

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4月2日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2011

課題番号：22590277

研究課題名（和文）転写因子 Nrf1 による脂質代謝制御機構の発展的研究

研究課題名（英文）Advanced investigation of molecular regulation of lipid metabolism by the transcription factor Nrf1

研究代表者

小林 聡 (KOBAYASHI AKIRA)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：50292214

研究成果の概要（和文）：

本研究計画では、転写因子 Nrf1 のノックアウトマウスがしめす脂質代謝異常に着目し、脂質代謝制御機構における Nrf1 の分子メカニズムを解析した。Nrf1 は細胞質と核において2つの異なるタンパク質分解機構により機能抑制されていること、また標的遺伝子としてプロテアソームサブユニット遺伝子を同定した。

研究成果の概要（英文）：

The experimental purpose of this project is to investigate regulatory mechanisms of the transcription factor Nrf1 (NF-E2-related factor 1) for lipid metabolism. First, we found that the turnover of Nrf1 is regulated by the ubiquitin ligase Hrd1 and β -TrCP in the cytoplasm and nucleus, respectively. Second, we identified that proteasome subunit genes psmc4 and psmb6 were direct Nrf1 target genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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・医科学一般

キーワード：脂質代謝異常・遺伝子発現制御・タンパク質分解機構・プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景

(1) 脂肪肝の発症機構を包括的に理解するためには、既存の因子では十分ではない。

脂質代謝に対する研究の社会的要請は高まっており、現在多角的な研究が展開されている。例えば、転写因子 PPAR α 、 γ や SREBP-1c

は、脂肪酸合成において重要な機能をもつため、これら転写因子の分子メカニズムや創薬の研究が精力的に進められている。しかし、一連の研究から明らかにされたことは、脂肪肝の発症機構はきわめて複雑であり、その病態の進展段階に応じて関与する因子が異なるということである。つまり、脂質代謝異常

の包括的な理解のためには、これまで注目されてきた脂質代謝関連因子だけでは不十分であり、ひきつづき新たな脂質代謝調節因子を同定し、これら因子から形成される脂質代謝ネットワークを研究することが重要になる。このような研究動向の中で、本申請研究は、転写因子Nrf1を新たな脂質代謝制御因子に位置づけ、詳細な分子制御機構を解明することを主題とする。

(2) 転写因子Nrf1の肝臓特異的ノックアウトマウスは、脂肪肝になる。

これまで転写因子 Nrf1 は酸化ストレス応答に関わると報告されてきたが、その詳細は不明であった。そこで申請者は、Nrf1 肝臓特異的ノックアウトマウスを作製し表現系解析を行ったところ、脂肪肝を示していることを明らかにした (Ohtsuji et al. (2008) J. Biol. Chem.)。すなわち本研究では、Nrf1 が脂質代謝機構に関わることを明らかにした。

(3) Nrf1 は脂肪酸取り込み因子 CD36 をはじめとする遺伝子の発現を制御する。

Nrf1 による脂質代謝機構を解明するためには、Nrf1 が発現制御する標的遺伝子の同定が重要となる。予備的な解析から申請者は、マウス初代肝細胞を用いたマイクロアレイ解析から、脂肪酸や酸化 LDL の取り込みに関わる CD36 遺伝子を見いだしていた。この結果を支持するように、CD36 遺伝子の調節領域には Nrf1 関連因子の結合配列が存在することが報告されている。しかしながら、CD36 の発現が低下すると脂肪酸取り込みの低下が予想されるため、ノックアウトマウスの脂肪肝とは相反する結果になる。ここに解析すべき問題点が存在する。

(4) Nrf1 の生理機能を理解するためには、そのタンパク質分解機構の解明が必要となる。

申請者は、通常 Nrf1 がタンパク質分解されて機能抑制を受けていることを見出していた。したがって、Nrf1 が転写因子として脂質代謝に関わる遺伝子発現制御を行うためには、この Nrf1 分解機構からの解除が必要となる。この分解機構を明らかにする目的で、すでに Nrf1 結合因子の網羅的スクリーニングを行い、ユビキチンライゲースアダプターである $\text{E}3\text{-Trep1/2}$ を同定している。しかし詳細な解析から、 $\text{E}3\text{-Trep1/2}$ は Nrf1 の核での分解機構に関わることがわかった。つまり Nrf1 は、細胞質と核において異なるメカニズムでタンパク質分解されていること、そして細胞質における Nrf1 タンパク質分解機構は

未解明の問題として残されていることが示された。

(5) Nrf1 の分解機構を解除する活性化するシグナルは？

上述したように、Nrf1 は通常タンパク質分解され機能抑制されている。Nrf1 が脂質代謝制御を行うためには、この分解機構を解除する活性化シグナルが存在することに気づく。これら活性化シグナルは、脂質代謝における重要な物質であることが予想されるため、この問題を解く必要がある。

