

令和元年6月17日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05922

研究課題名(和文) 環境転写因子Nrf1による基礎抗酸化力の底上げと加齢トレンド変換

研究課題名(英文) Modulation and/or controlling of the aging event by the basic anti-oxidative response with environmental transcriptional factor Nrf1

研究代表者

辻田 忠志 (Tsujita, Tadayuki)

佐賀大学・農学部・講師

研究者番号：20622046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,000,000円

研究成果の概要(和文)：環境応答転写因子Nrf1と老化の関連について個体を主体として解析を進めてきた。特に老化モデルマウスKlothoにおいて、遺伝子改変技術を用いてNrf1の発現量を調節すると、通常は9週齢までに加速度的に老化して死亡するが、20週齢程度まで、生育させることができた。老化マウスの解析から見出した3つの老化サロゲート遺伝子それぞれについての過剰発現、および欠失体の作出を試み、特に、Serpina4とCcl4遺伝子変異体について、早老様症状を示すことを明らかにしている。また、Klothoマウスと3年以上飼育した加齢マウスの低分子代謝物の変動解析から、ポリアミン代謝経路と老化の関連を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の機能不全は老化だけではなく、数々の疾患の原因となることが知られている。環境応答転写因子Nrf1はこれらの不良タンパク質除去に効果があると近年注目されている。本研究では、老化によって蓄積することを見出したことから、Nrf1タンパク質量を是正することで老化が制御できることを遺伝的に明確にできたことは大きな成果といえる。現時点では、Nrf1の下流でどの標的遺伝子が真の老化抑制を示すことはできていないが、今後、遺伝子改変動物を用いて老化現象を明確にし、そのタンパク質を制御する化合物や食品由来天然物を取得することにより、老化抑制のコンセプトを提唱することを目指している。

研究成果の概要(英文)：We have been studying that the relationship between aging and environmental transcriptional factor, Nrf1, using genetical modified mouse and zebrafish. Especially, we have found that genetical aging model mice, Klotho-knockout mice with modulate the Nrf1 expression profile could live longer compared with single klotho knockout mice. Consequently, Klotho-/- :: Nrf1-knockdown mice were lived 20 weeks after birth. From those experiment we have identified 9 aging surrogate genetical marker which can explain the aging stage. We have tried to generate overexpress and/or knockout zebrafish model for those genes. As a consequence, we have already identified that serpin4 and ccl4 knockout fish showed early aging phenotype. In addition, from metabolomic analysis compared with wild type, klotho knockout mouse and natural aging mice (over 3-years-old), we have identified that polyamine pathway have a several contribution to prevention of the aging phenotype.

研究分野：老化、遺伝子改変動物

キーワード：老化 酸化ストレス Nrf1

1. 研究開始当初の背景

栄養状態と公衆衛生の改善により、寿命は飛躍的に伸びたが、がん、神経変性疾患、脂肪肝、糖尿病、骨粗鬆症など加齢依存性の老年性疾患を罹患する高齢者が増えている。本邦は世界一の超高齢化社会構造（平成 26 年総務省情報通信白書 第 1 部）のため、病的老化を防止した「健全な老い」の実現は、活力ある社会の形成のみならず、保険医療費の削減に資する。

2. 研究の目的

加齢により、個体全体の酸化ストレス処理能力が弱まるが、その分子機構は明快ではない。申請者は、加齢モデルマウスにおいて Nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 1 (Nrf1) タンパク質が著明に蓄積する事実から、加齢モデルマウスにおいて Nrf1 の量を遺伝的に減少させた複合遺伝子改変マウスを作出したところ、著明な寿命延長効果を認めた。Nrf1 はエネルギー産生の亢進に働くが、副産物の活性酸素種 (ROS) の解毒に関与する抗酸化酵素群を発現抑制してしまうため、老化による Nrf1 蓄積が ROS 蓄積に直結すると予想される。本研究では Nrf1 の制御によって老化の改善方策を遺伝学的に検証し、Nrf1 を効果的に活性調整する手法を開発して抗酸化力の低下を補助し、加齢性疾患の発症リスク低減を目指した。

