

長寿シグナル IGF による老化制御機構の解明 (29-39)

主任研究者 津川 陽司 国立長寿医療研究センター 流動研究員

A 研究要旨

これまでに我々は認知症、長寿化の原因因子の一つであるインスリン(*Ins*)の分泌制御機構を研究してきた。最近、*Ins* は新規 *Ins* 分泌制御因子である *ATIS1* と結合しており、アルギニン投与によって *Ins-ATIS1* 複合体の解離が *Ins* 分泌を促進することを明らかにした(論文投稿中)。一方、酵母、線虫、ハエ、マウス・ラットにおいて *Ins* および *Ins* 様成長因子(*IGF*)シグナルは長寿化シグナルとして報告されており、また *Ins* と *IGF* のアミノ酸相同性は極めて高い。そこで、*Ins*(*B*鎖)と *IGF1/2* とのアミノ酸相同性を比較したところ、 β ターン2におけるアルギニンが高く保存されていることを見出した。このことから *IGF* も *Ins* と同様に *ATIS1* と結合し、同結合はアルギニンにより解離され、*IGF* の分泌を促進する可能性が示唆された。本研究では、*ATIS1* を介した *IGF* の分泌制御機構を明らかにし、その機能制御が寿命延伸にどのように寄与するのかを明らかにする。

主任研究者

津川 陽司 国立長寿医療研究センター 流動研究員

B 研究目的

長寿化シグナル *IGF* の *ATIS1* を介した分泌制御機構の解明およびその生理的意義を以下の3点について解析する。

① IGF- *ATIS1* の分泌制御機構の解析

現在までに、膵臓ランゲルハンス島 β 細胞株や β 細胞特異的 *ATIS1* 強制発現トランスジェニックマウスにおいてアルギニン刺激による *Ins-ATIS1* 複合体の解離・分泌促進を確認できた。この手技を用いて、肝臓由来細胞株において *IGF1* または *IGF2* が *ATIS1* と結合し、アルギニン刺激による *IGF* の分泌を確認する。また、*IGF-ATIS1* 結合活性化ドメイン候補がいくつか同定されたため、*IGF* 自身の結合活性化ドメインを明らかにし、シグナル制御機

構に関して詳細に解析する。

② IGF- ATIS1結合解離制御因子の探索

まず、IGF- ATIS1結合を元に化合物のスクリーニングを行う。これまでの研究によりIGFに対するATIS1結合予測部位をいくつか同定しているため、IGFおよびATIS1(変異体)強制発現培養細胞株を用いることでスクリーニングの感度・特異性を上げることが可能である。

③ 老齢マウス及び早老症マウスにおける寿命延伸効果の検証

2)で選択した候補薬剤による寿命延伸効果とそのメカニズムを明らかにするため、肝臓由来細胞株においてIGF分泌を亢進あるいは抑制するような投与条件を検討する。また、老齢マウスおよび早老症モデルマウスによる検討では、実際の効能や副作用について老化治療の観点から加齢疾患の病態進行時に候補薬剤を投与することで検証する。

C 研究方法

(1) 全体計画

① IGF- ATIS1 の肝細胞における分泌制御機構の解析

1-1: 肝細胞内のアルギニン誘導性 IGF- ATIS1 の結合解離メカニズムの解析

アルギニン処理を施した ATIS1 強制発現ヒト肝細胞株あるいは ATIS1 と IGF1(または IGF2)を強制発現した膵臓β細胞株の細胞抽出液に対して細胞内における結合解離が認められるか検討する。次に、インフォマティクス的手法を用いて、ATIS1 の IGF 標的ドメイン(あるいは ATIS1 結合部位)を予測し、それを基に作成したドメイン変異体を肝細胞株に発現させ、その IP-WB により結合解離活性を測定することで IGF 結合活性ドメインを明らかにする。また、IGF 全長と同定した結合部位の欠損 IGF ベクターを作製し、これらを肝細胞株に遺伝子導入し、IGF- ATIS1 による下流のシグナルを探る。

