

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25293064

研究課題名(和文) リボソームを介した新しい酸化ストレス応答機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of novel oxidative stress response mechanism via ribosome

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) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：個体レベルでのGCN1L1の役割を明らかにするためにGCN1L1LのRWD BD (RWD binding domain)特異的欠失マウス(GCN1L1 deltaRWDBDマウス)を作成した。GCN1L1 deltaRWDBDマウスは、胎児期により成長遅延を呈し出生直後に肺胞虚脱のため呼吸不全により死亡した。GCN1L1 KOマウス由来の胎児期繊維芽細胞で解析すると、DRG2のタンパク質量低下を伴うG2/M arrestを起こしていることが明らかになった。GCN1L1はDRG2の機能調節を介して細胞増殖を制御していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the roles of GCN1L1, we generated GCN1L1 mice lacking RWDBD (GCN1L1 delta RWDBD) that is required for GCN1L1 binding to RWD possessing proteins such as GCN2 and DFRP2. The embryos of GCN1L1 delta RWDBD mice shows growth retardation starting from at least 12.5 dpc and died soon after birth. The embryonic fibroblasts obtained from GCN1L1 delta RWDBD mice shows slower proliferation compared to those of wild-type mice associating with G2/M cell cycle arrest and decreased levels of DRG2 that heterodimerizes with DFRP2. These results suggest that GCN1L1 controls cell proliferation via the regulation of DRG2/DFRP2.

研究分野：分子生物学

キーワード：リボソーム アミノ酸飢餓 GCN1L1 Nrf2

### 1. 研究開始当初の背景

転写因子 Nrf2 は親電子性物質や活性酸素などによって活性化され一群の生体防御遺伝子を誘導するストレス応答性転写因子である。私たちは Nrf2 がアミノ酸飢餓応答に関わる転写因子 ATF4 および GCN1L1 と相互作用することを見出した。GCN1L1 は酵母においては、アミノ酸飢餓のセンシングに関わる因子であることがわかっていたが、哺乳動物における GCN1L1 の生理的役割は不明であった。

### 2. 研究の目的

Nrf2 の酸化ストレスによる活性化および Nrf2 の機能発現における ATF4 および GCN1L1 の役割を詳細に解析することにより、Nrf2 とアミノ酸飢餓ストレス応答経路とのクロストークが Nrf2 を介した酸化ストレス応答経路に果たす役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) GCN1L1 の *in vivo* での機能を知るために CRISPR/CAS9 を用いて GCN1L1 KO マウスを作成した。GCN2 の結合部位である RWD BD (RWD binding domain) 特異的欠失マウス (GCN1L1  $\Delta$ RWD マウス) と GCN1L1 を全長を欠失したマウス (GCN1L1  $\Delta$ 2<sup>nd</sup> exon マウス) の 2 とおりのノックアウトマウスを作成した。

(2) GCN1L1 の酸化ストレス応答における役割を Nrf2 の活性化 (親電子性物質ストレス) と ATF4 の活性化 (ミトコンドリアストレス) に注目して解析した。方法としては、ヒト一倍体細胞株 HAP1 において GCN1L1 をノックアウトした細胞 (HAP1 $\Delta$ GCN1L1) を利用した他に種々のがん細胞で GCN1L1 をノックダウンすることにより解析した。(3) Nrf2 と ATF4 による転写の協調作用を Nrf2 と ATF4 の両者が活性化するプロテアソーム阻害下で解析した。

### 4. 研究成果

(1) GCN1L1 が酸化ストレス防御に果たす役割の個体レベルでの検討 --- 個体レベルでの GCN1L1 の役割を明らかにするために GCN1L1L の RWD BD (RWD binding domain) 特異的欠失マウス (GCN1L1  $\Delta$ RWDBD マウス) を作成した。RWD 領域は他の生物種において GCN2 ばかりではなく DFPRP2 を介して DRG2 と複合体を形成することが知られている GCN1L1 の重要ドメインである。GCN1L1  $\Delta$ RWDBD マウスは、胎児期により成長遅延を呈し出生直後に肺胞虚脱のため呼吸不全により致死であった (図 1)。

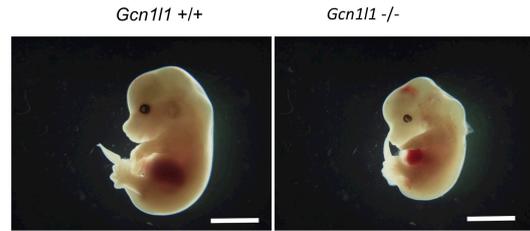


図1 GCN1L1 KOマウスでみられる胎児期での成長遅延

GCN1L1  $\Delta$ 2<sup>nd</sup> exon マウスはより重篤なフェノタイプを示し、胎生早期に致死であることが明らかになった。また、GCN2 KO マウスは GCN1L1  $\Delta$ RWDBD マウスにみられるようなフェノイプを呈さないため、このフェノタイプは GCN2 経路の機能不全によるものではないことが示唆された。KO マウスから MEF を作成して解析すると、GCN1L1 KO マウスでは野生型 MEF に比較して、細胞増殖抑制がみられた。ところで、DRG2 を欠失した細胞は 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る。そこで GCN1L1 KO マウス由来の MEF で解析すると、DRG2 のタンパク質量低下を伴う G2/M arrest を起こしていることが明らかになった。以上のことから、GCN1L1 は DRG2 の機能調節を介して細胞増殖を制御していることが示唆された。また、GCN1L1 KO マウス由来の MEF では IGF-1 による AKT のリン酸化が減弱していることが明らかになった。(2) HAP1 の野生株および HAP1 $\Delta$ GCN1L1 を用いて ATF4 活性化および Nrf2 活性化を解析した。ヒスチジン飢餓を模倣する histidinol 処理により野生株では ATF4 の標的遺伝子であるアスパラギン合成酵素 (ASNS) の発現が誘導されたが、GCN1L1 欠損株では誘導されなかった。ミトコンドリアストレス誘導剤として ATP アーゼ阻害剤 oligomycin およびミトコンドリア翻訳阻害剤 doxycycline で処理したところ、いずれによっても ASNS の発現誘導が見られ、HAP1 $\Delta$ GCN1L1 では野生株に比べ oligomycin による誘導に差はなかったが doxycycline による誘導が半減した (図 2)。

