

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750357

研究課題名(和文) 転写因子Nrf1で還元ストレスを解消し、老化関連疾患を予防できるのか？

研究課題名(英文) Does adjusting Nrf1 active status lead to remediate reductive stress and aging-related diseases?

研究代表者

辻田 忠志 (Tsujita, Tadayuki)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20622046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：老化マウスや早期老化モデルマウス(-Klotho欠失)においてNrf1の発現低下が確認される事実から、老化と細胞内チオール環境の変化、すなわち還元ストレスとの関連を明確にし、Nrf1の転写調節機能を活用して抗老化作用を誘導できないかを検証した。本研究計画によって、Nrf1を過剰発現すると、酸化ストレス応答転写因子であるNrf2の転写活性を抑制することを明らかにし、Nrf1による還元誘導は、加齢によって蓄積するNrf2の過剰なストレス応答を抑制する効果があることを明らかにした。現在もNrf1及びNrf2の活性是正による、老化防止方策を個体レベルでの実証に挑んでいる。

研究成果の概要(英文)：We have identified that the expression levels of Nrf1 in aged mouse or aging model mouse (i.e., -Klotho knockout mouse) were lower than young aged mice. Combination with our previous data that the liver from Nrf1 knockout mouse has higher thiol level, in this study, we trying to delay aging events under Nrf1 transcriptional control. Through our project, we succeed to reduce hysteric oxidative stress response that was induced through which Nrf2 over accumulation by increment the reductive status by Nrf1 over expression. We have proposed a concept that Nrf2 accumulation prevents by Nrf1, because Nrf1 has been competed with Nrf2 on antioxidative response element. We are continuing to confirm this anti-aging concept using a combinational effect with Nrf1 and Nrf2 in vivo.

研究分野：生化学 分子生物学

キーワード：Nrf1 老化 還元ストレス

1. 研究開始当初の背景

栄養状態と公衆衛生の改善により、私たちの寿命は飛躍的に伸びた代わりに、数々の老化関連疾病に悩まされることとなった。とくに我が国は世界一の超高齢化社会構造のため、高齢者の健康で質の高い生活、即ち「健全な老い」の実現は、活力ある社会の形成のみならず、財政面で大きな割合を持つ医療費の削減が可能となる。この大きな目標のため、医学研究者は、がん、老年性痴呆、脂肪肝、糖尿病、骨粗鬆症、心不全など老化関連疾患の発生機序を解明し、画期的な治療法の開発に貢献してきた。

2. 研究の目的

申請者が研究対象としている Nrf1 (NF-E2-related factor 1) は、CNC-bZip タンパク質ファミリーに属する転写因子であり、小 Maf 因子とヘテロダイマーを形成してゲノム上の ARE 配列 (TGA^G/cNNNGC) に結合し、転写を制御する。Nrf1 の全身欠損マウスは胎生致死であるが、Nrf1 の肝臓、脳神経における特異的な欠失は、それぞれ脂肪肝、神経変性疾患を発症する。さらに、Nrf1 はゲノム安定化に参与するポリコーム遺伝子 *Ezh2* や *Bmi-1* の発現を抑制すると共に、骨分化を促進する *Osterix* を転写活性化することから、Nrf1 の欠損はがん化および骨粗鬆症を誘導する。

申請者は薬剤誘導性肝特異的 Nrf1 ノックアウトマウスを作出した。本マウスは、出生後、肝の初期発生過程を阻害すること無く、任意の時期に Nrf1 を欠失可能であるため、脂肪肝の形成過程を成獣で詳細に解明できる。既に、本 Nrf1 欠損マウス肝のメタボロミクス解析を行い、Nrf1 欠損群ではトリグリセリド (TG) が野生型より 90% も増加することを観察している。また TG の脂肪酸組成を解析することで、Nrf1 が制御する代謝関連遺伝子を抽出し、発現解析を行った。その結果、TG

蓄積はリポタンパク質カイロミクロンや VLDL の取込み受容体 *ApoER2* 及び *LDLR* の発現亢進が原因であることを突き止め、脂肪酸不飽和化酵素 *FADS3*、*FADS1* の発現変動も見いだした。このように、Nrf1 は脂質代謝に重要な役割を果たす転写因子であり、脂肪肝発症に強く関与している。

プロテアソームの構成タンパク質を統一的に転写誘導する Nrf1 が欠損するとタンパク質が蓄積し、細胞にストレスを誘導する。また、折りたたみ異常に起因する変異タンパク質を過剰発現させたトランスジェニックマウス (α B-Crystallin Tg マウス) は、蓄積異常タンパク質のジスルフィド結合を開裂させ除去することが知られているが、この反応により、**過剰な還元力 (還元ストレス) を誘導し**、心不全を発症する。また、本マウスでは、還元ストレスの指標とされている還元型グルタチオン (GSH) が異常に蓄積される。樹立した薬剤誘導性肝特異的 Nrf1 ノックアウトマウスの肝においては α B-Crystallin Tg マウス以上の GSH の蓄積を確認しており、還元ストレスが誘導されていることを強く示唆している。そこで本研究では、Nrf1、還元ストレス、老化関連疾患の 3 つの要素を実際の作動分子 (遺伝子) でつなげ、Nrf1 を適切に制御し、老化関連疾患へ介入する理論的実証を得ることを目標とする。