1-2: IGF- ATIS1 の機能解析(シグナル転写因子の抽出と検証)

上記 IGF ベクターによる肝細胞株への遺伝子導入後、マイクロアレイ解析から老化・寿命制御に関わる遺伝子から長寿化のシグナル経路候補を抽出する。これまでの報告から、特に細胞周期、代謝、DNA 修復、細胞増殖関連因子の発現変動についてパスウェイ解析を行う。さらに、IGF または ATIS1 強制発現肝細胞株への抽出パスウェイに対する阻害剤投与や RNA 干渉法により上記機能の抑制効果が得られるのか検証する。

③ IGF- ATIS1結合解離制御因子の探索

まず、IGF- ATIS1結合を元に化合物のスクリーニングを行う。アルギニンとIGFが競合的にATIS1に結合し、IGF分泌が制御されるため、ATIS1に結合した物質は、アルギニンと同様に、IGF分泌を促進する可能性がある。そのため、IGF/ ATIS1強制発現肝細胞株を用いてアルギニン模倣化合物あるいはATIS1結合因子を標的としたアゴニス

トやアンタゴニストを候補としてIGF- ATIS1結合解離活性を検証する。

③ 老齢マウス及び早老症マウスにおける寿命延伸効果の検証

3-1: 老齢マウスおよび早老症モデルマウス)の解析

まず、①の *in vitro* 解析で得られた肝細胞株の抗老化メカニズムをより詳細に理解するため、生体内における IGF- ATIS1 の影響を解析する。老齢マウス(現在のところ 18 月齢を想定)と若年マウス(8-12 週齢)間において肝細胞内 IGF および ATIS1 発現量、IGF- ATIS1 結合量、アルギニンによる IGF- ATIS1 結合解離効率を比較する。

3-2: ②候補因子の老齢マウス生体投与による肝細胞 IGF 分泌能への影響を解析

最初に、WT マウスへ投与し、候補薬剤の生体内動態を検討する。候補因子の血液中動態、組織指向性、肝細胞への取込み量といった項目を免疫染色やイムノブロット法により測定する。また、IGF- ATIS1 結合解離率は、血中 IGF 量を ELISA によって測定する。分泌 IGF の受容体活性化効率は IGF 受容体発現細胞株によりや細胞分裂マーカーや酸化ストレスマーカー等の免疫染色、定量的 PCR により確認する。また、この候補因子刺激が肝細胞特異的なものかどうか検討するため、Ins 感受性組織や肝臓内非実質細胞系列における ATIS1 標的因子の影響を解析する。

(2) 年度別計画

<平成 29 年度>

肝細胞における IGF- ATIS1 の作用機序を明らかにする為、IGF と ATIS1 の結合活性化ドメイン同定とそのシグナル制御機構、および肝細胞に対する機能解析を行う。さらに、IGF- ATIS1 結変異体の強制発現肝細胞株を作製し、IGF 分泌の促進剤の探索を行う。

<平成 30 年度>

前年度に行った *in vitro*、*in vivo* の解析結果をもとに、候補因子の IGF- ATIS1 機能調節による老化モデルマウスの治療効果とその作用機序を明らかにする。

(倫理面への配慮)

本研究では動物実験(2 年目以降)と組換え DNA に関する実験を行う。

動物実験に関する研究は日本学術会議「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を遵守して行う。本研究が実施する動物実験に関する研究は国立長寿医療研究センター実験動物倫理委員会の承認を得たのち研究を開始する。

組換え DNA に関する研究は「遺伝子組み換え生物等の使用等の規則による生物の多様性の確保に関する法律(カルタヘナ法)」を遵守し、国立長寿医療研究センター遺伝子組み換え実験安全委員会の承認を得たのち研究を開始する。

