

平成 22 年 6 月 4 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790252

研究課題名 (和文) 脂質代謝制御における転写因子 Nrf1 の機能解析

研究課題名 (英文) A role of Nrf1 in the regulation of lipid metabolism

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)：転写因子 Nrf1 の肝臓特異的のノックアウトが脂肪肝をもたらすメカニズムを知るには、Nrf1 の細胞内における機能の解明が必須である。まず、293T 細胞に Nrf1 を過剰発現させて免疫沈降したサンプルを質量分析機で解析することによって、Nrf1 結合タンパク質を網羅的に同定した。これらのうち、E3 ユビキチンリガーゼ β -TrCP2 に着目してさらなる生化学的・分子生物学的解析を行なった。その結果、 β -TrCP2 のノックダウンにより Nrf1 タンパク質が安定化することを見出し、 β -TrCP2 が Nrf1 の核内での分解に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：To examine the physiological function of a transcription factor Nrf1 in the regulation of lipid metabolism, I tried to identify Nrf1-associated factors by using mass spectrometry. As a result, an E3 ubiquitin ligase subunit β -TrCP2 was identified. Further analyses revealed that β -TrCP2 regulates degradation of Nrf1 in the nucleus. These results provide a mechanistic insight into how Nrf1 is regulated to function in the target gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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, 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームの増加に伴い、脂質代謝制御への注目がこれまで以上に高まっている。以前は予後良好とされていた脂肪肝も、現在では非アルコール性脂肪性肝炎

(NASH) の原因となる可能性が指摘されている。脂質代謝制御機構では、脂肪合成系酵素群の転写を司る SREBP-1c や、脂肪酸酸化分解系酵素群などの転写を担う PPAR α , γ などの転写因子が非常に重要な役割を果たし

ており、これらを標的とした治療・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、Nrf1 結合配列に結合して下流の遺伝子発現を活性化することが知られている。Nrf1 は、同じ CNC ファミリーに属する転写因子 Nrf2 との相同性が高いため、これまでは Nrf2 同様酸化ストレス応答に関与すると考えられていた。しかし、肝細胞特異的な Nrf1 ノックアウトマウスでは酸化ストレス応答に異常は無く、むしろ肝臓への脂肪の蓄積が見られ、脂肪肝を経て最終的には肝癌が発症することを私が所属する研究室や米国のグループが見出している。このマウスの症状は、ヒトにおける NASH の症状と酷似しており、疾患モデルマウスとして NASH 発症のメカニズム解明に貢献することが期待される。このように、Nrf1 は脂質代謝に関与する可能性が高く、脂質代謝異常の新たな治療標的になり得る遺伝子である。しかしながら、Nrf1 の肝細胞特異的ノックアウトマウスにおける脂肪蓄積の原因は未だ明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肝臓における脂質代謝制御に関わる新規因子として転写因子 Nrf1 に注目し、その脂質代謝における機能およびその分子的基盤を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) Nrf1 結合因子の同定

FLAG タグを付加した Nrf1 を 293T 細胞に発現させ、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降することによって、細胞内で Nrf1 と結合する因子群を回収した。これらのタンパク質を SDS-PAGE で展開し、質量分析により Nrf1 と共沈降したタンパク質を同定した。

(2) 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 の部分欠失変異体は PCR を用いた mutagenesis 法により作成した。

(3) 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。

(4) Nrf1 分解アッセイ

Nrf1 の内部欠失変異体を 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 変異体タンパク質の分解タイムコースを Western blotting 法により調べた。

(5) 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あるいは RNA を抽出した。

(6) 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。

(7) マイクロアレイ

Nrf1 の DNA 結合領域を組換え酵素 Cre 依存的に欠失するように作成した遺伝子組換えマウス (Nrf1^{fl/fl} マウス) からプライマリー培養肝細胞を調製し、LacZ または組換え酵素 Cre を発現するアデノウイルスを感染させた。感染 24 時間後に細胞から RNA を抽出し、定法に従いマイクロアレイを行った。

4. 研究成果

(1) Nrf1 結合因子の同定

Nrf1 は小 Maf 因子とヘテロ二量体を形成して標的遺伝子の転写を制御するが、Nrf1 が他のどのような転写仲介因子あるいは制御因子と協調的に作用することで標的遺伝子の発現を活性化しているのかは不明である。Nrf1 と結合する因子を同定することで、脂質代謝遺伝子特異的な転写調節機構の解明を目指した。293T 細胞に過剰発現させた Nrf1 を免疫沈降することにより、細胞内で Nrf1 と相互作用する因子群を回収し、質量分析によって Nrf1 の結合パートナー候補を同定した。同定したタンパク質群の中にはユビキチン-プロテアソーム系に関与する E3 ユビキチンリガーゼサブユニットである β -TrCP2 および Skp1 が含まれており、これらの因子による Nrf1 のユビキチン-プロテアソーム系を介した分解制御機構が示唆された。

(2) Nrf1 と β -TrCP2 の相互作用に関与するドメインの同定

上記実験によって同定した β -TrCP2 と Nrf1 との機能連関を培養細胞を用いた実験により詳細に解析した。まず、Nrf1 と β -TrCP2 の相互作用を確かめるため、COS7 細胞に FLAG タグを付加した Nrf1 および HA タグを付加した β -TrCP2 を一過性に発現させ、免疫共沈降実験を行った。その結果、Nrf1 と β -TrCP2 の

