

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2019

課題番号：16KK0195

研究課題名（和文）代謝制御における酸化ストレスの役割の解明（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Roles of oxidative stress in metabolic regulations(Fostering Joint International Research)

研究代表者

宇留野 晃 (Urano, Akira)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・准教授

研究者番号：90396474

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,500,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：糖尿病は重篤な合併症を引き起こす疾患であるが、酸化ストレスとの関連が強い。酸化ストレスの制御に関わる転写因子としてCNC因子のNrf2およびNrf1が知られているが、これらの転写因子は抗酸化酵素、解毒代謝酵素、プロテアソームサブユニットなどに加えて、代謝系酵素の遺伝子発現も制御している。線虫のCNC因子であるskn-1は同一遺伝子からスプライスバリエーションとしてNrf2やNrf1のオルソログを発現する。線虫におけるRNAiによるskn-1ノックダウンおよびskn-1欠損モデルの代謝解析を実施したところ、脂質の組成や運動能の変化を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病は患者数は増加しており、その病態の解明は重要な課題である。高濃度グルコースは酸化ストレスを発生させることから、糖尿病は酸化ストレスと関連が強い疾患と考えられているが、酸化ストレスと代謝制御の関連は十分には解明されていない。本研究では、酸化ストレスに関するCNC因子ファミリー転写因子であるskn-1による代謝制御を解明することで、酸化ストレスと代謝制御の関連性について明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Diabetes causes serious complications, and it is strongly associated with oxidative stress. Transcription factors Nrf2 and Nrf1 belonging to the CNC factor family are known as transcription factors related to oxidative stress, and they also regulate the expression of metabolic genes in addition to antioxidant enzymes, detoxifying metabolic enzymes, proteasome subunits. Since metabolic analysis of Nrf1-deficient mice is technically difficult, nematodes orthologue skn-1 in Nrf1 and Nrf2 was focused on. Knockdown of skn-1 by RNAi and metabolic analysis of skn-1a deficient model were performed. These had different lipid compositions. Furthermore, analysis of the motor ability revealed that it changed.

研究分野：生化学

キーワード：酸化ストレス 代謝制御 Nrf1 Nrf2 skn-1 線虫

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は重篤な合併症を引き起こす疾患であるが、我が国においても、国民の生活パターンの変化から患者数は増加しており、その病態の解明は重要な課題である。高濃度グルコースは酸化ストレスを発生させることから、糖尿病は酸化ストレスと関連が強い疾患と考えられている。

転写因子 Nrf2 (Nuclear factor erythroid- related factor 2) は、酸化ストレス応答性に活性化し、抗酸化酵素や解毒代謝酵素の遺伝子発現を制御する転写因子である。また、Nrf2 と同じファミリーの CNC 因子群である Nrf1 (Nuclear factor erythroid-2-related factor 1)は、プロテアソームサブユニットや抗酸化酵素の遺伝子発現を制御している。Nrf2 と Nrf1 は、それぞれ同じ DNA 結合配列に結合し、複数の代謝系酵素の発現も制御していることから、酸化ストレスと代謝の関連を解明する上で重要である。しかし、Nrf2 を活性化モデルマウスでは糖尿病発症は予防され、Nrf1 過剰発現マウスでは逆に高血糖が発症するなど、その代謝制御における役割は複雑であったことから、酸化ストレスの代謝制御における役割を解明するためには、さらなるモデルが必要であった。

2. 研究の目的

酸化ストレスと代謝の関連を解明するためには、その鍵となる転写因子群である CNC 因子の役割を同定する必要がある。CNC 因子には、Nrf1、Nrf2、Nrf3 などが含まれている。ところが、マウスにおける Nrf1 欠損は胎生致死であることや、組織特異的欠損モデルも含めて代謝解析には技術的な困難があった。そこで、モデル動物として線虫 *C. elegans* に着目した。

