

令和 4 年 9 月 5 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04057

研究課題名(和文) ストレス感受性および最大応答度の調節による老化および肥満解消方策の確立

研究課題名(英文) Controlling the aging and metabolic process with anti-stress enzyme expression profiles through those controlling transcriptional factor, Nrf1

研究代表者

辻田 忠志 (TSUJITA, Tadayuki)

佐賀大学・農学部・講師

研究者番号：20622046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：老化を引き起こす活性酸素種を無毒化する抗酸化酵素群は、抗酸化応答配列に結合するNrf転写因子群により発現が制御される。この一群の中で、Nrf1には過剰な抗酸化応答を抑制する。研究代表者は老齢マウスや老化モデルマウス肝において、Nrf1タンパク質量がすることを発見したこと、本研究では、早期老化モデルであるKlotho欠失マウスと加齢マウスとの比較解析データとNrf1欠失マウスとの共通項から、老化によって変動する生体物質代謝経路として、ポリアミンとステロイド代謝系を明らかとし、これらが実際Nrf1で制御されることと、これらの遺伝子変動による加齢現象を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化のイベントは多岐にわたり、何が引き金になるのかは不明な点が多い中で、今回Nrf1タンパク質の発現低下が、老化の引き金の一端を担っていることを明確にできた点は大きい。この現象は、マウス個体で得られた成果であることから、ヒトへの外挿可能性も高い。さらにNrf1が制御する代謝経路についても、数種見いだせたので、このタンパク質成分の制御が老化抑制になるのか、今後遺伝子改変動物の作出を通して検証を進め、将来的には、老化を抑制する食品成分や低分子化合物の探索を可能とする情報を提供できた点で学術的に貢献した。

研究成果の概要(英文)：Increasing reactive oxygen species (ROS) is one of the main cause of aging, and that are detoxifying with the antioxidative proteins that are regulated through group of NF-E2-related factor (Nrf) transcription factors. Within this group, Nrf1 has a suppressive function for excessive antioxidant responses and cooperates with Nrf2 to regulate antioxidant mechanisms. To elucidating the molecular mechanisms involved in aging and ROS metabolism, we have been proposed that Nrf1 protein level was changed in the liver of aging mouse model. In this study, comparative analysis of data between Klotho-deficient (Klotho^{-/-}) mice as a model of and aged mice, as well as commonalities with Nrf1-deficient mice, we revealed that polyamine and steroid hormone metabolic pathways are altered during aging. Therefore, we conclude that Nrf1 genes might contribute for aging process.

研究分野：生化学

キーワード：老化 転写因子 ポリアミン 代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

老化を引き起こす活性酸素種 (ROS) を無毒化する抗酸化酵素群は、抗酸化応答配列に結合する NF-E2-related factor (Nrf) 転写因子群により発現が制御される。この一群の中で Nrf2 は最も強力に抗酸化酵素群を誘導できる転写活性化因子である (Yamamoto M, *Physiol Rev*, 2018)。一方で、研究代表者らは、Nrf1 には過剰な抗酸化応答を抑制する側面があり、Nrf2 と協調して抗酸化機構を制御することを実証してきた (Tsuji T, *et al.*, *Mol Cell Biol*, 2014)。研究代表者は、老化と ROS 代謝に関する分子メカニズムを解明する過程で、老齢マウスや老化モデルマウス肝において、Nrf1 タンパク質の存在量が変動することを見出した。そこで、早期老化モデルである *Klotho* 欠失マウス (*Klotho*^{-/-}) に Nrf1 発現減少マウス (*Nrf1-KD*) および、Nrf1 過剰発現マウス (*Nrf1-Tg*) を交配するなどして、Nrf1 と老化をはじめとする生体恒常性維持機構との関連を解明することを目的として研究を進めた。

2. 研究の目的

本研究では、Nrf1 の制御によって老化や肥満に改善すると目されているが、現象論に留まる状況であるため、次の3点に着目して老化および肥満を解消する分子メカニズムの実態解明を目的とした。

- 分子実態の解明

老化や肥満状況下で、Nrf1 が関与する遺伝子や低分子代謝物を割り出した。研究代表者が保持する複合遺伝子改変マウスの解析から、これまで変動量が少ないため見逃していた老化や肥満関連因子の同定に挑んだ。

