

## Nrf1 (NFE2L1) の転写抑制能による細胞内チオール量 および脂肪酸代謝制御

辻田 忠志

### 1. はじめに

現代社会で生きる上で、我々が多種多様な物性を持つ薬物やPM2.5などに代表される環境化学物質などに曝露される状況は確実に増えつつある。これらの物質は我々の体内に蓄積しないように、第1相酵素群により変性され、続く第2相酵素群による中和・抱合と解毒処理過程を経て、最終的に第3相輸送タンパク質により体外へ効率的に排出される。このうち、第2相酵素群は第1相で変性を受けた物質の存在量に応じて機動的に発現量が変動しており、その認識・応答にはKeap1-Nrf2系が重要な役割を果たしている。Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) はCullin3を主体とするE3ユビキチンリガーゼ複合体を基質の転写因子Nrf2 (NF-E2 p45 related factor 2) にリクルートするためのアダプター分子であると同時に、第1相で変性を受け生体分子に対して攻撃性が高まった化学物質を分子表面に存在するセンサーシステインで補足し、感知する機能も合わせ持っている。ひとたび化学物質で修飾を受けたKeap1は立体構造が変化することで不活化し、Nrf2のユビキチン化を停止させる。Keap1による分解を逃れたNrf2は核へ移行し、抗酸化・親電子性物質応答配列 (ARE/EpRE) に結合することで第2相酵素や抗酸化タンパク質群を強力に発現誘導する。最近、人為的にKeap1-Nrf2系を活性化させることで抗酸化力を高める方法が、疾患の治療にも応用されている<sup>1)</sup>。

ARE配列にはNrf2を含めて、NFE2p45, Nrf1, Nrf3, Bach1やBach2が属するCNC-bZipファミリー転写因子が、それぞれ小Maf因子とヘテロ二量体を形成して結合することで転写を調節する。それぞれのCNC-bZipファミリー転写因子に対する全身欠失マウスが作出され解析が進んでいる

が、Nrf1の欠失マウスのみが唯一胎生致死の表現型を示す<sup>2)</sup>。したがって、早期に条件つき欠失マウスが作出され、Nrf1を肝特異的に欠失したマウスでは出生後に重篤な脂肪肝炎を示すことが<sup>3,4)</sup>、中枢神経系特異的にNrf1を欠失したマウスは出生以降、進行性の運動性運動失調を示し、3週間で死亡することが示されていた<sup>5)</sup>。このように明確な表現型が観察されるものの、原因となるNrf1の標的遺伝子を同定できていなかった。

### 2. Nrf1はタンパク質分解経路に関与する

Nrf1の研究は培養細胞で先行し、多くの成果を上げていた。最近では、プロテアソームによるタンパク質分解経路が阻害されると、mTORC1等の活性化を通じたNrf1の安定化がプロテアソームの構成遺伝子群を統一的に発現誘導し、細胞内タンパク質の品質を管理する役割を持つことが発見された<sup>5,6)</sup>。したがって、神経特異的なNrf1欠失マウスでみられた神経変性疾患様の症状は、変性したタンパク質の異常蓄積に起因するものであると示唆された<sup>5)</sup>。培養細胞を用いた分子生物学的な解析によって、通常Nrf1は小胞体膜上にアンカリングされ、小胞体関連タンパク質分解経路 (ERAD) に関与するユビキチンリガーゼHrd1によって分解制御を受けており、外来的にMG132などのプロテアソーム阻害剤で細胞を処理すると、Nrf1は安定化し、核へ移行することでプロテアソーム関連遺伝子を発現誘導することが示されている<sup>7)</sup>。一方、肝臓特異的にNrf1を欠失すると著明な脂肪肝を生じることが独立した2つの研究グループから発表されていたが、病態の発現を説明できるNrf1の標的遺伝子を特定できない状態が続いていた<sup>3,4)</sup>。我々はNrf1に特異的な抗体を用いて通常のマウス肝臓における内因性のNrf1タンパク質検出を試みている過程で、予想に反してNrf1タンパク質は小胞体が含まれるミクロソーム画分のみならず、核にも一定量存在していることに気づき<sup>8)</sup>、Nrf1が通常状態で転写制御に関与する可能性が示唆された (図1)。

佐賀大学農学部生命機能科学科生化学分野 (〒840-8502 佐賀県佐賀市本庄町1番地)

**Intracellular thiol contents and fatty acid metabolism pathways are regulated by the Nrf1 (NFE2L1) with its transcriptional suppressor activity**

**Tadayuki Tsujita** (Laboratory of Biochemistry, Department of Applied Biochemistry and Food Science Faculty of Agriculture, Saga University, 1 Honjyou-machi, Saga 840-8502, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880776

© 2016 公益社団法人日本生化学会

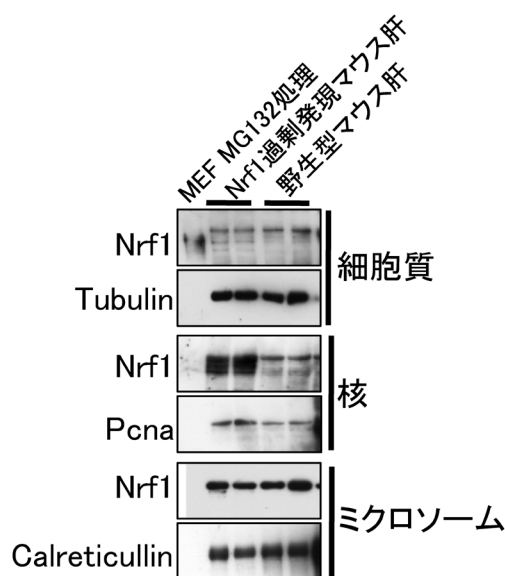


図1 肝臓におけるNrf1タンパク質の分布

MG132で刺激したマウス線維芽細胞 (MEF), Nrf1を過剰発現するマウス肝, 野生型マウス肝を細胞質, 核, ミクロソームに分画してNrf1タンパク質の分布を確認した。未刺激状態においても, 核にNrf1の存在が確認され, 転写調節に関与していると示唆される。

### 3. Nrf1欠失による表現型の解析と責任遺伝子の同定

#### 1) 成獣で後天的にNrf1を欠失させる新たなマウスシステムの樹立

Nrf1欠失によって発症するとされる脂肪肝, 糖尿病, がん, 神経変性疾患などは, 成人で後天的に発症する疾患であり, 素因は成人期にあるとされる。そこで, Nrf1欠失による初期発生への影響をなくし, 出生後, 後天的にNrf1を欠失させられるマウスモデルの作製を試み, *Nrf1* floxマウス (*Nrf1*<sup>F/F</sup>マウス) とラット *CYP1A1* 遺伝子の制御領域下でCre組換え酵素を発現するマウス (*CYP1A1*-Creマウス) を掛けあわせた薬剤誘導性肝臓特異的Nrf1コンディショナルKOマウス (*Nrf1*<sup>F/F</sup>::*CYP1A1*-Creマウス) の樹立に成功した。6週齢の *Nrf1*<sup>F/F</sup>::*CYP1A1*-Creマウスに *CYP1A1* 遺伝子の誘導剤である3-メチルコラントレンを皮下に注射すると24時間で, 肝臓においてNrf1を欠失でき, その後2週間飼育すると, これまでの肝特異的Nrf1欠失マウスと同様に著明な脂肪肝の形成を認めた<sup>9)</sup>。したがって, 発生が完了した肝臓においてNrf1を後天的に欠失することで, 急性期に脂肪肝を誘導できることが判明した。

#### 2) Nrf1はシスチンの取り込みを抑制制御する

これまで, Nrf1とNrf2はARE配列に対し同等の親和性を有し, とともに酸化ストレスに対して防御的に働く転写因子であると考えられていた<sup>3)</sup>。そこで, Nrf1欠失状態にお

ける抗酸化能を評価するため *Nrf1*<sup>F/F</sup>::*CYP1A1*-Creマウス肝における還元型および酸化型グルタチオン量を測定したところ, 予想に反してグルタチオンの総量が有意に上昇しており, むしろ抗酸化能が高い状態を示した。グルタチオンの生合成に関与する酵素群はARE制御配列を持ち, Nrf2の主要な標的遺伝子であるため, Nrf2を含め, GclcおよびGclmタンパク質量をNrf1欠失状態と比較したが明確な変動は見いだせなかった。そこで, グルタチオン生合成の原料となるアミノ酸組成を質量分析機で解析したところ, Nrf1欠失状態では肝臓におけるシステインの含有量が突出して増加しており, このシステインの増加はシスチン取り込み受容体xCTの発現上昇によるものであった。xCTは免疫系組織および脳脊髄液と直接接する部位に特異的に発現するとされており, 肝臓での発現は低い<sup>10)</sup>, *Nrf1*<sup>F/F</sup>::*CYP1A1*-Creマウス肝においてNrf1が欠失することで異所的な発現が誘導された可能性がある。これまでxCTは活性酸素種等によるNrf2の安定化や, アミノ酸飢餓応答におけるATF4の活性化にともなって誘導される標的遺伝子と広く知られており, その転写開始点前後に存在するARE配列およびAARE (amino acid response element) 配列によって正に制御されることが明らかとなっていた<sup>11, 12)</sup>。しかし, Nrf1欠失によってxCTの発現が著しく上昇することから, 抗Nrf1抗体を用いてクロマチン免疫沈降を実施したところ, xCTの転写開始点前後に存在する三つのARE配列が濃縮され, Nrf1が直接xCTの制御に関与することが示唆された。一方, ジメチルマレイン酸でNrf2を安定化させると, Nrf1が結合していたARE配列にNrf2が置き換わって結合することが, 抗Nrf2抗体によるクロマチン免疫沈降実験によって明らかとなった。したがって, xCTは通常状態ではNrf1によって積極的に転写が抑制制御されるが, 刺激によって誘導されたNrf2と置き換わることによって転写が活性化されることが明らかとなった (図2)。

#### 3) Nrf1による脂肪酸代謝調節

肝特異的Nrf1欠失マウスは著明な脂肪肝を示すが, どのように脂質が蓄積するのかも明確ではなかった。脂質の蓄積には, 脂質取り込み代謝・分泌に関与する遺伝子の発現変動が予想されていたが, 既報の遺伝子発現解析からはそのような因子を見いだすことはできなかった。しかし, 脂肪肝の脂質組成を解析したところ, トリグリセリドを由来とする脂肪酸が有意に蓄積していた一方で, コレステロールに代表される非極性脂質量の変化は観察されなかった。そこで, 血中を循環し, 肝臓におけるトリグリセリドを多含するカイロミクロンやVLDLの取り込みに関与する六つの受容体に着目して発現変動を確認したところ, Nrf1欠失状態で *Apoer2* や *Vldlr* の発現が著明に上昇していることを見いだした。VLDLの分泌に関与する受容体Mtp

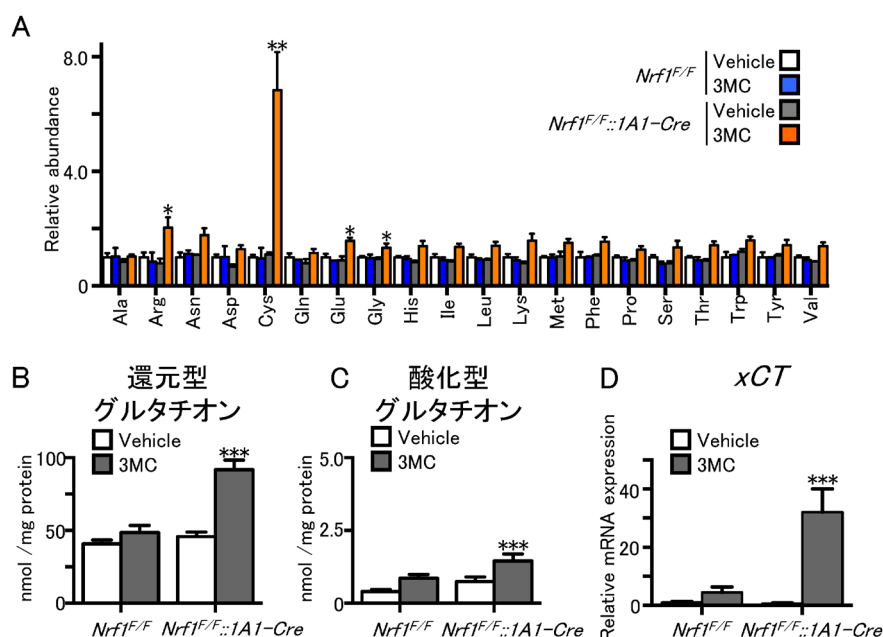


図2 Nrf1 を欠失すると細胞内チオール量が増加する

6週齢の *Nrf1<sup>F/F</sup>* マウスおよび *Nrf1<sup>F/F</sup>::CYP1A1-Cre* マウスに Vehicle または 3-メチルコラントレン (3MC) を皮下に注射し、2週間後の肝における代謝物の分析結果。Nrf1 欠失群は右端カラム、*Nrf1<sup>F/F</sup>::CYP1A1-Cre* マウス、3MC 処理群で表される。(A) アミノ酸の組成分析。Nrf1<sup>F/F</sup> マウスの Vehicle 処理群を基準として、相対的なアミノ酸量を示した。システインが突出して Nrf1 欠失群で蓄積している。(B, C) 還元型グルタチオン (B), 酸化型グルタチオン (C) 量の分析。両者とも Nrf1 欠失群で著明に上昇しており、細胞内チオール量の増加が示唆される。(D) xCT の発現解析。Nrf1 欠失によって、xCT の発現上昇が確認できる。

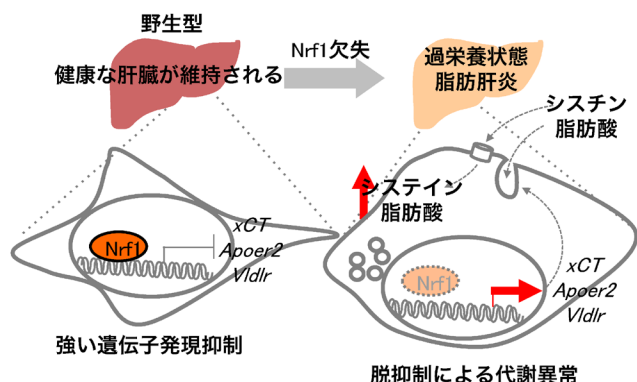


図3 Nrf1 欠失によるチオール過多、脂肪蓄積メカニズムの概略図

通常状態において Nrf1 は xCT, ApoER2, Vldlr を抑制制御するが、欠失によってこれらの標的遺伝子が脱抑制されることで肝臓はチオール過多、脂肪蓄積に陥る。

には変化がみられなかったことから、脂質の蓄積は外部からの取り込み過剰にあることを明らかにした。さらに、脂肪酸組成を詳細に分析したところ、パルミトレイン酸とオレイン酸の蓄積、アラキドン酸の減少が明確となった。この脂肪酸代謝変動は、脂肪酸不飽和化酵素の一種である *Fads3*、アラキドン酸からロイコトリエン経路へ移行させる初発酵素の一つである *Alox5ap* の発現亢進によって裏づ

けられた。これらの遺伝子も xCT と同様にクロマチン免疫沈降物解析から、Nrf1 によって直接抑制制御されることも確認した (図3)。

#### 4) *in vivo/in vitro* 間における Nrf1 解析結果の乖離

*Nrf1<sup>F/F</sup>::CYP1A1-Cre* マウスで得られた結果の再現をマウス肝培養細胞 Hepa1c1c7 で試みたが、Hepa1c1c7 における Nrf1 の発現量はマウス肝臓と比較して非常に低い状態にあった。この現象は、他の培養細胞においても観察されており、詳細な原因は明確ではないが、Nrf1 の挙動は生体の肝臓と培養細胞においてどうやら異なるようである。これまで Nrf1 は Nrf2 と同様、通常状態では常に分解されていると想定されていたが、NRF1 タンパク質は生体の肝臓において核および細胞質に常に存在することから、Nrf1 は構成的に転写を制御していると考えられる。したがって、Nrf1 は通常必要とされない抗酸化タンパク質の転写を積極的に抑制しており、酸化ストレス刺激に応答して蓄積してくる Nrf2 に ARE 領域をあけわたすことで、抗酸化タンパク質遺伝子群の転写を活性化するという、2段階の転写調節機構があることを提唱した<sup>9)</sup>。



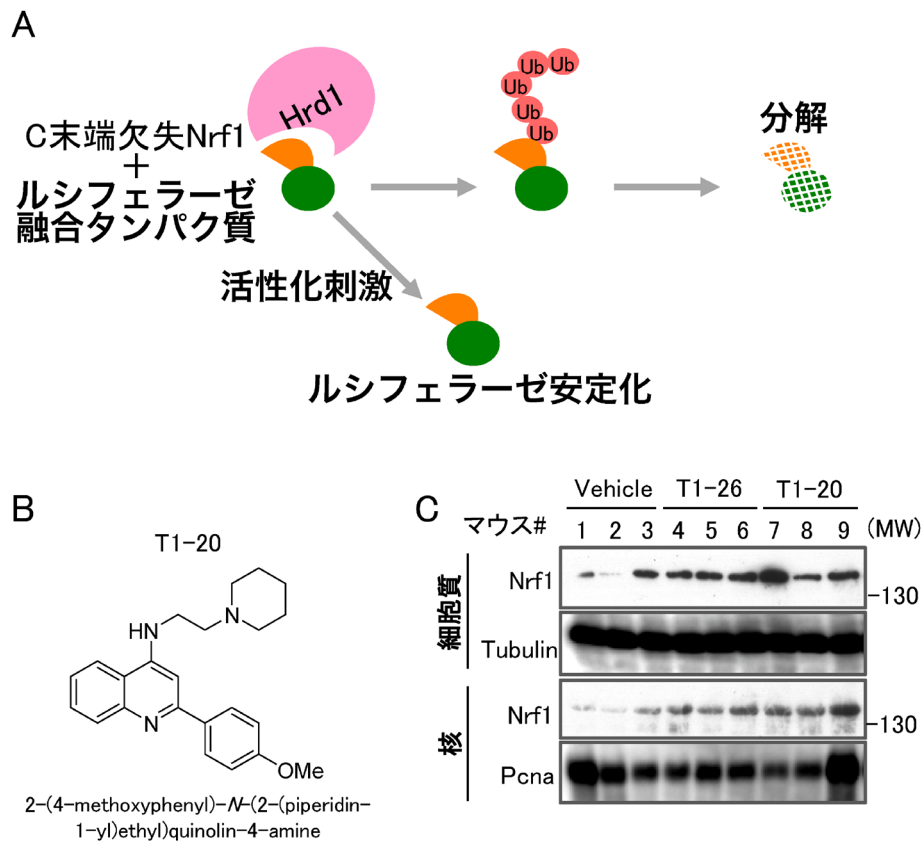


図4 Nrf1 調節化合物の探索とその活性

(A) C末端欠失型Nrf1とルシフェラーゼの融合タンパク質をNrf1の活性指標プローブとして、Hepa1c1c7細胞に安定発現させ、Nrf1活性モニター細胞システムとした。通常状態において、プローブはユビキチン化され速やかに分解されるが、活性化刺激によりプローブタンパク質は安定化し、ルシフェラーゼ活性で検出が可能となる。(B) スクリーニングで取得した新規Nrf1活性化剤T1-20。(C) T1-20および類縁化合物T1-26のマウス肝における効果。T1-20およびT1-26をマウスに投与し、24時間後の肝臓を細胞質および核に分画し、Nrf1タンパク質を検出した。両化合物によってNrf1の蓄積が誘導された。

#### 4. Nrf1経路を活性化する物質の探索

##### 1) プロテアソーム阻害剤はNrf1誘導剤として適切か？

*Nrf1<sup>F/F</sup>::CYP1A1-Cre*マウスを用いて、Nrf1欠失がどのようにしてグルタチオンや脂肪酸の蓄積を誘導するのかについて、それぞれの代謝経路を詳細に解析することで責任遺伝子を同定できたが、Nrf1タンパク質自体がどのような刺激で制御されているのかはいまだに明確ではなかった。前述の培養細胞の解析から、Nrf1タンパク質は通常ERAD経路によって常に分解されているため、その安定化にはプロテアソーム阻害剤(MG132やボルテゾミブなど)が用いられている。しかし、MG132などは、Nrf2をはじめプロテアソームで分解されている広範なタンパク質に非特異的に作用するため、Nrf1に特異的な誘導剤ではなく、これらの誘導剤を用いた実験の解釈には細心の注意が必要である。また酸化ストレス、小胞体ストレス、アスコルビン酸等がNrf1の安定化に寄与するとの報告もあるが、特異性についてまだ検討の余地がある。

##### 2) Nrf1経路を活性化する誘導剤の創出

Nrf1研究のもう一つの課題は特異的な活性化物質を探索するスクリーニング系の構築である。当初、我々がマウスの実験系で見いだした*xCT*など新規のNrf1標的遺伝子や、プロテアソームの構成タンパク質をコードする遺伝子の制御領域をルシフェラーゼレポーター遺伝子に結合した構築物を安定発現する細胞株を作製して挑んだが、Nrf1安定化によるレポーター遺伝子の制御幅は3倍程度にとどまり、スクリーニング系としては不十分であった。そこで、培養細胞においてNrf1タンパク質がプロテアソームによって速やかに分解されることを利用して、Nrf1のC末端欠失体とルシフェラーゼの融合タンパク質を安定発現する細胞を樹立し、Nrf1の安定化を指標としたNrf1活性測定レポーター細胞を構築した。本レポーター細胞を10μMのMG132で処理しNrf1-ルシフェラーゼ融合タンパク質を非特異的に安定化させると、溶媒比で1000倍程度のルシフェラーゼ活性の上昇が観察できた。本レポーター細胞を用いて、東京大学創薬機構より提供を受けた約1万種類

の化合物ライブラリー (Core9600) をスクリーニングしたところ、3種の初期ヒット化合物を取得した。このうちのT1 [ $N^1$ -(6-methoxy-2-phenylquinolin-4-yl)- $N^2,N^2$ -dimethylethane-1,2-diamine] 化合物はNrf1の安定化を誘導しないことから、プロテアソーム経路を阻害することなくNrf1を安定化させることを確認した。T1の活性を高めるために、側鎖の最適化を進めT1-20 [2-(4-methoxyphenyl)- $N$ -(2-(piperidin-1-yl)ethyl)quinolin-4-amine,  $EC_{50}$  値が1.8  $\mu$ M] を創出し、マウス個体への投与においても著明なNrf1蓄積を誘導できた<sup>13)</sup> (図4)。

## 5. 今後の課題

### 1) Nrf1の転写抑制機能と病態発現について

Nrf1欠失によって誘導される生理機能変化に着目し、その代謝経路からNrf1がいくつかの遺伝子を転写抑制することを明らかにしたが、それは肝臓のごく一部の表現型に対してのみである。今後Nrf1が転写調節する標的遺伝子を洗い出し、Nrf1の転写機能の総体を明らかにするために今回作出した抗Nrf1抗体が有効になる。特に、Nrf1が転写調節する遺伝子についてクロマチン免疫沈降物の網羅的シークエンスを通して、Nrf1がゲノム上で結合しているDNA配列が明確になれば、Nrf1が直接制御する標的遺伝子が明らかとなると考えている。さらに、肝臓以外の臓器におけるNrf1の発現分布についてもいまだ明確でないため、どの臓器にNrf1タンパク質が存在するのかを明らかにすることでNrf1が影響する病態等が明確になると予想している。

### 2) Nrf1の効率的な制御にむけて

T1-20によってNrf1を特異的に安定化させることができたが、その標的は明確ではない。現在、東京医科歯科大学細谷孝充教授のご協力のもと、アジド基導入型T1-20類似体を合成し、T1-20の標的タンパク質のスクリーニングに着手している<sup>14)</sup>。本化合物で培養細胞もしくは肝臓を刺激してNrf1を安定化させ、光化学反応処理による不可逆的な共有結合で架橋することで、T1-20が作用するタンパク質の捕獲を試みている。また、現時点ではNrf1の活性化化合物はT1-20のみであるため、さらにスクリーニングする化合物の種類を増やして、新たなNrf1安定化化合物の取得を進めている。同時に、Nrf1機能阻害物質のスクリーニングを実施することは急務と考えている。以上のように、Nrf1の活性調節については黎明期にあり、今後の研究発展が見込まれる。

## 6. おわりに

Nrf1はシステインの取り込みによって細胞内チオール量の調節や、脂質代謝経路、グルコース代謝さらにプロテアソームリカバリーなど基幹代謝経路の調節に関与することが判明しているが、その解析は発展途上にある。最近では疾患メカニズム解明のため、ゲノムシークエンス情報や網羅的な遺伝子発現解析などの結果がインターネット上で利用できるようになり、今後、重要な疾患でNrf1の変異が見つかるかもしれない。現在取得しているNrf1誘導剤T1-20を活用してNrf1誘導による代謝変化の解析を進めている。将来的にはよりよいNrf1活性調節剤等を開発につなげ、Nrf1を活用した研究をさらに展開していきたい。

## 謝辞

本研究は東北大学大学院医学系研究科医化学分野・山本雅之教授と英国Dundee大学のJohn D. Hayes教授のご指導、ご助言の元に行われたものである。また、両研究室のメンバーをはじめ、研究を進める上でご助言、ご鞭撻をいただいたすべての方々に厚く感謝いたします。

## 文 献

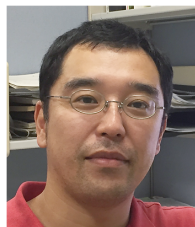
- 1) Suzuki, T. & Yamamoto, M. (2015) *Free Radic. Biol. Med.*, **88**(Pt B), 93–100.
- 2) Yamazaki, H., Katsuoka, F., Motohashi, H., Engel, J.D., & Yamamoto, M. (2011) *Mol. Cell. Biol.*, **32**, 808–816.
- 3) Ohtsui, M., Katsuoka, F., Kobayashi, A., Aburatani, H., Hayes, J.D., & Yamamoto, M. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 33554–33562.
- 4) Xu, Z., Chen, L., Leung, L., Yen, T.S., Lee, C., & Chan, J.Y. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 4120–4125.
- 5) Kobayashi, A., Tsukide, T., Miyasaka, T., Morita, T., Mizoroki, T., Saito, Y., Ihara, Y., Takashima, A., Noguchi, N., Fukamizu, A., Hirotsu, Y., Ohtsui, M., Katsuoka, F., & Yamamoto, M. (2011) *Genes Cells*, **16**, 692–703.
- 6) Zhang, Y., Nicholatos, J., Dreier, J.R., Ricoult, S.J., Widenmaier, S.B., Hotamisligil, G.S., Kwiatkowski, D.J., & Manning, B.D. (2014) *Nature*, **513**, 440–443.
- 7) Tsuchiya, Y., Morita, T., Kim, M., Iemura, S., Natsume, T., Yamamoto, M., & Kobayashi, A. (2011) *Mol. Cell. Biol.*, **31**, 4500–4512.
- 8) Hirotsu, Y., Higashi, C., Fukutomi, T., Katsuoka, F., Tsujita, T., Yagishita, Y., Matsuyama, Y., Motohashi, H., Uruno, A., & Yamamoto, M. (2014) *Genes Cells*, **19**, 650–665.
- 9) Tsujita, T., Peirce, V., Baird, L., Matsuyama, Y., Takaku, M., Walsh, S.V., Griffin, J.L., Uruno, A., Yamamoto, M., & Hayes, J.D. (2014) *Mol. Cell. Biol.*, **34**, 3800–3816.
- 10) Conrad, M. & Sato, H. (2012) *Amino Acids*, **42**, 231–246.
- 11) Sasaki, H., Sato, H., Kuriyama-Matsumura, K., Sato, K., Maebara, K., Wang, H., Tamba, M., Itoh, K., Yamamoto, M., & Bannai, S. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 44765–44771.
- 12) Ye, P., Mimura, J., Okada, T., Sato, H., Liu, T., Maruyama, A., Ohya, C., & Itoh, K. (2014) *Mol. Cell. Biol.*, **34**, 3421–3434.

13) Tsujita, T., Baird, L., Furusawa, Y., Katsuoka, F., Hou, Y., Gotoh, S., Kawaguchi, S.-i., & Yamamoto, M. (2015) *Genes Cells*, **20**, 563–577.

14) Hosoya, T., Hiramatsu, T., Ikemoto, T., Nakanishi, M., Aoyama, H., Hosoya, A., Iwata, T., Maruyama, K., Endo, M., & Suzuki, M. (2004) *Org. Biomol. Chem.*, **2**, 637–641.

## 著者寸描

### ●辻田 忠志 (つじた ただゆき)



佐賀大学農学部生命機能科学科生化学分野講師。博士 (バイオサイエンス)。

■略歴 1977年群馬県渋川市に生る。2000年九州大学農学部水産学科卒業。02年同大学院生物資源環境科学府生物機能科学専攻修士課程修了。05年奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科博士後期課程修了。同年JST-ERATO山本環境応答プロジェクト博士研究員。08

年 University of Dundee, Biomedical Research Centre, Postdoctoral Research Associate。11年東北大学大学院医学系研究科医化学分野助教。15年佐賀大学農学部生命機能科学科生化学分野講師。

■研究テーマと抱負 外来環境に応答する生体に備わった分子機構の解明に挑むと同時に、その仕組みを利用した創薬、健康食品、化粧品成分の開発を進めている。遺伝子改変動物を用いた解析を通して、農学分野から健康長寿社会を実現する「食」の力を提唱するような研究を展開したい。

■ウェブサイト <http://www.ag.saga-u.ac.jp/japanese/biochemistry/biochemistry.html>

■趣味 車弄り, 料理, 壊れた機械の修理, 登山。