C. elegans における Nrf2 および Nrf1 のオルソログは、skn-1 と呼ばれ、1つの遺伝子座からスプライスバリエーションとして複数の skn-1 のサブタイプが発現することが特徴である。その中の一つである skn-1a は、哺乳類の Nrf1 のオルソログと考えられており、全身性欠損モデルも解析が可能である。また、*C. elegans* は、RNAi を利用した個体レベルでの遺伝子ノックダウンが容易であるが、skn-1 のノックダウンも利用可能であることから、*C. elegans* における skn-1 および skn-1a の代謝制御における役割を解明を目指す本研究を立案した。

3. 研究の方法

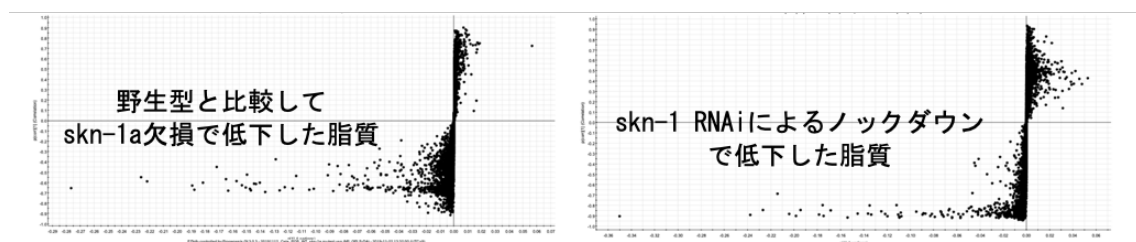
C. elegans における CNC 因子のオルソログである skn-1 の変異モデルで引き起こる代謝変化について検討した。野生型線虫に skn-1 RNAi を導入したノックダウンモデルおよび、ゲノム編集による skn-1a 欠損モデルを解析した。また、質量分析による代謝物解析を実施した。

4. 研究成果

米国ジョスリン糖尿病センターの Keith Blackwell 教授の研究室にて線虫 *C. elegans* に関する研究を実施した。線虫増殖培地の調整や大腸菌株の取り扱いを含めた基本的飼育方法を習得し、さらに線虫を用いた、各種基本的な解析方法を習得した。さらに、*C. elegans* を飼育し、各成長段階の個体を準備し、質量分析イメージングおよび LC-MS 解析に適した線虫の採取方法を考案した。各種成長段階で取り扱いの注意点が大きく異なることから、それぞれの段階に適した採取方法を複数種類検討して *C. elegans* を採取して保存した。skn-1a 欠失の線虫を飼育し、孵化後 2 日目、3 日目、7 日目に採取した。加えて skn-1 ノックダウンベクターを調整し、*C. elegans* に対して同ベクターを導入して skn-1 ノックダウン線虫を作出し、孵化後 2 日目および 3 日目に採取した。

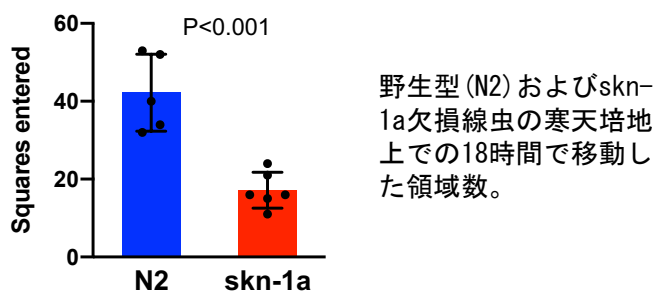
上記のジョスリン糖尿病センターにおける実験で採取した野生型、skn-1 欠失、skn-1 ノックダウン線虫を東北大学にて LC-MS によるメタボローム解析を実施したところ、skn-1 欠失および skn-1 ノックダウンの両方で脂質の組成の変化を認めた (図 1)。

