が活性化されるメカニズムに着目した。

FOXO は H₂O₂ 処理やグルコース枯渇培地処理などによる酸化ストレスに応答して速やかに核内に蓄積することを明らかにした。FOXO タンパク質の細胞内局在は、おもに PI3K-Akt シグナルカスケードの Akt による 3 ヶ所のセリン及びスレオニン残基のリン酸化によって制御されている。そこで、酸化ストレスに応答した Foxo4 の核内蓄積の間の Foxo4 のリン酸化状態を検討した。酸化ストレスに応答して Akt は活性化されるにもかかわらず、Akt によるリン酸化部位の一つである Foxo4 の Ser197 は、迅速に脱リン酸化された。一方、Akt のリン酸化によって 14-3-3 の結合モチーフとなる Thr32 のリン酸化状態は変化しなかった。これらの結果は、酸化ストレスに応答した Foxo4 の核内蓄積は、Akt の活性化状態に依存せず、脱リン酸化が関与していることを示唆している。FOXO の核内蓄積に関与する細胞内タンパク質を同定するために、FLAG-FOXO3 発現ベクターを導入した

293T細胞より免疫沈降したFLAG-FOXO3aと相互作用する分子群を液体クロマトグラフィ・質量分析により解析した結果、FOXO3aはセリン・スレオニンプロテインフォスファターゼPP2AのB'サブユニット、調節サブユニットAと結合することを見出した。PP2A活性の抑制は、酸化ストレスに応答したFoxo4のSer-197の選択的脱リン酸化、核内蓄積、転写活性制御を阻害することを見出した。これらの結果から、PP2Aは酸化ストレスに応答したFOXO機能の活性化を制御していることが明らかになった。

高齢者にとってQOL低下に結びつく運動機能障害は、老人性筋肉萎縮症(Sarcopenia)と廃用性筋萎縮である。これらの体支持機能を担う骨格系はメカニカルストレスや神経からの動作入力が減弱すると、その機能を低下させるため、組織の退行が起こる。今年度、ROSなどの酸化ストレスに応答してFOXOが筋萎縮を誘導することを見出した。また、筋萎縮時にFOXOによって誘導される新規ユビキチン結合因子ZNF216がタンパク質分解系に関わり、筋萎縮過程で重要な働きを担っていることを見いだした。

D. 考察

本研究において、酸化ストレスに応答してFOXOはPP2Aによって部位選択的に脱リン酸化され核内に移行し、GADD45など細胞周期制御、アポトーシス制御、ストレス抵抗性制御やDNA修復制御に関わる遺

伝子群の発現制御を行っていることを明らかにした。生細胞は酸化的代謝に由来する活性酸素種などの酸化ストレスを持続的に受けている。即ち、FOXOタンパク質の細胞内局在と転写活性はPI3K-Aktシグナル経路と酸化ストレス-PP2Aシグナル経路の活性の相関によって制御されていると考えられる。このバランスの破綻がFOXOを活性化し、老人性の筋肉萎縮症を誘導する可能性を示した。これらのことから、酸化ストレス応答とFOXOは、老人性の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. 結論

1. 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。

2. 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。

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* 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.

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. 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.

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

2. 学会発表
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

分担研究報告書

酸化ストレスに応答した FOXO 転写活性化メカニズム

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。Daf-16 の哺乳類ホモログである FOXO は、細胞周期・アポトーシス・DNA 修復・ストレス抵抗性・代謝などの種々の細胞機能の制御を行っている。FOXO は成長因子、生存因子の下流で作用する PI 3K-Akt シグナルカスケードによりネガティブに制御されている。一方、酸化ストレスに応答して核内に蓄積することによって転写因子として活性化される。しかしながら、FOXO の核内蓄積メカニズムは明らかにされていない。私たちは、酸化ストレスに応答した Foxo4 の核内移行に伴って、Akt によるリン酸化部位のうち Ser-197 が選択的に脱リン酸化されることを見出した。また、FOXO が A、B'、C サブユニットから構成されるタンパク質脱リン酸化酵素である PP2A と相互作用することを明らかにした。さらに、PP2A 活性の抑制は、酸化ストレスに応答した Foxo4 の Ser-197 の選択的脱リン酸化、核内蓄積、転写活性制御を阻害することを見出した。これらの結果から、PP2A は酸化ストレスに応答した FOXO 機能の活性化を制御していることが明らかになった。

A. 研究目的

Foxo1、Foxo3a、Foxo4 と Foxo6 からなるフォークヘッド転写因子 FOXO ファミリーは、ターゲット遺伝子の発現を誘導もしくは抑制することによって細胞周期、アポトーシス、DNA 修復、解毒作用制御に関与している。FOXO ファミリーは Akt (PKB) によってリン酸化されるコンセンサス配列