細胞内での相互作用が検出された。この相互作用に参与するタンパク質ドメインを同定するため、様々な Nrf1 の内部欠失変異体を作成し、免疫共沈降実験によって Nrf1 内に存在する β -TrCP2 結合部位の絞り込みを行った。その結果、 β -TrCP2 と相互作用し得るアミノ酸領域を 2 カ所同定した。また、 β -TrCP2 内の Nrf1 結合部位を同定するために、 β -TrCP2 の部分欠失変異体を作成し、同様に免疫共沈降実験を行い Nrf1 と相互作用する領域を同定した。

(3) β -TrCP2 による Nrf1 の分解制御

β -TrCP2 による Nrf1 の分解制御の可能性を調べるため、siRNA による β -TrCP2 のノックダウンが Nrf1 の安定性に影響を及ぼすかどうかを検証した。まず、 β -TrCP1 および β -TrCP2 に対する siRNA を設計し、HeLa 細胞に導入後、 β -TrCP1/2 の mRNA レベルを調べることでノックダウン効率を測定した。その結果、siRNA により β -TrCP1/2 の mRNA 発現量の減少が観察され、効果的にノックダウンできていることが分かった。このとき、一過性に発現させた Nrf1 のタンパク質安定性を Western blotting 法により調べた結果、 β -TrCP1/2 を共にノックダウンすることによって Nrf1 が安定化することが明らかになった。

(4) プロテアソームによる Nrf1 の分解

Nrf1 がプロテアソームによる分解を受けるかどうかを調べるため、野生型および Nrf1 ノックアウトマウスの胚性線維芽細胞をプロテアソーム阻害剤である MG132 で処理し、細胞からタンパク質を抽出した。細胞抽出液を抗 Nrf1 抗体を用いた Western blotting により解析した結果、MG132 処理により Nrf1 が安定化することを明らかにした。

(5) Nrf1 の分解制御ドメインの同定

Nrf1 の分解に関わるドメインを同定する目的で、Nrf1 の部分欠失変異体の安定性を調べる実験を行った。COS7 細胞に Nrf1 変異体を一過的に導入し、MG132 による安定化作用を解析した。その結果、プロテアソーム依存的分解に関与すると思われる領域を 2 カ所同定した。また、翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドを用いて Nrf1 変異体の分解速度を解析し、この 2 つの領域が Nrf1 の分解速度に影響していることを明らかにした。

(6) 2 つの Nrf1 分解機構

β -TrCP1/2 のノックダウンおよび核移行できない 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。これまでの知見から、Nrf1 は通常小胞体膜にアンカ

ーされ分解を受けることが分かっているため、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。現在、細胞質における分解メカニズムの詳細を解析中である。

(7) タンパク質キナーゼ CK2 と Nrf1 の機能関連解析

Nrf1 の結合因子として同定されたものの中にタンパク質キナーゼである CK2 が含まれていたことから、リン酸化による Nrf1 の機能制御という視点から解析を行った。まず、COS7 細胞に一過的に発現させた Nrf1 と CK2 の免疫共沈降実験から、Nrf1 と CK2 が細胞内で相互作用することを明らかにした。さらに、COS7 細胞に発現させ免疫沈降により回収した Nrf1 を基質として、CK2 による *in vitro* キナーゼアッセイを行った結果、CK2 が Nrf1 をリン酸化し得ることを見出した。現在、CK2 によるリン酸化が Nrf1 の機能に与える影響について解析中である。

(8) Nrf1 標的遺伝子の探索

Nrf1 の標的遺伝子を同定する目的で、Cre-loxP システムを用いた Nrf1 欠失による遺伝子発現変化の網羅的解析を行った。肝初代培養系においてアデノウイルスを用いて Cre を発現させ、Nrf1 の欠失によって下流どのような遺伝子群の発現変化が見られるかを調べた。現在、発現量に変化が見られた遺伝子が Nrf1 の標的遺伝子である可能性について詳細な解析を進めている。

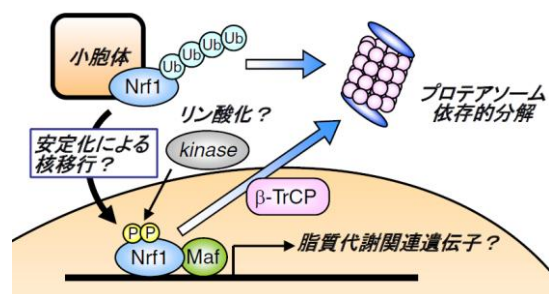


図1. Nrf1 の活性制御モデル

これらの結果から、Nrf1 の活性化機構として、細胞質での分解抑制により安定化した Nrf1 が核移行して標的遺伝子の発現を制御するというモデルが考えられる。また、 β -TrCP1/2 による核内での分解の意義について、Nrf1 の核内からのクリアランスに関与している可能性なども考えられ、今後さらなる解析が必要である。 β -TrCP1/2 による分解には、基質タンパク質のリン酸化が重要であることが分かっているため、Nrf1 のリン酸化による分解制御機構が存在する可能性も高い。

今後はこれら Nrf1 制御メカニズムの解析と標的遺伝子の同定の両面から、脂質代謝系に関わる遺伝子の Nrf1 による発現制御機構を明らかにしていく予定である。

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)

〔学会発表〕(計1件)

Tomoko Morita, Yoshiki Tsuchiya, Mehee Kim, Shun-ichiro Iemura, Takako Tsukide, Akiko Matsumoto, Tohru Natsume, Akira Kobayashi

Cytoplasmic and nuclear degradation mechanisms regulate biological function of transcription factor Nrf1.

'10 遺伝情報 DECODE・冬のワークショップ

2010年1月18日 新潟, 湯沢

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

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し