図1 リピドミクス解析



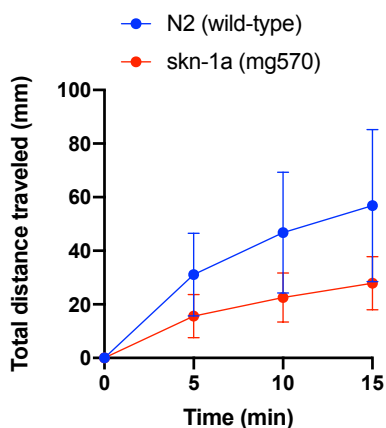
代謝変化の結果が生体の機能に及ぼす影響を調べるために、運動能を解析した。*C. elegans* が 18 時間運動および 15 分間運動について、各種パラメータを測定して、運動について評価を行った。野生型と比較して、*skn-1a* 欠失 *C. elegans* では、寒天培地上での 18 時間の移動が大きく低下しており、長時間における線虫の運動量の減少を認めた (図 2)。

図2 18時間の運動量



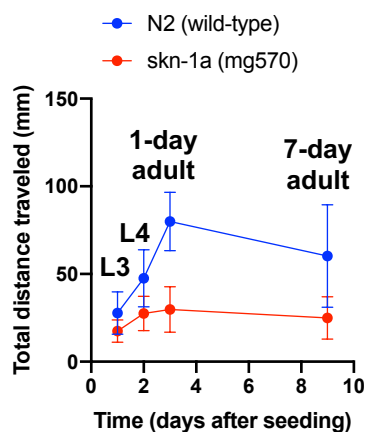
開始点からの 15 分間の放射状移動距離もついても野生型 (N2) と *skn-1a* 欠失線虫の間で有意な変化を認めなかったが、開始点からの 15 分間の移動距離について、運動開始 5 分以降で、*skn-1a* 欠失で低下していたことから、*skn-1a* が短時間の運動量に貢献していることが明らかとなった (図 3)。さらに、線虫の発達と 15 分間の移動距離の関連を評価した。L3、L4、1-day adult、7-day adult を用いて、15 分間の移動量を評価したところ、野生型では L3 と比較して、L4、1-day adult と成長の間に移動距離が大幅に伸びていたが、*skn-1a* 欠失ではその増加が緩やかであった (図 4)。