3. 研究の方法

(1) Nrf1 による老化改善・増悪効果の遺伝学的検証

代表的な早期老化モデルである *Klotho* 欠失マウスと *Nrf1* を過剰発現する (*Nrf1-Tg*) マウスおよび *Nrf1* 発現減少マウス (*Nrf1-KD*) それぞれと交配して生育および寿命改善効果について確認する。具体的には、*Klotho*<sup>-/-</sup>::*Nrf1-Tg* および *Klotho*<sup>-/-</sup>::*Nrf1-KD* マウス個体で Nrf1 調節効果を検証する。

(2) 老化によって変動する Nrf1 直接標的遺伝子の探索

老齢野生型マウス、*Klotho*<sup>-/-</sup> マウスから mRNA を回収し、RNA の発現変動解析を実施する。同時に、Nrf1 および Nrf2 の ChIP-seq 解析を実施して、Nrf1 および Nrf2 が直接発現調節に関与している遺伝子群を明確にする。その後、加齢との連関をパネル化する。

(3) Nrf1 依存性加齢サロゲートマーカーの探索

老化の表現系において最も両極端の表現系を示す遺伝子改変マウス *Klotho*<sup>-/-</sup>::*Nrf1-Tg* と老化に抵抗性を示す *Klotho*<sup>-/-</sup>::*Nrf1-KD* マウスから、タンパク質、脂質、低分子代謝物の変動を比較する。

4. 研究成果

(1) 老化は Nrf1 の発現抑制で防止が可能となる。

老化を加速させる活性酸素種 (ROS) を無毒化する抗酸化酵素群は、抗酸化応答配列に結合する NF-E2-related factor (Nrf) 転写因子群により発現が制御される。この一群の中で、Nrf2 はもっとも強力に抗酸化酵素群を誘導できる転写活性化因子である。一方で、Nrf1 には過剰な抗酸化応答を抑制する側面があり、Nrf2 と協調して抗酸化機構を制御することを実証してきた。当初、Nrf2 を誘導することで老化防止に貢献できると予想し、外来 Nrf2 誘導剤 (サルフォラフェン) の継続投与や *Keap1* 発現抑制マウスを活用して、早期老化モデルマウスである *Klotho*<sup>-/-</sup> マウスに介入を試みてきたが、寿命延伸効果は観察できなかった。その過程で、*Klotho*<sup>-/-</sup> マウスにおいて Nrf1 タンパク質が著明に蓄積していることを見出し、老化と基礎酸化ストレス応答機構の間に連関があるのではないかと仮説を立てた。この仮説を実証するために、早期老化モデルである *Klotho*<sup>-/-</sup> と *Nrf1* 発現減少マウス (*Nrf1-KD*) を交配した、*Klotho*<sup>-/-</sup>::*Nrf1-KD* (n=12) は *Klotho*<sup>-/-</sup> の平均余命 (8-9 週) よりも有意に長く生きる (20 週前後) ことを発見し、*Nrf1* を抑制することで老化を予防できる可能性を見出した。

現時点では、20 週を過ぎると、全例死亡するために、劇的な老化の進行を遅延することはできるが、*Serpinal* の欠失マウスのように、*Klotho* 欠失の効果を完全にリセットできるものではなかった。原因としては、今回使用した、*Nrf1* 発現減少マウスは 20% 程度の発現減少にとどまるので、現在、50% および 70% の Nrf1 の発現が減少するマウスと交配することで、寿命延伸効果を観察している。

