

博士論文

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

同志社大学大学院 生命医科学研究科 生命医科学専攻
博士課程（後期課程） 遺伝情報研究室

4E111301

森田 智子

指導教員 小林 聡 教授

2013年11月

目次

| | |
|------------------------------|----|
| 1. 序論 | 1 |
| 2. Nrf1 タンパク質機能制御機構の解析 | |
| 1. 概要 | 6 |
| 2. 実験方法 | 8 |
| 3. 結果 | 13 |
| 4. 考察 | 18 |
| 5. 結論 | 21 |
| 6. 図表 | 22 |
| 3. マクロファージにおける Nrf1 の生理機能の解析 | |
| 1. 概要 | 35 |
| 2. 実験方法 | 39 |
| 3. 結果 | 43 |
| 4. 考察 | 46 |
| 5. 結論 | 49 |
| 6. 図表 | 50 |
| 4. 結語 | 58 |
| 5. 引用文献 | 59 |
| 6. 謝辞 | 66 |

1. 序論

1-1. 生体の恒常性維持機構

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、環境に適応してきたため、それぞれの生活を送ることが可能となった。恒常性維持機構が機能している間、体内は快適な一定の状態に保たれている。

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[1]。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[2]。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。そこで、恒常性維持機構を研究することは疾患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。

1-2. Nrf1 の機能

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。現在まで報告されている、Nrf1 遺伝子欠損マウスで報告された表現型を表 1-1 に示す。全身性 Nrf1 遺伝子破壊マウスは貧血により胎生致死になる[3]。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こと[4]、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。肝臓では、代謝関連因子である Lipin1 と PGC-1 β (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 β) が Nrf1 の標的遺伝子であることが明らかになっている[5] [6]。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[7]。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役割を担っていると考えられる。

一方、細胞株でも研究は進められ Nrf1 は紫外線による DNA 損傷からの修復に関与

するという報告や[8][9], プロテアソームサブユニットの発現を制御するという報告がある[10][11]. したがって, Nrf1 の生理機能や制御機構を解明することは, 恒常性維持機構に関わる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ものと考えている.

1-3. CNC 転写因子群

CNC 転写因子群は後生動物において保存され, 発生および恒常性維持において重要な機能を持つことが知られている[12]. これらのことから, ストレス応答メカニズムが他の種でも存在することが分かる. 線虫の SKN-1 (Skinhead family member 1) [13], ショウジョウバエの Cnc は[14], 脊椎動物の p45/NF-E2 (nuclear factor erythroid-derived 2), Nrf1, Nrf2 (NFE2-related factor 2), Nrf3 (NFE2-related factor 3) のオーソログにあたる[15][16][17][18] (図 1-1). これら CNC 転写因子群は小 Maf (musculo-aponeurotic fibrosarcoma oncogene) 転写因子群 (MafF, MafG, および MafK) とヘテロ二量体を形成して[19][20][21][22], 遺伝子の上流に位置する抗酸化剤応答配列 (ARE : antioxidant response element) に結合し遺伝子発現を制御する (図 1-2).

1-4. Nrf1 タンパク質の機能制御機構

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[23]. 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 (図 1-3). 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[24]. しかし, 生理的条件下ではどのようなストレスが活性化しているのか, 小胞体からどのように解離しているのか, 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.

1-5. Nrf1 と免疫応答の関与

Nrf1 は表 1-1 に示したように生体の恒常性維持機構において重要な役割を担っていることが示唆されている. 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 [25]. さらに, **Nrf1** のホモログである **Nrf2** はマクロファージを介して免疫応答の制御を行うことが知られている [26][27][28]. オースログである線虫の **SKN-1** は病原体感染に対して保護的に機能することも報告されている [29]. そこで, **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。

1-6. 本研究の目的

本研究は, 1) 転写因子 **Nrf1** の機能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。

表 1-1. Nrf1 遺伝子欠損部位とその表現型

| Nrf1 遺伝子欠損部位 | 表現型 |
|--------------|--|
| 全身性 | 貧血による胎生致死 [3] |
| 骨芽細胞特異的 | 骨形成の減少による体の小型化 [4] |
| 肝臓特異的 | 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 [5][6] |
| 中枢神経特異的 | ユビキチン陽性タンパク質の蓄積と神経変性 [7] |

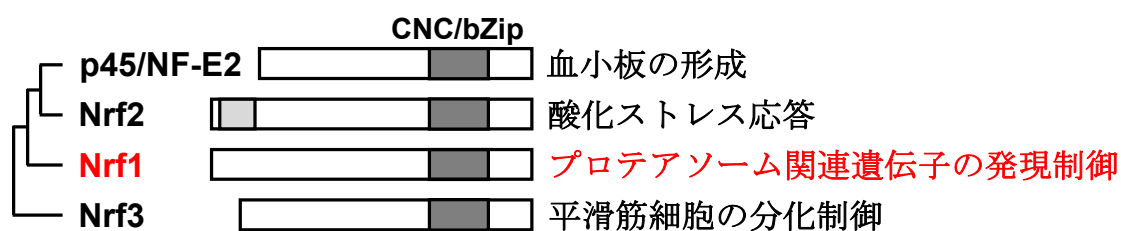


図 1-1. CNC 転写因子群と主な機能

CNC 転写因子群には, 43 アミノ酸残基で構成される CNC ドメインが保存されている.

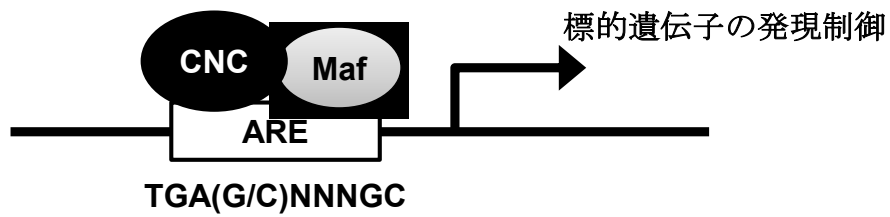


図 1-2. CNC 転写因子群の転写制御

CNC 転写因子群は小 Maf とヘテロ二量体を形成し、抗酸化剤応答配列 (ARE) に結合し遺伝子発現を制御する。

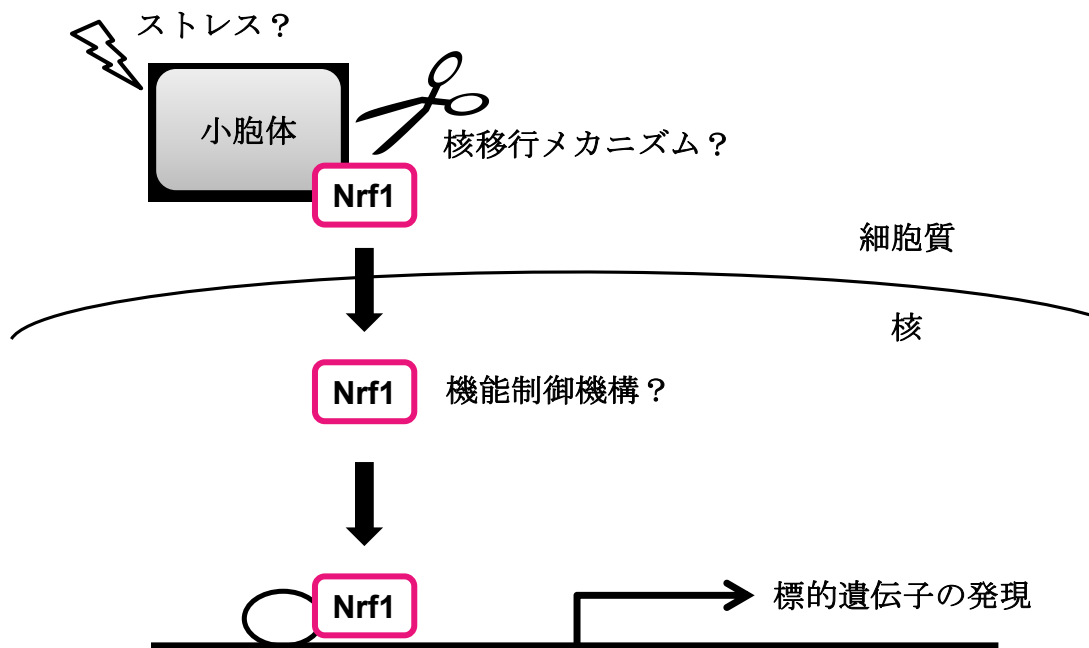


図 1-3. Nrf1 のストレス応答モデル

Nrf1 は通常アミノ末端側の NHB1 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が、ストレスによって小胞体から解離し核移行する。

2. Nrf1 タンパク質機能制御機構の解析

2-1. 概要

転写因子 **Nrf1** は、通常条件下では小胞体に留まっており転写因子としての機能が抑制されている一方、ストレス条件下では核移行し、標的遺伝子の発現を制御する。**Nrf1** 遺伝子欠損マウスが重篤な表現型を示すことから、恒常性維持機構において重要な役割を担っていることが考えられる。また、近年 **Nrf1** がプロテアソームサブユニットの発現制御を行うことで、ユビキチン-プロテアソームによるタンパク質の品質管理に関与していることも報告されたが、**Nrf1** の分子機構についてはまだ不明な点が多い。そこで、我々は **Nrf1** の生理機能や制御機構を解明することで、恒常性維持機構に関わる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得ることが可能になると考えた。

Nrf1 の機能制御機構もタンパク質分解制御に関わると仮説を立て解析を行った。その結果、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が明らかになった。これは、**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の存在を示唆している。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[30]、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) および Keap1 を同定した (表 2-1, 産業技術総合研究所・夏目博士との共同研究)。 β -TrCP2 と Skp1 は、SCF (Skp1-Cullin-F-box タンパク質) 複合体を形成し、転写因子 β -catenin の E3 ユビキチンリガーゼとして機能することが報告されている[31][32]。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)。そこで本研究では、**Nrf1** の分解機構における β -TrCP, Skp1, Keap1 の関与について研究を進め、 β -TrCP が核における **Nrf1** のタンパク質分解に関わることを見出した。

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) に着目した (表 2-1)。CK2 はセリン/スレオニンリン酸化酵素として知られており、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

してその機能を発現する[33]. 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[34]. この CK2 と Nrf1 の関連について解析を進めた結果, CK2 による Nrf1 のリン酸化が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していることを明らかにした.

表 2-1. 質量分析による Nrf1 結合因子の網羅的解析

| | | |
|----------------|------------------|---------|
| β -TrCP2 | ユビキチンリガーゼサブユニット | タンパク質分解 |
| Skp1 | ユビキチンリガーゼサブユニット | |
| Keap1 | ユビキチンリガーゼサブユニット | |
| CBP/P300 | 転写共役因子 | 転写関連因子 |
| Histone H4 | ヒストン | |
| HCF1 | 転写共役因子 | |
| PHF6 | 転写共役因子 | |
| TOP1 | DNA トポイソメラーゼ | |
| CK2 α | セリン/スレオニン リン酸化酵素 | リン酸化酵素 |
| CK2 β | セリン/スレオニン リン酸化酵素 | |
| Girdin | AKT リン酸化促進因子 | その他 |
| OGT | 糖転移酵素 | |

2-2. 実験方法

2-2-1. β -TrCP2 欠失変異体発現ベクターの作製

表 2-2 のプライマーを用い HA タグ融合 β -TrCP2 発現ベクター (東北大学 中山 啓子 教授からの恵与) を鋳型に PCR を行った後, 得られた DNA 断片をセルフライゲーションすることで β -TrCP2 欠失変異体発現ベクターを作製した (図 2-5A).

2-2-2. 細胞培養

Cos7 細胞 (アフリカミドリザル腎臓由来) と HeLa 細胞 (ヒト子宮頸がん由来) は D-MEM (High Glucose) 培地 (Wako) に 10%のウシ胎児血清および 40 μ g/ml の Streptomycin と 40 units/ml の Penicillin を加え, 37°Cの 5% CO₂ 恒温培養器にて培養した.

2-2-3. 免疫蛍光染色

6穴プレートに滅菌したカバーガラスを入れた上に Cos7 細胞をまき, 24 時間培養した (40-50%コンフルエント) 後に, Nrf1 発現プラスミド (1 μ g) および, β -TrCP2 発現プラスミド (1 μ g) を無血清 D-MEM (High Glucose) 培地で希釈した Lipofectamine™ Reagent (Invitrogen) および PLUS™ Reagent (Invitrogen) を用いて導入した. 3 時間後に 10%のウシ胎児血清を含む D-MEM (High Glucose) 培地に交換し, さらに 21 時間培養した. 次いで, 最終濃度 3.7%のホルムアルデヒドで 10 分間処理後, 細胞を固定した. PBS で 2 回洗浄した後に 0.5% Triton-X-100 を含む PBS で 5 分間透過処理し, 再び PBS で 2 回洗浄した. 1 次抗体の抗 Flag 抗体 (Sigma) および抗 HA 抗体 (Santa Cruz) を 1% BSA を含む PBS で 100 倍希釈し, 室温で 1 時間反応させた. PBS で 3 回洗浄後, 2 次抗体として Alexa488 結合抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen), Alexa546 結合抗ウサギ IgG 抗体 (Invitrogen) および DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole: 細胞核の染色 DOJINDO) を室温で 30 分反応させた. なお, Alexa488 結合抗マウス IgG 抗体, Alexa546 結合抗ウサギ IgG 抗体は 1% BSA を含む PBS で 500 倍希釈, DAPI は 1000 倍希釈して用いた.

2-2-4. BCA 法によるタンパク質の定量

調製した細胞抽出液のタンパク質濃度を測定するために, BCA Protein Assay

Reagent (Thermo) を使用した。吸光度計を用いて波長 570 nm で比色定量を行い、作製した検量線を元に各サンプルのタンパク質濃度を算出した。

2-2-5. SDS-PAGE およびウエスタンブロッティング

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) では、アクリルアミド濃度 4%の濃縮ゲル、アクリルアミド濃度 10%の分離ゲルを用いた。BCA 法により算出した各サンプルのタンパク質濃度を一定にした後に、泳動を行った。

ウエスタンブロッティングでは、Nrf1 欠失変異タンパク質の検出に 1 次抗体に 5000 倍希釈した抗 Flag 抗体 (Sigma) を、2 次抗体に 5000 倍希釈した HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen) を使用した。β-TrCP2 欠失変異タンパク質の検出には 1 次抗体に 2000 倍希釈した抗 HA 抗体 (Santa Cruz) を、2 次抗体に 5000 倍希釈した HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Invitrogen) を使用した。GFP の検出には 1 次抗体に 5000 倍希釈した抗 GFP 抗体 (Santa Cruz) を、2 次抗体に 5000 倍希釈した HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen) を使用した。Keap1 の検出には 1 次抗体に 5000 倍希釈した抗 Keap1 抗体 (Santa Cruz) を、2 次抗体に 5000 倍希釈した HRP 標識抗ラット IgG 抗体 (Invitrogen) を使用した。αTubulin の検出には 1 次抗体に 5000 倍希釈した抗αTubulin 抗体 (Sigma) を、2 次抗体に 5000 倍希釈した HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen) を使用した。

2-2-6. DNA と siRNA の同時トランスフェクション

12 穴プレート上で、24 時間培養した HeLa 細胞 (20-30%コンフルエント) に、無血清 D-MEM (High Glucose) 培地で希釈した Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) を用い、DNA および表 2-3 の siRNA を導入した。24 時間後に 10%のウシ胎児血清を含む D-MEM (High Glucose) 培地に置換し、さらに 24 時間培養した。次いで、100 μl の 1×SDS sample buffer (50 mM Tris-HCl (pH6.8), 10% glycerol, 1% SDS) で溶解後、超音波処理し、細胞抽出液を調製した。

2-2-7. RNA の精製とリアルタイム PCR

RNA は RNAeasy (QIAGEN) を用いて細胞から抽出した。抽出した RNA から random hexamer プライマー (TaKaRa) を使って cDNA を合成した。

リアルタイム PCR は表 2-4 のプライマーと FastStart Universal SYBR (Roche) を用いて, ABI Prism 7900 (Applied Biosystems) / Thermal Cycler Dice (TaKaRa) で測定した.