2. 研究の目的

本研究は、これまで申請者が解析してきた転写因子 Nrf1 による脂質代謝制御機構に関する研究 (H19-20, 基盤 C) の発展的研究にあたる。ここでは過去の研究から明らかにされた問題点として、1) Nrf1 が制御する脂質代謝遺伝子の同定、2) Nrf1 の活性制御に関わる細胞質でのタンパク質分解機構の解明、3) Nrf1 活性化シグナル、センサーの同定と感知機構の解明を行う。

3. 研究の方法

ノックアウトマウス組織ないし培養細胞の遺伝子発現は、リアルタイム PCR により解析した。Nrf1 により CD36 遺伝子の発現活性化は、リンフェラーゼレポーターを用いて解析した。Nrf1 の分子制御に関わる因子の機能的相関は、各因子をノックダウンさせる siRNA を用いた RNA 干渉法により解析した。内在性 Nrf1 の細胞内局在は、細胞分画法による抽出液を用いたウェスタンブロット法により確認した。

4. 研究成果

(1) プロテアソームサブユニット PSMC4, PSMB6 遺伝子は、Nrf1 が発現制御する標的遺伝子であることを見いだした。

これまで Nrf1 は、酸化ストレス応答遺伝子の発現を制御しているという報告がなされていた。この根拠は、Nrf1 関連因子である Nrf2 が酸化ストレス応答を制御していること、また Nrf1 ノックアウトマウスの組織において酸化ストレスが蓄積していることにもとづく。しかしながら申請者は、Nrf1 ノックアウトマウス脳を用いた発現解析から、酸化ストレス応答遺伝子の発現に変動がないことを見だし、真の Nrf1 標的遺伝子がまだ存在する可能性を見いだした (Kobayashi et al. (2011) Genes Cells)。そこで、さらに Nrf1 標的遺伝子を探索した結果、プロテアソームサブユニット遺伝子 PSMC4 ならびに PSMB6 を同定した。ここで Nrf1 は、構成的な

プロテアソーム遺伝子の発現には関わらず、プロテアソーム活性が阻害された時にプロテアソーム遺伝子が発現亢進するプロテアソームリカバリー経路に関わっていた。この Nrf1 によるプロテアソーム遺伝子発現制御は、他に存在するサブユニットにおいても一樣に見られる現象であることを明らかにした (論文投稿中)。Nrf1 によるプロテアソーム遺伝子の発現制御の生理的な意義としては、やはり脂質代謝との関連が考えられる。プロテアソーム複合体形成に関わる PAC1 遺伝子のノックアウトマウスでは、やはり脂質代謝異常を示すことが報告されているため、Nrf1 ノックアウトマウスの示す病態との類似性を認める。この問題は、今後詳細な解析が必要である。

(2) CD36 は、Nrf1 が直接制御する標的遺伝子ではないことがわかった。

これまでにマウス初代肝細胞において Nrf1 遺伝子を欠失させると、CD36 遺伝子の発現が低下することを見いだしていた。また CD36 遺伝子のプロモーター領域には、Nrf1 が認識する ARE 配列 (antioxidant response element) が存在し、マクロファージにおいては Nrf1 関連因子 Nrf2 が発現制御していることが報告されていた。以上のことから、肝細胞においては、この ARE 配列を介した Nrf1 による CD36 遺伝子の発現制御機構の存在が示唆された。しかしながら、その制御機構の詳細を解析したところ、細胞レベルの Nrf1 過剰発現系では、CD36 遺伝子レポーターを活性化することはなかった。また Nrf1 遺伝子欠失による CD36 遺伝子発現変動の時間経過を追ったところ、関連しないことが変わった。したがって、Nrf1 は CD36 遺伝子の発現にはむしろ間接的に関わることを示唆された。

(3) 細胞質における Nrf1 タンパク質の安定性は、ERAD に関わるユビキチン結合酵素 Hrd1 が制御している。

これまでの研究から、Nrf1 は通常ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質分解を受けていることを見いだしていた。脂質代謝制御における Nrf1 の遺伝子発現機構を理解するためには、このタンパク質分解からの脱抑制機構を解明することがきわめて重要となる。そのために、Nrf1 結合因子の網羅的探索し、ユビキチン結合酵素の構成因子である β -TrCP 2 と Skp1 を同定した。 β -TrCP は、Nrf1 分子中央に存在する DSGLS モチーフを認識し、ユビキチン化することを明らかにした。 β -TrCP はリン酸化セリンを認識することで、リン酸化依存的なタンパク質分解をもたらすことが知られている。Nrf1 の DSGLS

モチーフの2つのセリン残基もアラニン残基に変異させると、Nrf1 タンパク質の安定化が見られることから、Nrf1 のタンパク質分解にはリン酸化が関与する可能性が示された (Tsuchiya et al. (2011) Mol. Cell. Biol.)。

