

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860178

研究課題名(和文) 神経細胞防御にはたらく新しいストレス応答機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of a novel stress response system exerting neuroprotective effects

## 研究代表者

山崎 博未 (YAMAZAKI, Hiromi)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20720915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アミノ酸飢餓応答因子GCN1のマウス個体における役割を明らかにするため、GCN1欠失マウスの解析を行った。GCN1欠失マウスは、胎生11.5日以降に成長遅延を呈すること、呼吸不全のため出生後に致死となることが明らかとなった。また我々は、酸化ストレス応答性転写因子Nrf2がGCN1と結合することを見出していたが、アストロサイトーマ細胞においてGCN1はNrf2の標的遺伝子であるヘムオキシゲナーゼ-1の発現誘導に必須であることを明らかにした。以上のことから、GCN1は個体の発生および成長に必要な不可欠であること、GCN1とNrf2は協調的にストレス応答にはたらくことが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed GCN1 knockout mice to reveal a role of amino acid starvation responsive factor GCN1. GCN1 knockout mice exhibited growth retardation after E11.5 and died of respiratory failure after birth. We previously found that oxidative stress responsive factor Nrf2 binds to GCN1, and we further clarified that GCN1 is essential for expression of Nrf2 target gene, heme oxygenase-1. Collectively, we showed that GCN1 is indispensable for mice embryogenesis and GCN1 and Nrf2 cooperatively contribute to stress response.

研究分野：分子生物学

キーワード：アミノ酸飢餓 酸化ストレス GCN1 Nrf2

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えた今日において、加齢に伴い発症リスクが増加するアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患の罹患数は増加の一途をたどっている。神経変性疾患の発症と進行には、酸化ストレスが関与することが知られており、酸化ストレスに対する防御機構を理解することは、神経変性疾患の予防法・治療法を開発する上で非常に重要である。

申請者は、特に、酸化ストレス応答に関わる遺伝子の転写制御機構の重要性に着目している。転写因子 Nrf2 は、グルタチオン合成酵素やヘムオキシゲナーゼなどの抗酸化遺伝子群を統一的に制御する転写因子である。Nrf2 欠失マウスでは抗酸化遺伝子群の発現が低下し、その結果、酸化ストレスに対して脆弱性を示し、癌や炎症性疾患を起こしやすいことが報告されている (Itoh *et al.*, 1997 *Biochem Biophys Res Commun.*)。

GCN1/GCN2 は、翻訳レベルで酸化ストレス応答、アミノ酸飢餓応答にはたらくリボソーム結合性因子である。細胞がストレスに暴露されると、センサータンパク質である GCN1 はリン酸化酵素 GCN2 を活性化することにより、翻訳伸長因子 eIF2 のリン酸化を引き起こし、ストレス応答転写因子 ATF4 の翻訳亢進を介した抗酸化遺伝子群やアミノ酸合成酵素群活性化を行う (Castilho *et al.*, 2014 *Biochim Biophys Acta.*)。GCN2 は遺伝子欠失マウスの解析から、摂食行動、記憶形成、免疫寛容に必須の役割を果たすことが明らかになっている一方で、GCN1 のほ乳類における機能は明らかにされていない。

我々は、Nrf2 の研究を進める過程で、GCN1 が Nrf2 の相互作用因子であることを見出していた。Nrf2 と GCN1 という全く異なる二つの酸化ストレス応答経路の因子の相互作用することから、これらの因子による協調的な酸化ストレス機構が存在するのではないかと仮説を立てた。GCN1 の結合因子である GCN2 は神経組織における重要性が明らかにされていることから特に神経組織に焦点を絞って解析を行うこととした。

## 2. 研究の目的

本申請研究では、GCN1 欠失マウスおよび組織特異的欠失マウスを用いて、個体レベルで GCN1 のはたらきを明らかにすることを目的とする。さらに、Nrf2 と GCN1 の相互作用によるストレス応答の分子機構とその位置づけを理解する。

## 3. 研究の方法

条件付き GCN1 欠失マウスの作製・解析を行うこととした。また、ヒトアストロサイトーマ株 U373MG 細胞株を用いて GCN1 ノックダウンを行い、GCN1 の Nrf2 活性化における役割を検討した。