2-2-8. 免疫沈降実験

6 穴プレート上で, 24 時間培養した Cos7 細胞 (60-70%コンフルエント) に Nrf1 発現プラスミドおよび, β -TrCP2 発現プラスミドを無血清 D-MEM (High Glucose) 培地で希釈した LipofectamineTM Reagent および PLUSTM Reagent を用いて導入した. 3 時間後に 10%のウシ胎児血清を含む D-MEM (High Glucose) 培地に交換し, さらに 13 時間培養した後に 10 μ M になるように MG132 (ペプチド研究所) を加え, さらに 8 時間培養した.

IPWD-NP buffer 330 μ l (50 mM Tris-HCl (pH8.0), 10% Glycerol, 100 mM NaF, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM Sodium orthovanadate, 10 mM Sodium pyrophosphate, 10 mM β -glycerophosphate, 0.1% NP-40, 1xProtease Inhibitor cocktail (Roche)) で細胞抽出液を調製し, BCA 法でタンパク質濃度を算出した後に, タンパク質濃度を一定に揃えた. 得られた細胞抽出液に抗 Flag M2 affinity gel (Sigma) を加え, 4°C で 2 時間反応し, 抗原抗体複合体を形成させた. TBS buffer (50 mM Tris-HCl (pH7.4), 150 mM NaCl, 0.1% NP-40) で抗原抗体複合体を 3 回洗浄した後に, SDS sample buffer (50 mM Tris-HCl (pH6.8), 10% glycerol, 1% SDS) で溶離し, SDS-PAGE および, 5000 倍希釈した抗 Flag 抗体 (Sigma) と 2000 倍希釈した抗 HA 抗体 (Santa Cruz) を用いたウエスタンブロッティングで解析した.

2-2-9. Nrf1 欠失変異体の半減期の測定

6 穴プレート上で, 24 時間培養した Cos7 細胞 (70-80%コンフルエント) に Nrf1 発現プラスミドおよび GFP (Green Fluorescent Protein) 発現プラスミドを無血清 D-MEM (High Glucose) 培地で希釈した LipofectamineTM Reagent および PLUSTM Reagent を用いて導入した. 3 時間後に 10%のウシ胎児血清を含む D-MEM (High Glucose) 培地に交換し, さらに 21 時間培養した. 10 μ M になるように MG132 (ペプチド研究所) を加え, 更に 8 時間培養した. 20 μ g/ml になるように CHX (Cycloheximide) を添加した時間を 0 時間とし, 更に 1, 3, 6 時間後に 100 μ l の 1xSDS sample buffer (50

mM Tris-HCl (pH6.8) , 10% glycerol, 1% SDS) で細胞抽出液を調製した. BCA 法でタンパク質濃度を算出した後にタンパク質濃度を一定に揃え, SDS-PAGE および, 抗 Flag 抗体 (Sigma) と抗 GFP 抗体 (Santa Cruz) を用いたウエスタンブロッティングで解析した. 検出したバンドは解析用ソフト ImageJ 1.40 を用いて定量し, 半減期を調べた. 個々の実験データは GFP の発現量で補正した. 少なくとも 3 回の独立した実験から平均値および標準偏差を出している.

表 2-2. 発現ベクター作製用プライマーの配列

| | | |
|---------------|---------|--------------------------------------|
| β-TrCP2 ΔWD40 | forward | 5'-TTCTTAAATGTGCCTCCCAGTGCCCAGAAT-3' |
| | reverse | 5'-ATTTTCAGAGCGGCACTGGATCCTCTGCAA-3' |

表 2-3. siRNA の配列

| | | |
|-----------|-----------|-----------------------------|
| control | sence | 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3' |
| | antisense | 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3' |
| β-TrCP1/2 | sence | 5'-GUGGAAUUUGUGGAACAUCTT-3' |
| | antisense | 5'-GAUGUCCACAAAUCCACTT-3' |
| Keap1 | sence | 5'-GGCCUUUGGCAUCAUGAACTT-3' |
| | antisense | 5'-GUUCAUGAUGCCAAAGGCCTG-3' |

表 2-4. リアルタイム PCR プライマーの配列

| | | |
|----------------|-----------|---------------------------------|
| Nrf1 | sence | 5'-TGGAACAGCAGTGGCAAGATCTCA-3' |
| | antisense | 5'-GGCACTGTACAGGATTTCACTTGC-3' |
| GAPDH | sence | 5'-CCAGAACATCATCCCTGCCTCTACT-3' |
| | antisense | 5'-GGTTTTTCTAGACGGCAGGTCAG-3' |
| β -TrCP1 | sence | 5'-TGCCGAAGTGAAACAAGC-3' |
| | antisense | 5'-CCTGTGAGAATTCGCTTG-3' |
| β -TrCP2 | sence | 5'-TCAGTGGCCTACGAGATA-3' |
| | antisense | 5'-ACACGCTCATCATACTGCA-3' |
| PSMC4 | sence | 5'-GGAAGACCATGTTGGCAAAG-3' |
| | antisense | 5'-AAGATGATGGCAGGTGCATT-3' |
| PSMA4 | sence | 5'-CATTGGCTGGGATAAGCA-3' |
| | antisense | 5'-ATGCATGTGGCCTTCCAT-3' |
| PSMB6 | sence | 5'-CTGATGGCGGGAATCATC-3' |
| | antisense | 5'-CCCAATGGCAAAGGACTGC-3' |
| 18S rRNA | sence | 5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTC-3' |
| | antisense | 5'-CGAACCTCCGACTTTCGTTCT-3' |

2-3. 結果

2-3-1. 核と細胞質に局在する Nrf1 欠失変異体のタンパク質分解様式の解析

Nrf1 は、通常アミノ末端側の NHB1 ドメインを介して小胞体に留められることで核移行が阻害されているが、細胞がストレスを感知すると Nrf1 は核移行すると考えられている[23]. よって、ストレス誘導時には、Nrf1 は細胞質と核に局在することになる. 本研究では Nrf1 タンパク質の細胞質と核における分解メカニズムの解析を行った. まず、小胞体に留めるためのドメインである NHB1 を欠失させた変異体 (以後、P1 と呼ぶ)、核移行シグナル (NLS: nuclear localization signal) を含む bZip ドメインを欠失させた変異体 (以後、 Δ bZip と呼ぶ) と、野生型である全長の Nrf1 (以後、WT と呼ぶ) を用いた (図 2-2A).

P1 と Δ bZip の細胞内局在を確認するために、免疫蛍光染色を行った. Cos7 細胞に一過性に WT, P1 および Δ bZip を発現させ、細胞内局在を確認したところ、WT は細胞内全体に分布するのに対して、P1 は核に、 Δ bZip は細胞質に局在することを確認した (図 2-2B).

さらに、P1 と Δ bZip がタンパク質分解を受けるかどうかを確認するとともに、Nrf1 のタンパク質分解の場も明らかにした. それぞれの Nrf1 欠失変異体を Cos7 細胞に一過性に発現させ、プロテアソーム阻害剤である MG132 (10 μ M, 8 時間) 処理後にウエスタンブロッティングでそのタンパク質を解析した. その結果、MG132 処理でどちらの Nrf1 欠失変異体もタンパク質が安定化した (図 2-2C). これらから、P1 と Δ bZip はそれぞれ核と細胞質で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を明らかにした.

2-3-2. β -TrCP による核に局在する Nrf1 欠失変異体タンパク質分解の制御

Nrf1 はプロテアソーム依存的なタンパク質分解を受けることから、表 2-1 で同定されたユビキチンリガーゼサブユニットである β -TrCP2, Skp1 および Keap1 に着目した. β -TrCP2 は Skp1 と複合体を形成し、Keap1 は単独で、それぞれ Cul1 および Cul3 と結合することで基質特異的なユビキチンリガーゼ複合体として機能することが知られている[35][36]. そこで、核と細胞質に局在する Nrf1 タンパク質の分解に β -TrCP が関与するかを調べるために、siRNA を用いた RNA 干渉実験を行った. HeLa 細胞 (ヒト子宮頸がん由来) に β -TrCP1 および β -TrCP2 mRNA を標的とする siRNA と P1 および Δ bZip

発現ベクターを同時に導入した。β-TrCP siRNA による P1 の安定化が確認できる一方で、ΔbZip の安定化は見られなかった (図 2-3A)。また、β-TrCP siRNA が Nrf1 mRNA の発現を非特異的に抑制している可能性について検討するために、β-TrCP siRNA 処理した際のβ-TrCP1、β-TrCP2 および Nrf1 mRNA の発現をリアルタイム PCR で解析した。すると、β-TrCP siRNA はβ-TrCP1 およびβ-TrCP2 mRNA の発現を特異的に抑制し、Nrf1 mRNA の発現に影響しなかった。これらの結果は、β-TrCP siRNA は Nrf1 mRNA の発現に関与しないこと、β-TrCP は Nrf1 の核でのタンパク質分解に関与し、細胞質でのタンパク質分解機構とは独立して Nrf1 の機能制御に関わることを示している。

また、Nrf1 結合因子のスクリーニングで同定された Keap1 についても同様に解析を行った。Keap1 は Nrf1 と同じ CNC 転写因子群に属する Nrf2 のタンパク質分解に関与することが知られている[37]。そこで、Keap1 が Nrf1 タンパク質分解機構に関与するかを、Keap1 の siRNA を用いた RNA 干渉実験で確認した。HeLa 細胞に Keap1 mRNA を標的とする siRNA と Nrf1 および Nrf2 発現ベクターを同時に導入した。その結果、Keap1 siRNA によって Nrf2 タンパク質は安定化する一方で、Nrf1 タンパク質は安定化されなかった。このことから、Nrf1 のタンパク質分解に Keap1 は関与しないことを明らかにした (図 2-3C)。

2-3-3. β-TrCP と Nrf1 の局在と相互作用

β-TrCP と Nrf1 の細胞内局在を確認するために、β-TrCP と Nrf1 の免疫蛍光染色を行った。Cos7 細胞に 3xFlag Nrf1 と HA-β-TrCP を一過性に発現させたところ、Nrf1 と β-TrCP は共局在を示した (図 2-4A)。

次に、Nrf1 とβ-TrCP が相互作用をするかどうかを確認するために、免疫沈降実験で解析した。Cos7 細胞に両因子を一過性に発現させた細胞抽出液を用いて、抗 Flag 抗体結合ビーズを用いて免疫沈降をした結果、Nrf1 とβ-TrCP は相互作用することが明らかとなった (図 2-4B)。

2-3-4. β-TrCP の WD40 ドメインを介して Nrf1 は相互作用する

β-TrCP の Nrf1 相互作用ドメインを同定するために、β-TrCP 欠失変異体を作製し、免疫沈降実験を行った。β-TrCP の WD40 ドメインを欠失させた変異体 (ΔWD40)、F-box ドメインを欠失させた変異体 (ΔF-box) は図 2-5A に示す。Cos7 細胞に一過性に Nrf1

WT と β -TrCP の WT, Δ F-box および Δ WD40 変異体をそれぞれ発現させた細胞抽出液を用いて, 抗 Flag 抗体結合ビーズを用いて免疫沈降をした結果, Δ WD40 変異体でのみ Nrf1 WT との結合が検出できなかった. このことから, β -TrCP は WD40 ドメインを介して Nrf1 と結合することが明らかとなった (図 2-5B).

2-3-5. Nrf1 の 243-463 a.a. および 107-242 a.a. を介して β -TrCP は相互作用する

Nrf1 の β -TrCP 相互作用ドメインを同定するために, Nrf1 欠失変異体を用いて, 免疫沈降実験を行った. Nrf1 の欠失変異体は図 2-6A に示す. Cos7 細胞に一過性に β -TrCP WT と Nrf1 WT および各欠失変異体をそれぞれ発現させた細胞抽出液を用いて, 抗 Flag 抗体結合ビーズを用いて免疫沈降をした結果, P3 と P4 の間のドメイン (243-463 a.a.) (図 2-6B, レーン 5, 6) および M3 と M2 の間のドメイン (107-242 a.a.) (図 2-6B, レーン 9, 10) の二ヶ所で β -TrCP と結合することが明らかとなった.

2-3-6. Nrf1 の β -TrCP 分解責任ドメインの同定

二ヶ所ある Nrf1 の β -TrCP 結合ドメインのうち, 分解に重要なドメインがどこに該当するのかを同定するために, Nrf1 欠失変異体に対して β -TrCP siRNA を用いた RNA 干渉実験を行った. HeLa 細胞に β -TrCP siRNA と Nrf1 WT および Nrf1 欠失変異体発現ベクターを同時に導入した. その結果, β -TrCP siRNA によって Nrf1 WT および Nrf1 欠失変異体である P2 と P3 は安定化する一方で (図 2-7A, レーン 3-8), P4 は発現量に差が見られなかった (図 2-7A, レーン 9, 10). また, M1 (464-580 a.a. を欠失) が安定化する一方で, M2 (243-580 a.a. を欠失) は発現量に差が見られなかった (図 2-7A, レーン 11-14). これらの結果から, β -TrCP 依存的な Nrf1 タンパク質分解には M3 と M2 の間のドメイン (107-242 a.a.) ではなく, P3 と P4 の間のドメイン (243-463 a.a.) が必要であることを明らかにした.

次に, P3 と P4 の間のドメイン (243-463 a.a.) が Nrf1 タンパク質分解に関与しているかどうかを確認するために, Cycloheximide を用いてチェイス実験を行った. その結果, Nrf1 WT はタンパク質分解を受けており, P3 も同程度の半減期を示した. 一方, 243-463 a.a. を欠失した P4 は安定化を示した (図 2-7B). これらの結果から, β -TrCP は Nrf1 の 243-463 a.a. ドメインを介して Nrf1 の核でのタンパク質分解を制御していることが明らかになった.

2-3-7. β -TrCP 依存的な Nrf1 タンパク質分解には DSGLS モチーフを必要とする

β -TrCPは基質モチーフであるDpSGXnpS ($n \geq 1$, pS リン酸化セリン) を認識することで、プロテアソーム依存的なタンパク質分解に導くことが知られている (図2-8A). β -TrCPがタンパク質分解を制御するNrf1の243-463 a.a. ドメイン内を探索したところ、 β -TrCPの基質認識モチーフ様の配列があり、これをDSGLSとした. DSGLSは他の生物種や、他のCNC転写因子群であるNrf2, Nrf3およびp45/NF-E2に高度に保存されている (図2-8A). なお、先行研究でEpo-R (erythropoietin receptor) やYAP (Yes-associated protein) にDSGXSモチーフが存在し、 β -TrCPの基質認識モチーフとして機能することが報告されている[38][39] (図2-8A).