(RxRxxS/T) である Thr 及び Ser 残基を 3ヶ所保持している。Akt によるこれらの 3ヶ所の Thr 及び Ser 残基のリン酸化は 14-3-3・Crm1 依存的な核外排出を誘導し、その結果として FOXO の転写活性は抑制される。このように FOXO の転写活性は、主に核-細胞質間のシャトリングによって制御させている。私たちを含む他の研究グル

ープによって、酸化ストレスや他の細胞ストレスによってFOXOが核内に蓄積し活性かされることが示されてきた。しかしながら、FOXOの核内蓄積メカニズムは明らかにされていない。

細胞内シグナルカスケードはタンパク質キナーゼのみならずフォスファターゼによっても制御されている。タンパク質セリンスレオニンフォスファターゼの一員であるプロテインフォスファターゼPP2Aは細胞周期進行、形質転換などの種々の細胞機能を制御している。PP2Aは触媒サブユニット(PP2Ac)、調節・構造サブユニットAと3つ目の種々の調節サブユニットBからなる多量体酵素である。現在、B(PR55)、B'(PR61)、B''(PR72, PR130, PR59, PR59, PR48)、B'''(PR93/SG2NA, PR110/striatin)の4つの異なったBサブユニットのファミリーが同定されている。これらのサブユニットは細胞内局在及び基質特異性に関与していると考えられている。B'サブファミリー、B'α, B'β, B'γ, B'δ, B'εの少なくとも5つの異なった遺伝子産物を含んでおり、癌化の関連が示唆されている。

本年度、私たちはB'を含むPP2A複合体がFOXO相互作用タンパク質フォスファターゼであることを同定し、PP2Aが酸化ストレスに応答したFOXOの核内蓄積と遺伝子発現制御に重要な機能を果たしていることを見出した。

B. 研究方法

1. プラスミド

発現ベクターpCXN2、pMXpuro、MKK7-JNK、MKK7-KR、HA-B'発現プラスミドは、それぞれ宮崎博士、北村博士、吉岡博士、一條博士、菊池博士より供与して頂いた。pCXN2-FLAG-Foxo4-WT、pCXN2-FLAG-Foxo3a-WTは、Furukawa-Hibi Y, et al. J. Biol. Chem. 277: 26729-26732, 2002)に記載している。EGFPとFoxo3a及びFoxo4の融合タンパク質の発現ベクターはFoxo3a及びFoxo4 cDNAをpEGFP-C1に組み換えた。pMX-puro-Foxo4、pMX-puro-dnFoxo4、pMX-puro-Foxo3a-EGFP、pMX-puro-Foxo4-EGFPはそれぞれのcDNAをpMX-puroに組み換えて作成した。

2. 細胞、トランスフェクション及びインフェクション

NIH3T3細胞、C2C12筋芽細胞と293T(ヒト胎児腎)細胞はDMEM(10%FBS)培地で培養した。Foxo4、dnFoxo4、Foxo4-EGFP及びFoxo3a-EGFPを発現するレトロウイルスは、それぞれのpMX-puroベクターをPLAT-E細胞に導入することで産生した。これらのウイルスをNIH3T3細胞に感染させ、NIH-Foxo4、NIH-dnFoxo4、NIH-Foxo3a-EGFP及びNIH-Foxo4-EGFP細胞を樹立した。SV40 t抗原の野生型(Ad-ST)及びC97S変異体(Ad-ST-C97S)を発現するアデノウイルスはRundell博士より供与された。

3. 免疫沈降とウェ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。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 FOXO3、抗 FOXO4、抗 IκBα、抗ヒト Ser193 リン酸化 AFX (マウス Ser197 リン酸化 Foxo4 に反応)、抗ヒト Thr24 リン酸化 FKHR (マウス Thr32 リン酸化 Foxo4 に反応)、抗 Akt、抗 Ser473 もしくは Thr308 リン酸化 Akt、抗 JNK、抗リン酸化 JNK、抗 SV40 t 抗原抗、抗 PP2A-C サブユニット、抗ラミン及び抗α-tubulin である。免疫複合体は ECL Plus で検出した。

4. サブセラー分画

サブセラー分画は NE-PER 核・細胞質抽出試薬を用いた。画分の純度はラミン B と IκBα に対する抗体で免疫プロットによってモニターした。

5. 免疫蛍光解析

細胞は、3%パラフォルムアルデヒド PBS 溶液で 15 分間固定し、Foxo4、SV40 t 抗原に対する抗体で反応後、Cy3 結合抗ヤギ免疫グロブリン G 及び Alexa Fluor448 結合マウス免疫グロブリン G 二次抗体で可視化した。核は DAPI にて染色し、オリンパス IX71 蛍光顕微鏡にて観察した。

6. 定量的 RT-PCR 解析

トータル RNA は NucleoSpin RNA II キットで細胞より抽出した。scDNA を逆転写反応により作成し、LightCycler 1.5 を用いて real-time PCR にて解析した。