3. 研究の方法

(1) Nrf1 欠損は還元ストレスを誘導する

申請者は既に薬剤誘導性肝特異的 Nrf1 ノックアウトマウス肝で GSH の過剰蓄積を確認している。近年、過剰な GSH 蓄積により過酸化グルタチオン (GSSH) が生じ、生体高分子を還元することが還元ストレスの本体であると報告された。これまでの GSH 定量法では GSH と GSSH の区別ができないため、本マウスでの GSSH 量の定量には質量分析機を使用し、新たな検出法を確立する。特に、測定サン

ルの調整は、申請者らが確立したGSH定量法をもとに、チオール標識化合物、還元防止剤等を再検討する

また、還元ストレスにより細胞内チオール環境が高まると、タンパク質内のジスルフィド結合が開裂して不安定となり、異常タンパク質として封入体に蓄積する。本研究では、薬剤誘導性肝特異的Nrf1ノックアウトマウス肝から封入体(1%SDSに不溶な画分)を回収し、主な蓄積タンパク質を同定し、還元ストレスのマーカーとする。封入体の形成は熱ショックタンパク質Hsp25の蓄積を指標とする。

(2)還元ストレスはNrf1活性に影響を及ぼす

申請者らはこれまでマウス肝で観察された還元ストレスを、肝培養細胞で再現するため様々な解析を行ってきた。しかし、肝培養細胞ではNrf1は非常に強く転写抑制されており、還元ストレスを再現できない。そのため、前出の還元ストレスモデルマウス肝でNrf1の細胞内局在をスクロース濃度勾配法で検討する。これまでの解析結果から、Nrf1は活性化を受けると核に局在するとされており、還元ストレスとNrf1の関連が明らかとなる。当該マウスの実験が予定通りに進まない時のために、還元剤投与による還元ストレスモデルを確立する。モデルの妥当性については、肝臓におけるGSH量、Nrf1の細胞内局在、更に研究1で明らかにした還元ストレスマーカーで評価する。また、他の還元剤としてヨウ化カリウム、塩化スズの投与を試みる。

(3)老化と還元ストレスは密接に関連する

本研究では、老化モデルとして α -Klothoマウスを使用する。本マウスはリンやカルシウムの吸収を制御するタンパク質 α -Klothoタンパク質が欠損しており、出生後、急激に老化症状が誘導され、10週前後で死亡する。本老

化モデルにおいて研究1で確立したマーカーを用いて還元ストレスを評価する。加えて、60週齢以上の老齢マウスで再現されるか検証し、老化と還元ストレスの関連を明らかにする。

4. 研究成果

先行研究において、転写因子Nrf1が抑制的に機能することを薬剤誘導性、肝特異的Nrf1欠失マウスで証明していた。特にNrf1がシスチントランスポーターxCTや脂質代謝酵素群を直接抑制制御し、老化関連疾患の一つである脂肪肝の発症に関連することが明確となっていた。本研究は、老化マウスや早期老化モデルマウス(α -Klotho欠失)においてNrf1の発現低下が確認される事実から、老化と細胞内チオール環境の変化、すなわち還元ストレスとの関連を明確にし、Nrf1の転写調節機能を活用して抗老化作用を誘導できないかを検証した。

老化マウスや α -Klotho欠失マウスの肝においては、加齢により細胞内グルタチオンの量は減少するものの、酸化型グルタチオンと還元型グルタチオンの量比が還元型の方に偏りを示した。老化による還元ストレス亢進を、Nrf1の発現調節(Nrf1過剰発現マウス)によって改善を試みた。弱年齢のマウスにおいては酸化型・還元型グルタチオンの量比は変化が見られないが、2年齢の老化マウスにおいては、野生型と比較して有意に還元グルタチオンの量比が改善される傾向が観察された。同時に、Nrf1過剰発現マウスにおいて、老化マーカーである、ガラクトシダーゼ染色やタンパク質封入体の形成の減少も確認された。このNrf1の効果を老化モデルマウスである α -Klotho欠失マウスとNrf1過剰発現マウスとの交配において検証したが、老化誘導分子メカニズムの違いからか、Nrf1の発現状態によって著効しなかった。

Nrf1を過剰発現すると、酸化ストレス応答転

写因子である Nrf2 の転写活性を抑制する事実から、Nrf1 による還元誘導は、加齢によって蓄積する Nrf2 の過剰なストレス応答を抑制する効果があるのではないかと予想された。現在 Nrf1 及び Nrf2 の活性是正による、老化防止方策を個体レベルでの実証に挑んでいる。

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)

[雑誌論文] 全て査読あり (計 6 件)

Tsujita T, Baird L, Furusawa Y, Katsuoka F, Hou Y, Gotoh S, Kawaguchi S-i, and Yamamoto M. Discovery of an NRF1-specific inducer from a large-scale chemical library using a direct NRF1-protein monitoring system. *Genes Cells (in press)*

Tsujita T, Kawaguchi S-i, Dan T, Baird L, Miyata T, and Yamamoto M. Sensitive hypoxia reporter system for high through put screening. *Tohoku J Exp Med* **235**, 151-159 (2015) / Epub 2015 Feb 25. <http://dx.doi.org/10.1620/tjem.235.151>.

