

平成 21年 4 月 2日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 年度-2008 年度

課題番号：19590268

研究課題名（和文）メタボリックシンドロームにおける転写因子 Nrf1 の遺伝子発現ネットワーク

研究課題名（英文）Physiological roles of the transcription factor Nrf1 on the lipid metabolism

研究代表者

小林 聡 (KOBAYASHI AKIRA)

同志社大学・生命医科学部・准教授

研究者番号 50292214

研究成果の概要：

本研究の目的は、社会的な問題に発展しているメタボリックシンドロームに対する新たな治療標的として転写因子Nrf1に着目し、その脂質代謝にかかわる遺伝子発現制御ネットワークを解明する点にある。Nrf1の肝臓特異的遺伝子破壊マウスは、肝臓に脂肪が蓄積して、脂肪肝を経て最終的に肝ガンを発症する。このマウスの症状は、ヒトの非アルコール性脂肪肝(NASH)の症状ときわめて酷似しているため、疾患モデルマウスとなることが期待されている。本研究では、Nrf1の欠失による遺伝子発現制御ネットワークの破綻をもたらす脂質代謝異常について、その発症の分子機構を解析することを目標とした。

まず Nrf1 の標的遺伝子を同定するために、Nrf1 遺伝子破壊マウスの肝臓を用いてマイクロアレー解析を行った。Nrf1 は転写活性化因子のため、遺伝子破壊によって発現が減少している遺伝子に着目したが、脂質代謝に関わる遺伝子は見いだせなかった。このことは、Nrf1 は脂質代謝に対して直接は機能せず、本来の生理機能が破綻したことによって間接的に脂質代謝へ影響をもたらした可能性が示唆された。次に、Nrf1 の生理機能をもたらす分子基盤として、Nrf1 の細胞内局在とタンパク質機能制御について検討した。Nrf1 は、通常細胞質の小胞体 (ER) に局在し、プロテアソーム依存的なタンパク質分解を受けていることを見いだした。すなわち Nrf1 の機能発現には、この小胞体局在とタンパク質分解による機能抑制を解除する活性化シグナル・ストレスが存在することを見いだした。そこで、Nrf1 タンパク質の分解機構を解明する目的で、Nrf1 結合タンパク質を検索した結果、ユビキチン結合酵素のアダプターを同定した。したがって、Nrf1 は、ユビキチン-プロテアソーム依存的にタンパク質分解を受けている可能性が高いことが分かった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	1,500,000	450,000	1,950,000
平成20年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学，生化学，発生工学  
科研費の分科・細目：医化学一般  
キーワード：脂質代謝・転写制御・タンパク質分解

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 肝臓特異的Nrf1遺伝子破壊マウスの脂肪蓄積

脂質代謝調節機構では，転写因子PPAR $\alpha$ ， $\gamma$ やSREBP-1cが脂肪酸合成において非常に重要な機能を担っているため，これら転写因子を標的とした治療・創薬研究が盛んに行われている．一方，転写因子Nrf1は，血球分化や酸化ストレス応答に関わる因子と目されていたが，最近，肝臓特異的なNrf1遺伝子破壊マウスは，肝臓に脂肪が蓄積して，脂肪肝を経て最終的に肝ガンを発症することが報告された (1)．実際，申請者も同遺伝子破壊マウスの作成に成功し，図1に示すように，肝臓における脂肪の蓄積を明らかにした (2)．このマウスの症状は，ヒトの非アルコール性脂肪肝 (NASH) の症状ときわめて酷似しているため，疾患モデルマウスとなることが期待されている．すなわち，Nrf1は脂質代謝に関わる可能性が高いわけである．しかしながら，この遺伝子破壊マウスの解析は，詳細に行われておらず，その脂肪蓄積の原因も，肝臓での脂肪酸合成の亢進か，あるいは取り込みの亢進なのか，全く明らかにされていない状況である．

#### 参考文献

- 1) Xu Z. et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 4120-5.
- 2) 大辻摩希子 (2005) 筑波大学大学院医科学研究科修士論文

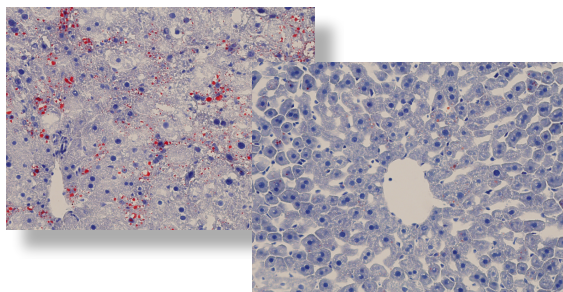


図1 Nrf1 遺伝子破壊マウス肝臓における脂肪蓄積 (Oil Red O染色, 左)