C. 研究結果

1. FOXO タンパク質は酸化ストレスにตอบสนองして迅速に核内に蓄積する。

細胞ストレスによって誘導される FOXO タンパク質の核内蓄積の分子メカニズムを明らかにするために、まずレトロウイルスにより Foxo4 を導入した NIH-Foxo4 細胞における Foxo4 の細胞内局在を検討した。IGF-I 存在化では、ほとんどの Foxo4 は細

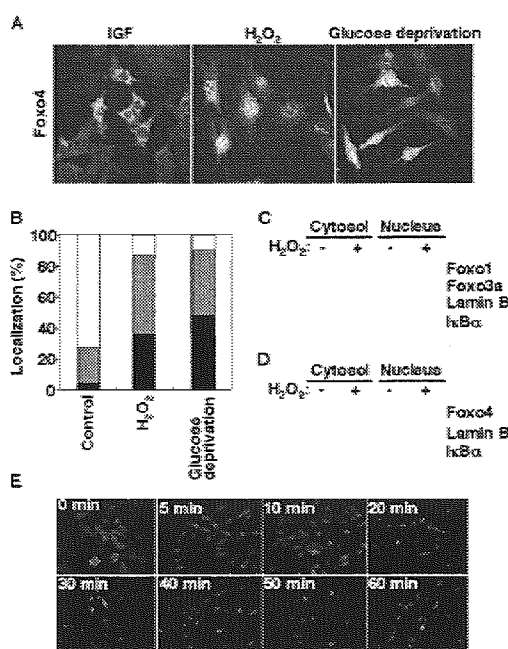


図1. 酸化ストレスにตอบสนองした細胞の核内蓄積

胞質に局在する。過酸化水素水 (H₂O₂) 処理やグルコース枯渇によって誘導される酸化ストレスは IGF-I 存在化でさえ、Foxo4 の核内蓄積をもたらした (図 1A, B)。UV 照射や放射線照射は Foxo4 の核内蓄積を誘導しなかった。H₂O₂ 処理は、NIH3T3 細胞において Foxo3a の細胞質から核内への移行を誘導した(図 2)。また、H₂O₂ 処理は、内在性の Foxo1、Foxo3a、Foxo4 の核内蓄

積も誘導した (図 1C, D)。NIH-Foxo4 細胞

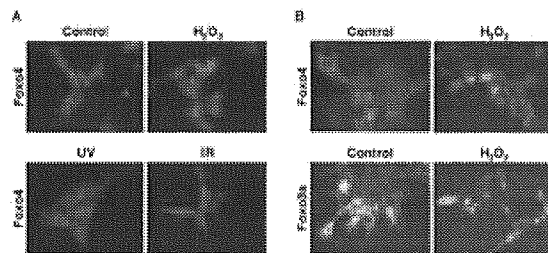


図2. 種々の刺激に応答した Foxo4 と Foxo38 の核内蓄積

における Foxo4 の核内蓄積は、 H_2O_2 処理の5分以内から検出でき、約20分で一定のレベルに到達した (図 1E)。これらの結果から、FOXO タンパク質は酸化ストレスに応答して迅速に核内に蓄積することが明らかになった。

2. JNK は酸化ストレスに応答した FOXO タンパク質の核内蓄積誘導に不十分である

ヒト Foxo3a は酸化ストレスに応答して8ヶ所のセリン及びスレオニン残基がリン酸化されることや Foxo4 の Thr447 と Thr451 が JNK によってリン酸化され転写活性が上昇する。さらに、JNK の強制発現は哺乳類 FOXO の ortholog である DAF-16 及び dFOXO の核局在を促進し、*C. elegans* 及び *D. melanogaster* の寿命を延長する。JNK は細胞ストレスに応答して活性化されヒト 14-3-3 の Ser184 をリン酸化して Bax や c-Abl からの解離を促進し、アポトーシスを誘導する。これらの報告から、酸化ストレスに応答した FOXO の核内蓄積に JNK が関与しているかどうかを検討した。JNK の特異的阻害剤 SP600125 処理、恒常的活性化型 JNK (MKK7-JNK) もしくは上流の活性化酵素 MKK のドミナントネガティブ変異