- 遺伝学的な実証

見出した遺伝子や低分子代謝物刺激を引き起こす標的遺伝子の調節を培養細胞で試み、遺伝学的な介入効果を解析した。

- 疾患補正戦略の提唱

薬理介入を目指した効果分子の探索系の創出に挑んだ。薬理作用のあるタンパク質の酵素活性評価系や転写調節レポーターなどを活用して、低分子化合物や活性天然物の探索研究の道筋をつけた。

3. 研究の方法

本研究では遺伝的老化モデル *Klotho*^{-/-}、自然加齢マウス (3 年飼育) と野生型マウス間において RNA は次世代シーケンサーで、タンパク質と低分子化合物は質量分析で網羅的変動解析を実施し、老化におけるサロゲートマーカーを探索した。見出したサロゲートマーカーや周辺の代謝関連酵素について、それぞれ Nrf1 との関連を ChIP 解析で確認した。

これまで、老化に伴い、Nrf1 タンパク質量が変動することを見出していたが、老化と Nrf1 の機能を遺伝学的に証明するために、*Nrf1-KD* および *Nrf1-Tg* マウスを用いて、遺伝的老化モデルマウス (*Klotho*^{-/-}) において Nrf1 の発現量を遺伝学的に調整した複合遺伝子改変マウス (それぞれ、*Klotho*^{-/-}::*Nrf1-KD*、および *Klotho*^{-/-}::*Nrf1-Tg*) を樹立して寿命延伸効果の解析を実施した。

4. 研究の成果

- Nrf1遺伝子発現調節と老化モデルの寿命延伸効果について
 遺伝学的老化モデル*Klotho*^{-/-}は長年遺伝学的な老化モデルとして使用されてきた。我々は研究の初期段階からNrf1タンパク質と老化の関連について注目をしていた。事実、老化および加齢によってNrf1タンパク質は著明に減少した。そこで、本研究で*Klotho*^{-/-}に*Nrf1-KD*および*Nrf1-Tg*で介入した複合遺伝子改変マウス(それぞれ、*Klotho*^{-/-}::*Nrf1-KD*、および*Klotho*^{-/-}::*Nrf1-Tg*)を樹立して寿命延伸効果の解析を進めた。十分な個体数の、野生型、*Klotho*^{-/-}、*Klotho*^{-/-}::*Nrf1-KD*、および*Klotho*^{-/-}::*Nrf1-Tg* *Klotho*^{-/-}の寿命について観察を実施した。*Klotho*^{-/-}::*Nrf1-KD*は出生後ごく早期に死亡してしまう個体があり、*Klotho*とNrf1の協調効果で初期発生へ影響する可能性が示唆されたのと、死亡する前に個体を回収することが困難であったので、解析を断念した。*Klotho*^{-/-}::*Nrf1-Tg*に関しては、*Klotho*^{-/-}との寿命の差異は認められなかった。

- 老化モデルマウス・加齢マウス・Nrf1欠失マウス3者間で共通する遺伝子発現解析
 そこで、*Klotho*^{-/-}および3年齢マウスと野生型マウスの肝臓から、RNA、タンパク質、低分子代謝物を回収し、多元的な解析を実施した。回収したRNAは次世代シーケンサー解析を通して、発現変動解析を実施した。そのうち、Nrf1の欠失によって直接制御される可能性があり、老化と関連がある遺伝子として*Smox*、*Srd5a1*などを見出した。

- *Smox*が関与する老化現象の解析
*Smox*は長鎖ポリアミン、スペルミンの分解に関与する酵素であり、その作用によって、スペルミジンと3アミノプロパナールを生じる。スペルミンはアミノ酸や他の代謝物へ変化するが、3-アミノプロパナールは非酵素的にアクロレインへ変化する。アクロレインはこれまでその存在があまり注目されてこなかったが、活性酸素種の1000倍程度も高く生体高分子を攻撃する能力を持つことが知られている。最近、遊離アクロレインを検出する蛍光プローブや、アクロレインが結合したタンパク質を検出する抗体などが開発されたため、我々も老化モデルマウス等で確認したところ、著明にアクロレインが蓄積することを確認できた(図1)。

