

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659122

研究課題名(和文) アミノ酸飢餓応答因子 GCN1L1 を介した Nrf2 活性化機構の解析

研究課題名(英文) Nrf2 activation mechanism mediated by amino acid starvation response factor GCN1L1

研究代表者

伊東 健 (Itoh, Ken)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10323289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000 円、(間接経費) 810,000 円

研究成果の概要(和文)：Nrf2は高等動物の酸化ストレス応答において中心的な役割を果たす転写因子である。酵母GCN1はアミノ酸飢餓応答に必須であることがわかっている。本研究において私たちは酵母GCN1のヒトホモログGCN1L1がNrf2と直接相互作用することを見出し、種々のヒトがん細胞やマウス繊維芽細胞においてGCN1L1のノックダウンがNrf2の活性化を減弱することを見出した。また、Nrf2はグリオーマU373MG細胞においてアミノ酸飢餓によって活性化することを見出した。以上のことから、Nrf2を介した酸化ストレス応答はアミノ酸飢餓応答とクロストークすることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Nrf2 plays an important role in oxidative stress response in animals. On the other hand, yeast GCN1 plays an essential role in amino acid starvation response. In this study, we found that GCN1L1, a human homologue of GCN1, directly binds to Nrf2 and that GCN1L1 knockdown diminishes Nrf2 response in various human cancer cells and mouse fibroblasts. Furthermore, Nrf2 was activated by the amino acid starvation. These results suggest the cross talk of Nrf2 stress response with amino acid starvation response pathway.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：アミノ酸飢餓 GCN2 GCN1 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

転写因子 Nrf2 はグルタチオン合成酵素を始めとする多くの抗酸化酵素の発現調節に関わり、活性酸素の蓄積を抑制してがんの増殖や神経変性疾患の防御に重要な役割を果たしている。Nrf2 の活性は抑制因子 Keap1 を介したユビキチン・プロテアソームによるタンパク質分解で負に制御されている。酸化ストレスによる Nrf2 の活性化は Keap1 タンパク質システインチオール基の酸化(不活化)を介した Nrf2 分解の抑制によることがこれまでに提唱されているが詳細は不明である(Yamamoto T et al, MCB 2008)。

酸化ストレス応答においては、細胞内に数 mM の濃度で存在するグルタチオン (GSH; グリシン、システイン、グルタミン酸よりなるトリペプチド) が重要な役割を果たすので、細胞内アミノ酸代謝も酸化ストレス応答に重要である。私たちは Nrf2 と相互作用する因子を網羅的に検索して、酵母 GCN1 ホモログである GCN1L1 が Nrf2 に結合することを発見した。GCN2 はアミノ酸飢餓のセンサーとして働くリン酸化酵素である。GCN2 は翻訳調節因子 eIF2a のリン酸化等を介してストレス耐性に寄与するが、酵母において GCN1 は GCN2 の活性化に必要とされるポリソーム結合性の因子である。私たちはこれまでにヒトアストロサイトーマ細胞株 U373MG においてグルタチオン枯渇薬である親電子性物質ジエチルマレイン酸 (DEM) による Nrf2 の活性化が GCN1L1 のノックダウンにより著明に減弱することを見出した。この結果は、GCN1L1 が Nrf2 の酸化ストレスによる活性化に必須の因子であり、さらに GCN1L1 が酸化ストレスのセンサーとして働くことを示唆した。

2. 研究の目的

本研究においては、酵母においてアミノ酸飢餓応答に必須の因子である GCN1 のヒトホモログ GCN1L1 が酸化ストレスの鍵転写因子 Nrf2 の活性化に果たす役割を解明するため、特に以下の2点について明らかにすることを目的とした。

(1) 酸化ストレス (DEM およびその他の酸化ストレス刺激) による Nrf2 活性化における GCN1L1 の役割および分子機構を明らかにする。

(2) 酵母において GCN2-GCN1 経路を活性化するアミノ酸飢餓 (特にシステイン飢餓) が Nrf2 を活性化するかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Nrf2 と GCN1L1 との相互作用部位を明らかにするため、GST-Nrf2 の融合タンパク質と ³⁵S 放射性ラベルした GCN1L1 タンパク質を用いてプルダウン法により解析した。

(2) GCN1L1 の細胞内局在は western blot 解析と免疫染色法により解析した。また、ハロタグ

を融合した GCN1L1 を用いて、DEM が GCN1L1 の細胞内局在に影響を与えるかどうかを解析した。(3) 種々のがん細胞や繊維芽細胞および種々の酸化ストレス剤を用いて GCN1L1 ノックダウンおよび GCN2 ノックダウンが Nrf2 経路に与える影響を解析した。