Nrf1のDSGLSモチーフが β -TrCPの基質認識モチーフとして機能しているかを検討するために、P3変異体を用いてリン酸化部位と考えられる448と451番目のセリンをアラニンに置換した変異体 (以後、P3-SAとする) で解析を行った. P3とP3-SA変異体の安定性を比較するために、 β -TrCP siRNAを用いたRNA干渉実験とCycloheximideを用いたチェイス実験を行った. P3変異体に β -TrCP siRNAを作用させた際は安定化が確認できる一方、control siRNAを作用させた際はこれまでの実験結果と同様にタンパク質分解を受けている. P3-SA変異体はcontrol siRNAを作用させた際と β -TrCP siRNAを作用させた際で同程度の安定化を示した (図2-8B). これらの結果から、 β -TrCP依存的なNrf1タンパク質分解にはDSGLSモチーフを必要とすることを明らかにした.

2-3-8. Nrf1 S497A は内在性の標的遺伝子の発現を亢進する

Nrf1 の結合因子の網羅的解析の際、 β -TrCP以外にリン酸化酵素であるCK2が単離された (表 2-1). β -TrCPはDSGLSモチーフを基質モチーフとして認識するが、このセリンはリン酸化されているため、CK2の関与が推測できる. しかし、当研究室でNrf1欠失変異体を用いた *in vitro* キナーゼアッセイを行ったところ、DSGLSモチーフ (447-451 a.a.) とは異なる491-508 a.a. にCK2依存的なリン酸化サイトがあることを見出した. さらに詳細な解析を進めたところ、CK2はNrf1の497番目のセリンをリン酸化することを明らかにした. この結果は、 β -TrCPとは異なるNrf1の機能制御機構の存在を示唆している. リン酸化の意義を解析するために497番目のセリンをアラニンに置換した変異体 (以後、S497Aとする) とWTを比較することにした. CK2によるリン酸化は転写因子の活性化能と関連することが先行研究で報告されている[40].

CK2 による Nrf1 のリン酸化が転写活性化能に影響するかどうかを検討するため、WT と S497A を HeLa 細胞に一過性に発現させ、Nrf1 の標的遺伝子であるプロテアソームサブユニットの mRNA の発現変動を解析した。その結果、S497A は内在性の PSMC4 と PSMA4 mRNA の発現を亢進することが明らかになった(図 2-9A)。これは、CK2 による Nrf1 のリン酸化は転写活性化能を抑制していることを示している。

2-4. 考察

本研究では、転写因子 Nrf1 が核において β -TrCP を介してユビキチン-プロテアソームによるタンパク質機能制御を受けていること、 β -TrCP は Nrf1 の DSGLS モチーフを介して結合していることを明らかにした。さらに、CK2 による Nrf1 のリン酸化は、Nrf1 標的遺伝子の発現を抑制することを明らかにした。

核における Nrf1 の機能制御について、当研究室では更なる知見を得ている。Nrf1 の結合配列である ARE を含むルシフェラーゼレポーターと P3 または P3-SA 変異体を一過性に発現させた際、P3-SA 変異体においてルシフェラーゼ活性の増加がみられた。P3-SA 変異体は β -TrCP の基質モチーフである DpSGXnpS のセリンをアラニン置換したもので、 β -TrCP の結合を阻害するものである。すなわち、ユビキチン-プロテアソームによる機能制御を免れる Nrf1 変異体であり、Nrf1 が安定化したため、転写活性化能を亢進したと考えられる。この推測を裏付けるように、 β -TrCP siRNA を作用させた際、Nrf1 の標的遺伝子である PSMC4, PSMA4 および PSMA2 mRNA の発現が増加することが明らかとなった[41]。これらの結果から β -TrCP は DSGLS モチーフを介して、Nrf1 の機能制御を行っていることが示された。一方、細胞質における Nrf1 タンパク質分解は ERAD (endoplasmic reticulum-associated degradation) 関連因子である E3 ユビキチンリガーゼ p97/VCP および Hrd1 が担うという報告がある[24]。そこで、Hrd1 の関与について検討するため、Hrd1 siRNA を作用させた際の Nrf1 標的遺伝子 PSMC4, PSMA4 および PSMA2 mRNA の発現をリアルタイム PCR で確認したところ、 β -TrCP siRNA を作用させた際と同程度の Nrf1 標的遺伝子の増加が確認できた。このことから、Hrd1 も Nrf1 タンパク質機能制御に関与していることが示され、Nrf1 は細胞質と核で異なるタンパク質機能制御を受けていることが明らかになった。以上のことから、ストレス非存在下においては、Nrf1 は小胞体に局在しており、Hrd1 によりタンパク質分解を受けることで常にその量を一定に保っていることが考えられる。一方、ストレスシグナルにより細胞が刺激を受けると、Nrf1 は核に移行し、ストレス応答因子の遺伝子発現制御を通じて細胞の恒常性を保つ。Nrf1 がその役目を果たした後には、本研究で明らかにした β -TrCP との結合を介して分解されることにより、その役割を終えることが推察される。

本研究で同定された DSGLS モチーフのリン酸化酵素が Nrf1 タンパク質分解の ON/OFF を切替える重要な因子であると考えられるが、まだ不明なままである。Nrf1

の DSGLS モチーフ近傍には Casein kinase2 (CK2) および Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) のコンセンサス配列である S/T-X-X-D/E と S/T-X-X-X-S/T に類似したアミノ酸配列が存在する[42][43]. CK2 は Nrf1 の結合因子の網羅的解析で同定された因子であるため、詳細な解析を行ったが *in vivo* キナーゼアッセイの結果 DSGLS モチーフとは異なるサイトのリン酸化に関与することが明らかになった[44]. GSK-3 は Nrf2 において、Nrf1 の DSGLS モチーフと類似した Nrf2 の DSGIS モチーフのリン酸化を担うこと、さらに β -TrCP がそのリン酸化サイトを認識して機能制御をするという報告がある[45]. しかしながら、Nrf1 に対して GSK-3 阻害剤である LiCl (lithium chloride) と SB216763 を用いたところ、Nrf1 の安定性に大きな変化は確認できなかった. このことから、Nrf1 は Nrf2 とは異なり、GSK-3 によるリン酸化が β -TrCP による Nrf1 の制御に必須である可能性は低いと考えられる.

Nrf1 の DSGLS モチーフを含む領域は AD2 ドメインと呼ばれ、転写活性化ドメインとして機能することが報告されている[46]. β -TrCP は自身の WD40 ドメインを介して CBP/p300 と結合するという報告がある[47]. CBP/p300 は Nrf1 の結合因子の網羅的解析でも同定されている (表 2-1). ヒストンアセチル化酵素として機能し、ヌクレオソーム構造を弛緩させることで転写因子が DNA に結合しやすくする役目を持つ[48]. CBP/p300 は Nrf1 のホモログである Nrf2 の Neh5 ドメインと結合し、転写活性化能を亢進することが報告されている[49][50][51]. この Neh5 ドメインは Nrf1 にも高度に保存されており、Nrf1 の Neh5 ドメインだけでも転写活性化能があることが報告されている[50]. これらの報告から Nrf1 の Neh5 ドメインと CBP/p300 が結合していることが推測できる. また、 β -TrCP と CBP/p300 複合体が β -TrCP の基質である β -catenin と SMAD3 と結合し、それぞれの転写活性化能を亢進する報告がある[47][52]. これらの知見から、Nrf1 は一時的に β -TrCP-CBP/p300 と複合体を形成することで標的遺伝子の転写活性化能が亢進する可能性が推測できる.

前述したように、Nrf1 は CK2 によるリン酸化でも機能制御を受けている. 例えば、CK2 は *in vivo* キナーゼアッセイの結果 DSGLS モチーフ (447-451 a.a.) とは異なる 497 番目のセリンをリン酸化している[44]. このリン酸化が機能的であるかを確認するためにクロマチン免疫沈降実験で、Nrf1 が標的遺伝子の ARE に結合する程度を検討することにした. CK2 siRNA を作用させて CK2 の活性を抑制した際、Nrf1 は ARE へ多く結合することが示されたため、リン酸化が ARE への結合を阻害していることが考え

られる。これは、リン酸化を受けない **S497A** において標的遺伝子の mRNA 発現レベルが増加する結果 (図 2-9) と一致する。この結果から、リン酸化が **Nrf1** のタンパク質分解を促進している可能性が考えられるが、野生型 **Nrf1** と **S497A** の半減期を比較した結果、安定性に差は見られていない[44]。これらの結果から、**CK2** による **Nrf1** のリン酸化はストレスに応答して速やかに標的遺伝子の活性化を促すシステムの一つであることが考えられる。**Nrf1** は通常状態において、細胞質では **Hrd1**[24]、核では β -**TrCP** によるタンパク質機能制御を受けている[41]。一方、ストレス条件下ではこれらのタンパク質分解から免れ、**Nrf1** は安定化すると考えられる。その後、さらに **CK2** によるリン酸化制御によってストレスの程度に合わせた非常に細やかな標的遺伝子の転写制御を行う可能性も考えられる。または、 β -**TrCP** によるタンパク質分解は転写活性化能を亢進し、役目を終えた **Nrf1** の分解・除去の機能を持つものであり、実際の転写活性化能の制御には **CK2** のリン酸化が決定的な要因となる可能性もある。

Nrf1 のストレス応答モデルはどのようなストレスが活性化因子となるのか、どのような方法で核に移行するのか、など未解明な点が残されている。今後、更なる研究により **Nrf1** 制御機構が明らかになることで、**Nrf1** 欠損マウスで見られるような表現型に対し治療法が確立することが期待される。

2-5. 結論

本研究から, Nrf1 は細胞質と核でそれぞれプロテアソーム依存的なタンパク質分解による機能制御を受けていること, そして, 核でのタンパク質分解は β -TrCP が Nrf1 の DSGLS モチーフを介して制御していることを明らかとした.

さらに, CK2 による Nrf1 のリン酸化は, Nrf1 標的遺伝子の発現を抑制することを明らかにした. (図 2-1)

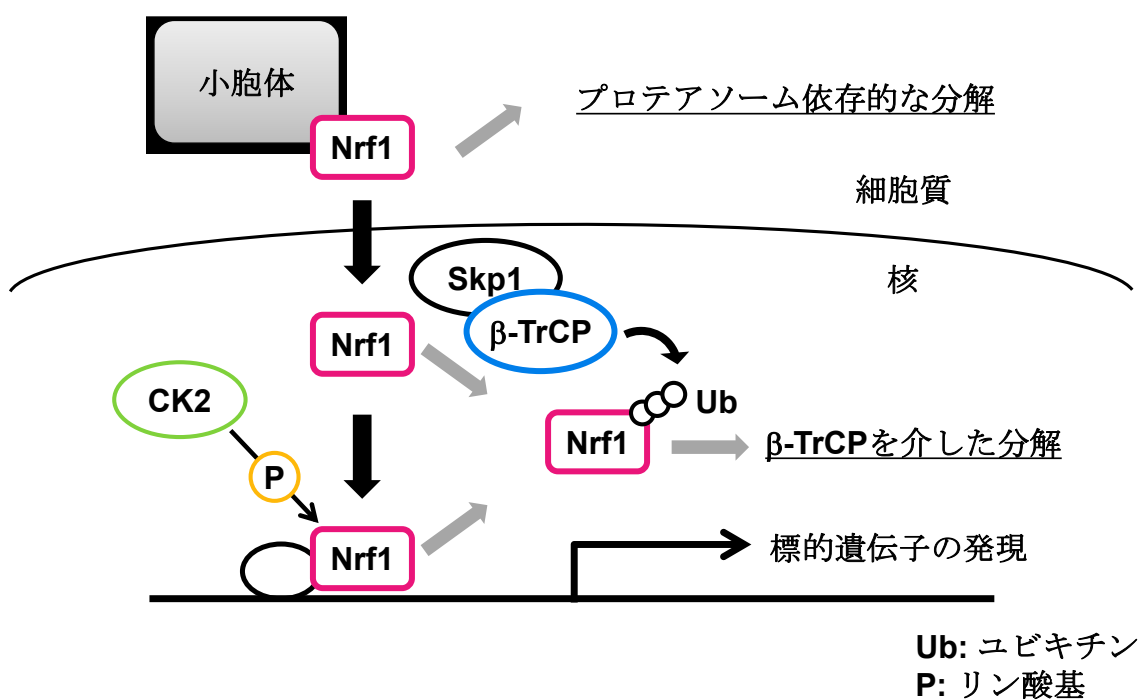


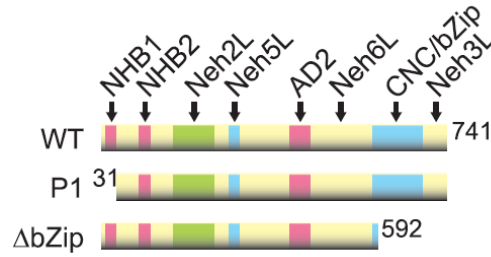
図 2-1. Nrf1 タンパク質機能制御機構のモデル図

Nrf1 は細胞質と核でそれぞれプロテアソーム依存的なタンパク質分解による機能制御を受けている. 核でのタンパク質分解は β -TrCP によって制御されている.

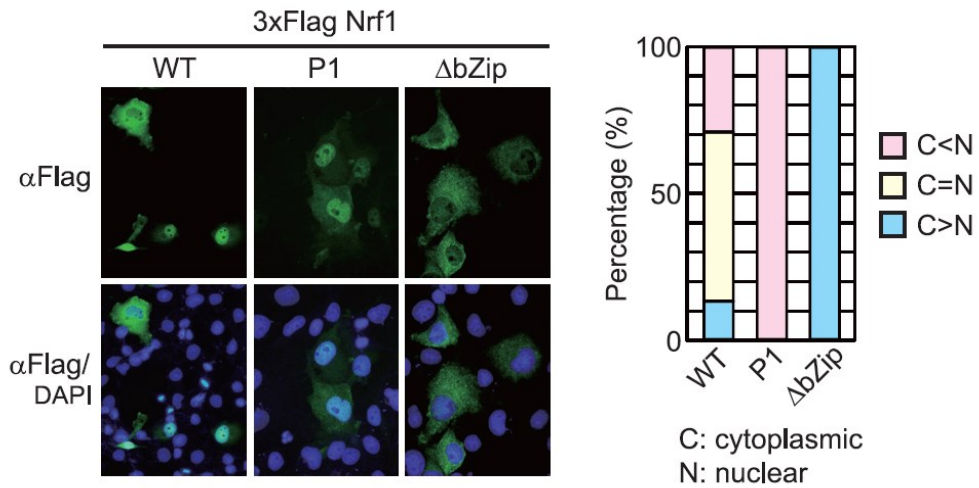
CK2 による Nrf1 のリン酸化は, Nrf1 標的遺伝子の発現を抑制する.

2-6. 図表

A.



B.



C.

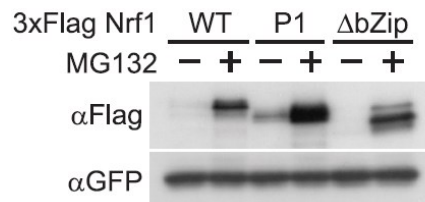


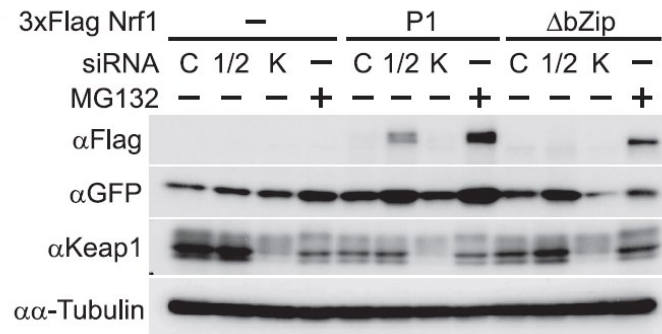
図 2-2. 核と細胞質における Nrf1 タンパク質分解

(A) Nrf1 欠失変異体の模式図 (P1: NHB1 ドメイン欠失変異体, ΔbZip: bZip (basic leucine zipper) ドメイン欠失変異体). (NHB2: N-terminal homology box2, Neh2L: Neh2-like, Neh5L: Neh5-like, AD2: acidic domain2, Neh6L: Neh6-like, Neh3L: Neh3-like).