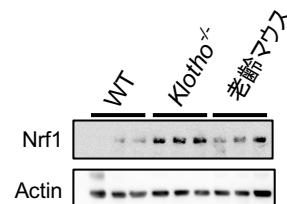


図 1, *Klotho* 欠失および老齢マウスにおいては Nrf1 タンパク質が蓄積する。

(2) 老化を防止できる Nrf1 直接標的遺伝子の探索

老齢野生型マウスと Nrf1 欠失マウス肝臓でマイクロアレイ解析を実施し、2 倍以上変動する遺伝子（老齢野生型マウスでは 153 遺伝子、Nrf1 欠失マウスでは 4,810 遺伝子）を抽出して、共通して変動する 61 遺伝子を見出した。Nrf1 が制御配列に直接結合して制御するかについて判断するために、Nrf1 の特異的抗体を用いて、ChIP-seq 解析を実施することによって樹立したパネルを活用した。その結果、*Serpina4*、*Ccl4* および *Mt1*、3 つの遺伝子が Nrf1 の制御下で老化防止に関与する遺伝子として見いだすことができた。現在、この 3 つの遺伝子をゼブラフィッシュ個体において欠失および過剰発現させて解析を行っている。予備的な解析では、*Serpina4*、*Ccl4* 欠失体では早老様症状を示すことが明らかになりつつある。ゼブラフィッシュはこれらの遺伝子のオールソログ他に持つ可能性がゲノム情報から予想されており、これらすべての遺伝子の欠失体樹立を進めている。同時に、数ラインの過剰発現体を樹立して、体内酸化ストレス状態等に焦点を当て解析を進めている。

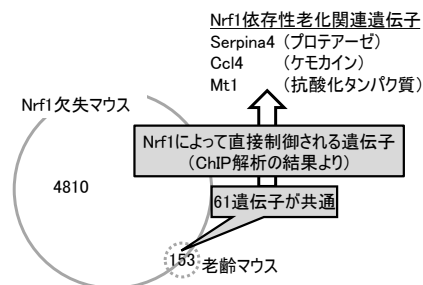


図 2. Nrf1 欠失マウスと老齢マウスにおいて共通変動する遺伝子から、Nrf1-ChIPseq 解析の結果を用いて、Nrf1 依存性老化関連遺伝子を見出した。

(3) Nrf1 に依存する加齢サロゲートマーカーの探索

野生型（8 週齢）、*Klotho* 欠失マウス（8 週齢）、老年マウス（3 年齢）の肝臓を回収して、メタボロミクス解析を実施した。その結果、ポリアミンの代謝経路において *Klotho* 欠失マウスおよび老年マウスに変化を認めた。遺伝子発現変動解析の結果、不可逆的なタンパク質変性をもたらすアクロレインの蓄積が予想された。アクロレインは非常に反応性が高いため、直接の検出ができないので、細胞内アクロレイン抱合タンパク質量の測定を行なった。その結果、野生型に対して、*Klotho* 欠失マウス、老年マウスにおいては、著明なアクロレイン化タンパク質の蓄積を認め、加齢サロゲートマーカーとなることが示唆された。現在、これらのマウスから得られた血清成分においても、アクロレインを始め、各種融合タンパク質の網羅的解析を通して、非侵襲的加齢マーカータンパク質の開発に取り組んでいる。