## 4. 研究成果

(1) GCN1 はマウス胎生期の発生に必須である

CRISPR/Cas9 法により、GCN1 遺伝子のイントロン内 2 箇所に loxP を挿入することにより条件付き欠失マウスの作製を試みた。その結果、作製したマウスは 2 箇所で DNA 二本鎖切断を起こし、その間が欠失した全身欠失マウスであることが分かった。条件付き欠失マウスは引き続き作製中であるが、本研究では、GCN1 欠失マウスの解析を行うこととした。GCN1 ヘテロ欠失マウスは明らかな異常を示さず、同マウス同士の交配により GCN1 ホモ欠失マウスの作出を試みた。その結果、生きた新生仔の GCN1 ホモ欠失マウスは得られず、出生後に死亡していることが分かった。そこで出生直前の胎生 18.5 日の解析を行ったところ、GCN1 欠失マウスは各組織の形成に明らかな異常は認められないが、体が小さく (図 1A)、肺泡虚脱を呈していた (図 1B)。このことから、GCN1 欠失マウスは呼吸不全により出生直後に致死となると予想された。また、成長遅延は胎生 11.5 日以降に観察された。以上のことから、GCN1 は個体の発生・成長に必要不可欠であることが明らかになった。

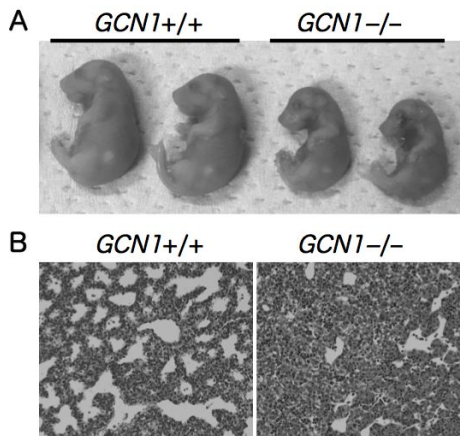


図1 胎生18.5日のGCN1<sup>-/-</sup>胎仔 (A) と肺 (B)

(2) GCN1 はヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) の発現に必須である

ヒトグリオーマ U373MG 細胞において GCN1 のノックダウンを行い、Nrf2 の誘導剤であるジエチルマレイン酸 (DEM) を処理したところ、Nrf2 の標的遺伝子である HO-1 の mRNA レベルは変化しないが (図 2A)、タンパク質が顕著に減少していた (図 2B)。この結果より、GCN1 は HO-1 の遺伝子発現には必要ではないがタンパク質発現誘導に必要であることを明らかにした。

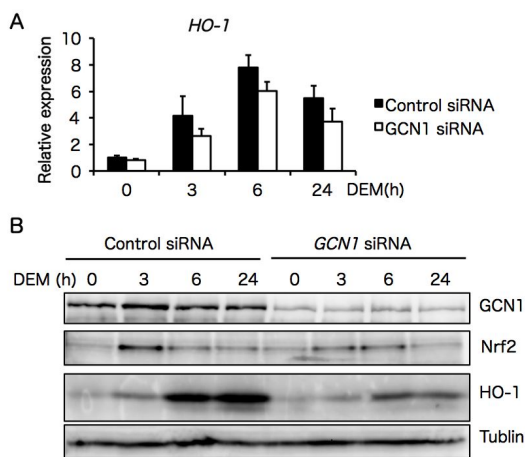


図2. GCN1ノックダウン細胞においてHO-1発現が減少

## 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 2件)

1. Yamazaki H, Tanji K, Wakabayashi K, Matsuura S, Itoh K. Role of the Keap1/Nrf2 pathway in neurodegenerative diseases. *Pathol Int.* 2015 May;65(5):210-9. 査読有 doi: 10.1111/pin.12261.
2. Yamazaki H, Suzuki M, Otsuki A, Shimizu R, Bresnick EH, Engel JD, Yamamoto M. A remote GATA2 hematopoietic enhancer drives leukemogenesis in inv(3)(q21;q26) by activating EVI1 expression. *Cancer Cell.* 2014 Apr 14;25(4):415-27. 査読有 doi: 10.1016/j.ccr.2014.02.008.

[学会発表](計 1件)

1. Yamazaki H, Mimura J, Itoh K. Screening of mitophagy inducers in HeLa cells. *6<sup>th</sup> world congress on targeting mitochondria*, October 28-30 2015, Berlin, Germany.

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

弘前大学大学院医学研究科附属高度先進医学研究センター分子生体防御学講座

<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~admed/department/index.html>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

山崎 博未 (YAMAZAKI HIROMI)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：20720915

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：