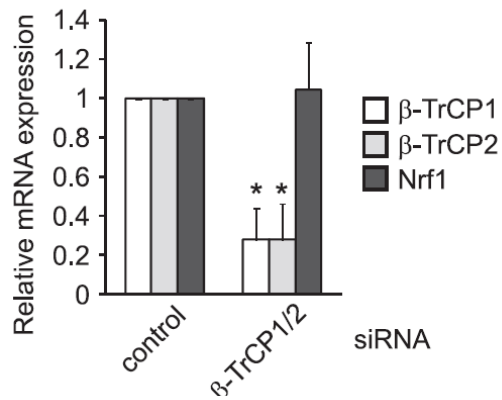
(B) Cos7 細胞を使った過剰発現系で免疫蛍光染色を行い, Nrf1 欠失変異体の局在を確認した. P1 は核に, Δ bZip は細胞質に局在することが示された (C: 細胞質, N: 核).

(C) WT と同様に, P1 と Δ bZip もプロテアソーム阻害剤 MG132 処理 (10 μ M, 8 時間) で安定化した. DNA 導入効率の内部標準として GFP を用いた.

A.



B.



C.

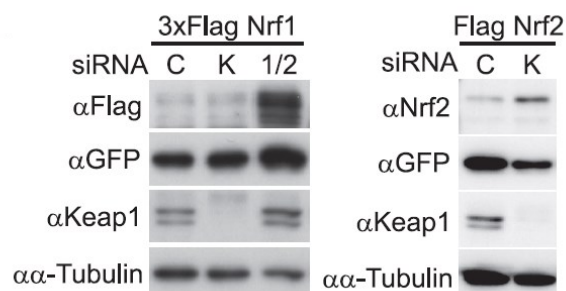


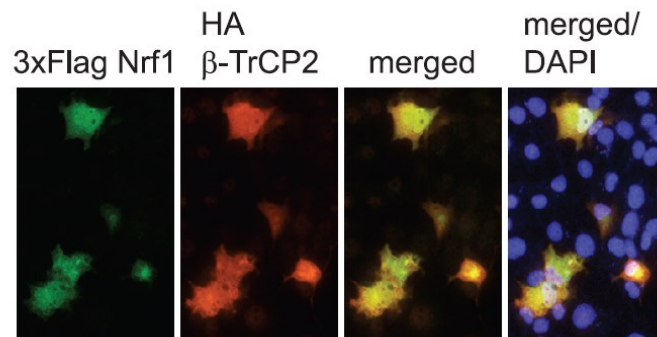
図 2-3. β-TrCP は核に局在する Nrf1 タンパク質の分解を制御している

(A) Nrf1 欠失変異体に対する各 siRNA の効果 (C: control, 1/2: β-TrCP, K: Keap1, MG132 10μM, 8 時間). 核局在型 P1 は, β-TrCP siRNA により安定化されるが, 細胞質局在型 ΔbZip は β-TrCP siRNA により安定化されない. 導入効率の指標として GFP を用いた.

(B) β -TrCP の siRNA を用いた RNA 干渉実験のノックダウン効果. 各 mRNA の発現はリアルタイム PCR により確認した. なお, 個々の実験データは GAPDH の値で補正した. 少なくとも 3 回の独立した実験から平均値および標準偏差を出している ($n=3$; *, $P<0.001$ vs control, two-tailed Student's t test.) .

(C) Nrf1 と Nrf2 に対する各 siRNA の効果 (C: control, K: Keap1, 1/2: β -TrCP). Keap1 siRNA により Nrf2 は安定化されるが, Nrf1 は Keap1 siRNA により安定化されない. 導入効率の指標として GFP を用いた.

A.



B.

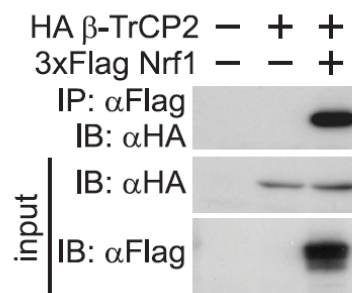
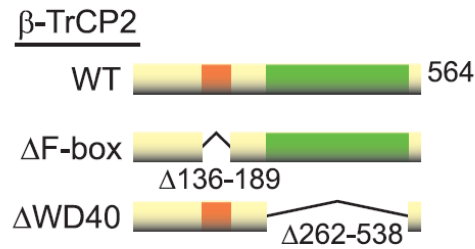


図 2-4. Nrf1 と beta-TrCP の局在と相互作用

(A) Cos7 細胞に過剰発現させた Nrf1 と beta-TrCP2 の細胞内局在を、免疫蛍光染色法で解析した. Nrf1 と beta-TrCP2 が細胞内で共局在することが確認できた.

(B) Nrf1 と beta-TrCP2 を過剰発現させた Cos7 細胞の細胞抽出液を用いて、免疫沈降実験を行った. 抗 Flag 抗体 (Nrf1) による沈降物に beta-TrCP2 が存在することを、ウエスタンブロッティングにより確認し、Nrf1 と beta-TrCP2 が結合することを示した.

A.



B.

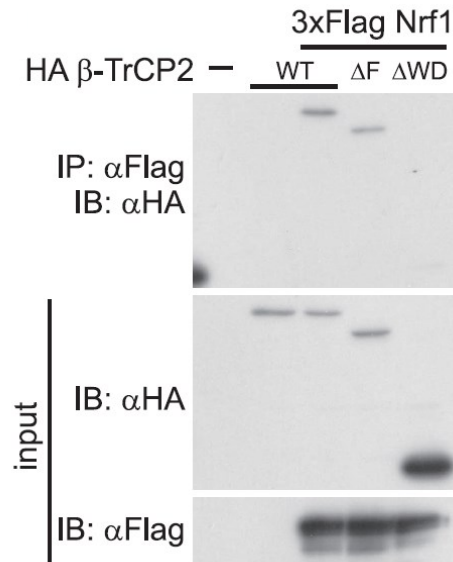
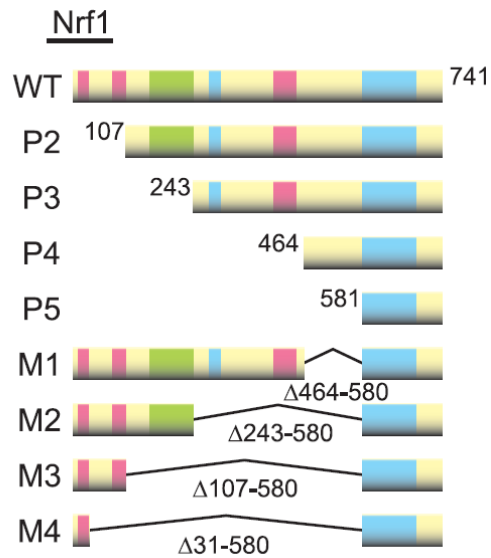


図 2-5. β -TrCP2 は WD40 ドメインを介して Nrf1 と相互作用する

(A) β -TrCP2 欠失変異体の模式図 (Δ WD40: WD40 ドメイン欠失変異体, Δ F-box: F-box ドメイン欠失変異体).

(B) β -TrCP2 欠失変異体 (図 2-5A) を用いた β -TrCP2 の Nrf1 結合ドメイン探索. 免疫沈降実験およびウエスタンブロッティングを用いて解析した. β -TrCP2 は WD40 ドメインを介して Nrf1 と結合していることが明らかになった.

A.



B.

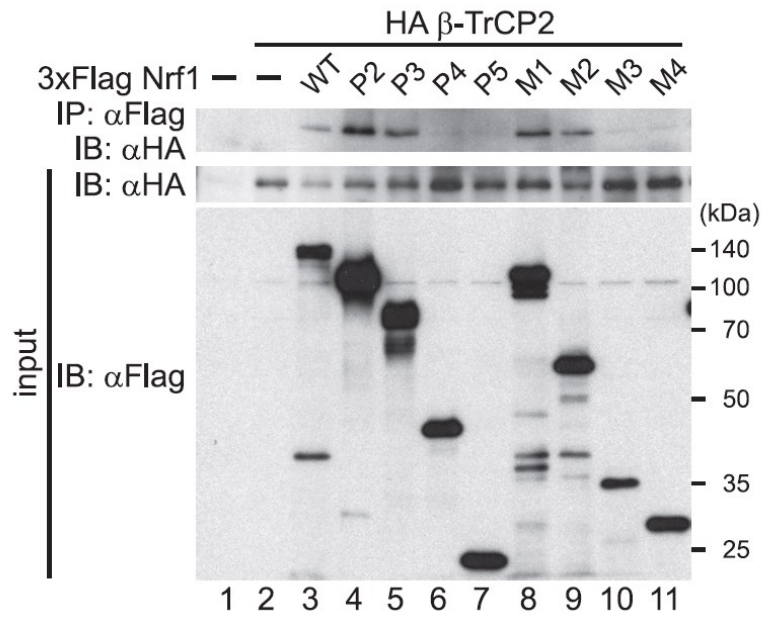


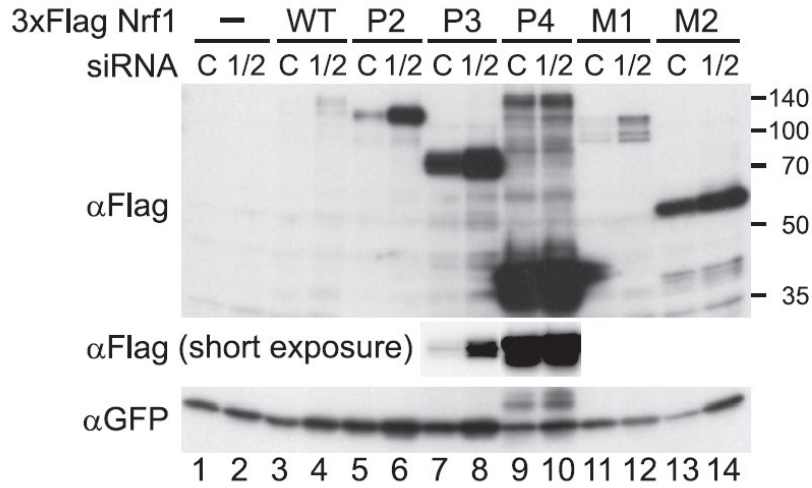
図 2-6. Nrf1 は P3 と P4 の間のドメイン (243-463 a.a.) および M3 と M2 の間のドメイン (107-242 a.a.) でβ-TrCP2 と相互作用する

(A) Nrf1 欠失変異体の模式図.

(B) Nrf1 欠失変異体 (図 2-6A) を用いた Nrf1 のβ-TrCP2 結合ドメインの探索. 免疫沈

降実験およびウエスタンブロッティングで解析した。Nrf1 は, P3 と P4 の間のドメイン (243-463 a.a.) および M3 と M2 の間のドメイン (107-242 a.a.) で β -TrCP2 と結合していることを明らかにした (レーン 5 と 6, レーン 9 と 10).

A.



B.

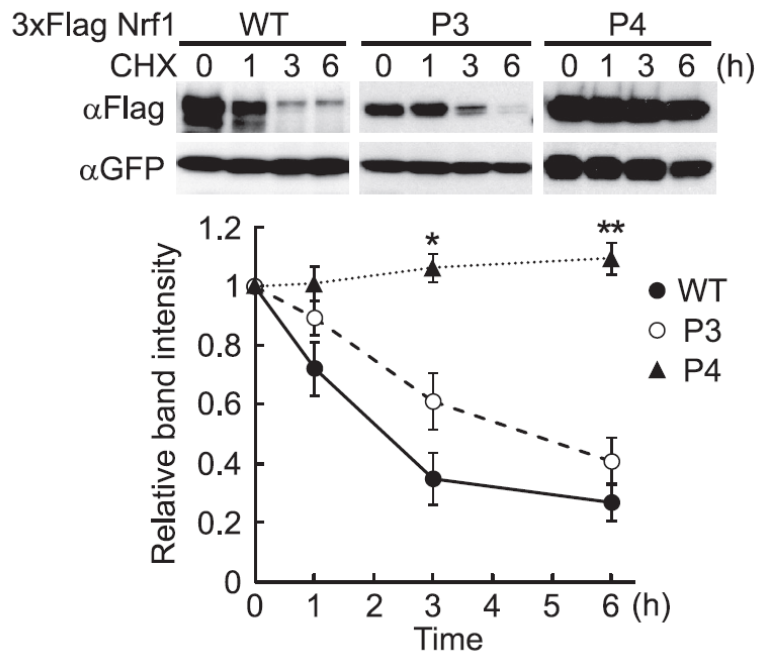


図 2-7. β -TrCP の Nrf1 分解責任ドメインの同定

(A) Nrf1 の β -TrCP と結合が検出されたドメインを含む欠失変異体に対し、 β -TrCP siRNA を用いた RNA 干渉実験を行った (C: control, 1/2: β -TrCP). P3 と P4 の間 (243-463 a.a.) に β -TrCP 依存的なタンパク質分解を受けるドメインが存在することを明らかにした (レーン 3-8, レーン 9 と 10). また, M2 に存在する β -TrCP 結合

ドメインは β -TrCP 依存的なタンパク質分解に関与しないことが明らかになった (レーン 11-14). DNA 導入効率の内部標準として GFP を用いた.

(B) β -TrCP 依存的なタンパク質分解を受けるドメインを持つ P3 と、持たない P4 に対してタンパク質合成阻害剤 CHX (Cycloheximide, 20 μ g/ml) 処理をした細胞を経時的に試料採取し、ウエスタンブロッティングによりタンパク質の発現量を解析した. DNA 導入効率の内部標準として GFP を用いた. 上記のウエスタンブロッティングのバンドを定量し、タンパク質分解の半減期を測定した. なお、個々の実験データは GFP の発現量で補正した. 少なくとも 3 回の独立した実験から平均値および標準偏差を出している ($n=3$; *, $P<0.05$; **, $P<0.001$ vs WT, two-tailed Student's t test.).

A.

| | | | | | |
|-----------|-----|-----------------------------|-----|--|--|
| Nrf1 | | | | | |
| Mouse | 442 | EEFDSD DSGLS LDSSHSP | 458 | | |
| Human | 471 | EEFDSD DSGLS LDSSHSP | 487 | | |
| Chicken | 473 | EEFDSD DSGLS LDSGHSP | 489 | | |
| Zebrafish | 494 | DELSD DSGLS LDSSHSP | 510 | | |
| Nrf2 | | | | | |
| Nrf2 | 329 | EFNDSD SGIS LNTSPSR | 345 | | |
| Nrf3 | | | | | |
| Nrf3 | 382 | LFEEP DSGLS LNSSYNS | 398 | | |
| p45/NF-E2 | | | | | |
| p45/NF-E2 | 140 | EDPES DSGLS LNTETPL | 156 | | |
| hYAP | | | | | |
| hYAP | 378 | RDEST DSGLS MSSYSVP | 394 | | |
| hEpoR | | | | | |
| hEpoR | 456 | YLVVSD SGIS TDYSSGD | 473 | | |

B.

