

令和元年6月19日現在

機関番号：11101

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26111010

研究課題名(和文) 酸素ストレス感受性転写因子ネットワークによる生体内レドックス環境調節機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of redox regulatory mechanisms by transcription factor network

研究代表者

伊東 健 (Itoh, Ken)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：10323289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 61,800,000円

研究成果の概要(和文)：Nrf2とATF4が相互作用しプロテアソーム阻害時などにおいて一群の細胞防御遺伝子を協調的に活性化することを見出した。ATF4の上流活性化因子GCN1L1はGCN2依存的なアミノ酸飢餓や紫外線応答に重要であると同時にGCN2非依存的なメカニズムで細胞周期やマウスの胎児期での成長を制御することを明らかにした。Keap1は複数のシステイン残基を使い分けて多様なストレス刺激を感知することを実証し、Nrf2誘導剤はシステイン必要性の違いから5種類に分類されることを明らかにした。新規プロテアソーム機能調節因子を複数同定し、また、プロテアソーム機能低下によるNrf1の活性化因子としてDDI2を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸化ストレス応答やタンパク質生体恒常性維持機構に関わる重要な因子を同定するとともに、生体におけるそれらの役割を明らかにした。これらは、加齢性疾患の病態生理を理解し予防法を検討する上で重要な標的因子になると思われる。また、親電子性物質や活性酸素に対するKeap1のセンシング機構を明らかにした。これらは、細胞の酸化ストレス感知機構に重要な意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：We identified the strong physical interaction between Nrf2 and ATF4, and demonstrated that they cooperatively regulates gene expression of a set of cytoprotective genes. We also showed that GCN1L1 regulates cell cycle and embryonic development in a GCN2-independent manner as well as GCN2-dependent amino acid starvation and UV response. We also demonstrated that Keap1 senses a variety of stresses by using multiple cysteine residues and consequently, Nrf2 inducers can be classified into at least 5 subclasses. We also identified novel regulators of proteasome and an Nrf1 activator during proteasome inhibition.

研究分野：ストレス応答

キーワード：Nrf2 Keap1 ミトコンドリア プロテアソーム 活性酸素 酸素ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内レドックスやタンパク質動態の恒常性維持機構(プロテオスタシス)の破綻は、それぞれ酸化ストレスおよびタンパク質変性ストレスとしてクロストークしつつ加齢性疾患等の発症・病態形成に関与する。これは生体外からの環境ストレスばかりではなく細胞内恒常性維持機構の破綻(例えば老化に伴うミトコンドリア機能低下や腸内細菌のアンバランス)としても生じうる。

高等動物レドックス制御の鍵転写因子Nrf2は、活性酸素や親電子性物質の消去・除去や細胞内レドックス環境の維持に加え、プロテアソームの発現誘導やミトコンドリア機能の活性化など幅広い生理作用を発揮することが報告されている。このことは、酸素ストレス(酸素あるいは酸素を起源とする活性分子種の最適レベルからの逸脱およびこれに起因するレドックス異常)で活性化されたNrf2による遺伝子発現制御が細胞内外からの刺激に対する環境適応に重要な働きを有していることを示唆している。例えば、モデル動物の線虫においては、ミトコンドリア異常によって活性化した線虫Nrf2が細胞内環境適応に働き、寿命の延長につながることも報告されている(いわゆるミトホルミシス現象(mitohormesis))。

申請者はこれまでにKeap1/Nrf2応答系が生体防御に果たす役割やKeap1がレドックス異常を感知する分子機構について世界に先駆けた研究を展開してきた。近年では、Nrf2相互作用因子の網羅的検索からプロテオスタシスに関連する転写因子ATF4(eIF2 α リン酸化の下流で選択的に活性化されIntegrated Stress Response(ISR)に中心的な役割を果たす)やアミノ酸飢餓応答因子GCN1L1(eIF2 α リン酸化の上流因子)がNrf2と相互作用することを見出し、その役割を解析してきた。生理的な加齢や病態に伴うNrf2の活性化機構・役割を明らかにするためには、従来の外来性親電子性物質によるNrf2応答経路の解析ばかりではなく、種々の細胞内小器官とのクロストーク解析などを含めたNrf2活性化機構・恒常性維持機構の解析が肝要である。

