

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：34310

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790329

研究課題名（和文） 脂肪性肝炎発症にかかわる転写因子 Nrf1 のリン酸化シグナリング

研究課題名（英文） Phosphorylation-mediated regulation of Nrf1 in the pathogenesis of steatohepatitis

研究代表者

土谷 佳樹（TSUCHIYA YOSHIKI）

同志社大学・生命医科学部・助教

研究者番号：30456777

研究成果の概要（和文）：脂肪性肝炎発症との関連が示唆される転写因子Nrf1の結合因子としてβ-TrCPおよびCK2を同定し、β-TrCPがNrf1の核内分解を制御することでその転写活性化能を調節していることを見出した。この成果は*Molecular and Cellular Biology*誌に掲載された。さらに、CK2がNrf1をリン酸化することでその転写活性化能を抑制し、Nrf1の標的であるプロテアソーム遺伝子の発現を抑制することを見出した。これらの成果は、Nrf1のリン酸化が脂肪性肝炎や神経変性疾患で見られる異常タンパク質蓄積を抑制する新たな治療標的となる可能性を示している。

研究成果の概要（英文）：I identified β-TrCP and CK2 as Nrf1-binding proteins. I found that β-TrCP regulates Nrf1 degradation in the nucleus and its transcriptional activity (Tsuchiya *et al.* (2011) *Mol. Cell. Biol.* 31: 4500-4512). I also found that CK2 phosphorylates Nrf1 and suppresses its transcriptional activity, thereby impairs Nrf1-dependent induction of proteasome gene expression. These results suggest that phosphorylation of Nrf1 is a novel therapeutic target for ameliorating accumulation of protein aggregates observed in steatohepatitis and neurodegenerative diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：代謝異常学

1. 研究開始当初の背景

(1) Nrf1 は脂質代謝に関わる重要な転写因子である

転写因子 Nrf1 は塩基性ロイシンジッパー型の CNC ファミリーに属する転写因子であり、小 Maf 因子とヘテロ二量体を形成し、下流の遺伝子発現を活性化する。Nrf1 の生理機

能については、同じファミリーに属する転写因子 Nrf2 と相同性が高いため、Nrf2 同様、酸化ストレス応答に関わると考えられていた。しかし、私の所属研究室や米国のグループは、Nrf1 全身性ノックアウトマウスが胚性致死になること、また肝細胞特異的 Nrf1 ノックアウトマウスがヒト非アルコール性脂

肪性肝炎 (NASH) に酷似した脂肪肝を発症することを見出した。これらの知見は、Nrf1 が Nrf2 とは異なる生理機能を持ち、生体の機能維持に必須の役割を果たしていることを示しているが、その詳細は明らかにされていない。したがって、Nrf1 の生理機能を明らかにすることはきわめて重要であると考えられる。

(2) Nrf1 の機能発現にはタンパク質分解を調節する活性化メカニズムが必要となる

Nrf1 は細胞質で恒常的な分解を受けているが、何らかの刺激によって安定化して核移行し、標的遺伝子の転写を活性化すると考えられている。しかしながら、Nrf1 を活性化するシグナルや、分解の制御機構、転写活性化メカニズム、および Nrf1 の標的遺伝子に関しては詳細な解析がなされておらず、ほとんど分かっていない。

そこで、これら Nrf1 の制御機構を解明する目的で結合タンパク質の網羅的解析を行い、ユビキチンリガーゼのサブユニットである β -TrCP2 や Skp1 を同定した。さらに、申請者は β -TrCP1/2 が Nrf1 の分解に関与することを示す予備的データを既に得ている。これらの結果は、Nrf1 の分解制御機構の解明に向けた糸口となり、さらには Nrf1 の活性化メカニズムについての理解が大きく進むことが期待される。ところで、 β -TrCP1/2 による基質タンパク質のユビキチン化には、基質タンパク質のリン酸化が重要であることが知られている。上述した Nrf1 結合タンパク質の網羅的解析からは、タンパク質キナーゼ CK2 のサブユニットやその他複数のキナーゼ関連因子も同定されている。これらの結果は、リン酸化依存的な Nrf1 分解機構の存在を強く示唆しており、引き続き詳細な解析が必要となる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、発生や脂質代謝において重要な役割を果たしていると考えられる転写因子 Nrf1 の活性化機構を解析することによって、その生理機能の分子的基盤を明らかにすることである。予備的データから、Nrf1 の活性制御機構においてリン酸化の重要性が示唆されているので、リン酸化による Nrf1 活性化シグナリング経路の全容解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) プラスミドの構築