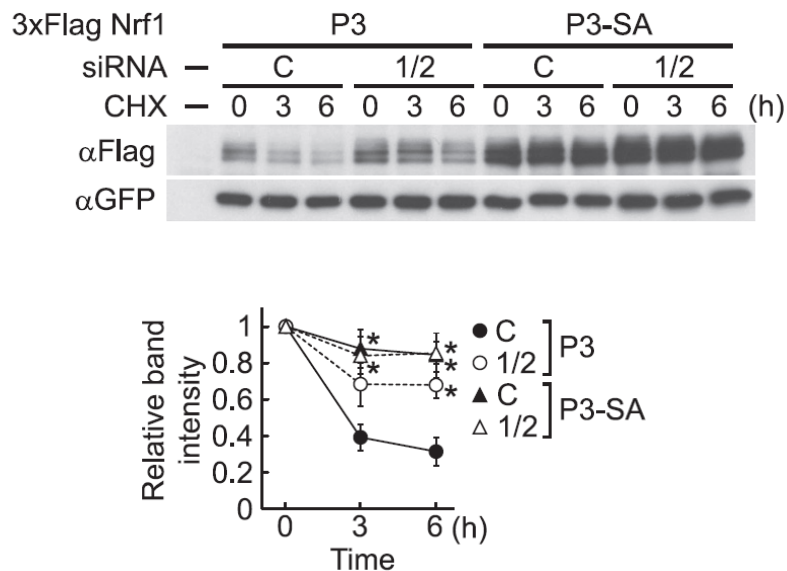


図 2-8. β -TrCP 依存的な Nrf1 のタンパク質分解は DSGLS モチーフを必要とする

(A) Nrf1 に存在する β -TrCP 分解モチーフ様の DSGLS モチーフ. このモチーフは, 動物種間あるいは CNC 転写因子群内で高度に保存されている.

(B) β -TrCP siRNA を用いた RNA 干渉実験を行った (C: control, 1/2: β -TrCP) 後に, タンパク質合成阻害剤 CHX (Cycloheximide, 20 μ g/ml) 処理をした細胞を経時的に試料採取し, SDS-PAGE およびウエスタンブロッティングによりタンパク質の発現量を解析した. DSGLS モチーフ点変異体である P3-SA は安定化を示す一方で,

DSGLS モチーフ野生型である P3 は β -TrCP siRNA を作用させた時のみ安定化を示した。DNA 導入効率の内部標準として GFP を用いた。上記のウエスタンブロッティングのバンドを定量し、タンパク質分解の半減期を測定した。なお、個々の実験データは GFP の発現量で補正した。少なくとも 3 回の独立した実験から平均値および標準偏差を出している ($n=3$; *, $P<0.05$ vs WT, two-tailed Student's t test.).

A.

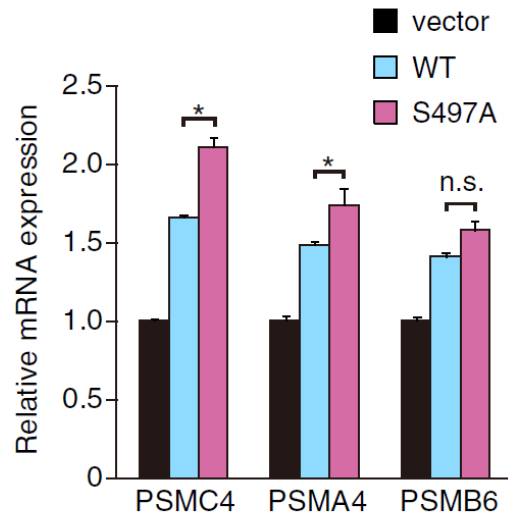


図 2-9. Nrf1 S497A は内在性のプロテアソーム遺伝子 PSMC4 および PSMA4 mRNA の発現量を増加させる

(A) HeLa 細胞に Nrf1 WT と Nrf1 S497A を過剰発現させた際の、各 Nrf1 標的遺伝子 mRNA の発現変動をリアルタイム PCR により確認した。なお、個々の実験データは 18S rRNA の値で補正した。少なくとも 5 回の独立した実験から平均値および標準偏差を出している ($n=5$; *, $P<0.005$ vs WT, two-tailed Student's t test.).

3. マクロファージにおける Nrf1 の生理機能の解析

3-1. 概要

転写因子 **Nrf1** は中枢神経特異的、肝臓特異的および骨芽細胞特異的な遺伝子欠損マウスが重篤な表現型を示すことから、生体の恒常性維持機構において重要な役割を担っていることが示唆されている。本研究は、**Nrf1** のホモログである **Nrf2** やオーソログである **SKN-1** の知見を参考に、いまだ明らかにされていない **Nrf1** の生理機能を解析することを目的とした。

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[29][53]。 **Nrf1** のホモログである **Nrf2** はマクロファージにおいて LPS 刺激に応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[26][27][28]。しかしながら、**Nrf1** のマクロファージにおける役割については明らかにされていなかった。そこで、本研究においては **Nrf1** の免疫恒常性維持への関与について検討した。また、免疫恒常性維持の解析を行うにあたり、遺伝子発現プロファイルデータベースで **Nrf1** の発現がマクロファージで高いこと (図 3-1)、ヒト単球系細胞株である 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から[25] (図 3-2)、免疫細胞であるマクロファージを用いた実験を行った。

まず、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[54]。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[55]。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が明らかになった。次に、より詳細な解析をするために各 TLRs のアゴニストで BMDM を刺激したところ、**Nrf1 mRNA** の発現が増加することを見出した。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示唆した。

さらに、マクロファージ特異的な *Nrf1* 遺伝子欠損の影響を検討するために、*Nrf1*^{flox/-}: *LysM-Cre* マウスと、コントロールとして *Nrf1*^{flox/flox} マウスを作製したが、これらは正常に出生・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、それぞれのマウス由来の BMDM は野生型マウス由来の BMDM と同程度のマクロファージマーカーの発現を示したことから、*Nrf1* の欠損はマクロファージへの分化にはあまり影響しないことが明らかとなった。そこで、*Nrf1* を完全に欠損させた際の LPS 刺激応答を検討するために、*Nrf1* 欠損 MEF (Mouse Embryonic Fibroblast (マウス胎児線維芽細胞)) を用いた。*Nrf1* 欠損 MEF と野生型 MEF を用いて炎症性サイトカインである IL-6 の発現を比較したところ、*Nrf1* 欠損 MEF においては LPS による IL-6 の増加亢進作用が阻害された。

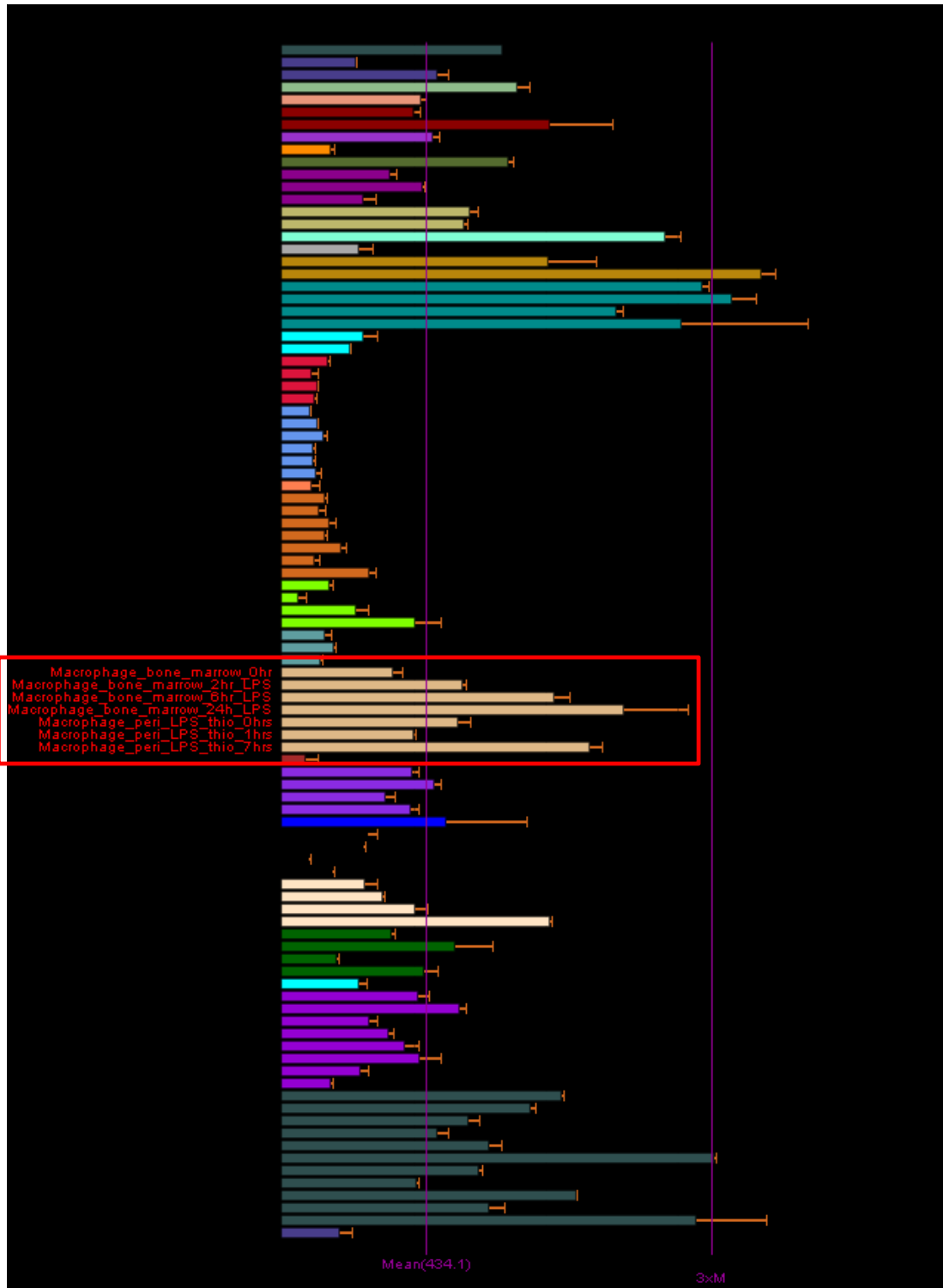


図 3-1 各組織・細胞における *Nrf1* 発現プロファイル

遺伝子発現プロファイルデータベース BioGPS (<http://biogps.org/>) より改変

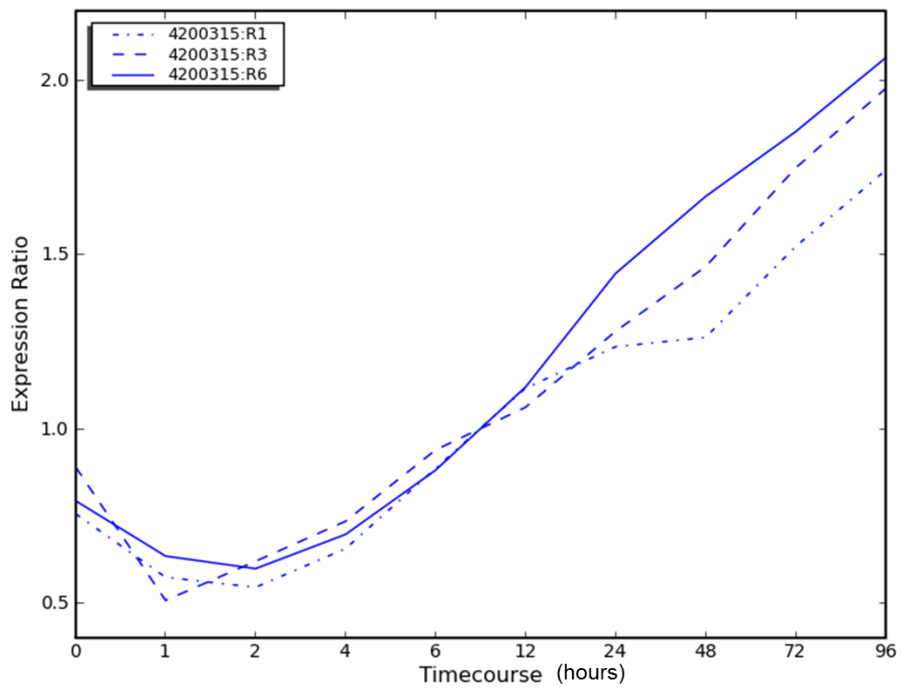


図 3-2 THP-1 細胞のマクロファージへの分化過程における Nrf1 mRNA の発現変動

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. [25]より改変

3-2. 実験方法

3-2-1 細胞培養

THP-1 細胞 (ヒト単球性白血病株) は RPMI 1640 培地 (WAKO) に 10%のウシ胎児血清 (Invitrogen), 10mM HEPES (Nacalai Tesque), 1mM Sodium Pyruvate (Nacalai Tesque), 50 μ M 2-Mercaptoethanol (Nacalai Tesque) および 40 μ g/ml の Streptomycin と 40 units/ml の Penicillin を加え, 37 $^{\circ}$ Cの 5% CO₂ 恒温培養器にて培養した. L929 細胞 (マウス線維芽細胞由来の繊維肉腫株) は D-MEM (High Glucose) 培地に 10%のウシ胎児血清および 40 μ g/ml の Streptomycin と 40 units/ml の Penicillin を加え, 37 $^{\circ}$ Cの 5% CO₂ 恒温培養器にて培養した. BMDM (Bone marrow-derived macrophages) は D-MEM (High Glucose) 培地に 10%の L929 培養上清, 10%のウシ胎児血清および 40 μ g/ml の Streptomycin と 40 units/ml の Penicillin を加え, 37 $^{\circ}$ Cの 5% CO₂ 恒温培養器にて培養した. MEF (Mouse Embryonic Fibroblast (マウス胎児線維芽細胞)) は IMDM 培地 (SIGMA) に 15%のウシ胎児血清, 2mM L-glutamine, 0.1M 2-mercaptoethanol および 40 μ g/ml の Streptomycin と 40 units/ml の Penicillin を加え, 37 $^{\circ}$ Cの 5% CO₂ 恒温培養器にて培養した.

3-2-2 マクロファージ特異的な *Nrf1* 欠失マウスの作製

マクロファージ特異的な *Nrf1* 遺伝子欠損マウスは *Nrf1*^{fl^{ox}}マウスと[5], *LysM-Cre* マウス[56] (理研バイオリソースセンター) を交雑させることで得た. *LysM-Cre* マウスは単球・マクロファージに高発現するリソソーム酵素である M リゾチームの染色体遺伝子座に *Cre* をインフレームで挿入したノックインマウスであるため, *Cre-loxP* システムを用いることで, 単球・マクロファージ特異的な遺伝子欠損が可能となる. *LysM-Cre* マウスと *Nrf1*^{fl^{ox}/-}マウスと交雑させ, *Nrf1*^{fl^{ox}/-}:*LysM-Cre* マウスとして, 実験に用いた. C57BL/6J Jms Slc と戻し交配を 8 回行った.

マウスは SPF (specific-pathogen-free) 区域で飼育し, 実験手順は同志社大学の動物実験倫理審査委員会の認可を受けている.

3-2-3 L929 培養上清の調製

L929 細胞 (理研バイオリソースセンター) はマクロファージの分化・増殖を促す M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor) を培養上清中に大量に分泌することが

知られており、骨髄細胞を Bone marrow-derived macrophages (BMDM (マウス骨髄由来マクロファージ)) に分化させる際に用いられる[57]. L929 細胞を 1×10^7 個/10ml になるように 10cm ディッシュにまき、6 日間 37°C の 5% CO₂ 恒温培養器にて培養する. 培養上清を回収し、2000rpm, 10 分間遠心した後に BMDM の分化に用いた.