2. 研究の目的

本研究では、プロテオスタシスやミトコンドリアからの生理的・病理的なシグナルがKeap1-Nrf2経路を中心とした核内転写調節機構とクロストークする様子を解析し、酸素ストレスに応答した細胞内環境リモデリング機構を解明することを目的にした。

3. 研究の方法

- 1) 酸素ストレスで活性化する転写因子のネットワークを、細胞内小器官間のクロストーク(特にミトコンドリア-核とのクロストーク)を基盤に解析する。特に、Nrf2結合因子であり、ATF4の上流活性化因子であるGCN1L1に注目し酸素ストレス感受性転写因子ネットワークの役割をNrf2経路とeIF2 α リン酸化経路とのクロストークを中心に明らかにする。
- 2) プロテアソーム機能低下マウス(PAC1 KOマウス等)における酸化ストレス惹起メカニズムを解明し、老化への関与を検討する。また、プロテアソームとレドックス制御を結びつける因子を、プロテアソームと会合する新規因子の探索およびショウジョウバエ遺伝学などを用いて明らかにする。さらにKeap1-Nrf2経路とのクロストークを解析し、その破綻としての疾患発症・病態形成機構について明らかにする。

4. 研究成果

1) Keap1-Nrf2経路とGCN1L1-ATF4経路による酸素ストレス応答転写因子ネットワークの解析以前に酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより、Nrf2がATF4と相互作用することを見出していたがその意義や詳細な分子メカニズムについては不明であった。今回、プロテアソーム阻害により活性化されたNrf2とATF4が協調的に働いてシスチントランスポーターであるxCT遺伝子の発現調節に協調的に関わることを明らかにした。また、この協調機構はプロテアソーム阻害剤に対してがん細胞が耐性を獲得するメカニズムの1つであることを明らかにした。実際にxCT阻害剤共投与によりプロテアソーム阻害剤による細胞毒性は著明に増強した。また、ファイトケミカルであるカルノシン酸は、ATF4とNrf2を同時に活性化しこれらの協調効果によりnerve growth factor (NGF), グルタチオン合成酵素GCLC, xCTなどの発現をsuper inductionした。これらの結果はいずれもNrf2とATF4が一群の生体防御遺伝子に対して協調的に働くことを示唆した。

2) Nrf2によって制御されるH0-1がミトコンドリア品質管理に及ぼす生理的意義の解析
酸化ストレスに応答したNrf2依存性のH0-1 enhancer領域からのlong non-coding RNAの発現がH0-1の遺伝子の発現誘導に重要であることを明らかにした。H0-1は酸化ストレス応答遺伝

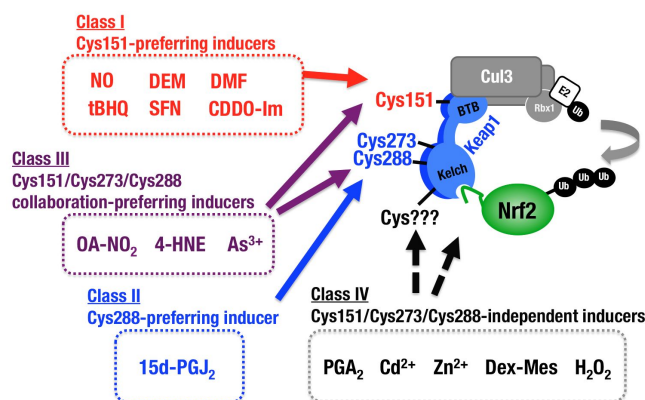
子であり、その応答メカニズムの分子基盤を明らかにする端緒となるものと思われた。HO-1 KO 胎児繊維芽細胞 (MEF) を用いて解析し、HO-1 はミトコンドリアスーパーオキシドによる細胞毒性には関与しないことを明らかにした。