### (2) CNCファミリー転写因子Nrf1とNrf2の機能的協調性と差異

Nrf1は，塩基性ロイシンジッパー型のCNCファミリー転写因子群に属し，小Maf因子とヘテロ二量体を形成して，抗酸化物質応答配列に結合して遺伝子の発現を活性化することが，培養細胞レベルの実験で明らかにされている．しかしながら，個体レベルのNrf1の生理機能に関しては，その遺伝子破壊マウスが胎性致死になり成獣での機能解析ができないため，全く不明である．そこで，申請者を含む2つのグループが，条件付きNrf1遺伝子破壊マウスを作成し，上述したような脂質代謝における新たな機能が分かり始めている現状である．

一方，申請者は，同ファミリーに属するNrf2と酸化ストレスセンサーKeap1により形成される酸化ストレス応答の分子機構を研究してきた．Keap1は，Nrf2のNeh2と名付けられたドメインと相互作用し，Nrf2の核移行を阻害することで転写活性を抑制する．このNeh2ドメインは，Nrf1にも相同性の高いアミノ酸配列として存在するため，Nrf1もKeap1の制御下にあることが予想されたが，申請者の解析は，その仮説を否定した (3)．すなわち，Nrf1は，Nrf2の酸化ストレス応答とは異なる生理機能していることを，強く示唆している．

### (3) 転写因子Nrf1のタンパク質安定性を介した活性制御機構

申請者は，培養細胞をプロテアソーム阻害剤MG132あるいはラクタシチンで処理すると，内在性Nrf1タンパク質が安定化することを見出している．関連因子のNrf2も，プロテアソームによる分解抑制を受けているが，これはKeap1依存的なメカニズムであることを明らかにした．したがって，Nrf1の分解機構は，Nrf2とは異なるメカニズムであると予想される．これに対する1つのヒントとしては，最近，Nrf1のアミノ末端に膜貫通ドメインが存在し，このドメインを介してNrf1は小胞体にアンカーしているという報告がある (4)．これらの知見から仮説を立てると，通常，Nrf1は小胞体にとどめられてタンパク質分解を受けているが，何らかの刺激によりNrf1

は活性化され、核へ移行後、脂質代謝に関わるような標的遺伝子の発現を活性化するモデルが考えられる (図2)。

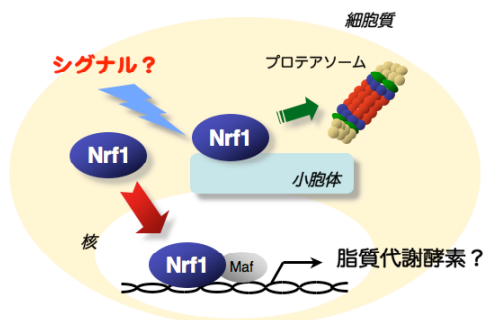


図2 Nrf1活性化モデル

参考になる例としては、脂質代謝に関わる SREBP-1c のプロテアーゼにより切断され、活性化される制御が有名である。すなわち Nrf1 の生理機能を知る上で、この活性化シグナルとそれによる Nrf1 の活性化機構を明らかにすることは、きわめて重要であることが理解される。

#### 参考文献

- 3) Kobayashi A. et al. (2004) *Methods Enzymol.* 378, 273-286.
- 4) Wang W. et al. (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 19676-87.

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、社会的な問題に発展しているメタボリックシンドロームに対する新たな治療標的として転写因子 Nrf1 に着目し、その脂質代謝にかかわる遺伝子発現制御ネットワークを解明する点にある。Nrf1 の肝臓特異的遺伝子破壊マウスは、肝臓に脂肪が蓄積して、脂肪肝を経て最終的に肝ガンを発症する。このマウスの症状は、ヒトの非アルコール性脂肪肝 (NASH) の症状ときわめて酷似しているため、疾患モデルマウスとなることが期待されている。本研究では、Nrf1 の欠失による遺伝子発現制御ネットワークの破綻がもたらす脂質代謝異常について、その発症の分子機構を解析することを目標とした。