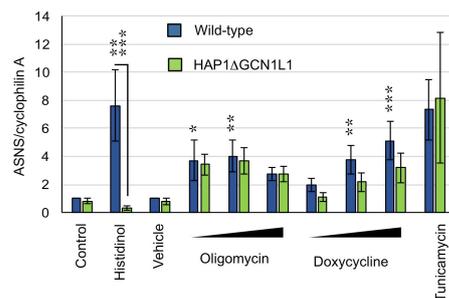


図2 HAP1 $\Delta$ GCN1L1におけるミトコンドリアシグナルの異常

以上のことから、GCN1L1はドキシサイクリン処理によるミトコンドリアの異常を特異的に感知できる可能性が示唆された。一方で親電子性物質ジエチルマレイン酸によるNrf2の活性化を野生株およびHAP1ΔGCN1L1を用いて解析するとHAP1ΔGCN1L1においてNrf2の活性化が著明に減弱していることが明らかになった。以上のことからGCN1L1は親電子性物質によるNrf2の活性化に関与することが示唆された。(3) Nrf2と相互作用する因子を酵母ツーハイブリッド法により検索し、ATF4を同定した。膀胱癌細胞T-24細胞においてプロテアソーム阻害剤はNrf2とATF4を同時活性化し、シスチントランスポーターxCTの発現を協調的に活性化した。クロマチン免疫法で解析するとNrf2とATF4はそれぞれ独自にそれぞれの応答配列に結合したが、両者はそれぞれプロモーター上で相互作用し複合体を形成していた。Nrf2とATF4による協調的なxCTの発現制御は、膀胱癌のプロテアソーム阻害剤抵抗性に寄与していた。

#### 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 7件) (すべて査読あり)

- Dayalan Naidu S, Muramatsu A, Saito R, Asami S, Honda T, Hosoya T, Itoh K, Yamamoto M, Suzuki T, Dinkova-Kostova AT. 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.
- Sakai E, Morita M, Ohuchi M, Kido MA, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Itoh K, Yamamoto M, Tsukuba T. Effects of deficiency of Kelch-like ECH-associated protein 1 on skeletal organization: a mechanism for diminished nuclear factor of activated T cells cytoplasmic 1 during osteoclastogenesis. *FASEB J* 31, 4011-4022, 2017.
- Mimura J, Itoh K. Role of Nrf2 in the pathogenesis of atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 88, 221-232, 2015.
- Yamazaki H, Tanji K, Wakabayashi K, Matsuura S, Itoh K. Role of the Keap1/Nrf2 pathway in neurodegenerative diseases. *Pathol. Int* 65, 210-219, 2015.
- Itoh K, Ye P, Matsumiya T, Tanji K, Ozaki T. Emerging functional cross-talk between the Keap1-Nrf2 system and mitochondria. *J Clin Biochem Nutr* 56, 91-97, 2015.
- 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.
- 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.

[学会発表] (計 9件)

- 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-27日、東北大学医学部星陵オーディトリウム、仙台.
- 三村純正, 伊東健, Nrf2経路とATF4経路の協調作用 2017年度生命科学系学会合同年次大会 神戸ポートアイランド、12月7日、2017、神戸.
- 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 2016年7月8日-9日、東京.
- 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2016年8月30日-31日、仙台.
- 伊東健, Nrf2とeIF2 $\alpha$ -ATF4ストレス応答経路のクロストークによるレドックス応答機構、第58回歯科基礎医学会学術大会、札幌、8月24日-26日、2016.
- Itoh K. Elucidation of Nrf2-centered transcriptional network toward the development of novel neuroprotective strategy 第9回国際NO学会、2016年5月20日-22日、仙台.
- 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、2015年12月1日-12月4日、神戸ポートアイランド、神戸.
- Itoh K. Emerging molecular mechanisms of Nrf2-mediated gene induction. The Environmental Response IV. Feb 28<sup>th</sup>-Mar 2, 2014, Sendai, Japan.
- Itoh K. Development of a Novel Neuroprotective Strategy by the Cooperative Transcriptional Network Centered on Nrf2. SFRBM 2014, Nov 20-24, 2014, Seattle, USA.

〔図書〕(計 2件)

1. 葛西秋宅、對馬迪子、伊東健. ATF と Nrf2 によるミトコンドリアホメオスタシスレドックス制御. 実験医学増刊 735-739、羊土社. 2018年.
2. Ken Itoh, Maruyama A. Chapter 7, Role of the Keap1-Nrf2 pathway in protection against ionizing radiation. Fukushima Nuclear Accident: Global Implications, Long-Term Health Effects, and Ecological Consequences. 115-131, Nova, 2015.

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊東健 (ITO, Ken)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10323289

### (2) 研究分担者

松宮朋穂 (MATSUMIYA, Tomoh)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30344592

### (3) 連携研究者

三村純正 (MIMURA, Junsei)

弘前大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60344884

丸山敦史 (MARUYAMA, Atsushi)

東北医科薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：10431438

姫野俵太 (HIMENO, Hyouta)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：80208785

(4) 研究協力者

なし