3) Nrf2結合因子GCN1L1の個体レベルでの解析

Nrf2 結合因子であり、ATF4 の上流活性化因子である GCN1L1 を私どもは以前に Nrf2 結合因子として見出しており、Nrf2 と ATF4 とのクロストークに GCN1L1 が関与することが予想された。そこで今回私たちは2つの GCN1 変異マウス (GCN1^{Nu11} (完全欠失) と GCN1L1^{ΔRWDBD} マウス (RWD ドメイン結合ドメイン欠失変異体マウス) を作り機能を解析した。RWDBD は GCN1L1 における GCN2 との結合ドメインである。GCN1^{Nu11} は胎生早期に致死であったが、GCN1L1^{ΔRWDBD} マウスは胎児期成長遅延を呈して出生直後に死亡した。GCN2 と同様に RWD を有する DRG2 の発現低下細胞は p21 の発現誘導を伴う G2/M arrest を起こすことが報告されていた。GCN1L1^{ΔRWDBD} マウス由来の胎児期繊維芽細胞 (GCN1L1^{ΔRWDBD} MEF) で解析すると、DRG2 の発現低下細胞とよく似た p21 の発現増加を伴う G2/M arrest を起こしていた。また、GCN1L1^{ΔRWDBD} MEF では IGF-1 に対する応答も低下していた。これらの異常が *in vivo* での成長遅延に関与していると思われる。しかしながら、親電子性物質に対する Nrf2 経路の応答は野生型 MEF と変わらなかったことから GCN1L1 の RWDBD は Nrf2 の活性化には関与しないことが明らかになった。

4) Keap1-Nrf2 経路によるストレス感知機構の解析

Keap1-Nrf2 システムは様々な親電性物質や活性酸素種に反応して一群の生体防御遺伝子群を活性化する。Keap1 の3つのシステイン残基 C151、C273、C288 は親電子性物質に対する反応性が高く、ストレスセンサーとして働くと考えられていたが、その機能的検証は十分に行われていなかった。そこで、これらの反応性システイン残基について各種変異体を作成し、様々な Nrf2 誘導剤に対する応答性を検証した。その結果、Nrf2 誘導剤は標的システイン残基の違いから、少なくとも以下の4つのグループに分類できることがわかった。すなわち、1) C151 依存型、2) C288 依存型、3) C151/C273/C288 相補型、4) C151/C273/C288 非依存型誘導剤に分類された。本研究により、Keap1 は複数のストレス感知機構を備え持つことが機能的にはじめて実証された。また、これまで長く謎であった過酸化水素に対する Keap1 センサーシステイン残基を明らかにした。



5) プロテアソームとレドックス制御のクロストーク解明

脱アセチル化酵素 Sirt1 が、タンパク質品質管理機構に関与していることを明らかにした。一方で、26S プロテアソームの新規ユビキチン受容体サブユニット Rpn13 が実際にマウス生体内において既存のユビキチン受容体サブユニット Rpn10 と協調して働き、細胞恒常性維持に働くことを遺伝学的に示した。研究の進んでいる酵母では Rpn10, Rpn13 両者が欠損してもマイルドな表現型を示すのに比べ、哺乳類では両者の働きが必須であることを示した。また、プロテアソーム機能低下時のプロテアソーム遺伝子発現亢進を担う Nrf1 の活性化因子として DDI2 を同定した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 55 件)

(全て査読あり)

1. Concomitant Nrf2- and ATF4-activation by Carnosic Acid Cooperatively Induces Expression of Cytoprotective Genes. *Mimura J, Inose-Maruyama A, Taniuchi S, Kosaka K, Yoshida H, Yamazaki H, Kasai S, Harada N, Kaufman RJ, Oyadomari S, Itoh K. **Int. J. Mol. Sci.** 20, 2019.
2. Dayalan Naidu S, Muramatsu A, Saito R, Asami S, Honda T, Hosoya T, Itoh K, Yamamoto M, *Suzuki T, *Dinkova-Kostova A. C151 in KEAP1 is the main cysteine sensor for the cyanoenone class of NRF2 activators, irrespective of molecular size or shape. **Sci Rep** 8, 8037, (2018).
3. Kasai S, Yamazaki H, Tanji K, Máté János Engler, Matsumiya, Itoh K. Role of ISR-ATF4 pathway and its cross talk with Nrf2 in mitochondrial quality control. **J. Clin. Biochem. Nutr.** 64, 1-12, 2019.