Nishikawa K, Iwamoto Y, Kobayashi Y, Katsuoka F, Kawaguchi S, Tsujita T, Nakamura T, Kato S, Yamamoto M, Takayanagi H and Ishii M. DNA methyltransferase 3a regulates osteoclast differentiation by coupling to an S-adenosylmethionine-producing metabolic pathway. *Nat Med* **21**, 281-287 (2015) / Epub 2015 Feb 23. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3774>.

Tsujita T, Peirce V, Baird L, Matsuyama Y, Takaku M, Walsh SV, Griffin JL, Uruno A, Yamamoto M, and Hayes JD. Transcription factor Nrf1 negatively regulates the

cystine/glutamate transporter and lipid-metabolizing enzymes. *Mol Cell Biol* **34**, 3800-3816 (2014) / Epub 2014 Aug 4. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00110-14>.

Hirotsu Y, Higashi C, Fukutomi T, Katsuoka F, Tsujita T, Yagishita Y, Matsuyama Y, Motohashi H, Uruno A, and Yamamoto M. Transcription factor NF-E2-related factor 1 impairs glucose metabolism in mice. *Genes Cells* **19**, 650-665 (2014) / Epub 2014 Jul 6. <http://dx.doi.org/10.1111/gtc.12165>.

Skoko JJ, Wakabayashi N, Noda K, Kimura S, Tobita K, Shigemura N, Tsujita T, Yamamoto M, and Kensler TW. Loss of Nrf2 in mice evokes a congenital intrahepatic shunt that alters hepatic oxygen and protein expression gradients and toxicity. *Toxicol Sci* **141**, 112-119 (2014) / Epub 2014 Jun 12. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfu109>.

[学会発表] (計 7 件)

辻田 志志, Vivian Mullin, Liam Baird, 松山由香, 高久 美咲, Shawn Walsh, Julian Griffin, 山本 雅之, John Hayes. 転写因子 Nrf1 はシステイン・グルタミントランスポーターおよび脂質代謝酵素群を抑制制御する, 第25回日本生化学会大会. 国立京都国際会館 (京都), 2014.10.15-18 / 4T09p-05 (一般口頭発表), 3P-206 (ポスター)

Tsujita T, Furusawa Y, Kawaguchi S-I, Hou Y, Baird L, Uruno A, Hayes JD, and Yamamoto M. Use of a newly established screening system to identify activators of transcription factor Nrf1/NFE2L1, and their use to correct lipid and thiol metabolomic disorders. The Gordon Research Conference on Thiol-Based Redox Regulation & Signaling, Girona (Spain), 20-25 July, 2014

辻田 忠志, Vivian Mullin, Liam Baird, 松山由香, 高久 美咲, Shawn Walsh, Julian Griffin, 山本 雅之, John Hayes. 転写因子 Nrf1 はシスチントランスポーターおよび脂質代謝酵素群を抑制制御する, 第25回日本生体防御学会学術総会. 東北大学片平さくらホール (仙台), 2014.7.9-11 / 講演抄録集 pp59

Tsujita T, Mullin V, Baird L, Matsuyama Y, Takaku M, Walsh SV, Griffin JL, Yamamoto M, and Hayes JD. Transcription factor Nrf1 negatively regulates the cystine transporter and lipid metabolic enzymes to prevent over-nutrition in hepatocytes. 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (SFRRRI2014), 国立京都国際会館 (京都), 23-26 March 2014 / *J Clin Biochem Nutr* 54, Supplement 108

Tsujita T, Mullin V, Baird L, Matsuyama Y, Takaku M, Walsh SV, Griffin JL, Yamamoto M, and Hayes JD. Transcription factor Nrf1 negatively regulates the cystine/glutamate transporter and lipid-metabolizing enzymes, The Environmental Response IV, 東北大学片平さくらホール (仙台), 28 February – 2 March, 2014 / Program & Abstracts pp112

Kawaguchi S-i, **Tsujita T**, Dan T, and Miyata T. New therapy for hypoxia by a prolyl hydroxylase inhibitor. NIH-Tohoku University-JSPS Symposium, 東北大学医学部良陵会館 (仙台), 5-11 May, 2013

[図書] (計1件)

辻田 忠志, 山本 雅之「酸化ストレス認識分子基盤と創薬応用」生命科学から創薬へのイノベーション (南山堂), 10章, 63-70 (2014)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

辻田 忠志 (Tsujita, Tadayuki)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 20622046