

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08581

研究課題名(和文)酸化ストレスと寿命及びNrf2の新規ユビキチンリガーゼSiah2の働き

研究課題名(英文) New regulation mechanism of Nrf2 (SKN-1) and Effects of these factors on lifespan elongation.

研究代表者

今岡 進 (Imaoka, Susumu)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号：60145795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳動物における酸化ストレス応答因子Nrf2は通常の制御因子Keap1以外にWDR23がその発現量を制御していることを明らかにした。ビスフェノールA(BPA)とクロロゲン酸(CGA)はNrf2や線虫の相同因子SKN-1(SK-1の発現量が線虫の寿命に影響を与えることを明らかにしている)を誘導することを明らかにしているが、線虫の寿命については逆の効果を示すことを見出した。当該研究では哺乳動物においてBPAはKeap1を介してNrf2を増加させ、CGAはWDR23を介してNrf2を誘導することを明らかにした。このメカニズムの違いが両化合物の線虫の寿命への影響の違いであると推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸化ストレスはがん、糖尿病、脳神経変性疾患(Alzheimer病など)の病態や成因と深く関わっていると考えられている。当該研究では、酸化ストレス応答の鍵因子であるNrf2の発現を調節している新規因子を明らかにした。線虫を用いて酸化ストレスと寿命の関係を検討し、酸化ストレス(あるいは応答因子SKN-1)が寿命と深く関わっていることを解明し、このメカニズムについて検討し、その一部を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Nrf2 is a main regulator of cellular redox homeostasis and is regulated by Keap1. In this study, we proved that WDR23 as well as Keap1 regulated Nrf2 in mammalian cell. BPA and CGA induced Nrf2 in mammalian cell and SKN-1 in C.elegans. CGA but not BPA increased the lifespan of C. elegans. BPA induced Nrf2 by Keap1 inactivation and CGA induced Nrf2 by decrease of DDB-1, a factor of WDR23 system. Although both BPA and CGA induced SKN-1 which contributes to elongation of lifespan, differences in elongation of lifespan by both compounds may be due to difference in the mechanism behind the induction of SKN-1.

研究分野：環境生理学

キーワード：ビスフェノールA クロロゲン酸 酸化ストレス Nrf2 (SKN-1) 線虫 寿命

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスは我々が日常的にさらされるストレスであり、日本人の多くが罹患する病気である糖尿病、がん、心筋梗塞をはじめとする血管病変において、病態と深く関わっている。虚血・再灌流障害に代表されるように、低酸素状態と酸化ストレス状態は表裏一体あるいは連続して起こる現象である。一方で、ミトコンドリアの活性化と寿命が反比例するなど、活性酸素の生成は寿命や病気に大きく関わっているとされている。Nrf2 は酸化ストレス応答に働く鍵因子であり、ヘムオキシゲナーゼやNQO-1などの抗酸化因子を誘導して、酸化ストレスを緩和する働きがある。Nrf2 は非ストレス下ではユビキチンリガーゼのアダプタータンパク質である Keap1 によってトラップされ、ユビキチン化され、プロテアソーム系で分解されていることが明らかにされている。申請者らは Nrf2 の新規ユビキチンリガーゼ Siah2 を発見し、心筋梗塞や脳梗塞において引き起こされる虚血時における低酸素下での Nrf2 発現量低下のメカニズムを明らかにした。当時線虫においても Siah2 が SKN-1(Nrf2 の相同因子)と考えていたが、研究を進めるにつれ、線虫では Keap1 の相同因子は存在せず、変わって WDR23 が SKN-1 の発現制御には重要であることが明らかとなり、Siah2 ではなく WDR23 について検討を行った。

2. 研究の目的

酸化ストレスに関わる因子として Nrf2 が注目されている。当該研究では病態時における Nrf2 の役割と酸化ストレスあるいは Nrf2 発現量が寿命に与える影響を解明することを目的として、研究項目(1)WDR23 による Nrf2 の発現制御の検討(2)Nrf2 を発現制御できる化学物質の探索とその制御メカニズムの検討(3)線虫を用いた酸化ストレス及び Nrf2 発現が寿命に与える影響、を実施する。当該研究は Nrf2 の新規発現調節タンパク質因子及び化合物さらにそれらが働く機構を解明することで Nrf2 の病態時における機能解明さらには治療薬開発に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