体 (MKK7-KR) の発現は酸化ストレスによる Foxo4 の核内移行に影響を示さなかった (図 3)。

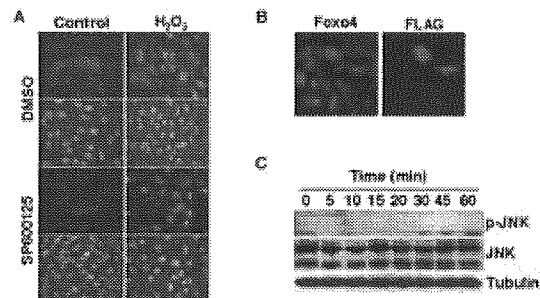


図3. MKK7-KRの発現がFoxo4の核内移行に与える影響

これらの結果より、JNK 活性は酸化ストレスに応答した FOXO タンパク質の核内移行には不十分であることが明らかになった。

3. 酸化ストレスに応答した核内蓄積に伴った Foxo4 の選択的脱リン酸化

FOXO タンパク質の細胞内局在は、おも

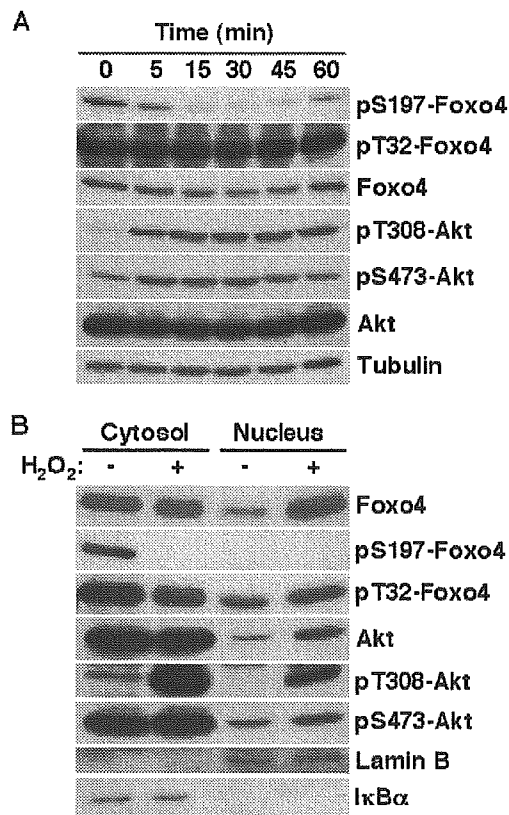


図4. 酸化ストレスと FOXO のリン酸化

に PI 3K-Akt シグナルカスケードの Akt による 3 ヶ所のセリン及びスレオニン残基のリン酸化によって制御されている。そこで、酸化ストレスに応答した Foxo4 の核内蓄積の間の Foxo4 と Akt のリン酸化状態を検討した。H₂O₂ 処理によって、以前の報告と一致して Akt の Thr308 と Ser473 のリン酸化 (Akt の活性化を示す) は増加した。Akt の活性化にもかかわらず、Akt によるリン酸化部位の一つである Foxo4 の Ser197 は、迅速に脱リン酸化された。一方、Akt のリン酸化によって 14-3-3 の結合モチーフとなる Thr32 のリン酸化状態は変化しなかった (図 4A)。細胞分画により、酸化ストレスに応答して活性型 Akt は核内に蓄積していた。活性型 Akt が核内に蓄積しているにもかかわらず酸化ストレスに応答して核内に蓄積した Foxo4 の Ser197 のリン酸化は著しく減少していたが、Thr32 は変化していなかった (図 4B)。これらの結果は、酸化ストレスに応答した Foxo4 の核内蓄積は、Akt の活性化状態に依存せず、脱リン酸化が関与していることを示唆している。種々の抗部位特異的リン酸化抗体の特異性は、PI 3K の特異的阻害剤 LY294002 で処理した細胞のウエスタンブロット解析で確認している。

4. Foxo4 と PP2A の相互作用

FOXO の核内蓄積に関与する細胞内タンパク質を同定するために、FLAG-FOXO3 発現ベクターを導入した 293T 細胞より免疫沈降した FLAG-FOXO3a と相互作用する分子群を液体クロマトグラフィー・質量分析

により解析した結果、FOXO3a はセリン・スレオニンプロテインフォスファターゼ PP2A の B'サブユニット、調節サブユニット A と結合することを見出した。この結果を検証するために、HA-B' と FLAG-Foxo4 を 293T 細胞に発現させ、免疫沈降・ウエスタンブロット解析を行った結果、HA-B' と FLAG-Foxo4 は共沈した。さらに Foxo4 は内在性の PP2A の触媒サブユニット C とも結合することを明らかにした。以上の結果

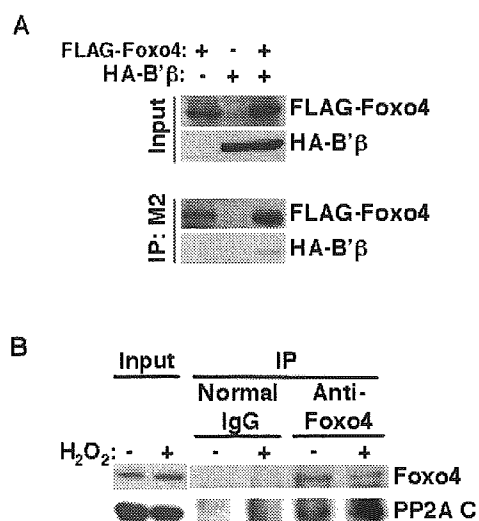


図5. FOXO と PP2A の相互作用
より、FOXO は PP2A と複合体を形成することが明らかになった(図5)。

5. PP2A 活性の阻害は酸化ストレスに 応答した Foxo4 の核内蓄積と脱リン酸化を抑制する

PP2A が酸化ストレスに応答した Foxo4 の核内蓄積を制御しているかどうかを明らかにするために、PP2A の特異的阻害剤 Okadaic Acid (OA) と Calyculin A の影響を検討した。NIH-Foxo4 細胞を OA もしくは