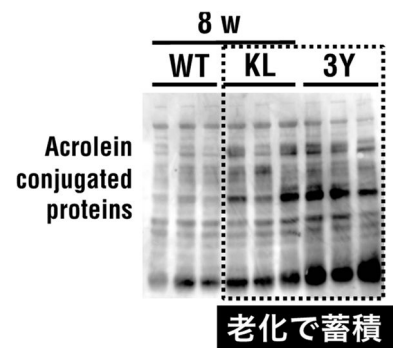


図1 遺伝的老化モデル(KL)、高齢マウス(3Y)肝において、アクロレイン抱合タンパク質が蓄積し、遊離アクロレインの蓄積が示唆される。

老化モデルや加齢マウスではSmoxの発現が上昇しており、アクロレインの蓄積が裏付けられた。逆にSmoxを過剰発現させたところ、確かに遊離アクロレインが著明に上昇することも確認できた(図2)。ここでSmoxを阻害することが老化抑制につながると想定し、Smoxの阻害剤取得のために、組換えタンパク質の合成に着手した。大腸菌発現系でSmox過剰発現に挑んだが、組換えタンパク質を得ることはできなかった。現在バキュロウイルス発現系で組換えタンパク質を取得することができたので、Smoxの酵素活性を指標としたスクリーニング系の構築に現在取り組んでいる。

翻って、Smoxがどのように発現制御されるかについても、解析を進めた。Smoxには転写開始領域周辺にNrf1やNrf2が結合する抗酸化応答配列が4つ存在することがChIP-seq解析から判明した。そのうち開始メチオン近傍の抗酸化応答配列にNrf1が結合することを見出した。以上の結果から、老化によってNrf1の発現が低下し、Smoxの発現が上昇、スペルミンが分解側の流れが

亢進し、その副産物としてアクロレインが発生し、細胞にダメージを与え、Senescence-associated secretory phenotype (SASP)因子などが上昇することが老化の一因となるのではないかと結論した。実際にSASP因子として、炎症性のサイトカイン、ケモカイン、細胞外マトリクス酵素などの上昇が老化モデル、加齢マウスおよびNrf1欠失マウスで見出されているので、今後はこれらの連関を明らかにする研究も推進する予定である。

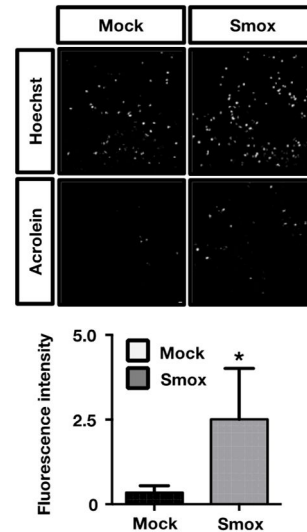


図2 Smoxを過剰発現させると遊離アクロレインが増加する。遊離アクロレインは蛍光プローブで可視化し、Hoechst核染色との比でアクロレイン蓄積量を定量化した。

- Srd5a1と老化の関連について

一般的に老化が進むと、もっとも顕著に表現系が現れるのは生殖系であることは想像に難くない。老化モデルや加齢マウスの解析において、生殖系列に関係しそうな経路についてもmRNA-seqおよび代謝物の解析から導き出したところ、男性ホルモン、テストステロンの成熟に関係する酵素、Steroid 5 alpha reductase 1 (Srd5a1)を見出した。Nrf1ヘテロ欠失雄マウスが、早期に生殖能力が低下する傾向にあることが知られていたが、実際にNrf1欠失させると、著明にSrd5a1の発現低下が認められた。Srd5a1は性の分化や男性ホルモンの代謝に重要な役割を持っており、非可逆的にテストステロンをジヒドロテストステロン(DHT)に還元する酵素である。そして、同様の機能を持つ酵素としてSrd5a2、3も存在するが、老化やNrf1低下によって影響を受けるのはSrd5a1のみであり、事実クロマチン免疫沈降解析によって、Srd5a1の転写調節領域に直接結合することを明確にした。Srd5a1はNrf1欠失によって発現が低下し、Nrf1を遺伝的に過剰発現、もしくはプロテアソーム阻害剤などでNrf1を強制的に安定化させると発現が上昇した。現在、最もSrd5a1の発現寄与が大きい、前立腺における機能解析を進め、Srd5a1の発現調節や、酵素活性に注目した、阻害物質の探索に挑むことにしている。