一方、 β -TrCP による Nrf1 分解機構の細胞内の場を解析したところ、核における Nrf1 分解に関わることを明らかにした。このことは、細胞質における Nrf1 分解機構の存在を意味する。そこでこの分子機構の解明を行った。仮説としては、Nrf1 は通常小胞体に局在していることが知られているので、Nrf1 は小胞体関連タンパク質分解機構 (ERAD: ER-associated degradation) により分解されていると考え、ERAD に関わるユビキチン結合酵素との関連を調べた。すると Hrd1 が Nrf1 の細胞質におけるタンパク質分解機構を制御していることを見出した (Tsuchiya et al. (2011) Mol. Cell. Biol.)。

(4) Nrf1 活性化シグナルとして、プロテアソーム活性阻害剤を同定した。

(1) で述べたように、Nrf1 はプロテアソームリカバリー経路における遺伝子発現制御に関わることを見いだした。細胞レベルの実験で、Nrf1 が活性化し核移行していることを検証した。HeLa 細胞を、プロテアソーム阻害剤で処理すると、内在性 Nrf1 は核に蓄積することを生化学的な細胞分画法により確認した。核移行した Nrf1 が、標的遺伝子であるプロテアソームサブユニット PSMC4 遺伝子のプロモーターに存在する ARE 配列への結合が亢進していることを、クロマチン免疫沈降実験で確認した。以上のことから、Nrf1 活性化シグナルの1つとして、プロテアソーム阻害剤を同定した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Tsuchiya, Y., Morita, T., Kim, M., Iemura, S., Natsume, T., Yamamoto, M. and Kobayashi, A. (2011) Dual regulation of the transcriptional activity of Nrf1 by β -TrCP- and Hrd1-dependent degradation mechanisms. Mol. Cell. Biol. 31, 4500-4512. 査読有り
- ② Kobayashi, A., Tsukide, T., Miyasaka, T., Morita, T., Mizoroki, T., Saito, Y., Ihara, Y., Takashima, A., Noguchi, N., Fukamizu, A., Hirotsu, Y., Ohtsuji, M., Katsuoka, F. and *Yamamoto, M. (2011) Central nervous system-specific deletion of transcription factor Nrf1 causes progressive motor neuronal dysfunction. Genes Cells 16, 692-703.

査読有り

[学会発表] (計 7 件)

- ① 土谷佳樹, 森田智子, 金 美姫, 家村俊一郎, 夏目 徹, 山本雅之, 小林 聡. 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 13-16 日.
- ② 伊藤義起, 土谷佳樹, 家村俊一郎, 夏目徹, 小林 聡. CK2 regulates the transcriptional activity of Nrf1 to maintain cellular homeostasis. 第 34 回日本分子生物学会年会. 横浜. 2011 年 12 月 13-16 日.
- ③ Tsuchiya, Y., Morita, T., Kim, M., Iemura, S., Natsume, T., Yamamoto, M., and Kobayashi, A. Dual regulation of the transcription factor Nrf1(Nfe2l1) by β -TrCP- and Hrd1-dependent degradation mechanisms. EMBO Workshop on Intracellular Proteolysis and Cancer, Valencia, Spain, Oct. 26-28, 2011.
- ④ Morita, T., Tsuchiya, Y., Kim, M., Iemura, S., Tsukide, T., Natsume, T., Yamamoto, M., and Kobayashi, A. Cytoplasmic and nuclear degradation mechanisms regulate biological function of the transcription factor Nrf1. 第 33 回日本分子生物学会, 神戸, 2010 年 12 月 7-10 日.
- ⑤ Ito, Y., Tsuchiya, Y., Iemura, S., Natsume, T., and Kobayashi, A. CK2 regulates the transcription factor Nrf1 to maintain cellular homeostasis. 6th International Conference on Protein Kinase CK2, Cologne, Germany, Sep. 7-10, 2010.
- ⑥ Tsukide, T., Kobayashi, A., Miyasaka, T., Morita, T., Mizoroki, T., Saito, Y., Ihara, Y., Takashima, A., Noguchi, N., Fukamizu, A., Hirotsu, Y., Ohtsuji, M., Katsuoka, F. and Yamamoto. Central nervous system-specific deletion of transcription factor Nrf1 causes progressive motor neuronal dysfunction. M. 5th International Symposium on GATA transcription factor, Sendai, Japan, Nov.17-19, 2010.
- ⑦ 伊藤義起, 土谷佳樹, 家村俊一郎, 夏目徹, 小林 聡. リン酸化による転写因子 Nrf1 の機能制御機構解析. 分子生物学会 第 10 回春季シンポジウム. 松島, 宮城. 2010 年 6 月 7-8 日.

[その他]

ホームページ

http://biomedical.doshisha.ac.jp/staff/index.html#gaku_ise

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 聡 (KOBAYASHI AKIRA)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号 : 50292214

(2) 研究分担者

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