4. Kasai S, Mimura J, Ozaki T, *Itoh K. Emerging regulatory role of Nrf2 in iron, heme and hemoglobin metabolism in physiology and disease. **Front. Vet. Sci.** 5:242, 2018.
5. *Liu PY, Sokolowski N, Guo ST, Siddiqi F, Atmadibrata B, Telfer TJ, Sun Y, Zhang L, Yu D, Mccarroll J, Liu B, Yang RH, Guo XY, Tee AE, Itoh K, Wang J, Kavallaris M, Haber M, Norris MD, Cheung BB, Byrne JA, Ziegler DS, Marshall GM, Dinger ME, Codd R, Zhang XD, Liu T. The BET bromodomain inhibitor exerts the most potent synergistic anticancer effects in combination with quinone-containing compounds and anti-microtubule drugs. **Oncotarget.** 7, 79217-79232, 2016.
6. Mimura J, *Itoh K. Role of Nrf2 in the pathogenesis of atherosclerosis. **Free Radic. Biol. Med.** 221-232, 2015.
7. *Itoh K, Ye P, Matsumiya T, Tanji K, Ozaki T. Emerging functional cross-talk of Keap1-Nrf2 system and mitochondria. **J. Clin. Biochem. Nutr.** 56, 91-97, 2015.
8. Maruyama A, Mimura J, *Itoh K. Non-coding RNA derived from the region adjacent to the human HO-1 E2 enhancer selectively regulates HO-1 gene induction by modulating Pol II binding. **Nucleic Acids Res.** 42, 13599-13614, 2014.
9. Ye P, *Mimura J, Okada T, Sato H, Liu T, Maruyama A, Ohyama C, Itoh K. Nrf2- and ATF4-dependent upregulation of xCT modulates the sensitivity of T24 bladder carcinoma cells to proteasome inhibition. **Mol. Cell. Biol.** 34, 3421-3434, 2014.
10. Yoshida E, *Suzuki T, Morita M, Taguchi K, Tsuchida K, Motohashi H, Doita M, and *Yamamoto M. Hyperactivation of Nrf2 leads to hypoplasia of bone in vivo. **Genes to Cells** 23, 2018.
11. Higashi C, Kawaji A, Tsuda N, Hayashi M, Saito R, Yagishita Y, Suzuki T, Uruno A, Nakamura M, Nakao K, Furusako S, **Yamamoto M. The novel Nrf2 inducer TFM-735 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. **Eur J Pharmacol.** 802, 76-84, 2017.
12. *Suzuki T, Seki S, Hiramoto K, Naganuma E, Kobayashi HE, Yamaoka A, Baird L, Takahashi N, Sato H and *Yamamoto M. Hyperactivation of Nrf2 in early tubular development induces nephrogenic diabetes insipidus. **Nature Communications.** 8, 14577, 2017.
13. Iso T, *Suzuki T, Baird L, **Yamamoto M. Absolute amounts and status of Nrf2-Keap1-Cul3 complex within cells. **Mol Cell Biol,** 36, 3100-3112, 2016.
14. Nezu M, Souma T, Yu L, Suzuki T, Saigusa D, Ito S, Suzuki N, and Yamamoto M. Transcription factor Nrf2 hyperactivation in early-phase renal ischemia-reperfusion injury prevents tubular damage progression. **Kid Int.** 91, 387-401, 2016.
15. Kobayashi HE, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, Sekine H, Tanaka N, Moriguchi T, Motohashi H, Nakayama K, and * Yamamoto M. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. **Nature Communications.** 7, 11624, 2016.
16. Saito R, *Suzuki T, Hiramoto K, Asami S, Naganuma E, Suda H, Iso T, Yamamoto H, Morita M, Baird L, Furusawa Y, Negishi T, Ichinose M, * Yamamoto M. Characterizations of Three Major Cysteine Sensors of Keap1 in Stress Response. **Mol Cell Biol.** 36, 271-284, 2016.
17. Koizumi S, Hamazaki J, *Murata S. Transcriptional regulation of the 26S proteasome by Nrf1. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.** 94, 325-336, 2018.
18. Tomita T, Hirayama S, Sakurai Y, Ohte Y, Yoshihara H, Saeki Y, Hamazaki J, *Murata S. Specific modification of aged proteasomes revealed by tag-exchangeable knock-in mice. **Mol Cell Biol.** 39, e00426-18, 2018.
19. Uechi H, Kuranaga E, Iriki T, Takano K, Hirayama S, Miura M, Hamazaki J, *Murata S. Ubiquitin-binding protein CG5445 suppresses aggregation and cytotoxicity of amyotrophic lateral sclerosis-linked TDP-43 in drosophila. **Mol Cell Biol.** 38, e00195-17, 2018.
20. Lu X, Nowicka U, Sridharan V, Liu F, Rndles L, Hymel D, Dyba M, Tarasov SG, Tarasova NI, Zhao XZ, Hamazaki J, Murata S, Burke TR Jr, *Walters KJ. Structure of the Rpn13-Rpn2 complex provides insights for Rpn13 and Uch37 as anticancer targets. **Nat Commun.** 8, 15540, 2017.
21. Uddin MM, Ohigashi I, Motosugi R, Nakayama T, Sakata M, Hamazaki J, Nishito Y, Rode I, Tanaka K, Takemoto T, *Murata S, *Takahama Y. Foxn1-β5t transcriptional axis controls CD8+ T-cell production in the thymus. **Nat Commun.** 8, 14419, 2017.
22. Koizumi S, Irie T, Hirayama S, Sakurai Y, Yashiroda H, Naguro I, Ichijo H, Hamazaki J, *Murata S. The aspartyl protease DDI2 activates Nrf1 to compensate for proteasome dysfunction. **Elife.** 5, e18357, 2016.
23. Hamazaki J, Hirayama S, *Murata S. (2015) Redundant roles of Rpn10 and Rpn13 in recognition of ubiquitinated proteins and cellular homeostasis. **PLoS Genet.** 11, e1005401.
24. Uechi H, Hamazaki J, *Murata S. (2014) Characterization of the testis-specific proteasome subunit α4s in mammals. **J Biol Chem.** 289, 12365-74, 2014.