Calyculin A で処理すると H₂O₂ によって誘導される Foxo4 の核内蓄積が抑制された

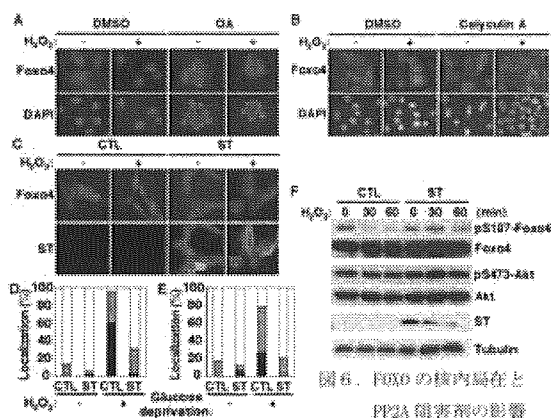


図6. FOXOの核内蓄積とPP2A阻害剤の影響

(図6A, B)。PP2A複合体からBサブユニットを解離させることでPP2A活性を特異的に阻害するSV40 t抗原の発現は、H₂O₂処理及びグルコース枯渇培地による酸化ストレスによって誘導されるFoxo4の核内蓄積を抑制した(図6C-E)。これと一致して、酸化ストレスにตอบสนองしたFoxo4のSer197の脱リン酸化も抑制された(図6F)。以上の結果より、PP2Aは酸化ストレスにตอบสนองしたFOXOの核内蓄積を制御していることが明らかになった。

6. SV40 t抗原によるPP2Aの阻害は酸化ストレスにตอบสนองしたFOXOによるGADD45の発現誘導を抑制する

FOXOとPP2Aの相互作用の機能における意義を明らかにするために、酸化ストレスにตอบสนองしたFOXOによる遺伝子発現の制御を検討した。私たちやGreenbergらのグループは、細胞ストレスにตอบสนองしてFOXOはGADD45の発現誘導を行うことを示してきた。これまでの結果と一致して、H₂O₂処理やグルコース枯渇によってGADD45

の発現は誘導されたが、ドミナントネガティブ型のdnFoxo4を発現するNIH細胞ではその発現は著しく抑制されていたので、酸化ストレスにตอบสนองしたGADD45の発現誘導はFOXOによって制御されていることを示している。NIH3T3細胞やC2C12筋芽細胞にSV40 t抗原を発現させるとH₂O₂処理やグルコース枯渇による酸化ストレスに

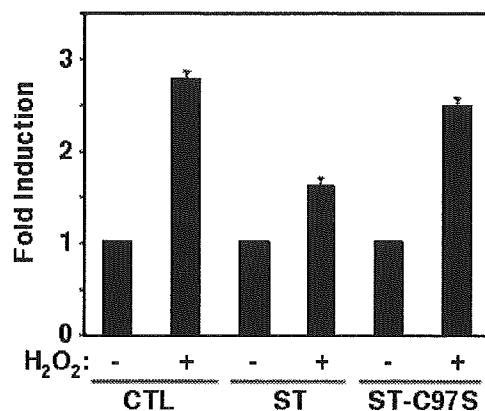


図7. FOXOの転写活性におけるPP2A阻害の影響

ตอบสนองしたGADD45の発現誘導が阻害されたが、PP2A活性を抑制できない変異型SV40 t抗原(ST-C97S)はGADD45の発現誘導に影響しなかった(図7)。これらの結果から、PP2AはFoxo4のSer197の選択的脱リン酸化を介して酸化ストレスにตอบสนองしたFoxo4の核内移行と活性化を制御していることが示された。