図3 15分間の運動量の比較



L4 wormsを用いて、寒天培地上における15分間の移動距離を計測した。

図4 線虫の発達と15分間運動量の関連



L3、L4、1-day adult、7-day adultにおける寒天培地上における15分間の移動距離を計測した。

以上から、*skn-1* が脂質代謝および運動に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Rashad S, Saigusa D, Yamazaki T, Matsumoto Y, Tomioka Y, Saito R, Uruno A, Niizuma K, Yamamoto M, Tominaga T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Metabolic basis of neuronal vulnerability to ischemia; an in vivo untargeted metabolomics approach.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 6507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-63483-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Uruno A, Matsumaru D, Ryoke R, Saito R, Kadoguchi S, Saigusa D, Saito T, Saido TC, Kawashima R, Yamamoto M	4. 巻 40
2. 論文標題 Nrf2 Suppresses Oxidative Stress and Inflammation in App Knock-In Alzheimer's Disease Model Mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Cell Biol	6. 最初と最後の頁 e00467-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00467-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saigusa D, Saito R, Kawamoto K, Uruno A, Kano K, Aoki J, Yamamoto M, Kawamoto T.	4. 巻 91
2. 論文標題 Conductive Adhesive Film Expands the Utility of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anal Chem	6. 最初と最後の頁 8979-8986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.9b01159	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kurosawa R, Satoh K, Kikuchi N, Kikuchi H, Saigusa D, Al-Mamun EA, Siddique MAH, Omura J, Satoh T, Sunamura S, Nogi M, Numano K, Miyata S, Uruno A, Kano K, Matsumoto Y, Doi T, Aoki J, Oshima Y, Yamamoto M, Shimokawa H.	4. 巻 125
2. 論文標題 Identification of Celastramycin as a Novel Therapeutic Agent for Pulmonary Arterial Hypertension-High-throughput Screening of 5,562 Compounds.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circ Res	6. 最初と最後の頁 309-327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCRESAHA.119.315229	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Rashad S, Niizuma K, Saigusa D, Han X, Sato-Maeda M, Saito R, Uruno A, Fujimura M, Ikawa S, Yamamoto M, Tominaga T.	4. 巻 384
2. 論文標題 Intracellular S1P Levels Dictate Fate of Different Regions of the Hippocampus following Transient Global Cerebral Ischemia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 188-202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2018.05.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Abe T, Niizuma K, Kanoke A, Saigusa D, Saito R, Uruno A, Fujimura M, Yamamoto M, Tominaga T.	4. 巻 58
2. 論文標題 Metabolomic Analysis of Mouse Brain after a Transient Middle Cerebral Artery Occlusion by Mass Spectrometry Imaging.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurol Med Chir (Tokyo)	6. 最初と最後の頁 384-392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/nmc.oa.2018-0054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato K, Saigusa D, Saito R, Fujioka A, Nakagawa Y, Nishiguchi KM, Kokubun T, Motoike IN, Maruyama K, Omodaka K, Shiga Y, Uruno A, Koshiba S, Yamamoto M, Nakazawa T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Metabolomic changes in the mouse retina after optic nerve injury.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 11930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-30464-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yagishita Y, Uruno A, Chartoumpakis DV, Kensler TW, Yamamoto M.	4. 巻 未定
2. 論文標題 Nrf2 represses the onset of type 1 diabetes in non-obese diabetic mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Endocrinol	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JOE-18-0355	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamaguchi-Kabata Y, Yasuda J, Uruno A, Shimokawa K, Koshiba S, Suzuki Y, Fuse N, Kawame H, Tadaka S, Nagasaki M, Kojima K, Katsuoka F, Kumada K, Tanabe O, Tamiya G, Yaegashi N, Kinoshita K, Yamamoto M, Kure S; Tohoku Medical Megabank Project Study Group.	4. 巻 240
2. 論文標題 Estimating carrier frequencies of newborn screening disorders using a whole-genome reference panel of 3552 Japanese individuals.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hum Genet	6. 最初と最後の頁 403-416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00439-019-01998-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Higashi C, Kawaji A, Tsuda N, Hayashi M, Saito R, Yagishita Y, Suzuki T, Uruno A, Nakamura M, Nakao K, Furusako S, Yamamoto M.	4. 巻 802
2. 論文標題 The novel Nrf2 inducer TFM-735 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 76-84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2017.02.044.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yagishita Y, Uruno A, Fukutomi T, Saito R, Saigusa D, Pi J, Fukamizu A, Sugiyama F, Takahashi S, Yamamoto M	4. 巻 18
2. 論文標題 rf2 improves leptin and insulin resistance provoked by hypothalamic oxidative stress.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2030-2044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2017.01.064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Akira Uruno and Masayuki Yamamoto
2. 発表標題 The multiple functions of Nrf2 in diabetes mellitus and obesity.
3. 学会等名 The Environmental Response V, 17th JBS Biofrontier Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yexin Liu, Akira Uruno, Masayuki Yamamoto
2. 発表標題 The role of Nrf2 in diabetic kidney disease.
3. 学会等名 The Environmental Response V, 17th JBS Biofrontier Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小暮真奈、平田匠、土屋菜歩、中村智洋、宮川健、小清水宏、小原拓、目時弘仁、宇留野晃、菊谷昌浩、菅原準一、栗山進一、辻一郎、呉繁夫、竇澤篤
2. 発表標題 高血圧に対する尿ナトカリ比の目標値の検討：東北メディカル・メガバンク計画コホート調査の成果から
3. 学会等名 第42回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇留野晃
2. 発表標題 The Keap1-Nrf2 system and oxidative damage in diabetes mellitus
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宇留野晃、柳下陽子、山本雅之
2. 発表標題 Nrf2は1型糖尿病モデルNODマウスの糖尿病発症を抑制する
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第84回例会・シンポジウム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 生体組織上の還元型グルタチオン分布を測定する方法及び診断用データの取得方法	発明者 山本雅之、宇留野 晃、三枝大輔、齋藤 律水	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-122085	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ブラックウェル ケース (Blackwell Keith)	ジョスリン糖尿病センター・研究部門・教授	