PCR 法を用いて増幅したマウス Nrf1 の cDNA を pCMV10-3xFLAG ベクターにクローニングした。Nrf1 のアミノ酸置換変異体は PCR を用いた mutagenesis 法により作成した。

(2) 免疫共沈降による相互作用解析

COS7 細胞に FLAG タグあるいは HA タグを付加したタンパク質を共発現させ、24 時間後に細胞からタンパク質を抽出した。細胞抽出液に抗 FLAG 抗体を結合させたアガロースビーズを加えて免疫沈降を行い、免疫沈降サンプルを SDS-PAGE で展開し、抗 FLAG 抗体および抗 HA 抗体を用いて Western blotting を行った。

(3) Nrf1 分解アッセイ

Nrf1 の野生型および変異体を COS7 細胞に一過的に発現させ、翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドで細胞を処理して Nrf1 タンパク質の分解タイムコースを Western blotting 法により調べた。

(4) siRNA による遺伝子ノックダウン

12-well プレートに HeLa 細胞を播種し、即日 siRNA のトランスフェクションを行った。さらに 24 時間後に 2 回目の siRNA トランスフェクションを行い、48 時間後に細胞からタンパク質あるいは RNA を抽出した。

(5) リアルタイム PCR による mRNA の定量

細胞から抽出した mRNA から逆転写により cDNA を調製し、目的の遺伝子に対するプライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、siRNA によるノックダウン効率を調べた。

(6) in vitro リン酸化アッセイ

大腸菌に発現させて精製した CK2 α と Nrf1 部分断片および変異体を [γ - 32 P]ATP 存在下で混合し、in vitro でリン酸化反応を行った。反応産物を SDS-PAGE で展開し、オートラジオグラフィーによりリン酸化を検出した。

4. 研究成果

β -TrCP1/2 のノックダウンおよび核および細胞質特異的な局在を示す Nrf1 変異体を用いた解析から、Nrf1 は細胞質よりも核内において β -TrCP1/2 による分解を受けやすいことが分かった (図 1)。最近の報告から、Nrf1 は細胞質においても分解を受けることが示唆されているため、Nrf1 には細胞質での分解機構と

β -TrCP1/2 による核内での分解機構の 2 つの機構で分解されていることが明らかとなった。ま

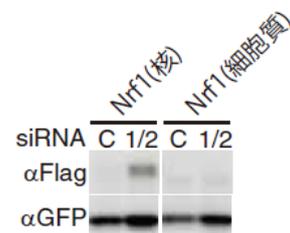


図 1 β -TrCP1/2 ノックダウン (1/2) による核局在型 Nrf1 の安定化. コントロールとして GFP を共発現させた。

た、Nrf1 のアミノ酸配列中にβ-TrCP1/2 の結合認識配列があることを見出し、配列中の保存されたセリンをアラニンに置換した Nrf1 変異体 (Nrf1-SA) を作製し、野生型との違いを調べた。その結果、Nrf1-SA は野生型と比較してタンパク質安定性が高いことが明らかとなった (図2)。また、プロテアソームサブユニット遺伝子の1つである PSMA4 のプロモーター上に存在する Nrf1 結合配列 (ARE)を用いてレポーターアッセイを行ったところ、

Nrf1-SA の転写活性化能が野生型よりも有意に高いという結果を得た (図3)。これらの結果から、β-TrCP1/2 はNrf1 の核内での分解を担っており、Nrf1 の転写活性を抑制する働きをもつことが可能性が考えられた。そこで、Nrf1 依存的なプロテアソームサブユニット遺伝子の発現誘導に対するβ-TrCP1/2 ノックダウンの影響を調べたところ、β-TrCP1/2 のノックダウンは MG132 によるプロテアソームサブユニットの発現誘導を顕著に亢進した (図4)。以上の結果から、β-TrCP1/2 は Nrf1 の分解を制御することで、プロテアソーム遺伝子群の発現を調節していることが明らかとなった。また、Nrf1 は細胞