D. 考察

今年度、PP2Aを含む酸化ストレス誘導シグナル経路はPI3K-Aktシグナル経路に反対に作用することを示した。生細胞は酸化代謝に由来する活性酸素種などの酸化

ストレスを持続的に受けている。即ち、FOXO タンパク質の細胞内局在と転写活性は PI3K-Akt シグナル経路と酸化ストレス-PP2A シグナル経路の活性の相関によって制御されている。Akt による FOXO タンパク質の保存された 3 ヶ所の Thr 及び Ser 残基のリン酸化は、核外排出を誘導し細胞質に局在化させる。今回、酸化ストレスに応答した Foxo4 の核内蓄積に伴って、Akt によるリン酸化部位の Ser197 の選択的脱リン酸化が生じることを見出した。Ser197 は核移行シグナル配列を含むフォークヘッドドメイン内に存在している。マウス Foxo4 の Ser197 の相当するヒト FOXO3a のフォークヘッドドメイン内の Ser253 のリン酸化は、14-3-3 結合モチーフを形成し、14-3-3 との結合は FOXO3a の核移行機構の因子との会合を阻害することで細胞質に局在化させる。Foxo4 の Ser197 の脱リン酸化は核移行機構の因子との会合を可能にし、核内に移行させるかもしれない。実際、核移行機構の因子である Importin- α は酸化ストレスに応答して迅速に核内に移行する。さらに、マウス Foxo4 の Ser197 に相当するヒト FOXO1 の Ser256 のリン酸化は、FOXO1 が DNA に結合する能力を阻害する。これらの結果を考え合わせると、酸化ストレスに応答した Foxo4 の Ser197 の脱リン酸化は、Foxo4 と核移行機構の因子との会合、核内移行を誘導し、ターゲット遺伝子の発現制御を行っていることが示唆される。

E. 結論

FOXO タンパク質は酸化ストレスに応答して PP2A に選択的脱リン酸化され、核内に蓄積しターゲット遺伝子の発現を制御している。

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.* 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.

2. 学会発表

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

筋萎縮における ZNF216 の機能

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

体幹部の骨折や神経機能障害などで、長期臥床を強いられる患者にとって問題となる運動機能障害は、廃用性筋萎縮ならびに骨量低下である。これらの体支持機能を担う骨格系はメカニカルストレスや神経からの動作入力が減弱すると、その機能を低下させるため、組織の退行が起こる。我々は筋萎縮時に誘導される ZNF216 がタンパク質分解系に関わり、筋萎縮過程で重要な働きを担っていることを見いだした。

A. 研究目的

疾患・けがなどによる長期臥床や神経疾患、また宇宙空間などの微小重力下など、筋肉へのメカニカルストレスの減少により廃用性の筋萎縮が起きることが知られている。とりわけ高齢者においては、長期臥床が体支持機能を担う骨・筋肉系の廃用性萎縮を引き起こし、ひいては、さらなる骨折のリスクを高めると同時に、社会復帰への大きな足かせとなっている。本研究では、この廃用性筋萎縮のメカニズムを明らかにするとともに、筋萎縮時に発現誘導される遺伝子 (Atrogene) として、ZNF216 を同定し、筋萎縮での機能を明らかにすることにより、筋萎縮抑制の創薬ターゲットとしての可能性を *in vivo* で検証することを目的とする。

B. 研究方法

ZNF216 の発現は、C2C12 細胞を多核化した筋繊維 (筋管細胞) に分化させた後、Dex 処理を行い、RNA を抽出してノーザンブロットティングにより検討を行った。また、8 週齢雄マウスを用い、短期絶食 (48 時間)、ならびに坐骨神経切除 (左、切除: 右、偽手術 (対照)) を行い、下肢腓腹筋より RNA を抽出し、発現を検討した。活性型 FOXO 発現系は、主任研究者本山博士より供与された。

Aggresome 誘導時における局在については、293 細胞に、FLAG-ZNF216 と HA-ubiquitin を発現させ、それぞれの tag (FLAG, HA) に対する抗体による間接蛍光抗体法により検討を行った。Aggresome の誘導は、0.5 μ M の MG132 で 24 時間処理することにより行

った。

ZNF216 の機能を調べるため、相互作用分子の同定を Zub1 を bait にした yeast two-hybrid screening、および免疫沈降した Zub1 を含む分子複合体の構成タンパクの網羅的解析をタンデムマススペクトロメトリにより行った。Znf216 ノックアウトマウスは、遺伝子トラップ技術を用いて作製したものであるが、RNA レベルならびにタンパク質レベルでの発現が見られないことを確認した。

(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、材料採取等に伴う動物実験は、国立長寿医療センター動物実験施設指針等に則り、ZNF216 ノックアウトマウスや筋萎縮誘導実験等、材料、モデルともに、動物愛護上の配慮をしたうえで行った。