## 3. 研究の方法

### Nrf1 標的遺伝子の同定

Nrf1 肝特異的遺伝破壊マウスにおいて、脂

肪蓄積をもたらす原因遺伝子を同定するために、遺伝子破壊マウスの肝臓から mRNA を調製し、遺伝子発現の変動をマイクロアレイ解析で観察する。その再現性をとるために、別個体のマウス肝臓を用いて、RT-PCR を行う。これらが Nrf1 の直接的な標的遺伝子の場合には、その遺伝子の調節領域に Nrf1 の結合配列である抗酸化物質応答配列が存在し、さらに様々な動物種間で保存されはばずである。そこで、ゲノムデータベースをサーチして、制御領域内に Nrf1 の結合配列である抗酸化物質応答配列が存在するか確認する。

## タンパク質分解制御を介した Nrf1 活性化機構の解析

### 1) Nrf1 タンパク質分解機構の解析

前述したように、申請者はすでに、Nrf1 がプロテアソーム依存的な分解を受けている可能性を見出している。このことは、タンパク質分解機構のオン・オフにより、Nrf1 の転写活性が制御されていることを示唆している。そこで、まずこの分解機構を解明する。分解をもたらす責任ドメインの同定を行う。種々の Nrf1 欠失変異体プラスミドを構築し、上記培養細胞へ遺伝子導入し、それぞれのタンパク質の半減期を測定する。この分解機構が、ユビキチン化依存的であるのか検討するために、温度感受性ユビキチン化酵素欠損培養細胞が存在するので、Nrf1 が安定化するか調べる。

### 2) Nrf1 タンパク質安定化シグナルの同定

何らかの生理的シグナルが、Nrf1 タンパク質の安定化をもたらす、その機能を発動させるはずである。そこで、マウスおよびヒト肝臓由来培養細胞 Hepa-I、HepG2 細胞を、脂質合成に関わる試薬をはじめとして、様々な試薬で処理し、細胞抽出液を用いて、Nrf1 タンパク質の安定化を観察する。同定したシグナルが、Nrf1 の分解ドメインの機能を阻害することを確認する。

### 3) 内在性 Nrf1 の細胞内局在解析

Nrf1 が小胞体にアンカーしているという報告があるが、これは培養細胞への過剰発現実験により示された結果であり、果たして正常な Nrf1 の細胞内局在ないし動態を反映しているか疑問の余地がある。そこで、内在性 Nrf1 の細胞内局在を解析する。上記実験で明らかにした Nrf1 活性化シグナルを、細胞に添加し、実際 Nrf1 が安定化し、核移行することを、免疫蛍光染色解析で確認す