図2 A. 保存されたβ-TrCP認識配列 (太字部分).
B. Nrf1-SA 変異体は WT よりも安定である. CHX : シクロヘキシミド

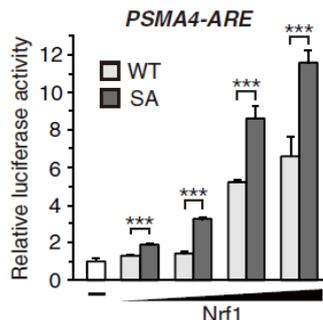


図3 Nrf1-SA は WT よりも転写活性化能が高い。

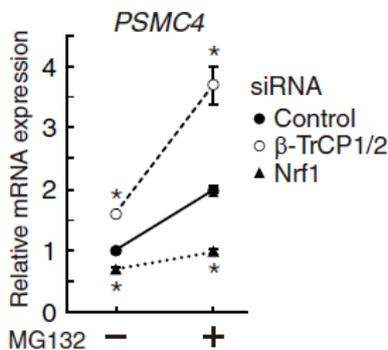


図4 β-TrCP1/2 ノックダウンによる PSMC4 の発現誘導亢進

質においては Hrd1 と VCP の関与する小体関連分解 (ERAD) 経路により分解されており、Nrf1 の活性が細胞質と核の二重の分解機構で制御されていることが明らかとなった (図5)。本研究により、Nrf1 の活性制御機構の一端が明らかとなり、Nrf1 の活性制御がプロテアソーム遺伝子群の発現を調節することが分かった。本成果は *Molecular and Cellular Biology* 誌に掲載された。

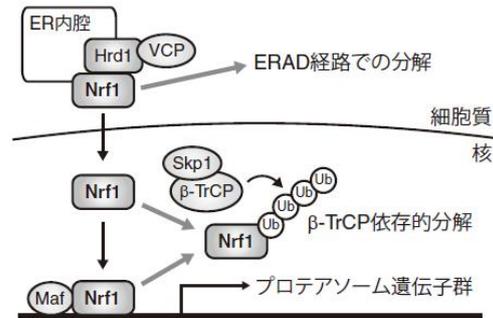


図5 分解調節による Nrf1 活性化制御機構

また、Nrf1 結合因子として同定した CK2 についての解析を行い、CK2 が Nrf1 を直接リン酸化することでその転写活性化能を抑制することを示す結果を得た。私は CK2 によってリン酸化される Nrf1 中のアミノ酸を特定し、そのアミノ酸をアラニンに置換した変異体の転写活性化能を調べた。その結果、この変異体は野生型よりも転写活性化能が高いことが明らかとなった。さらに、CK2 のノックダウンにより Nrf1 の標的遺伝子であるプロテアソームサブユニットの転写が亢進することも分かった。この成果は 2012 年 5 月現在論文投稿準備中である。

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 1 件)

① Tsuchiya Y, Morita T, Kim M, Iemura S, Natsume T, Yamamoto M, Kobayashi A. Dual regulation of the transcriptional activity of Nrf1 by β-TrCP- and Hrd1-dependent degradation mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 査読有, 31, 4500-12. (2011) DOI: 10.1128/MCB.05663-11

[学会発表] (計 2 件)

① Tsuchiya Y, Morita T, Kim M, Iemura S, Natsume T, Yamamoto M, Kobayashi A. Dual regulation of the transcriptional activity of Nrf1 by β-TrCP- and Hrd1-dependent degradation mechanisms.

第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜)
2011 年 12 月 15 日

② **Tsuchiya Y**, Morita T, Kim M, Iemura S,
Natsume T, Yamamoto M, Kobayashi A.
Dual Regulation of the Transcription Factor
Nrf1(Nfe2l1) by β -TrCP- And Hrd1-Dependent
Degradation Mechanisms.
EMBO Workshop on Intracellular Proteolysis &
Cancer (スペイン, バレンシア)
2011 年 10 月 26 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土谷 佳樹 (TSUCHIYA YOSHIKI)
同志社大学・生命医科学部・助教
研究者番号 : 30456777