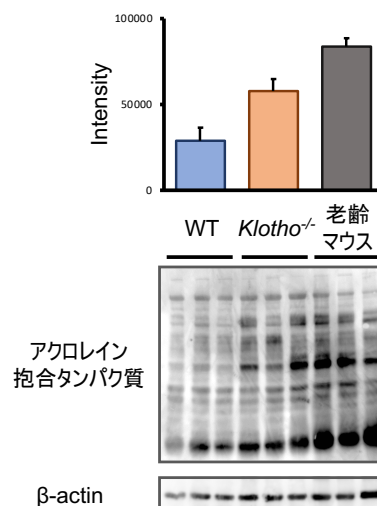


図 3. 野生型に対して、*Klotho* 欠失マウス、老年マウスにおいては、著明なアクロレイン抱合タンパク質の蓄積を認めた。

(4) 老化を制御する Nrf1 調節化合物の開発

Nrf1 の発現を抑制することで老化を防止できることが、遺伝改変マウスから示唆された。そこで、薬理的に Nrf1 の活性を調節するために、Nrf1 の活性化経路の分子メカニズム解析を進めた。Nrf1 は 2 型膜タンパク質として小胞体に局在している。転写活性化ドメインは小胞体ルーメン側に向いているため、Nrf1 が転写活性を發揮するために核に移行するためにはいくつかのステップが必要なが示唆されていた。最近、AAA-ATPase の p97 によって、小胞体ルーメン側から細胞質側に引き出されたのちに、アスパラギン酸プロテアーゼドメイン、DDI-2 によって N 末端が切断され、核へ移行することが明らかとなった。一方で研究代表者は、Nrf1 を特異的に安定化できる化合物 T1-20 の開発に成功しており、この化合物のプローブ化に取

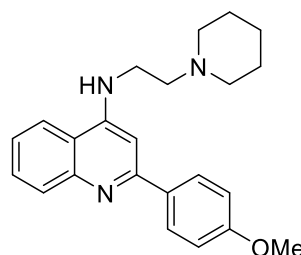


図 4. Nrf1 特異的活性化化合物 T1-20 の構造。

り組んだ。修飾基にはアジド基を採用し、T1-20 を改変することを試した。数種のプローブ化合物の中から、Nrf1 を強力に安定化できる化合物を得ることができた。すでに、プローブ化 T1-20 に相互作用するタンパク質の同定に着手し、いくつかの候補タンパク質を見出している。現在、これらの遺伝子を破壊するなどした培養細胞で Nrf1 の挙動を確認している。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Sekine H, Okazaki K, Kato K, Alam MM, Shima H, Katsuoka F, Tsujita T, Suzuki N, Kobayashi A, Igarashi K, Yamamoto M and Motohashi H. O-GlcNAcylation signal mediates proteasome inhibitor resistance in cancer cells by stabilizing NRF1. *Mol Cell Biol*, 38, e00252-18 / Epub 2018 June 25. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00252-1> (査読あり)
2. Mukaigasa K<sup>¶</sup>, Tsujita T<sup>¶</sup>, Nguyen VT<sup>¶</sup>, Li L<sup>¶</sup>, Yagi H, Fuse Y, Nakajima-Takagi Y, Kato K, Yamamoto M, Kobayashi M. Nrf2 activation attenuates genetic endoplasmic reticulum stress induced by a mutation in the phosphomannomutase 2 gene in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 115, 2758-2763 (2018) / Epub 2018 Feb 22. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1714056115>. <sup>¶</sup>co-first author (査読あり)
3. Tsuchida T<sup>¶</sup>, Tsujita T<sup>¶</sup>, Hayashi M, Ojima A, Keleku-Lukwete N, Katsuoka F, Otsuki A, Kikuchi H, Oshima Y, Suzuki M, Yamamoto M. Halofuginone enhances the chemo-sensitivity of cancer cells by suppressing NRF2 accumulation. *Free Radic Biol Med* 103, 236-247 (2017) / Epub 2016 Dec 28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.041>. <sup>¶</sup>co-first author (査読あり)
4. Baird L, Tsujita T, Kobayashi E, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, and Yamamoto M. A Homeostatic Shift Facilitates Endoplasmic Reticulum Proteostasis through Transcriptional Integration of Proteostatic Stress Response Pathways. *Mol Cell Biol* 37, e00439-16 (2017) / Epub 2016 Dec 6. <https://doi.org/10.1128/MCB.00439-16>. (査読あり)
5. 辻田 忠志. Nrf1 (NFE2L1) の転写抑制能による細胞内チオール量および脂肪酸代謝制御, 生化学 (日本生化学会) **88**, 776-781 (2016) / <https://doi:10.14952/SEIKAGAKU.2016.880776>