D 研究結果

平成29年度は主に、IGF/ATIS1のアルギニンを介したIGF分泌制御メカニズムの解析を行った。結果・進捗状況を以下に示した。

① 肝細胞におけるIGF/ATIS1のアルギニンを介した結合解離を確認した

独自に作成したアルギニン化合物を基質としたビーズを用い、ヒト肝臓由来細胞株(HepG2)の抽出液からATIS1を単離することができた。また、アルギニン飢餓状態のHepG2抽出液から免疫沈降法によりL-アルギニン濃度依存的なIGF1-ATIS1複合体解離が認められた。ATIS1-FLAG/IGF1-myc強制発現293T細胞抽出液を利用し、アミノ酸あるいはアルギニン模倣化合物によるATIS1/IGF1複合体の解離効率を比較したところ、特にL-アルギニンによる複合体の解離効率が高く、この解離効率は化合物のプラス電荷の高さに比例傾向であった。

② 肝細胞においてATIS1はアルギニン依存的なIGF1分泌を制御している

初代マウス肝細胞とHepG2では、IGF1/2がATIS1と結合し、アルギニンあるいはアルギニン模倣化合物刺激によるATIS1-IGF複合体の解離・分泌を確認できた。上記細胞を用いたIGF1/ATIS1遺伝子強制発現やATIS1に対するRNA干渉法により、ATIS1はIGF1の前駆体であるpro-IGF1と結合しており、小胞体においてIGF1の分泌を制御していることが明らかとなった。さらに、ATIS1発現細胞株に対するAMPK活性化剤刺激により、アルギニン誘導性IGF1分泌はcAMP依存的な分泌制御を受けることが分かった。また同様のシグナル経路として、IGF1の産生を促進することで代表的な成長ホルモン(GH)による刺激応答試験を行ったところ、アルギニン飢餓状態あるいはATIS1強制発現細胞においてGH誘導性IGF1分泌が減弱された。ATIS1強制発現細胞において、これらのIGF1の発現制御や分泌機構に関与する遺伝子のうちIGF1, IGFBP3, SOCS2, IGFALSはコントロールと比較して有意なmRNA発現変動は認められなかった。

③ アルギニン依存的なATIS1/IGF1結合活性化ドメインの同定

IGF1-ATIS1結合活性化ドメイン予測からC末端結合ドメイン欠損(あるいは1アミノ酸置換)変異体を作製し、ATIS1におけるIGF1結合ドメイン(E-Boxドメイン)を同定した。IGF1におけるATIS1結合ドメインの解析には、IGF1とInsのアミノ酸配列と立体構造的に高い相同性があることから、いくつかの候補ドメインを選出することができた。また、ATIS1の元来保有するグリコシルトランスフェラーゼ活性を欠損した変異体あるいは糖鎖を受けないマウス由来のIGF1の強制発現細胞により、アルギニン依存的なIGF1分泌制御にグリコシルトランスフェラーゼ活性は関与せず、糖鎖修飾から独立した分子メカニズムの存在が示唆された。

④ 肝細胞ATIS1はpro-IGF1の恒常性維持に関与している

HepG2に対するRNA干渉によりATIS1発現量を抑制したところ、細胞内IGF1量は減少する一方、細胞外へのIGF1分泌に変化はなかった。また、アルギニン飢餓状態において細胞内のpro-IGF1の存在量が上昇した。これらのことから、ATIS1のpro-IGF1の恒常性維持への影響を検討し、タンパク質合成阻害剤により、ATIS1がpro-IGF1のタンパク質

分解の抑制に寄与することが明らかとなった。ヒトユビキチン-HA、IGF1-myc、ATIS1-FLAGの共強制発現細胞からIGF1-mycの免疫沈降により、ATIS1発現細胞ではコントロールと比較してproIGF1のユビキチン化効率が減少した。これらのことから、ATIS1が何らかのタンパク質分解機構をたどり、細胞内proIGF1の品質維持に関わっている可能性が示唆された。