哺乳動物細胞としてはヒト肝がん細胞 Hep3B, 子宮頸がん細胞 HeLa を用いた。Western blotting, 免疫沈降に使用したヒト Nrf2, WDR23, 線虫 SKN-1 抗体は研究室で自作した。

4. 研究成果

(1) WDR23 による Nrf2 の発現制御の検討

哺乳動物 Nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2 (Nrf2)は通常ユビキチンリガーゼアダプタータンパク質である Kelch like ECH associated protein 1(Keap1)によって発現調節されている。一方、線虫においては Keap1 の相同因子は存在せず WDR23 が SKN-1(Nrf2 の相同因子)の発現調節をしていると考えられている。そこで Hep3B 細胞に WDR23 が蛋白質レベルで存在しているかどうかを Western blotting で明らかにした(図1)。一方、WDR23 は isoform 1 と 2 からなることを見出し、それぞれ過剰発現したが、過剰発現効果は少なく、Keap1 ノックダウン状態で Nrf2 の減少が観察され、哺乳動物においては Keap1 の活性が低い状況で WDR23 が補助的に Nrf2 の量を調節していることが示唆された(図1)。

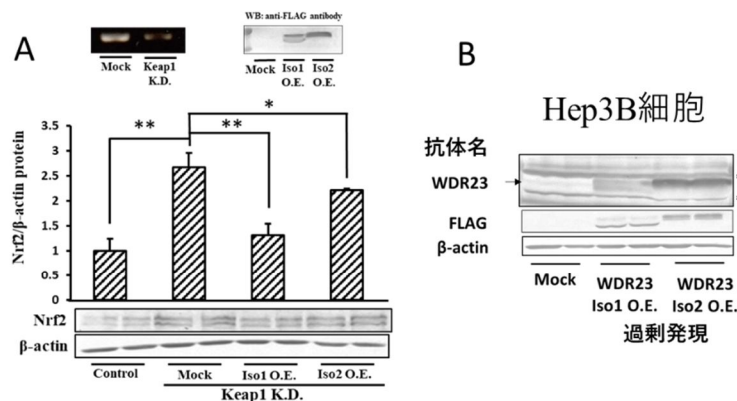


図1 内在性WDR23とその過剰発現がNrf2の発現量に及ぼす影響
 A) Keap1 ノックダウン (KD)におけるWDR23 isoform 1,2のNrf2発現量に及ぼす影響 B) Flag-WDR23の過剰発現の確認と内在性WDR23の検出

(2) Nrf2 を発現制御できる化学物質の探索とその制御メカニズムの検討

環境化学物質である BPA とコーヒーに含まれるポリフェノールである CGA はどちらも Nrf2 の発現量を増加させる。後に述べるように、線虫においても Nrf2 相同因子 SKN-1 の増加を誘導するが、CGA は寿命を延長するのに対して、BPA は寿命を短縮させる。一方、申請者らは SKN-1 の発現量が、線虫の寿命を決定することを明らかにしており、哺乳動物細胞を用いて、BPA と CGA による Nrf2 発現誘導メカニズムの違いについて検討した。その結果、BPA は IP₃ 受容体と直接的に相互作用することで細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させ、それによって一酸化窒素合成酵素 (NOS) が活性化され、NO ラジカルが Keap1 を不活化することで、Nrf2 の量を上昇させていることが明らかとなった(図 2)。