- 老化とNrf1の連関について

老化のモデルマウスや加齢によってNrf1タンパク質の存在量が低下することが明らかと

なってきたが、その制御メカニズムについてはまだ不明な点が多い。事実、老化によってNrf1のmRNAの発現量は変動していない。最近、Nrf1が転写因子として核へ以降するためには、小胞体からの逆輸送、糖鎖の除去、小胞体膜からの切断、核膜の通過、核内における糖鎖修飾など多くのステップを経て、抗酸化応答配列に結合することが明らかとなってきた。さらに、ゲノムDNAに結合したNrf1がどのような刺激でその場所から離脱し、分解をされるのかについても不明な点が多い。今回は、老化という一つの制御因子を見つけることができたが、Nrf1タンパク質自体がどこで制御を受けるのかについては、今後挑戦すべき課題と言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Bogahawaththa Sudarma, Kodithuwakku Suranga P., Wijesundera Kavindra K., Siriweera Eranga H., Jayasinghe Lalith, Dissanayaka Waruna L., Rajapakse Jayanthe, Herath Chandana B., Tsujita Tadayuki, Wijayagunawardane Missaka P. B.	4. 巻 26
2. 論文標題 Anti-Fibrotic and Anti-Angiogenic Activities of Osbeckia octandra Leaf Extracts in Thioacetamide-Induced Experimental Liver Cirrhosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 4836 ~ 4836
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules26164836	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 該当する

1. 著者名 Sonoda Kento, Bogahawaththa Sudarma, Katayama Akito, Ujike Saki, Kuroki Sae, Kitagawa Naho, Hirotsuru Kohichi, Suzuki Norio, Miyata Toshio, Kawaguchi Shin-ichi, Tsujita Tadayuki	4. 巻 5
2. 論文標題 Prolyl Hydroxylase Domain Protein Inhibitor Not Harboring a 2-Oxoglutarate Scaffold Protects against Hypoxic Stress	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Pharmacology & Translational Science	6. 最初と最後の頁 362 ~ 372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acspsci.2c00002	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9件（うち招待講演 4件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 辻田 忠志
2. 発表標題 ストレス応答性転写因子Nrf1によるアミノ酸の取込および感知機構の制御
3. 学会等名 第12回トランスポーター研究会九州部会・シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻田 忠志
2. 発表標題 含硫化合物が起点となる細胞内ストレス耐性機構の調節
3. 学会等名 第94回日本生化学大会 ・シンポジウム「含硫化合物・温故知新 生物多様性に学ぶ含硫代謝物の多彩な生理作用」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平川 智章, 谷内 めぐみ, 植村 武史, 辻田 忠志.
2. 発表標題 Nrf1の欠失による慢性肝疾患はアクロレインの過剰蓄積が原因か
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本めぐみ, 辻田忠志
2. 発表標題 Nrf1欠失細胞における外来ストレス応答度の変化と分子メカニズム解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平川智章, 辻田忠志
2. 発表標題 Smox過剰発現によるポリアミンインバランス誘導と内因的に発生するアクロレインの評価
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tadayuki Tsujita
2. 発表標題 Discovering the sunny and dark side of Nrf1 transcriptional factor and its utilization
3. 学会等名 31st annual congress of the PGIA (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻田忠志.
2. 発表標題 ポリアミン代謝の不均衡による内因性アクロレインの発生と肝疾患
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会, フォーラム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 志賀奏, 辻田忠志
2. 発表標題 早期老化 -Klotho-/-マウスおよび加齢マウスを用いた老化指標の探索
3. 学会等名 第43回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tadayuki Tsujita, Megumi Taniuchi, Tomoaki Hirakawa, Minami Kudo, Megumi Matsumoto, Kanade Shiga
2. 発表標題 Accumulation of the acrolein conjugated protein in Nrf1 knockout mice and cellular model.
3. 学会等名 The Environmental response V (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 新規な含窒素環状化合物及びその用途	発明者 川口真一, 辻田忠志	権利者 佐賀大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-174971	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

http://seika.ag.saga-u.ac.jp

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	水沼 正樹 (MIZUNUMA Masaki) (10343295)	広島大学・統合生命科学研究科(先)・教授 (15401)	
研究分担者	山本 雄広 (YAMAMOTO Takehiro) (50383774)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
スリランカ	ペラデニア大学			
ドイツ	ヘルムホルツ研究所			