C. 研究結果

① 筋萎縮における

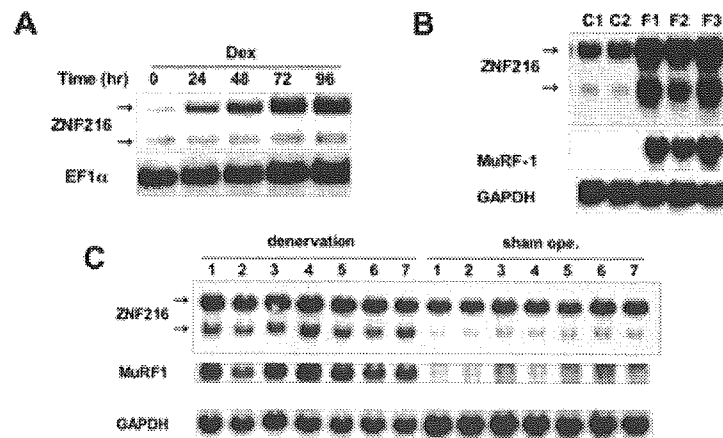


図1 筋萎縮時のZNF216発現 A, C2C12由来筋繊維のDex処理によるin vitro筋萎縮誘導。B, マウス短期絶食による筋萎縮。C, コントロール群、F, 絶食群。C, 坐骨神経切除による筋萎縮。左7つが神経切除側、右7つが偽手術側。

ZNF216 発現誘導

in vitro で筋分化させた C2C12 細胞を Dexamethasone で処理することにより、筋繊維幅の萎縮を誘導させたところ、ZNF216 の発現上昇が観察された。また、マウスを用い、坐骨神経神経切除、尾部懸垂、短期絶食などの筋萎縮モデル実験を行い、後肢の腓腹筋での ZNF216 の発現を検討したところ、筋萎縮誘導群で顕著な発現誘導が検出された (図 1)。

さらに、寿命関連遺伝子産物である FOXO 転写因子が、筋萎縮と深く関わっていることが示唆されていることから、恒常的活性型 FOXO 強制発現系による ZNF216 遺伝子発現を検討したところ、FOXO 導入細胞において顕著な発現増加が観察された (図 2)。

② ZNF216 の分子機能

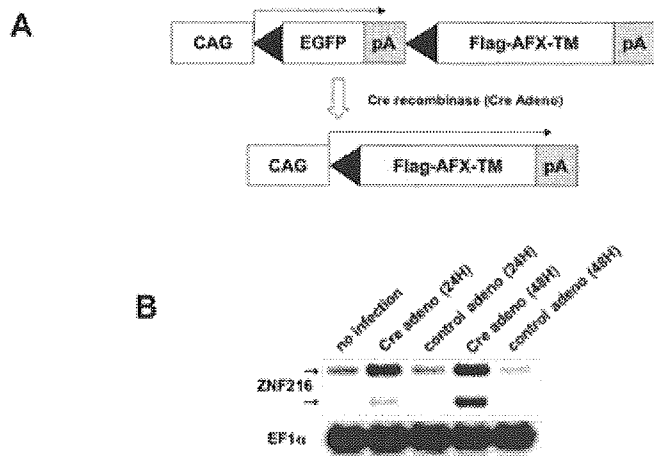


図2 活性型FOXOによるZNF216遺伝子発現誘導 A. Cre-loxP系を利用した恒常的活性型FOXO転写因子発現誘導系。B. ZNF216の発現（ノーザンブロットイング）

ZNF216 の分子機能に関する知見はほとんど報告されていなかったため、ZNF216の結合分子の探索を行った。酵母2ハイブリッド法により、相互作用分子としてユビキチンを同定し、リコンビナント ZNF216タンパクとポリユビキチン鎖を用いた *in vitro* での解析により、直接結合能があることを明らかにした。さらに、N 末端側 Znフィンガー領域ならびに C 末端側 Znフィンガー領域について、点変異変異体および欠失変異体を作製し、ポリユビキチン鎖結合部位の検討を行ったところ、N末端側 Znフィンガー領域の変異もしくは欠失

によりポリユビキチン鎖結合能を失うことなどから、同部位がポリユビキチン鎖結合に必要十分であることを示した。また同時に nano-LC-MS/MS を用いた ZNF216 の網羅的相互作用解析により、26S プロテアソーム構成サブユニットが検出された。

また、ZNF216 は、神経変性疾患などの病理との関連が示唆されるユビキチン化タンパクの細胞内凝集（アグリソーム）に共存することから、ユビキチン-プロテアソーム系のタンパク質分解系に関わっていることが示唆された（図3）。

③ZNF216 ノックアウトマウスでの筋萎縮筋萎縮時の発現誘導ならびにタンパク質

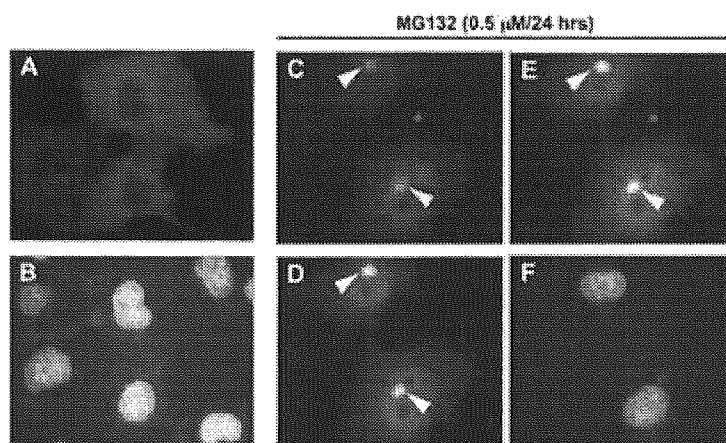


図3 細胞内ユビキチン化タンパク質沈着（Aggresome）誘導時のZNF216の局在 A, B, 未処理細胞、C~F, 処理細胞（同一視野）。A, B, ZNF216（赤）、B, F, 核染色（青）、D, ユビキチン（緑）、E, ZNF216とユビキチンの共局在。矢頭は、誘導されたAggresome。