(4) GCN1L1 が Nrf2 の転写活性化能に与える影響を HeLa 細胞における一過性過剰発現実験により解析した。トランスフェクション試薬には Fugene を用いた。

(5) システインなどのアミノ酸が欠乏した培地を用いてアミノ酸飢餓が Nrf2 経路に与える影響を解析した。

4. 研究成果

(1) Neh2, Neh4, Neh5 を含む Nrf2 N 末端 (NT) 領域と GCN1L1 との相互作用様式を明らかにするため、Nrf2 および GCN1L1 の各種欠変異体を用いて解析した。その結果、Nrf2 の Neh5 領域が GCN1L1 全長と強く相互作用することが明らかになった。Neh2-4 を含む領域は非常に弱く GCN1L1 と相互作用した。また、Nrf2-NT は GCN1L1 の最も N 末端の 1~373 アミノ酸領域と強く相互作用することが明らかになった。この領域は機能ドメインが同定されていない機能未知の領域であった。

(2) GCN1L1 をノックダウンした T-24 細胞 (膀胱癌細胞)、U87MG 細胞 (グリオーマ) においては、U373MG 細胞と同様に DEM や tBHQ による Nrf2 の細胞内蓄積の減弱が観察された。また、マウス繊維芽細胞においては、GCN1L1 ノックダウンにより過酸化水素による Nrf2 の蓄積が減少した。また、U373MG 細胞においては、プロテアソーム阻害による Nrf2 の蓄積が GCN1L1 ノックダウンにより減弱した。

GCN1L1 をノックダウンした U373MG 細胞では DEM 刺激による AKT のリン酸化 (Ser473 番目のリン酸化) が減弱していたが、T-24 細胞ではそれが観察されなかったことから GCN1L1 の役割は細胞種ごとで異なることが示唆された。HeLa 細胞において解析すると、GCN1L1 のノックダウンは酸化ストレスによる Nrf2 の細胞内蓄積には影響を与えなかったが HO-1 のタンパク質レベルでの誘導を減弱した。このことは、GCN1L1 が Nrf2 の制御とは独立して HO-1 の発現制御を担う可能性を示唆した。さらに U373MG 細胞では、GCN2 のノックダウンが HO-1 の mRNA レベルおよびタンパク質レベルでの発現を著明に増加することから (図 1)、GCN1L1-GCN2 経路は HO-1 の発現レベルをタンパク質あるいは mRNA レベルで調節していることが考えられた。

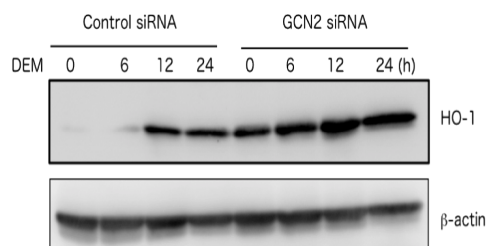


図1 GCN2ノックダウンによるHO-1タンパク質の誘導。ControlまたはGCN2 siRNAをトランスフェクションして24時間後、DEM処理してHO-1の発現量をwestern blot法で解析した。コントロールには、 β -actinを用いた。

(3) GCN1L1のNrf2活性化に果たす役割を解析するため、GCN1L1の細胞内局在を解析した。その結果、GCN1L1はU373MG細胞およびHeLa細胞の両方において細胞質に局在することが明らかになった。また、この結果と一致してハロタグを付加したGCN1L1も核周囲の細胞質に強い局在が観察された(図2)。この局在はDEM処理によって変化しなかった。一方、実験ごとのばらつきはあるものの、GCN1L1はDEM処理によってタンパク質レベルで増加することが観察された。このことが酸化ストレス感知に役立っていることが考えられた。

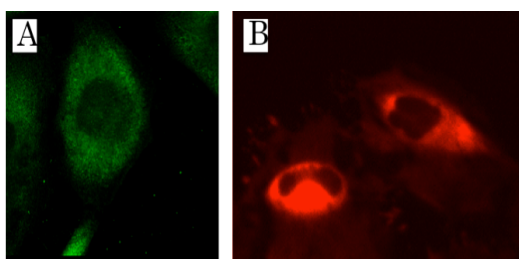


図2. HeLa細胞におけるGCN1L1の細胞内局在。(A) GCN1L1抗体で検出したGCN1L1。(B) ハロタグGCN1L1の融合タンパク質を蛍光顕微鏡により検出した。いずれも核周囲の細胞質に強い局在を示した。