3-2-4 BMDM の調製

骨髄細胞は 6 週齢の雄マウスの大腿骨および寛骨の骨端を切り落とし、27G の注射針を用いて 2% FBS を含む PBS で洗い流すようにして 6cm ディッシュに採取した. ピペティングで懸濁した後、Cell Strainer 100 μ m Nylon (BD) に通し、500x g, 10 分間遠心することで単離した. 得られたペレットを DMEM (10% FBS, 40 μ g/ml Streptomycin, 40 units/ml Penicillin) で二回洗浄し、5ml の DMEM (10% L929 培養上清, 10% FBS, 40 μ g/ml Streptomycin, 40 units/ml Penicillin) で再懸濁した後に細胞数を計測する. 骨髄細胞を 5×10^6 個になるように 10cm ディッシュにまき、7 日間 10% L929 培養上清を含む培地で培養し、浮遊細胞を除去することで BMDM を得た.

3-2-5 FACS 解析

FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) 解析では、抗マウス CD16/32 抗体 (clone 93), PE 標識ラット IgG2a 抗体 (clone RTK2758), PE 標識 F4/80 抗体 (clone BM8), FITC 標識 Rat IgG2b 抗体 (clone RTK4530), FITC 標識 CD11b 抗体 (clone M1/70) を用い、FACS Aria II (BD) で解析を行った

3-2-6 アデノウイルス感染による BMDM の刺激実験

12 穴プレート上で、24 時間培養した BMDM に組換えアデノウイルス (TaKaRa) を感染させ、24 時間後にアデノウイルスを含む培地を除去し、新鮮な培地を加えてさらに 24 時間培養する. その後、RNA を抽出してリアルタイム PCR で解析した.

3-2-7 TLRs アゴニストによる BMDM の刺激実験

12 穴プレート上で、培養した BMDM に対し各 TLRs (Toll-like receptors) のアゴニストである LPS (Lipopoly saccharide) (SIGMA), Poly (I:C) (Polyinosinic-Polycytidylic acid) (SIGMA), CpG-B (Type B CpG oligonucleotide (ODN1668)) (InvivoGen) および

Imiquimod (R837) (InvivoGen) を添加後 18 時間培養し, RNA を抽出してリアルタイム PCR で解析した.

3-2-8 RNA の精製とリアルタイム PCR

RNA は RNAeasy (QIAGEN) を用いて細胞から抽出した. 抽出した RNA から random hexamer プライマー (TaKaRa) を使って cDNA を合成した.

リアルタイム PCR は表 3-1 のプライマーと FastStart Universal SYBR (Roche) を用いて, Thermal Cycler Dice (TaKaRa) で測定した.

3-2-9 マイクロアレイ解析

RNA は RNA easy を用いて BMDM から抽出した. RNA 濃度は NanoDrop ND-1000 分光光度計 (NanoDrop Technologies) で測定し, RNA の純度はアガロースゲル電気泳動で確認した. RNA は WT Terminal Labeling Kit (Affymetrix) を用いて, ビオチン化した cRNA 断片に変換した. cRNA 断片を Mouse Gene 1.0 ST Array (Affymetrix) にハイブリダイズし, Affimetrix GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix) を用いて, 洗浄した後にスキャンした. スキャン後に作成された CEL ファイルは Gene Array Analyzer (<http://gaa.mpi-bn.mpg.de/>) を用いて解析した.

表 3-1. リアルタイム PCR プライマーの配列

| | | |
|----------|-----------|--------------------------------|
| 18S rRNA | sence | 5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTC-3' |
| | antisense | 5'-CGAACCTCCGACTTTCGTTCT-3' |
| Nrf1 | sence | 5'-TGGAACAGCAGTGGCAAGATCTCA-3' |
| | antisense | 5'-GGCACTGTACAGGATTTCACTTGC-3' |
| NQO1 | sence | 5'-AGCTGGAAGCTGCAGACCTG-3' |
| | antisense | 5'-CCTTTCAGAATGGCTGGCA-3' |
| HO-1 | sence | 5'-GTGATGGAGCGTCCACAGC-3' |
| | antisense | 5'-TTGGTGGCCTCCTTCAAGG-3' |
| p62 | sence | 5'-GCTGCCCTATACCCACATCT-3' |
| | antisense | 5'-CGCCTTCATCCGAGAAAC-3' |
| IL-6 | sence | 5'-CCACGGCCTTCCCTACTT-3' |
| | antisense | 5'-TCCACGATTTCCAGAGA-3' |

3-3. 結果

3-3-1. THP-1 細胞を PMA 刺激すると, Nrf1 mRNA の発現が増加する

ヒト単球系細胞株である THP-1 細胞は PMA 刺激によりマクロファージへ分化することが知られている[58]. その分化過程で, Nrf1 mRNA の発現が亢進するという報告をもとに[25], THP-1 細胞を PMA (30ng/ml) で 4 日間刺激し, 継時的に試料採取し, Nrf1 mRNA の発現量をリアルタイム PCR で解析した. その結果, PMA 刺激から 96 時間後で Nrf1 mRNA の発現量は約 2 倍に増加していることを明らかにした (図 3-3). このことから, Nrf1 は単球ではなくマクロファージにおいて何らかの機能を有すると仮定して, 以降の実験を行った.

3-3-2. 野生型マウス由来 BMDM におけるアデノウイルスの感染実験

Nrf1 の生理機能をマクロファージで解析するために, より *in vivo* の条件に近い BMDM を用いた. まず, 野生型マウス由来 BMDM がマクロファージであるか確認するために, マクロファージマーカーである CD11b と F4/80 に対する抗体を用いて FACS 解析を行った. その結果, BMDM として採取した細胞の約 90%がマクロファージであることが明らかになった (図 3-4A)

次に Nrf1 が免疫恒常性に関与するかを検討するために, 野生型マウス由来 BMDM に対して, アデノウイルスの感染実験を行った. アデノウイルスは感染症の原因となる病原体であり, 免疫細胞を介して免疫応答を活性化することが知られている[59]. その結果, Nrf1 mRNA はアデノウイルス感染によって, 発現が増加することが明らかにした (図 3-4B).

3-3-3. マクロファージ特異的な Nrf1 遺伝子欠損マウスの作製

野生型マウス由来 BMDM で Nrf1 と免疫恒常性の関与が示唆されたため, さらに詳細に解析を進めるためにマクロファージ特異的な Nrf1 遺伝子欠損マウスを作製した. その模式図は図 3-5 に示す. *Nrf1*^{flox/flox} と *Nrf1*^{flox/-}: *LysM-Cre* マウスを作製したが, これらは正常に出生・生育し繁殖能力もあり, 顕著な病態は観察されなかった.

3-3-4. 免疫活性化剤により, Nrf1 mRNA の発現は亢進する

Nrf1^{flox/flox} と *Nrf1*^{flox/-}: *LysM-Cre* マウス由来 BMDM がマクロファージであるか確

認するために、マクロファージマーカーである CD11b と F4/80 に対する抗体を用いて FACS 解析を行った。その結果、どちらも BMDM として採取した細胞の約 90% がマクロファージであることが明らかになった (図 3-6A)。

Nrf1^{flox/-}: *LysM-Cre* マウス由来 BMDM の *Nrf1* 欠失効率を確認するために、*Nrf1* mRNA の発現をリアルタイム PCR で解析した。*Nrf1*^{flox/-}: *LysM-Cre* マウス由来 BMDM と *Nrf1*^{flox/flox} マウス由来 BMDM の *Nrf1* mRNA の発現を比較した結果、*Nrf1*^{flox/-}: *LysM-Cre* マウス由来 BMDM で約 80% 減少していることを見出した (図 3-6B)。

次に、*Nrf1*^{flox/flox} と *Nrf1*^{flox/-}: *LysM-Cre* マウス由来 BMDM に対し、免疫活性化剤である Poly (I:C), LPS, Imiquimod および CpG-B を添加し、*Nrf1* mRNA の発現の変動をリアルタイム PCR で解析した。これらの免疫活性化剤はそれぞれ、TLR3, TLR4, TLR7 および TLR9 を刺激することが知られており、研究に用いられている[60]。BMDM を免疫活性化剤で刺激した結果、*Nrf1* mRNA の発現が増加することが明らかになった(図 3-6C)。

図 3-6A の結果はどちらのマウス由来 BMDM も同程度の割合でマクロファージへ分化することを示しており、*Nrf1* は BMDM の分化に関与しないことが明らかとなった。また、マクロファージ分化後の BMDM に対し免疫活性化剤を用いて刺激を行った際、*Nrf1* mRNA の発現が増加していることから *Nrf1* は単球からマクロファージへの分化過程ではなく、分化後のマクロファージで何らかの機能を有している可能性が示唆された。

3-3-5. マイクロアレイ解析の結果

二回分のマイクロアレイ解析で得られた四つの CEL ファイルを Gene Array Analyzer を用いて解析した。解析条件は *Nrf1*^{flox/-}: *LysM-Cre* マウス由来 BMDM の値を *Nrf1*^{flox/flox} マウス由来 BMDM の値で割った際に、P-Value < 0.05, Fold change < -1, Fold change > 1 となる遺伝子を抽出することにした。解析の結果、上記条件で発現の変動がみられる遺伝子はなかった (図 3-7)。

3-3-6. MEF に対する LPS 刺激

マクロファージ特異的な *Nrf1* 欠損 BMDM では約 20%, *Nrf1* mRNA の発現が確認できた。これは Cre-loxP システムでは完全な遺伝子欠損が難しいことを示している。そ

ここで、MEF を用いた炎症性サイトカインの発現解析の先行論文を参考に[61], 野生型 MEF と Nrf1 欠損 MEF を用いて実験を行った。その結果, Nrf1 欠損 MEF では完全な Nrf1 の欠損が確認できた (図 3-8, Nrf1) 野生型 MEF と Nrf1 欠損 MEF を用いて遺伝子発現量を比較すると, Nrf1 欠損 MEF では抗酸化遺伝子である NQO1 と HO-1 の mRNA の発現が増加することと, 炎症性サイトカインである IL-6 mRNA がやや増加することが明らかとなった。これらの MEF に対して, LPS を添加すると, 抗酸化遺伝子の発現はさらに増加を示した。また, 野生型 MEF では LPS 刺激により IL-6 mRNA の増加がみられる一方で, Nrf1 欠損 MEF では LPS による IL-6 の増加作用が認められないことが明らかになった (図 3-8)。

3-4. 考察

本研究では **Nrf1 mRNA** 発現が免疫応答に伴い増加することが明らかになった。 **Nrf1** をノックダウンした単球からマクロファージへの分化が見られたことから、 **Nrf1** はマクロファージの分化には関与せず、むしろ分化後のマクロファージの機能制御に関与する可能性が示唆された。 また、 **Nrf1** 欠損 MEF を使った実験から、 **Nrf1** は液性免疫を制御するサイトカインの一つである **IL-6** の発現制御に関与している可能性を示唆した。 以上のことから、本研究では **Nrf1** が免疫応答の一端を担っていることが明らかになった。

先行研究で、 **Nrf1 mRNA** の発現が単球からマクロファージへの分化過程で増加していることが報告されている[25] (図 3-2)。 この結果を受けて、 **Nrf1** は単球からマクロファージへの分化に関与すると仮説をたてたが、本研究 (図 3-6A) に示されるように、マクロファージ特異的な **Nrf1** ノックダウンマウスにおいてマクロファージの分化能に影響が見られなかった。 よって、THP-1 細胞で見られた **Nrf1 mRNA** の発現の亢進から **PMA** が **Nrf1** の遺伝子発現調節経路を活性化している可能性が考えられる。 THP-1 細胞をマクロファージ様細胞へ分化させる際に用いた **PMA** は、 **PKC (Protein kinase C)** の活性化剤であるとも知られている[62]。 **PKC** はセリン/スレオニン リン酸化酵素であり、細胞増殖、細胞分化、神経伝達物質や成長因子など無数のシグナル伝達に関与することが知られている[63]。

アデノウイルスは二本鎖 DNA ウイルスであり、ゲノム DNA 中に **TLR9** のアゴニストとなる非メチル化 **CpG** 配列を持つことが知られている [64]。 アデノウイルスの感染実験の結果、 **Nrf1 mRNA** の発現増加が確認できたが (図 3-4B)、この結果は **TLR9** を介した免疫応答に **Nrf1** の遺伝子発現調節経路の活性化因子が含まれている可能性が考えられる。 この結果を支持するように、 **TLR9** の活性化剤である **CpG-B** を添加する実験でも **Nrf1 mRNA** の発現の増加が確認できる (図 3-6C)。

免疫活性化剤による **Nrf1 mRNA** の発現増加により (図 3-4B, 3-6C)、 **Nrf1** の活性化には外部からの刺激が必要であることが示された。 しかし、本研究で見られた **Nrf1 mRNA** 発現量の増加は約 2 倍程度であった。 前章では **Nrf1** が外部からのストレスにตอบสนองして、通常留められている小胞体から核内へ移行するメカニズムを巧みに利用して、生体内恒常性維持因子の遺伝子発現を制御していることが明らかにされている。 このことから、 **Nrf1** の発現量の増減は恒常的なストレス応答に関与し、核への移行および

β -TrCP などによる分解制御は比較的速いストレス応答に關与している可能性が考えられる。

本研究では, *Nrf1*^{flox/flox} と *Nrf1*^{flox/-}:*LysM-Cre* マウス由来 BMDM を用いたマイクロアレイ解析を行い, 遺伝子発現変動の網羅的な解析を行ったが, 顕著に変動する遺伝子は見つからなかった. この原因として二つ理由が考えられる. 一つは, *Nrf1* は外部からの刺激に応じて遺伝子発現を変動させるストレス応答型転写因子であることから, 刺激の無い条件であったため *Nrf1* は活性化されておらず, 標的遺伝子の発現に差が認められなかった可能性が考えられる. 二つ目は, BMDM の *Nrf1* 欠失効率は 80%であり, 完全な欠損とは言えないことが挙げられる. 残存した 20%の *Nrf1* が正常に機能するため, 顕著な差が確認できなかった可能性も考えられる. そこで, *Nrf1* を完全に欠損した *Nrf1* ノックアウトマウスから作製した MEF を用いることでこの可能性を排除できると考え, 次に野生型 MEF と *Nrf1* 欠損 MEF を用いた実験を行った.

Nrf1 欠損 MEF では LPS 刺激した際, 炎症性サイトカインである IL-6 の発現が減少していた. この結果から, IL-6 の発現制御に *Nrf1* が關与していることが考えられる. 先行研究で, クロマチン免疫沈降シークエンスの結果, *Nrf2* が IL-6 の制御領域に結合していることが報告されている[65]. また, IL-6 の制御領域には *Nrf1* の結合配列である ARE の存在が報告されている[66]. これらの知見から直接 *Nrf1* が IL-6 の ARE に結合し, 発現を制御している可能性も考えられる. また, LPS 無刺激の状態では IL-6 の発現には変動が認められなかったことから, 免疫応答時における IL-6 遺伝子を発現調節する可能性が示唆される. 生体から単離・分化させた BMDM において *Nrf1* 欠損による影響が認められなかったことから, 何らかの刺激を加えた上でマイクロアレイなどの網羅的解析を行うことで *Nrf1*^{flox/flox} と *Nrf1*^{flox/-}:*LysM-Cre* マウス由来 BMDM で有意な遺伝子発現変動の差がみられる可能性が推察される. この点に関しては, 今後検討が必要である.