分解系への関与という知見から、ZNF216の機能を抑えることにより、筋萎縮へ抵抗性を獲得する可能性があるのではないかと考えられた。そこで、ZNF216 ノックアウト(ZNF216KO)マウスを作製した。坐骨神経切除による筋萎縮モデル実験を行ったとこ

パク質分解系、とりわけユビキチン化タンパク質の分解が抑制されている可能性が考えられた。

D. 考察

ZNF216 には、ポリユビキチン結合活性が

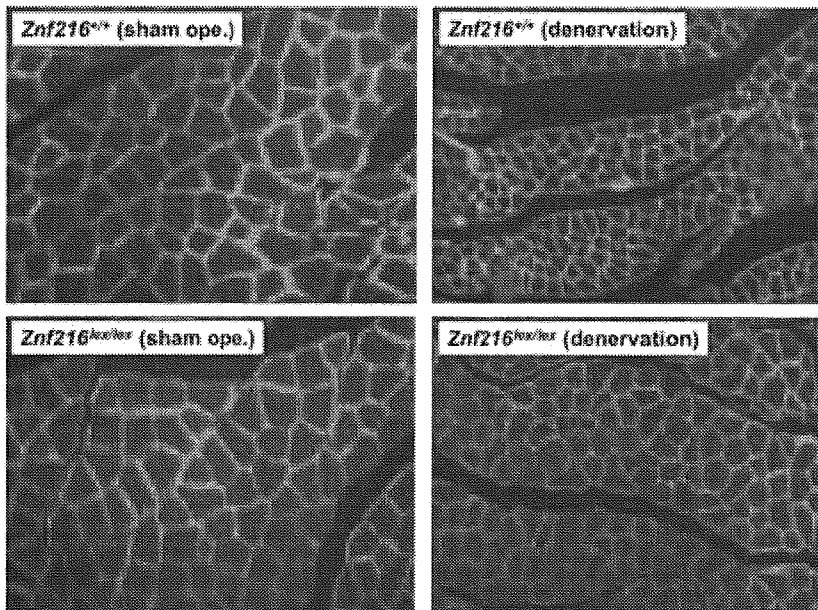


図4 坐骨神経切除による萎縮筋断面（左が偽手術、右が切除；上が野生型、下がZNF216KOマウス）

ろ、野生型マウスでは、1週間で20～30%の筋重量の減少が観察されたのに対し、ZNF216KOマウスでは10%程度と筋萎縮が顕著に抑制されていた（図4）。

さらに、萎縮筋でのユビキチン-プロテアソーム系について検討を行った。筋萎縮において筋肉内にユビキチン化タンパク質の蓄積が認められるが、ZNF216KOマウス由来筋肉においてはWTマウス由来筋肉と比べてより多くのユビキチン化タンパク質の蓄積が認められた。このことから、ZNF216KOマウスにおいて、筋萎縮時にユビキチン-プロテアソーム系を介したタン

あり、26Sプロテアソームと複合体を形成している可能性が示唆された。これらのことから、ユビキチン化されたタンパク質とプロテアソームをリンクするような機能が予想される。ただ、

プロテアソーム画分には細胞内ZNF216の一部が検出されるのみで、プロテアソームに常駐しているタイプのものではないと考えられ、ユビキチン化タンパク質のプロテアソームへのターゲッティングに寄与している可能性が示唆される。事実、ZNF216KOマウスの筋萎縮モデル実験では、プロテアソーム活性に差がないにもかかわらず、野生型の筋肉より、より多くのユビキチン化タンパク質が検出されることも、ターゲッティング機能の可能性を支持している。また、一時的な細胞内ユビキチン化タンパク質の増加は、脱ユビキチン化酵素によるユビ

キチン除去や代償的経路による分解により解消されることが知られており、このターゲティング機能の抑制が、重篤な筋疾患を招くというよりはむしろ、筋萎縮速度を抑制し、軽減させていると考えられる。

E. 結論

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、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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

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

Hishiya A, Ikeda K, and Watanabe K. A RANKL-inducible gene *Znf216* in osteoclast differentiation. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* 25: 199-216, 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.

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

4. 特許取得

なし

5. 実用新案登録

なし

6. その他

なし

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

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**. RumMAGE-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.