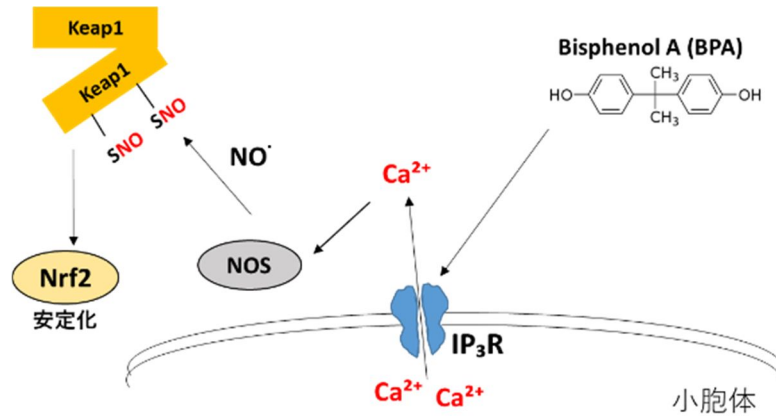


図 2 BPAによるNrf2安定化のメカニズム

CGA については Keap1 には影響を及ぼさず、WDR23 系に影響を及ぼしていることを見出した。特にその中の因子の一つである DDB-1 の発現量を低下させることで WDR23 の活性を抑制し、その結果 Nrf2 が増加していることを明らかにした。CGA が DDB-1 を低下させるメカニズムについては現在検討中である(図 3)。

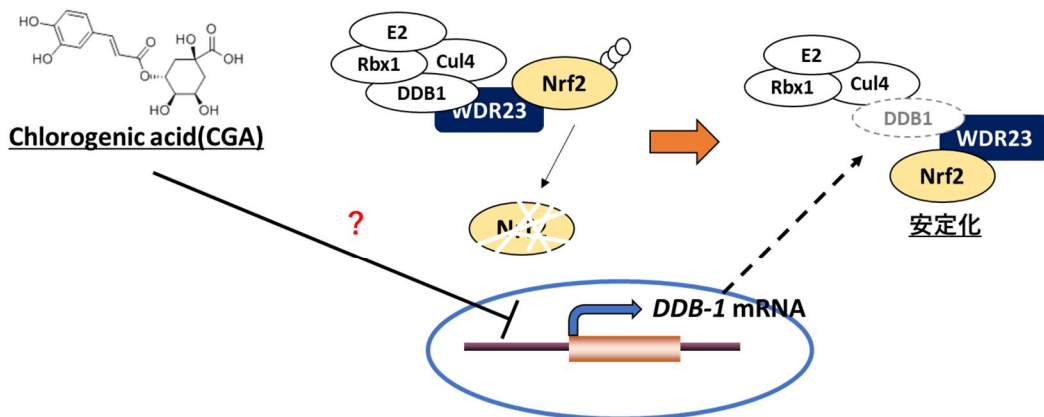


図 3 CGAによるNrf2安定化メカニズム

(3) 線虫を用いた酸化ストレス及び SKN-1 (Nrf2 の相同因子) 発現が寿命に与える影響

BPA, CGA が線虫における Nrf2 のホモログである SKN-1 に与える影響について検討を行ったところ、BPA や CGA は SKN-1 発現量を増加させた。しかし、その一方で、CGA は寿命を延長させたが BPA は寿命を短縮させた (図 4)。