一方, *Nrf2* は LPS 刺激に応答して BMDM 細胞における p62 (オートファジーマーカータンパク質) の発現を亢進することが知られている[67]. しかしながら, MEF 細胞においては LPS 刺激による p62 の増加が認められたにもかかわらず, *Nrf1* 欠損による影響は見られなかった. これはおそらく本実験に使用した細胞と過去の報告にて使用した細胞の機能性の違い, もしくは *Nrf2* の作用が保たれるため p62 の発現は変化しない可能性が考えられる. 実際, *Nrf2* の標的遺伝子である HO-1 と NQO1 mRNA の発現が

亢進していることから, **Nrf2** は活性化していると考えられる (図 3-8). **Nrf1** による **p62** 遺伝子発現調節に関しては今後さらなる検討が必要である.

3-5. 結論

本研究から, **Nrf1** はマクロファージの分化には関与しない可能性を見出した. さらに, **Nrf1 mRNA** は成熟マクロファージにおける免疫応答に伴い, 発現が増加することが明らかになった.

さらに **Nrf1** 欠損 **MEF** を使った実験から, **Nrf1** は炎症性サイトカインである **IL-6** の発現制御に関与している可能性を示唆した.

3-6. 図表

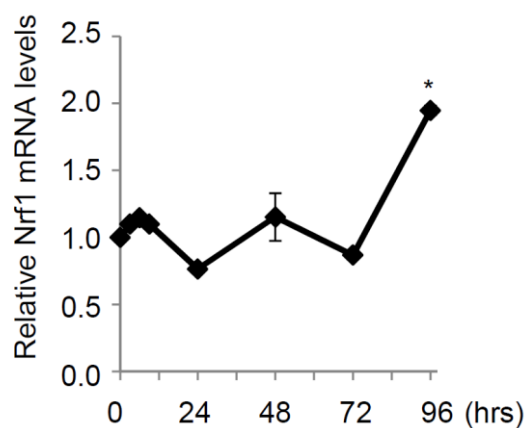
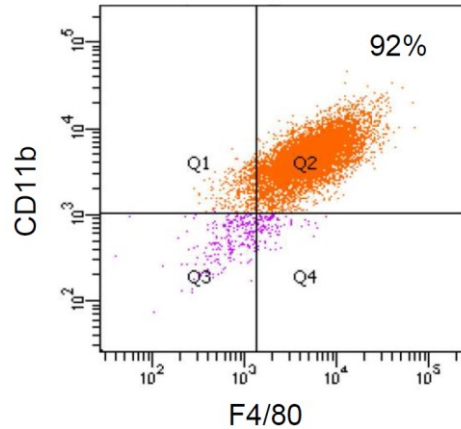


図 3-3. THP-1 細胞を PMA 刺激すると, Nrf1 mRNA の発現が増加する

ヒト単球性白血病株である THP-1 細胞の PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate, 30ng/ml) 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. なお, 個々の実験データは 18S rRNA の値で補正した. 少なくとも 3 回の独立した実験から平均値および標準偏差を出している ($n=3$; *, $P<0.001$ vs 0h, two-tailed Student's t test).

A.



B.

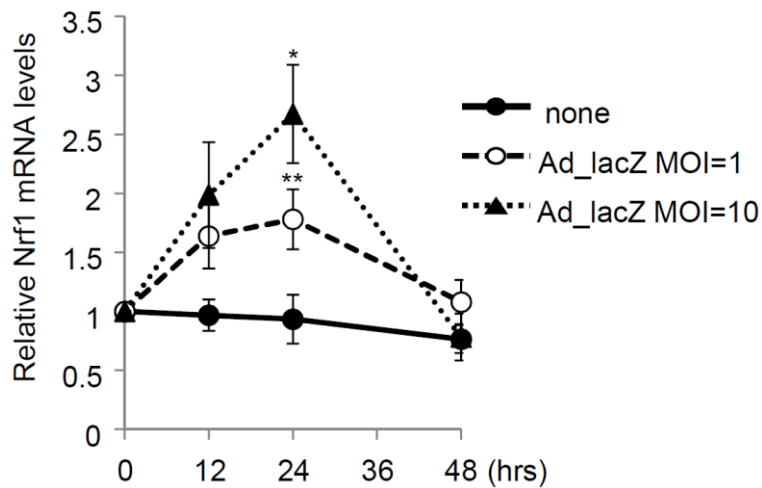


図 3-4. 野生型マウス由来 BMDM におけるアデノウイルスの感染実験

(A) マクロファージマーカーである CD11b と F4/80 を指標に、FACS 解析で野生型マウス由来 BMDM がマクロファージであることを確認した。

(B) 野生型マウス由来 BMDM に対して、アデノウイルスを感染させた際の Nrf1 mRNA の発現変動を継時的にサンプル回収し、リアルタイム PCR により確認した。なお、個々の実験データは 18S rRNA の値で補正した。少なくとも 3 回の独立した実験か

ら平均値および標準偏差を出している ($n=3$; *, $P<0.01$; **, $P<0.005$ vs none, two-tailed Student's t test). (MOI: multiplicity of infection)

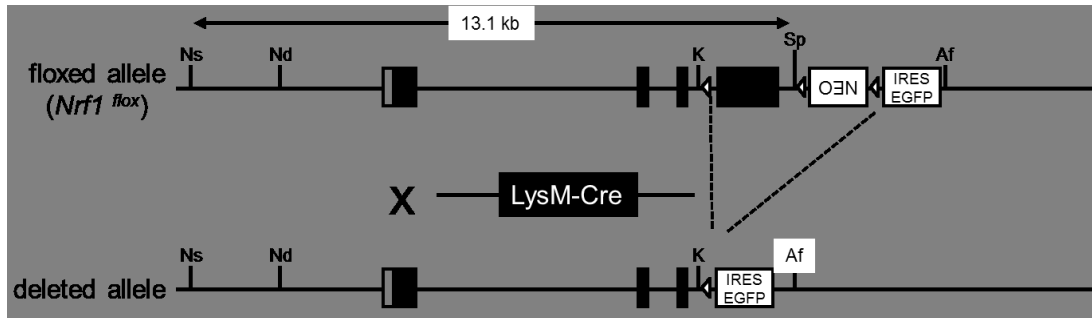
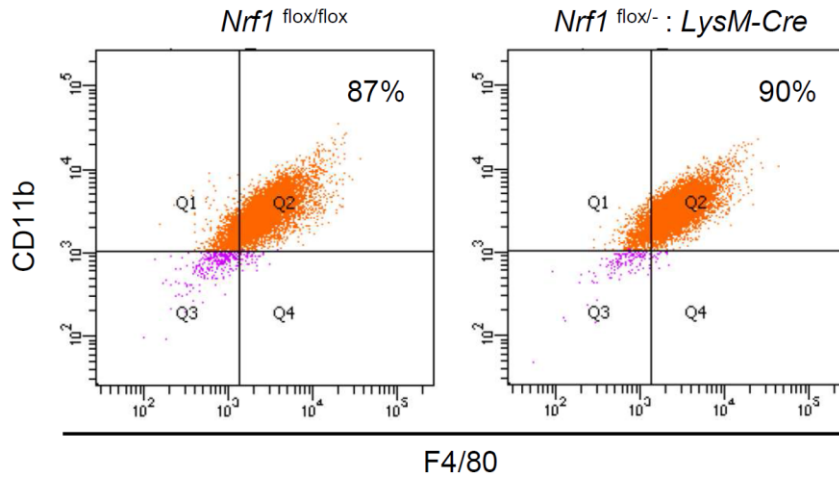


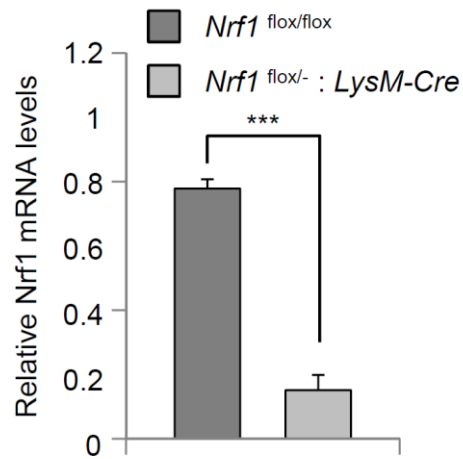
図 3-5. マクロファージ特異的な *Nrf1* 遺伝子欠損マウスの作製

Nrf1^{flox/-}マウスと[5], *LysM-Cre* マウスを交配させることで[56], マクロファージ特異的な *Nrf1* 遺伝子欠損マウスを得た. (◁: loxP 配列, Ns: Nst1, Nd: Nde1, K: Kpn1, Sp: Spe1, Af: AflIII)

A.



B.



C.

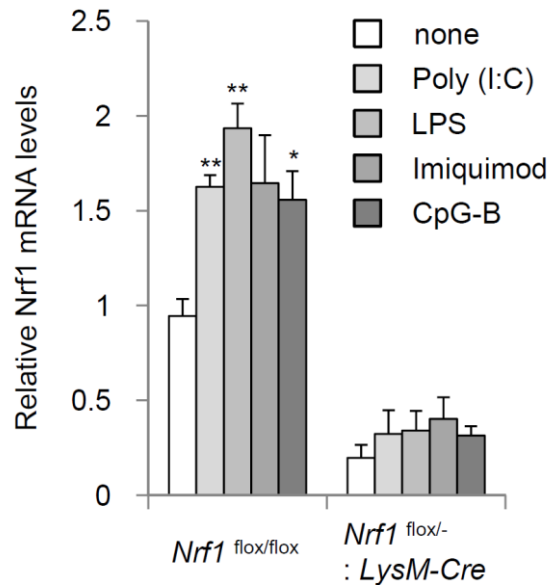


図 3-6. 免疫活性化剤により, *Nrf1* mRNA の発現は亢進する

(A) マクロファージマーカーである CD11b と F4/80 を指標に, FACS 解析で *Nrf1*^{flox/flox} マウスと *Nrf1*^{flox/-} : *LysM-Cre* マウス由来 BMDM がマクロファージであることを確認した.

(B) *Nrf1*^{flox/flox} マウスと *Nrf1*^{flox/-} : *LysM-Cre* マウス由来 BMDM を用いて, *Nrf1* の欠失効率をリアルタイム PCR で解析した. なお, 個々の実験データは 18S rRNA の値で補正した. 少なくとも 3 回の独立した実験から平均値および標準偏差を出している ($n=3$; *, $P<0.0005$ vs *Nrf1*^{flox/flox}, two-tailed Student's *t* test).

(C) *Nrf1*^{flox/flox} マウスと *Nrf1*^{flox/-} : *LysM-Cre* マウス由来 BMDM に対し, Poly (I:C) (10 μ g/ml), LPS (100ng/ml), Imiquimod (10 μ g/ml) および CpG-B (1 μ M) を添加し, 各 BMDM における *Nrf1* mRNA の発現をリアルタイム PCR で解析した. なお, 個々の実験データは 18S rRNA の値で補正した. 少なくとも 3 回の独立した実験から平均値および標準偏差を出している ($n=3$; *, $P<0.05$; **, $P<0.0005$ vs none, two-tailed Student's *t* test).

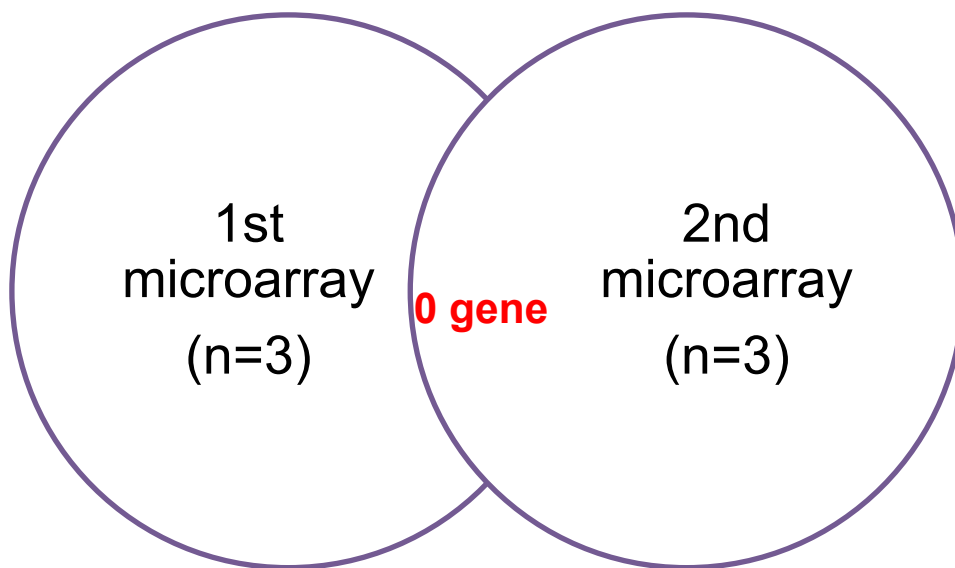


図 3-7. マイクロアレイ解析の結果

マイクロアレイ解析は *Nrf1*^{fl^{ox}/fl^{ox}} と *Nrf1*^{fl^{ox}/-}: *LysM-Cre* マウス由来 BMDM を各 3 個体分ずつ用意し, RNA の濃度および純度の条件を満たしたサンプルを混合して一回分とした (n=3). マイクロアレイ解析は二回行った (n=6).

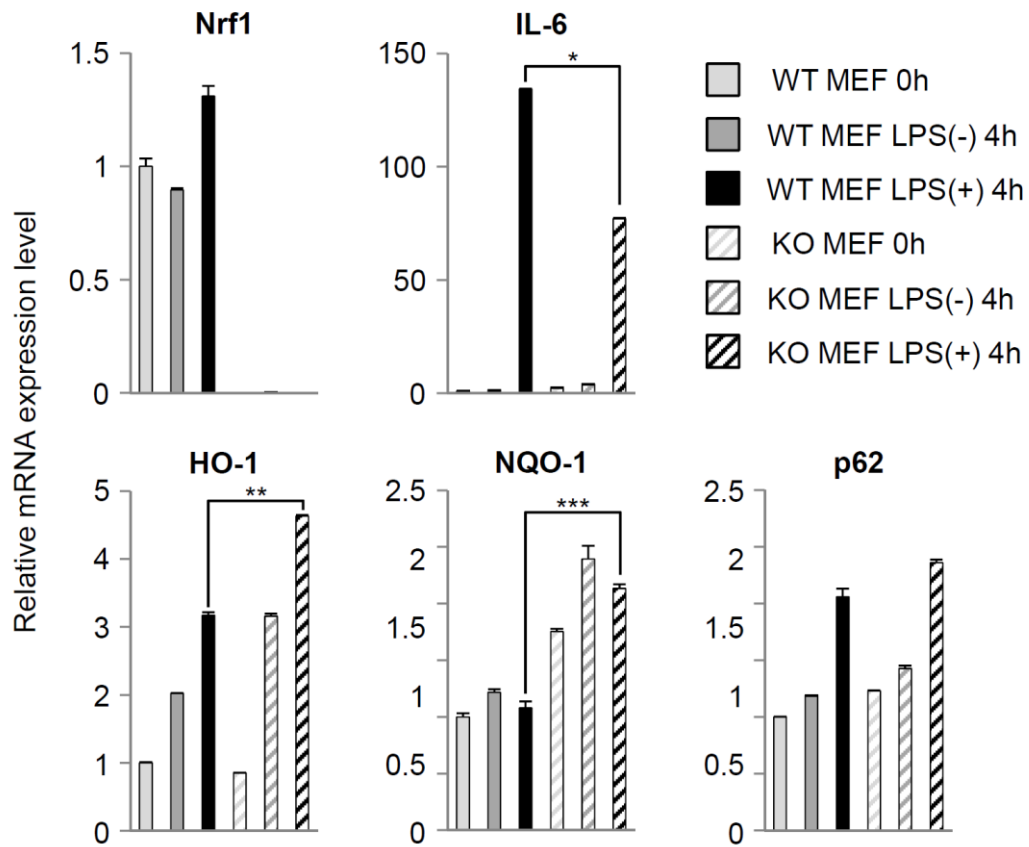


図 3-8. MEF に対する LPS 刺激

野生型 MEF と Nrf1 欠損 MEF を LPS (100ng/ml) で処理した後、各サンプルにおける Nrf1 mRNA の発現をリアルタイム PCR で解析した。なお、個々の実験データは 18S rRNA の値で補正した。少なくとも 3 回の独立した実験から平均値および標準偏差を出している ($n=3$; *, $P<0.005$; **, $P<0.0005$; ***, $P<0.0001$ vs WT, two-tailed Student's t test).