る。

#### 4. 研究成果

Nrf1 の標的遺伝子を同定するために、Nrf1 遺伝子破壊マウスの肝臓を用いてマイクロアレイ解析を行った。Nrf1 は転写活性化因子のため、遺伝子破壊によって発現が減少している遺伝子に着目したが、脂質代謝に関わる遺伝子は見いだせなかった。このことは、Nrf1 は脂質代謝に対して直接は機能せず、本来の生理機能が破綻したことによって間接的に脂質代謝へ影響をもたらした可能性が示唆された。次に、Nrf1 の生理機能をもたらす分子基盤として、Nrf1 の細胞内局在とタンパク質機能制御について検討した。Nrf1 は、通常細胞質の小胞体 (ER) に局在し、プロテアソーム依存的なタンパク質分解を受けていることを見いだした。すなわち Nrf1 の機能発現には、この小胞体局在とタンパク質分解による機能抑制を解除する活性化シグナル・ストレスが存在することを見いだした。そこで、Nrf1 タンパク質の分解機構を解明する目的で、Nrf1 結合タンパク質を検索した結果、ユビキチン結合酵素のアダプターを同定した。したがって、Nrf1 は、ユビキチン-プロテアソーム依存的にタンパク質分解を受けている可能性が高いことが分かった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Ohtsuji, M., Katsuoka, F., Kobayashi, A., Aburatani, H., Hayes, J. D. and Yamamoto, M. (2008) Nrf1 and Nrf2 Play Distinct Roles in Activation of Antioxidant Response Element-dependent Genes. *J. Biol. Chem.* **283**, 33554-33562. 査読有
- ② Mamiya, T., Katsuoka, F., Hirayama, A., Nakajima, O., Kobayashi, A., Maher, J. M., Matsui, H., Hyodo, I. and Yamamoto M., and Hosoya, T. (2008) Hepatocyte-specific deletion of heme oxygenase-1 disrupts redox homeostasis in Basal and oxidative environments. *Tohoku J Exp Med.* **216**, 331-339. 査読有
- ③ Kusano, Y., Horie, S., Shibata, T., Satsu, H., Shimizu, M., Hitomi, E., Nishida, M., Kurose, H., Itoh, K., Kobayashi, A., Yamamoto, M. and Uchida, K. (2008) Keap1 regulates the constitutive expression of GST A1 during differentiation of Caco-2 cells. *Biochemistry* **47**, 6169-6177. 査読有
- ④ Padmanabhan, B., Tong, K.I., Kobayashi, A., Yamamoto, M., and Yokoyama S. (2008) Structural insights into the similar modes of Nrf2 transcription factor recognition by the cytoplasmic repressor Keap1. *J Synchrotron Radiat.* **15**(Pt 3), 273-276. 査読有
- ⑤ Ohta, T., Iijima, K., Miyamoto, M., Nakahara, I., Tanaka, H., Ohtsuji, M., Suzuki, T., Kobayashi, A., Yokota, J., Sakiyama, T., Shibata, T., Yamamoto, M., Hirohashi, S. (2008) Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Res.* **68**, 1303-1309. 査読有
- ⑥ Yamamoto, T., Suzuki, T., Kobayashi, A., Wakabayashi, J., Maher, J., Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2008) Physiological Significance of Reactive Cysteine Residues of Keap1 in Determining Nrf2 Activity. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 2758-2770. 査読有
- ⑦ Satoh, T., Kosaka, K., Itoh, K., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Shimojo, Y., Kitajima, C., Cui, J., Kamins, J., Okamoto, S., Izumi, M., Shirasawa, T. and Lipton, SA. (2008) Carnosic acid, a catechol-type electrophilic compound, protects neurons both in vitro and in vivo through activation of the Keap1/Nrf2 pathway via S-alkylation of targeted cysteines on Keap1. *J. Neurochem.* **104**, 1116-1131. 査読有
- ⑧ Hayashi H, Tsuchiya Y, Nakayama K, Satoh T, Nishida E. (2008) Down-regulation of the PI3-kinase/Akt pathway by ERK MAP kinase in growth factor signaling. *Genes Cells.* **13**, 941-947. 査読有
- ⑨ Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y.-S., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J., Ezaki, J., Murata, S., Hamazaki, J., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Yanagawa, T., Uwayama, J., Warabi, E., Yoshida, H., Ishii, T., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Yue, Z., Uchiyama, Y., Kominami, E. and Tanaka, K. Loss of p62/SQSTM1 Suppresses Cytoplasmic Inclusion Body Formation and Liver Injury in Autophagy- Deficient Mouse. *Cell* **131**, 1149-1163. 査読有
- ⑩ Sawa, T., Zaki, M.H., Okamoto, T., Akuta, T., Tokutomi, Y., Kim-Mitsuyama, S., Ihara, H., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Fujii, S., Arimoto, H. and Akaike, T. Protein S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Nature Chem. Biol.* **11**, 727-735. 査読有
- ⑪ Tong, K.I., Padmanabhan, B., Kobayashi, A., Shang, C., Hirotsu, H., Yokoyama, S. and

Yamamoto, M. Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response.

*Mol. Cell. Biol.* 21, 7511-7521. 査読有

- ⑫ Watai, Y., \*Kobayashi, A., Nagase, H., Mizukami, M., McEvoy, J., Singer, J.D., Itoh, K., and \*Yamamoto, M. Subcellular Localization and Cytoplasmic Complex Status of Endogenous Keap1. *Genes to Cells*. 12, 1163-1178. 査読有

(\*corresponding authors & 表紙に採択)

[学会発表] (計 1 件)

小林 聡 「老化をもたらす酸化ストレスに対する生体防御機構」BMB2008 2008年12月9日 神戸

[図書] (計 1 件)

小林 聡、山本雅之、診断と治療社「Keap1-Nrf2 システムによる酸化ストレス・親電子性物質応答機構」(2008) 酸化ストレスの医学, 46-53.

[その他]

第三回 匂坂記念賞受賞

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 聡 (KOBAYASHI AKIRA)

同志社大学・生命医科学部・准教授

研究者番号：50292214

### (2) 研究分担者

土谷 佳樹 (TSUCHIYA YOSHIKI)

同志社大学・生命医科学部・准教授

研究者番号：30456777

### (3) 連携研究者

なし