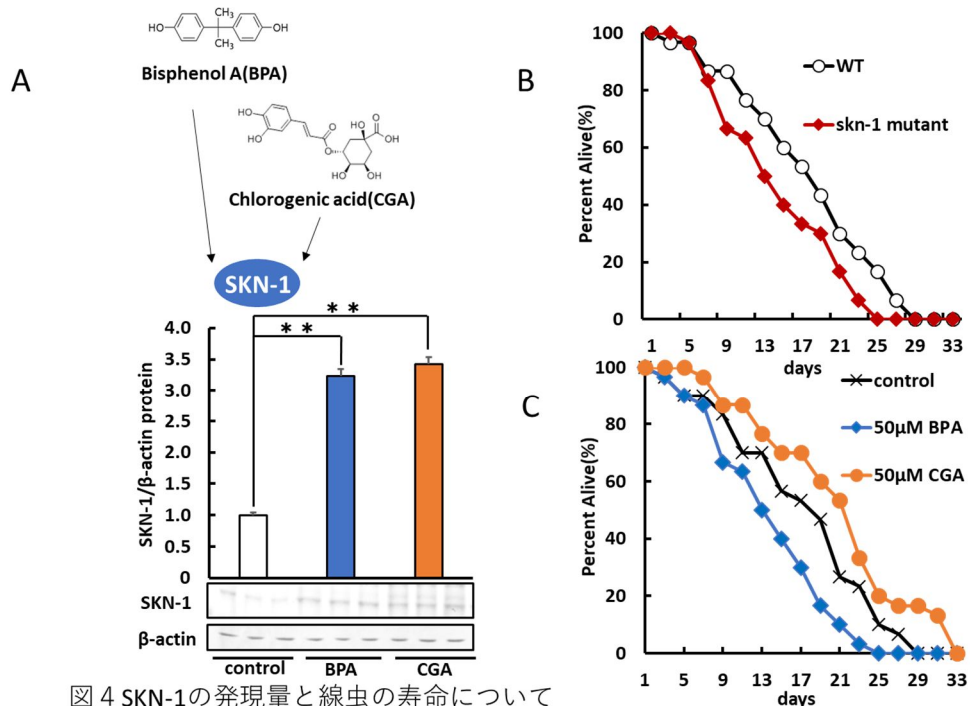


図 4 SKN-1 の発現量と線虫の寿命について
 A) 線虫における BPA, CGA による SKN-1 誘導
 B) SKN-1 変異体線虫の寿命について
 C) BPA, CGA 投与の線虫の寿命について

そこで、この違いについて、BPA や CGA による寿命の変化に関与する因子について探索を行うことで検討した。様々な因子の変異体を用いて検討した結果、まず、BPA と CGA は異なる経路で SKN-1 を上昇させている。そして SKN-1 の誘導は GCS-1 (哺乳動物のグルタチオン合成酵素の相同因子) の上昇によって線虫の寿命を延長しているのではないかと。しかし BPA と CGA ではまだ不明な部分が多いが、少なくとも BPA は Akt1/2 によるリン酸化阻害を介して、SKN-1 を安定化している (図 5)。CGA は WDR23 のリン酸化を介して SKN-1 を安定化しているようだがまだまだそのメカニズム解明には及んでいない。現在得られているデータでは寿命に影響を与えている因子である TOR に影響を与えるラパマイシン投与でも SKN-1 の発現が上昇する。CGA の SKN-1 誘導においては daf-2 (哺乳動物 IGF 受容体相同因子) が必要など断片的なものである。

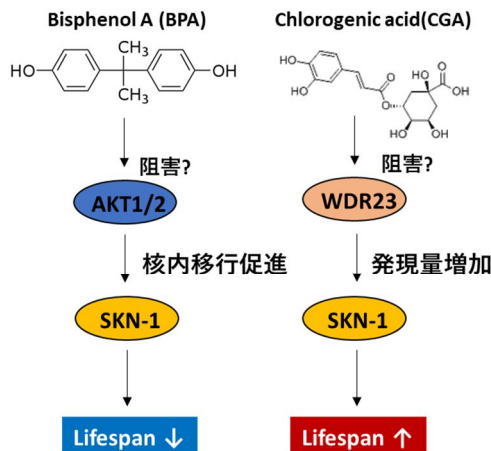


図 5 線虫における BPA と CGA の SKN-1 に及ぼす影響のメカニズム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Oguro, A., Imaoka, S.	4. 巻 9
2. 論文標題 Thioredoxin-related transmembrane protein 2 (TMX2) regulates the Ran protein gradient and importin- dependent nuclear cargo transport.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports.	6. 最初と最後の頁 15296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-51773-x	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 Oguro, A., Inoue, T., Kudoh, S. N., Imaoka, S.	4. 巻 6
2. 論文標題 14, 15-epoxyeicosatrienoic acid produced by cytochrome P450s enhances neurite outgrowth of PC12 and rat hippocampal neuronal cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pharmacol. Res. Perspect.	6. 最初と最後の頁 e00428
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/prp2.428	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 Nakamura, M., Yamanaka, H., Oguro, A., and Imaoka, S.	4. 巻 33
2. 論文標題 Bisphenol A induces Nrf2-dependent drug-metabolizing enzymes through nitrosylation of Keap1.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Drug Metabol. Pharmacokinet.	6. 最初と最後の頁 194-202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dmpk.2018.04.003	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 Kobayashi, Y., Oguro, A., and Imaoka, S.	4. 巻 41
2. 論文標題 Bisphenol A and its derivatives induce degradation of HIF-1alpha via the Lysosomal pathway in human hepatocarcinoma cell line, Hep3B.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 374-382
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b17-00693.	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 Siswanto, F.M., Oguro, A., and Imaoka, S.	4. 巻 6
2. 論文標題 Chlorogenic acid modulates hypoxia response of Hep3B cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Personalized Medicine Universe	6. 最初と最後の頁 12-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pmu.2017.03.001	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 -