[学会発表] (計 11 件)

- 1 谷内 めぐみ, 井口 瑤子, 辻田 忠志. 肝特異的 Nrf1 欠失マウスにおける NAFLD とアクロレイン化タンパク質の関連解析, 日本ポリアミン学会第 10 回年会. 山中座, 加賀, 2018 年 12 月 7-8 日 (口頭発表) 講演要旨集 p14
- 2 谷内 めぐみ, 井口 瑤子, 辻田 忠志. 肝特異的 Nrf1 欠失マウスにおいて非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) を誘導する代謝経路の探索. 第 42 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム. ホテル龍登園, 佐賀, 2018 年 8 月 29-31 日 (ポスター発表, P-19) 講演要旨集 p48 優秀ポスター賞受賞
- 3 辻田 忠志. 転写因子 Nrf1 による生体恒常性維持機構の解明, 第 32 回 HiHA (広島大学健康長寿研究拠点) セミナー, 広島大学先端科学総合研究棟 3 階 302S 会議室, 東広島, 2018 年 7 月 31 日
- 4 谷内めぐみ, 井口瑤子, 辻田忠志. Nrf1 欠失マウス肝において非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) を誘導する代謝経路の探索, 日本農芸化学会 2018 年度大会. 名城大学天白キャンパス, 名古屋, 2018 年 3 月 16-18 日 (ポロ頭発表, 2A23a13) 大会プログラム集 p64
- 5 福元 雄大, 辻田 忠志, 川口 真一. ストレス応答転写因子 Nrf1 を特異的に安定化する誘導剤の探索. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会. 神戸ポートアイランド, 神戸, 2017.12.6-9 / 3PT04-13 (一般口頭発表), 3P-0496 (ポスター)
- 6 辻田 忠志. Functional analysis and advanced application for drug discovery with environmental response transcriptional factors, 第 6 回脳科学セミナー, 青山学院大学相模原キャンパス, 相模原, 2017 年 9 月 12 日

- 7 谷内 めぐみ, 井口 瑤子, 辻田 忠志. 肝特異的 Nrf1 欠失マウスにおいて炎症を誘引する代謝経路の探索, 第 41 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム. 休暇村南阿蘇, 高森, 2017 年 8 月 31 日-9 月 2 日 (ポスター発表, P-07) 講演要旨集 p40
- 8 福元 雄大, 川口 真一, 辻田 忠志. Nrf1 を特異的に安定化する既存薬の探索. 第 41 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム. 休暇村南阿蘇, 高森, 2017 年 8 月 31 日-9 月 2 日 (ポスター発表, P-24) 講演要旨集 p57
- 9 Tadayuki TSUJITA, Possible link and future direction between stress transcriptional factor Nrf1/2 and NGLY1, 4<sup>th</sup> Global NGLY1 Conference Palo Alto, CA, 27-28 July 2017
- 10 福元雄大, 辻田 忠志, ストレス応答転写因子 Nrf1 を特異的に活性化する誘導剤の探索. 平成 29 年度日本生化学会九州支部例会, 宮日会館・宮崎大学清武キャンパス, 宮崎, 2017.5.13-14 O19 (口頭発表), P35 (ポスター発表) 講演要旨集 p48 優秀ポスター賞受賞
- 11 辻田 忠志, Liam Baird, 古澤 祐樹, 勝岡 史樹, 彭 よしか, 後藤 智美, 川口 真一, 山本 雅之. Nrf1 タンパク質の活性化状態を直接モニターできるレポーター培養細胞による大規模化合物スクリーニングと Nrf1 に特異的な活性化化合物の創出, 第 89 回日本生化学会大会. 仙台, 2016.9.25-27 / 3T17-02 (一般口頭発表), 3P-336 (ポスター)

[その他]

ホームページ等

<https://researchmap.jp/tadatsujita/>

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。