(4) GCN1L1がNrf2の転写活性化能に与える影響を解析するため、QR-AREを持つリポーター遺伝子を用いて解析した。GCN1L1およびGCN1L1ハロタグ融合タンパク質の過剰発現はリポーター遺伝子の発現を濃度依存性に活性化した。また、GCN1L1は過剰発現したNrf2の転写活性化能を濃度依存性に活性化した。

(5) U373MG細胞を用いて、システイン欠乏培地(Cys(-))、メチオニン欠乏培地(Met(-))、ロイシン欠乏培地(Leu(-))がNrf2の蓄積に対する影響を解析した。その結果、いずれの欠乏培地もNrf2の細胞内蓄積を誘導した。次にNrf2標的遺伝子の発現を解析した。興味深いことに、Cys(-)はLeu(-)に比べて非常に強くヘムオキシゲナーゼ1の遺伝子誘導をおこした。逆にLeu(-)はCys(-)に比べてNQO1の発現誘導を強く起こした。Preliminaryな結果ではあるが、Leu(-)はCys(-)に比べてNrf2の核蓄積を強く誘導した。これらの結果は各アミノ酸に対する

特異的な飢餓応答が存在することを示唆した。

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5件)

以下は全て査読有り。

1. Maruyama A, Mimura J, Harada N, Itoh K. Nrf2 activation is associated with Z-DNA formation in the human HO-1 promoter. *Nucleic Acids Res* 41, 5223-5234, 2013. doi: 10.1093/nar/gkt243.
2. Meng P, Yoshida H, Matsumiya T, Imaizumi T, Tanji K, Xing F, Hayakari R, Dempoya J, Tatsuta T, Aizawa-Yashiro T, Mimura J, Kosaka K, Itoh K, Satoh K. Carnosic acid suppresses the production of amyloid- β 1-42 by inducing the metalloprotease gene TACE/ADAM17 in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neurosci Res* 75, 4-102, 2013. doi: 10.1016/j.neures.2012.11.007.
3. Tanji K, Maruyama A, Odagiri S, Mori F, Itoh K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Keap1 is localized in neuronal and glial cytoplasmic inclusions in various neurodegenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 72, 18-28, 2013. doi: 10.1097/NEN.0b013e31827b5713.
4. Harada N, Ito K, Hosoya T, Mimura J, Maruyama A, Noguchi N, Yagami KI, Morito N, Takahashi S, Maher JM, Yamamoto M, Itoh K. Nrf2 in bone marrow-derived cells positively contributes to the advanced stage of atherosclerotic plaque formation. *Free Radic Biol Med* 53, 2256-2262, 2012. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.001.
5. Okada K, Warabi E, Sugimoto H, Horie M, Tokushige K, Ueda T, Harada N, Taguchi K, Hashimoto E, Itoh K, Ishii T, Utsunomiya H, Yamamoto M, Shoda J. Nrf2 inhibits hepatic iron accumulation and counteracts oxidative stress-induced liver injury in nutritional steatohepatitis. *J Gastroenterol* 47, 924-935, 2012. doi: 10.1007/s00535-012-0552-9.

[学会発表] (計8件)

1. Liu T, Kimura S, Yamazaki H, Maruyama A, Nishikawa K, Harada N, Mimura J, Yamamoto M, Itoh K. The role of ribosomal interacting protein GCN1L1 in oxidative stress-mediated Nrf2 activation. 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International. Kyoto

International Conference Center, Mar 23-26 2014, Kyoto.

2. 伊東健, Nrf2転写調節経路とeIF2aリン酸化経路とのクロストーク. 日本放射線影響学会第56回大会, 平成25年10月18日-10月20日, ホテルクラウンパレス, 青森.
3. 伊東健, 酸化ストレスで活性化する転写経路のクロストーク. 第102回日本病理学会総会平成25年6月6日-6月8日, ロイトン札幌, 札幌.
4. Ken Itoh. The role of ribosome interacting protein GCN1L1 in oxidative stress-mediated Nrf2 activation. International symposium 2012 on Signaling, Function of Reactive Oxygen Species. December 17 2012, Kyushu University Station-I for Collaboration Research (Fukuoka)
5. 伊東健、他. アミノ酸飢餓応答因子GCN1L1によるNrf2活性制御機構の解析. 第82回日本生化学会大会、2012年12月14日-16日、福岡国際会議場 (福岡).

[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

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊東 健 (ITO H KEN)
弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号 : 10323289

(2) 研究分担者

なし

研究者番号 :

(3) 連携研究者

三村 純正 (MIMURA JUNSEI)
弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・講師
研究者番号 : 60344884