〔学会発表〕 計21件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 杉谷 篤志、大黒 亜美、今岡 進
2. 発表標題 Bisphenol A(BPA)がC.elegans の寿命に与える影響の検討
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林之乃、大黒亜美、今岡進
2. 発表標題 ヒト肝がん細胞 (Hep3B細胞) におけるHIF-1αのBPAによる不安定化メカニズムの検討
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平田佑太、大黒亜美、今岡進
2. 発表標題 Ero1によるPDIの酸化とHIF-1αの不安定化
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中西望、小林之乃、佐久間理香、今岡進
2. 発表標題 Ref-1による低酸素応答因子HIF-1 の発現調節の検討
3. 学会等名 第17回がんとハイポキシア研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐久間理香、小林之乃、今岡進
2. 発表標題 ペリサイト幹細胞化に関する酸素依存因子、インスリン様成長因子の解析
3. 学会等名 第17回がんとハイポキシア研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐久間理香、松山知弘、中込隆之、今岡進
2. 発表標題 虚血ペリサイト由来多能性幹細胞の酸素依存因子、インスリン様成長因子の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉谷篤志、大黒亜美、佐久間理香、今岡進
2. 発表標題 ビスフェノールA(BPA)によるNrf2/SKN-1活性化と線虫の寿命に与える影響の検討
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮田瑛仁、佐久間理香、今岡進
2. 発表標題 低酸素・低グルコース環境下における糖代謝経路の酵素発現量の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村美里、大黒亜美、今岡進
2. 発表標題 低酸素下におけるp62発現低下のメカニズムの検討
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大黒亜美、井上巧、工藤卓、今岡進
2. 発表標題 アラキドン酸及びDHAのエポキシ体が神経細胞の機能に及ぼす効果の検討
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉谷篤志、Ferbian Milas Siswanto、大黒亜美、今岡進
2. 発表標題 BPA及びCGAによるSKN-1(Nrf2ホモログ)依存的な寿命の調節メカニズムの検討
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村美里、大黒亜美、今岡進
2. 発表標題 低酸素下におけるNrf2及びその制御因子の発現解析
3. 学会等名 第45回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉谷篤志、大黒亜美、今岡進
2. 発表標題 ビスフェノールAによるNrf2活性化メカニズムの検討
3. 学会等名 第45回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobayashi Y, Nakamura M, Sugitani A, Oguro A, and Imaoka S.
2. 発表標題 The mechanism behind the regulation of oxygen-dependent factors, Nrf2 and HIF-1alpha, by BPA.
3. 学会等名 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Siswanto F M, Oguro A, and Imaoka S.
2. 発表標題 Induction of Nrf2 by Chlorogenic Acid in Hep3B Cells and Elongation of Lifespan of Caenorhabditis elegans by Induction of SKN-1 (Nrf2 Homolog)
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村美里、小林之乃、大黒亜美、今岡進
2. 発表標題 Siah2及びp62によるNrf2発現調節機構の検討
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大黒亜美、今岡進
2. 発表標題 チトクロームP450によるアラキドン酸代謝物の神経細胞における生理機能解析
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北山晃嗣、大黒亜美、今岡進
2. 発表標題 HIF-1 及びIKKに対するPHDアイソフォームの活性の違いについて
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大黒亜美、山中秀剛、小林之乃、今岡進
2. 発表標題 環境化学物質ビスフェノールAによるNrf2活性化機構の解析
3. 学会等名 第44回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Lestari D A, Kobayashi Y, Oguro A, and Imaoka S.
2. 発表標題 Bisphenol A is a villain or a hero: it suppresses VEGF expression in Hep3B cells and ERp29 binds to it.
3. 学会等名 The 23rd International Congress of Personalized Medicine (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大黒亜美、今岡進
2. 発表標題 アラキドン酸エポキシド(EET)の神経細胞における生理作用解析
3. 学会等名 第59回日本脂質生化学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

関西学院大学理工学部生命医化学科今岡研究室 https://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~imaoka/
--

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
研究分担者	大黒 亜美 (Oguro Ami) (20634497)	広島大学・統合生命科学研究科・助教 (15401)	