⑤ ATIS1によるIGF1の分泌制御と生理的意義について解析

5-1：生体内におけるATIS1を介したストレス応答の分子メカニズム解析を検討

加齢動物に関わるデータベースから若齢ラットと老齢ラットの肝臓におけるインフォマティクス解析を行ったところ、老齢ラットにおいてATIS1タンパク質発現量が1.5-2倍程度上昇していることが分かった(mRNAでは変化なし)。一方で、C57BL6j雄マウス(6週、2年齢)の肝臓におけるATIS1タンパク質発現量を比較したところ、6週に対して2年齢で1.5倍程度の上昇を確認することができた。生体内でのATIS1の機能解析を行うため、ハイドロダイナミックインジェクション法(iHTV法)によりATIS1発現DNAプラスミドをC57BL6jマウス(オス6週齢)の肝臓特異的に強制発現させたところ(LIU: Liver-inducible ATIS1-overexpressing)、コントロール群と比較して肝臓内proIGF1量の増加、そして血中IGF1(およびIGF2)の分泌量が低下していることが分かった。現在、上記マウスを使用し、絶食時あるいは再栄養化処理後(高フルクトース食)の肝臓内小胞体ストレスに対するATIS1の役割について検討を進めている。

5-2：成長ホルモン不応症または糖尿病におけるATIS1の機能解析

IGF1分泌不全を原因とする成長ホルモン不応症患者において、該当のIGF1遺伝子変異部位がInsにおけるIns-ATIS1結合部位と一致していることがわかった。現在、この候補ドメインの変異体を作製し、上記と同様の結合解離実験を検討している。

一方、興味深いことに、糖尿病患者の血液サンプルからATIS1のSNP解析を行ったところ、ATIS1 C末端ドメインに変異型を見出した。このATIS1変異体を作製し、HepG2細胞を用いて結合解離実験を行ったところアルギニンによるIGF1/ATIS1複合体の解離効率の減弱が明らかとなった(膵β細胞株におけるIns分泌効率も同様に減弱した)。

先に示した2年目の事業計画書とおり、肝細胞特異的にATIS1を安定的に発現するトランスジェニックマウスを作製し、肝細胞におけるATIS1/IGF1分泌制御機構の老化に対する生理的影響について解析を行う。

以上の結果および進捗状況から、事業計画書に沿っておおむね順調に進展している。

E. 考察と結論

これまでに我々は認知症、長寿化の原因因子の一つであるIns分泌制御機構の研究を行ってきた。最近、アルギニンをベースとした特殊磁気ビーズを作製し、アルギニンおよびIns

と結合するATIS1の単離に成功した。組換えタンパク質やATIS1遺伝子改変マウスなどの解析により、「アルギニンの競合によってIns - ATIS1複合体の解離がIns分泌を促進する」ことを明らかにした(論文投稿中)。

一方、線虫やハエにおいて Ins および IGF シグナルは長寿化シグナルとして知られており、また Ins と IGF のアミノ酸相同性、構造類似性は極めて高い。これまでの *in vitro* 解析や一過性の肝臓特異的 ATIS1 の強制発現マウスの *in vivo* 解析から、生体内において IGF も Ins と同様に肝臓 ATIS1 と結合し、アルギニンによって IGF- ATIS1 複合体解離が促進されることを明らかにしている。さらに、ATIS1 の新たな機能として小胞体内で pro 体の IGF1 と結合し、生体内の栄養状態によって IGF1 分泌を制御していることを見出した(論文投稿準備中)。これらのことから、ATIS1 は生体内の栄養状態を識別して IGF1 のホメオスタシスも維持している可能性が示唆された。しかし、この IGF 分泌制御・維持機構がどのようにして加齢に伴う疾患や老化現象に関与するのか不明である。平成 30 年度には、ATIS1 を介した IGF の維持・分泌制御機構と加齢性疾患あるいは寿命にどのように寄与するのかを明らかにし、分子メカニズムを基とした治療法の開発をおこなう。

●健康危険情報

なし

●研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし