

博士学位論文審査要旨

2014年 2月 19日

論文題目：転写因子 Nrf1 の活性制御機構とマクロファージにおける生理機能の解析

学位申請者：森田 智子

審査委員

主査：同志社大学大学院生命医科学研究科 教授 小林 聡
副査：同志社大学大学院生命医科学研究科 教授 野口 範子
副査：同志社大学大学院生命医科学研究科 教授 西川 喜代孝

要 旨：

転写因子 Nrf1 (NFE2L1)は、その遺伝子改変マウスがヒト疾患に類似した様々な病態を示すことから、生体の恒常性維持に重要な機能を担っていると考えられている。しかしながら、その詳細については不明な点が多かった。本論文では、1) タンパク質分解機構を介した Nrf1 の活性制御機構を解明し、2) マクロファージにおける生理機能について遺伝子改変マウスを作成し解析を行った。

まず Nrf1 活性制御機構については、通常 Nrf1 は細胞質と核においてユビキチン化依存的なタンパク質分解を受けていること、核ではユビキチン結合酵素サブユニット β TrCP が Nrf1 の安定性を制御していることを解明した。また β TrCP は、Nrf1 分子内の DSGLS モチーフを含んだドメインを認識して結合し、Nrf1 をユビキチン依存的なタンパク質分解していた。さらに同モチーフ内のセリン残基のリン酸化が β TrCP による Nrf1 分解機構に関わることを証明した。一方、リン酸化酵素 CK2 による Nrf1 の転写抑制機構も見出した。これら核における Nrf1 抑制機構は、核移行した Nrf1 活性を消退させる役割を担っていると考えられた。

一方、Nrf1 の生理機能解析については、マクロファージ特異的な Nrf1 遺伝子破壊マウスの作成に成功した。同マウスのマクロファージは正常に分化し、遺伝子発現様式も非感染時では顕著な変化はないことがわかった。その要因としては、同マクロファージでは Nrf1 遺伝子が完全欠失していないことが考えられた。そこで完全に Nrf1 が欠損した Nrf1 遺伝子破壊マウス由来のマウス線維芽細胞 (MEF) をモデル細胞として用い、さらに LPS 刺激を行った。その結果、Nrf1 は LPS による炎症性サイトカイン IL-6 遺伝子の誘導に関わる可能性を見出した。

以上、本論文では Nrf1 はタンパク質分解制御機構により活性制御を受け、炎症応答時に IL-6 遺伝子の発現を制御している可能性があることを新たに見出した。よって、本論文は、博士 (理学) (同志社大学) の学位を授与するにふさわしいものであると認められる。

総合試験結果の要旨

2014年 2月 19日

論文題目：転写因子 Nrf1 の活性制御機構とマクロファージにおける生理機能の解析

学位申請者：森田 智子

審査委員

主査：同志社大学大学院生命医科学研究科 教授 小林 聡
副査：同志社大学大学院生命医科学研究科 教授 野口 範子
副査：同志社大学大学院生命医科学研究科 教授 西川 喜代孝

要 旨：

上記審査委員は、森田智子氏に対する総合試験を、2014年1月16日午後4時半より口頭発表40分、質疑応答30分、そして口頭試問30分の構成で実施した。総合試験において学位申請者は、提出された論文の内容に関する質問および諮問に的確に応答し、研究の内容と意義、研究方法、解析法について十分な理解を示すとともに、研究の背景について専門知識を有していることを示した。本研究の実験はすべて本申請者が行ったものであり、またデータの再現性については申請者自身が厳しく追求しており、信頼性の高い結果を提示している。本論文における実験方法は、分子生物学ないし細胞生物学的解析に加えて、マウス遺伝学を駆使した遺伝子改変マウスの作成ならびに同マウスを用いた動物実験までと多岐におよぶが、いずれも原理および手法を確実に修得し、結果につなげていることが示された。

申請者は自コースの「特殊研究」を履修し、研究科内に設置されている授業科目から合計4単位以上を履修していた。語学試験「英語」は入学時に高得点で合格している。また国内学会においてポスター発表を行い有意義な議論をおこなった。さらに、参考論文である学術雑誌 *Mol. Cell. Biol.* への投稿論文の執筆内容から、申請者が研究遂行上必要な英文読解能力と作成能力を有することが確認された。よって、総合試験の結果は合格と認める。

博士學位論文要旨

論文題目： 転写因子 Nrf1 の活性制御機構とマクロファージにおける
生理機能の解析

氏 名： 森田 智子

要 旨：

我々は日々生活する上で内的・外的要因に関わらず様々なストレスにさらされている。しかしながら、生物は進化の過程でストレスに対応するための恒常性維持機構を獲得し、環境に適応して生命活動を行っている。例えば、細胞内で活発に合成されるタンパク質は、時に立体構造形成の異常や凝集体の形成が認められる。これら異常タンパク質の蓄積はやがて細胞死を誘導するため、タンパク質分解によるタンパク質の品質管理機構が存在する。また、ウイルス感染は我々にとって脅威であり免疫恒常性を乱すものであるが、免疫応答という巧妙な機構によりウイルスに対抗する。これらタンパク質恒常性維持機構や免疫応答の破綻は、それぞれ神経変性疾患や自己免疫疾患など様々な疾患を引き起こし、穏やかな生活を送ることを難しくする。よって、恒常性維持機構を研究することは疾患の発症機構に対する知見を深め、治療の対策を立てる上でも重要であると考えられる。

Nrf1 (NFE2-related factor 1) は塩基性ロイシンジッパー (bZip) 型の転写因子であり、CNC (Cap'n'collar) 転写因子群に属する。現在まで様々な Nrf1 遺伝子破壊マウスの表現型が報告されている。全身性 Nrf1 遺伝子破壊マウスは肝細胞の細胞死により貧血となり胎生致死になる。また、骨芽細胞特異的な Nrf1 遺伝子破壊マウスは骨形成が減少することで体が小さくなる。肝臓特異的な Nrf1 遺伝子破壊マウスは脂肪が蓄積し、ヒト非アルコール性脂肪肝炎 (NASH: non-alcoholic steatohepatitis) に酷似した表現型を示すが、これは Nrf1 の標的遺伝子である代謝関連因子 Lipin1 と PGC-1 β (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 β) の発現低下による。さらに、本研究室で作製した神経特異的な Nrf1 遺伝子破壊マウスは、ユビキチン陽性タンパク質を蓄積し神経変性を引き起こすことを見出している。以上のような重篤な表現型が示すように、転写因子 Nrf1 は恒常性維持において非常に重要な機能を担っていることが強く予想される。したがって Nrf1 の生理機能や制御機構を解明することは、恒常性維持機構の破綻がもたらす神経変性疾患や脂質代謝異常などに対して重要な知見を与えることが推察される。

Nrf1 は、通常アミノ末端側の NHB1 (N-terminal homology box 1) ドメインを介して小胞体に留められ、核移行が阻害されている。このことは、Nrf1 が何らかのストレスによって小胞体から解離し核移行するストレス応答型転写因子であることを意味する。今までにプロテアソーム阻害剤によるタンパク質毒性がストレスとなって Nrf1 が活性化し、標的遺伝子であるプロテアソームサブユニットの発現を亢進することが報告されている。しかし、生理的条件下ではどのようなストレスで活性化しているのか、小胞体からどのように解離するのか、さらにはプロテアソームサブユニット以外の標的遺伝子はあるのかなど、Nrf1 の制御機構は未だ不明な点が多い。

近年、ヒト単球性白血病株である THP-1 細胞の PMA 刺激によるマクロファージへの分化過程で、Nrf1 mRNA の発現が亢進することが報告された。さらに、Nrf1 のホモログである Nrf2 (NFE2-related factor 2) はマクロファージにおいて LPS 刺激に应答して抗炎症性遺伝子の発現を誘導することや、Nrf2 遺伝子破壊マウスが LPS 感受性の増大を示して敗血症性ショックを誘導することから、免疫応答の制御を行うと報告されている。また、線虫においては病原体感染時に産生される ROS (reactive oxygen species) によって Nrf1 のオーソログである SKN-1 が活性化され、標的遺伝子である第二相解毒酵素の発現を亢進することで生体保護的に機能することが報告されている。これらの知見から、Nrf1 が免疫細胞であるマクロファージにおいて重要な役割を担うと仮説を立てた。

本研究は、1) 転写因子 Nrf1 の活性制御機構を解明すること、2) 免疫細胞における Nrf1 の生理機能を解析することを目的とした。

研究項目 1) では、Nrf1 の活性制御機構にはタンパク質分解制御が関わりと仮説を立て解析を行った。当研究室では、MEF (Mouse Embryonic Fibroblast (マウス胎児線維芽細胞)) をプロテアソーム阻害剤で処理することで内在性 Nrf1 が著しく細胞内に蓄積することを見出していた。この結果は、Nrf1 が細胞内においてプロテアソーム依存的なタンパク質分解を受けていること、そして Nrf1 にユビキチン鎖を付加する E3 ユビキチンリガーゼが存在することを示唆している。そこで Nrf1 のタンパク質分解機構の全容を解明する目的で、まず E3 ユビキチンリガーゼの同定を Nrf1 結合因子の網羅的スクリーニングにより行い、ユビキチンリガーゼサブユニットである β -TrCP2 (F-box and WD repeat domain containing 11), Skp1 (S-phase kinase-associated protein 1) を同定した。 β -TrCP2 と Skp1 は、SCF (Skp1-Cullin-F-box タンパク質) 複合体を形成し、基質となるタンパク質をユビキチン-プロテアソーム系により分解する。また β -TrCP2 には機能的に等価な β -TrCP1 が存在する (本研究では、これらをまとめて β -TrCP と呼ぶ)。細胞質と核に局在する Nrf1 欠失変異体を用いた実験から、Nrf1 は細胞質と核でそれぞれタンパク質分解を受けており、 β -TrCP は Nrf1 の DSGLS モチーフを介して核における Nrf1 のタンパク質分解に関わることを明らかにした。

さらに、Nrf1 結合因子の網羅的スクリーニングにより同定された CK2 (casein kinase 2) に着目し研究を行った。CK2 は触媒サブユニットである α と制御サブユニットである β がヘテロ四量体を形成し、セリン/スレオニンリン酸化酵素として機能する。これまでに、細胞分化・細胞分裂・細胞生存やアポトーシスの制御に関与することが報告されている。本研究では、CK2 は Nrf1 をリン酸化することで Nrf1 の標的遺伝子であるプロテアソームサブユニットの発現を抑制することを明らかにした。

研究項目 2) では、免疫細胞マクロファージにおける Nrf1 の生理機能を解明する目的で、マウス骨髄由来マクロファージ (BMDM) を用い、アデノウイルス感染や TLRs (Toll-like receptors) アゴニストによる刺激実験を行った。TLRs は免疫細胞に高発現し、病原体の構成分子を認識することで免疫応答を活性化させる受容体である。現在までにヒトでは 10 種、マウスでは 12 種の存在が確認されている。TLRs はそれぞれの受容体で認識する分子が異なる。免疫応答と Nrf1 の関与を明らかにするために、まずアデノウイルスを BMDM に感染させたところ、Nrf1 mRNA の発現が増加することを明らかにした。また各 TLRs に対するアゴニストで BMDM を刺激したところ、Nrf1 mRNA の発現が増加することを明らかにした。これらの結果から、アデノウイルスや TLRs のアゴニストである免疫活性化剤は Nrf1 を活性化する可能性を明らかにした。

そこで、マウス個体レベルでのマクロファージにおける Nrf1 の生理機能を解明する目的で、マクロファージ特異的な Nrf1 遺伝子破壊マウス (*Nrf1^{fllox1}: LysM-Cre*) を作製

した。同マウスは正常に出生・生育し繁殖能力もあり、顕著な病態は観察されなかった。また同マウス由来のBMDMは野生型マウス由来のBMDMと同程度のマクロファージ分化能を示した。そこでマイクロアレイによるNrf1ノックダウンBMDMの遺伝子発現解析を行った結果、有意な発現変動を示す遺伝子を見出すことができなかった。この要因の一つとして、Nrf1ノックダウンBMDMには20%ほどNrf1が残存するため、これが機能欠損を相補している可能性が考えられた。そこで、Nrf1を完全に欠損させたNrf1欠損MEF (Mouse Embryonic Fibroblast (マウス胎児線維芽細胞)) を用いて、LPS刺激に対する応答を検討した。その結果、Nrf1欠損MEFにおいてはLPSによる炎症性サイトカインであるIL-6の増加亢進作用が阻害されることを見出した。

本研究では、Nrf1は核と細胞質におけるタンパク質分解とCK2によるリン酸化という多重制御を受けていることを見出した。したがって、Nrf1の活性化には多重制御を解除する何らかの刺激が必要であることが示された。マクロファージでは、免疫活性化剤に対する免疫応答を介してNrf1が活性化し、IL-6の発現誘導に関与する可能性を見出した。