〔学会発表〕(計 100 件)

1. Itoh K. Prevention of Age-related Degenerative Diseases by Nrf2-based Early Intervention. シンポジウム「Targeting antioxidant defense system in redox diseases」 WCP2018 KYOTO. July 1-July 7, 2018, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan.

2. 伊東 健. Nrf2とATF4の相互作用を基盤にした加齢性変性疾患予防法の開発. 第14回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム. 平成29年10月26日(木) - 27日(金) 東北大学医学部星陵オーデトリウム、仙台.
3. Itoh K. Elucidation of Nrf2-centered transcriptional network toward the development of novel neuroprotective strategy. 9TH International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. May 20-22, 2016, Sendai International Center, Sendai, Japan.
4. 伊東 健. 酸化ストレス鍵転写因子Nrf2の生理的役割・進化論的意義と疾患予防. 第69回日本酸化ストレス学会学術集会, 平成28年8月30日(火) - 31日(水), 仙台国際センター, 仙台.
5. 伊東 健. Nrf2を中心とした転写因子ネットワークによる疾患制御. 第37回日本循環制御医学会総会, 平成28年7月8日(金) - 9日(土)、ステーションコンファレンス東京, 東京.
6. 伊東 健. Nrf2を中心とした転写因子ネットワークの活性化を利用した食品機能性成分による脳神経変性疾患予防戦略. 第7回岐阜薬科大学機能性健康食品(蜂産品)研究講演会、平成28年12月3日(土), じゅうろくプラザ, 岐阜.
7. 伊東 健. Nrf2-FPN1経路を介した抗炎症の分子機構の解析, 第38回日本分子生物学会年会, 平成27年12月1日(火) - 12月4日(金), 神戸ポートアイランド, 神戸.

〔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:
 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:
 国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 鈴木 隆史

ローマ字氏名: Suzuki Takafumi

所属研究機関名: Tohoku University

部局名: Graduate School of Medicine

職名: lecturer

研究者番号(8桁):

70508308

研究分担者氏名: 濱崎 純

ローマ字氏名: Hamazaki Jun

所属研究機関名：The University of Tokyo

部局名：Graduate School of Pharmaceutical Sciences

職名：助教

研究者番号（8桁）:

80533588

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。