4. 結語

本研究から、転写因子 **Nrf1** は細胞質と核で二つの異なるタンパク質分解機構による機能制御を受けていることを明らかにした。さらに、核における機能制御は **Nrf1** の **DSGLS** モチーフを介して結合している **β -TrCP** が担っていることを明らかにした。また、**CK2** による **Nrf1** のリン酸化は、**Nrf1** 標的遺伝子の発現を抑制することを明らかにした。

Nrf1 mRNA 発現は免疫応答に伴い増加することが明らかになった。**Nrf1** をノックダウンした単球からマクロファージへの分化が見られたことから、**Nrf1** はマクロファージの分化には関与せず、むしろ分化後のマクロファージの機能制御に関与する可能性が示唆された。また、**Nrf1** 欠損 MEF を使った実験から、**Nrf1** は液性免疫を制御するサイトカインの一つである **IL-6** の発現制御に関与している可能性を示唆した。

以上のことから、**Nrf1** は核と細胞質におけるタンパク質分解・**CK2** によるリン酸化の機能制御を受けていること、**Nrf1** の活性化には何らかの刺激が必須であることが示された。また、マクロファージでは免疫活性化剤を刺激として、上記の機能制御機構を介して、**IL-6** の発現制御へ関与することを示唆した。

5. 引用文献

- [1] Dimant H, Ebrahimi-Fakhari D, McLean PJ. (2012) Molecular chaperones and co-chaperones in Parkinson disease. *Neuroscientist*. **18**:589-601.
- [2] Takeuchi O, Akira S. (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. **140**:805-820.
- [3] Chan JY, Kwong M, Lu R, Chang J, Wang B, Yen TS, Kan YW. (1998) Targeted disruption of the ubiquitous CNC-bZIP transcription factor, Nrf-1, results in anemia and embryonic lethality in mice. *EMBO J*. **17**:1779-1787.
- [4] Kim J, Xing W, Wergedal J, Chan JY, Mohan S. (2010) Targeted disruption of nuclear factor erythroid-derived 2-like 1 in osteoblasts reduces bone size and bone formation in mice. *Physiol Genomics*. **40**:100-110.
- [5] Ohtsuji M, Katsuoka F, Kobayashi A, Aburatani H, Hayes JD, Yamamoto M. (2008) Nrf1 and Nrf2 play distinct roles in activation of antioxidant response element-dependent genes. *J Biol Chem*. **283**:33554-33562.
- [6] Hirotsu Y, Hataya N, Katsuoka F, Yamamoto M. (2012) NF-E2-related factor 1 (Nrf1) serves as a novel regulator of hepatic lipid metabolism through regulation of the Lipin1 and PGC-1 β genes. *Mol Cell Biol*. **32**:2760-2770.
- [7] Kobayashi A, Tsukide T, Miyasaka T, Morita T, Mizoroki T, Saito Y, Ihara Y, Takashima A, Noguchi N, Fukamizu A, Hirotsu Y, Ohtsuji M, Katsuoka F, Yamamoto M. (2011) Central nervous system-specific deletion of transcription factor Nrf1 causes progressive motor neuronal dysfunction. *Genes Cells*. **16**:692-703.
- [8] Han W, Ming M, Zhao R, Pi J, Wu C, He YY. (2012) Nrf1 CNC-bZIP protein promotes cell survival and nucleotide excision repair through maintaining glutathione homeostasis. *J Biol Chem*. **287**:18788-18795.
- [9] Oh DH, Rigas D, Cho A, Chan JY. (2012) Deficiency in the nuclear-related factor erythroid 2 transcription factor (Nrf1) leads to genetic instability. *FEBS J*. **279**:4121-4130.
- [10] Radhakrishnan SK, Lee CS, Young P, Beskow A, Chan JY, Deshaies RJ. (2010) Transcription factor Nrf1 mediates the proteasome recovery pathway after

- proteasome inhibition in mammalian cells. *Mol Cell*. **38**:17-28.
- [11] Steffen J, Seeger M, Koch A, Krüger E. (2010) Proteasomal degradation is transcriptionally controlled by TCF11 via an ERAD-dependent feedback loop. *Mol Cell*. **40**:147-158.
- [12] Sykiotis GP, Bohmann D. (2010) Stress-Activated Cap'n'collar Transcription Factors in Aging and Human Disease. *Sci Signal*. **3**(112):re3.
- [13] Bowerman B, Eaton BA, Priess JR. (1992) *skn-1*, a maternally expressed gene required to specify the fate of ventral blastomeres in the early *C. elegans* embryo. *Cell*. **68**:1061-1075.
- [14] Mohler J, Vani K, Leung S, Epstein A. (1991) Segmentally restricted, cephalic expression of a leucine zipper gene during *Drosophila* embryogenesis. *Mech Dev*. **34**:3-9.
- [15] Andrews NC, Erdjument-Bromage H, Davidson MB, Tempst P, Orkin SH. (1993) Erythroid transcription factor NF-E2 is a haematopoietic-specific basic-leucine zipper protein. *Nature*. **362**:722-728.
- [16] Chan JY, Han XL, Kan YW. (1993) Cloning of Nrf1, an NF-E2-related transcription factor, by genetic selection in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**:11371-11375.
- [17] Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. (1994) Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91**:9926-9930.
- [18] Kobayashi A, Ito E, Toki T, Kogame K, Takahashi S, Igarashi K, Hayashi N, Yamamoto M. (1999) Molecular Cloning and Functional Characterization of a New Cap'n' Collar Family Transcription Factor Nrf3. *J. Biol. Chem*. **274**:6443-6452.
- [19] Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**:7987-7992.
- [20] Johnsen O, Murphy P, Prydz H, Kolsto AB. (1998) Interaction of the CNC-bZIP factor TCF11/LCR-F1/Nrf1 with MafG: binding-site selection and regulation of transcription. *Nucleic Acids Res*. **26**:512-520.

- [21] Johnsen O, Skammelsrud N, Luna L, Nishizawa M, Prydz H, Kolsto AB. (1996) Small Maf proteins interact with the human transcription factor TCF11/Nrf1/LCR-F1. *Nucleic Acids Res.* **24**:4289-4297.
- [22] Itoh K, Igarashi K, Hayashi N, Nishizawa M, Yamamoto M. (1995) Cloning and Characterization of a Novel Erythroid Cell-Derived CNC Family Transcription Factor Heterodimerizing with the Small Maf Family Proteins. *Mol Cell. Biol.* **15**:4184-4193.
- [23] Zhang Y, Lucocq JM, Yamamoto M, Hayes JD. (2007) The NHB1 (N-terminal homology box 1) sequence in transcription factor Nrf1 is required to anchor it to the endoplasmic reticulum and also to enable its asparagine-glycosylation. *Biochem J.* **408**:161-172.
- [24] Steffen J, Seeger M, Koch A, Krüger E. (2010) Proteasomal degradation is transcriptionally controlled by TCF11 via an ERAD-dependent feedback loop. *Mol Cell.* **40**:147-158.
- [25] FANTOM Consortium et al. (2009) The transcriptional network that controls growth arrest and differentiation in a human myeloid leukemia cell line. *Nat Genet.* **41**:553-562.
- [26] Rushworth SA, Chen XL, Mackman N, Ogborne RM, O'Connell MA. (2005) Lipopolysaccharide-induced heme oxygenase-1 expression in human monocytic cells is mediated via Nrf2 and protein kinase C. *J Immunol.* **175**:4408-4415.
- [27] Thimmulappa RK, Lee H, Rangasamy T, Reddy SP, Yamamoto M, Kensler TW, Biswal S. (2006) Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. *J Clin Invest.* **116**:984-995.
- [28] Fujita K, Srinivasula SM. (2011) TLR4-mediated autophagy in macrophages is a p62-dependent type of selective autophagy of aggresome-like induced structures (ALIS). *Autophagy.* **7**:552-554.
- [29] Hoeven Rv, McCallum KC, Cruz MR, Garsin DA. (2011) Ce-Duox1/BLI-3 generated reactive oxygen species trigger protective SKN-1 activity via p38 MAPK signaling during infection in *C. elegans*. *PLoS Pathog.* **7**:e1002453.
- [30] 夏目 徹. (2006) 蛋白質 核酸 酵素 ユビキチン-プロテアソーム系と大規模蛋白質ネットワーク解析 **Vol.51 No.10**:1183-1188

- [31] Hart M, Concordet JP, Lassot I, Albert I, del los Santos R, Durand H, Perret C, Rubinfeld B, Margottin F, Benarous R, Polakis P. (1999) The F-box protein β -TrCP associates with phosphorylated β -catenin and regulates its activity in the cell. *Curr Biol.* **9**:207-210.
- [32] Suzuki H, Chiba T, Kobayashi M, Takeuchi M, Suzuki T, Ichiyama A, Ikenoue T, Omata M, Furuichi K, Tanaka K. (1999) $I\kappa B\alpha$ Ubiquitination Is Catalyzed by an SCF-like Complex Containing Skp1, Cullin-1, and Two F-Box/WD40-Repeat Proteins, β TrCP1 and β TrCP2. *Biochem Biophys Res Commun.* **256**:127-132.
- [33] Niefind K, Guerra B, Ermakowa I, Issinger OG. (2001) Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *EMBO J.*; **20**:5320-5331.
- [34] Litchfield DW. (2003) Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J.* **369**:1-15.
- [35] Latres E, Chiaur DS, Pagano M. (1999) The human F box protein beta-Trcp associates with the Cul1/Skp1 complex and regulates the stability of beta-catenin. *Oncogene.* **18**:849-854.
- [36] Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, Igarashi K, Yamamoto M. (2004) Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol.* **24**:7130-7139.
- [37] Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* **13**:76-86.
- [38] Meyer L, Deau B, Forejtníková H, Duménil D, Margottin-Goguet F, Lacombe C, Mayeux P, Verdier F. (2007) beta-Trcp mediates ubiquitination and degradation of the erythropoietin receptor and controls cell proliferation. *Blood.* **109**:5215-5222.
- [39] Zhao B, Li L, Tumaneng K, Wang CY, Guan KL. (2010) A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes Dev.* **24**:72-85.
- [40] Tamaru T, Hirayama J, Isojima Y, Nagai K, Norioka S, Takamatsu K,

- Sassone-Corsi P. (2009) CK2alpha phosphorylates BMAL1 to regulate the mammalian clock. *Nat Struct Mol Biol.* **16**:446-448.
- [41] Morita T, Tsuchiya Y, Kim M, Iemura S, Natsume T, Yamamoto M, Kobayashi A. (2011) Dual regulation of the transcriptional activity of Nrf1 by β -TrCP- and Hrd1-dependent degradation mechanisms. *Mol Cell Biol.* **31**:4500-4512.
- [42] Apopa PL, He X, Ma Q. (2008) Phosphorylation of Nrf2 in the transcription activation domain by casein kinase 2 (CK2) is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of Nrf2 in IMR-32 neuroblastoma cells. *J Biochem Mol Toxicol.* **22**:63-76.
- [43] Harwood AJ. (2001) Regulation of GSK-3: a cellular multiprocessor. *Cell.* **105**:821-824.
- [44] Tsuchiya Y, Taniguchi H, Ito Y, Morita T, Karim MR, Ohtake N, Fukagai K, Ito T, Okamuro S, Iemura S, Natsume T, Nishida E, Kobayashi A. (2013) The casein kinase 2-nrf1 axis controls the clearance of ubiquitinated proteins by regulating proteasome gene expression. *Mol Cell Biol.* **33**:3461-3472.
- [45] Rada P, Rojo AI, Evrard-Todeschi N, Innamorato NG, Cotte A, Jaworski T, Tobón-Velasco JC, Devijver H, García-Mayoral MF, Van Leuven F, Hayes JD, Bertho G, Cuadrado A. (2012) Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by the glycogen synthase kinase 3/ β -TrCP axis. *Mol Cell Biol.* **32**:3486-3499.
- [46] Caterina JJ, Donze D, Sun CW, Ciavatta DJ, Townes TM. (1994) Cloning and functional characterization of LCR-F1: a bZIP transcription factor that activates erythroid-specific, human globin gene expression. *Nucleic Acids Res.* **22**:2383-2391.
- [47] Kimbrel EA, Kung AL. (2009) The F-box protein beta-TrCp1/Fbw1a interacts with p300 to enhance beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem.* **284**:13033-13044.
- [48] Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y. (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell.* **87**:953-959.

- [49] Katoh Y, Itoh K, Yoshida E, Miyagishi M, Fukamizu A, Yamamoto M. (2001) Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes Cells*. **6**:857-868.
- [50] Zhang J, Hosoya T, Maruyama A, Nishikawa K, Maher JM, Ohta T, Motohashi H, Fukamizu A, Shibahara S, Itoh K, Yamamoto M. (2007) Nrf2 Neh5 domain is differentially utilized in the transactivation of cytoprotective genes. *Biochem J*. **404**:459-466.
- [51] Sun Z, Chin YE, Zhang DD. (2009) Acetylation of Nrf2 by p300/CBP augments promoter-specific DNA binding of Nrf2 during the antioxidant response. *Mol Cell Biol*. **29**:2658-2672.
- [52] Fukuchi M, Imamura T, Chiba T, Ebisawa T, Kawabata M, Tanaka K, Miyazono K. (2001) Ligand-dependent degradation of Smad3 by a ubiquitin ligase complex of ROC1 and associated proteins. *Mol Biol Cell*. **12**:1431-1443.
- [53] Papp D, Csermely P, Söti C. (2012) A role for SKN-1/Nrf in pathogen resistance and immunosenescence in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathog*. **8**:e1002673.
- [54] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. **388**:394-397.
- [55] Kawai T, Akira S. (2011) Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* **34**:637-650.
- [56] Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Förster I. (1999) Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res*. **8**:265-277.
- [57] Pan Q, Kravchenko V, Katz A, Huang S, Li M, Mathison JC, Kobayashi K, Flavell RA, Schreiber RD, Goeddel D, Ulevitch RJ. (2006) NF-kappa B-inducing kinase regulates selected gene expression in the Nod2 signaling pathway. *Infect Immun*. **74**:2121-2127.
- [58] Kawaji H, Severin J, Lizio M, Waterhouse A, Katayama S, Irvine KM, Hume DA, Forrest AR, Suzuki H, Carninci P, Hayashizaki Y, Daub CO. (2009) The FANTOM web resource: from mammalian transcriptional landscape to its dynamic regulation.

Genome Biol. **10**:R40.

- [59] Nociari M, Ocheretina O, Schoggins JW, Falck-Pedersen E. (2007) Sensing infection by adenovirus: Toll-like receptor-independent viral DNA recognition signals activation of the interferon regulatory factor 3 master regulator. *J Virol.* **81**:4145-4157.
- [60] Park B, Buti L, Lee S, Matsuwaki T, Spooner E, Brinkmann MM, Nishihara M, Ploegh HL. (2011) Granulin is a soluble cofactor for toll-like receptor 9 signaling. *Immunity.* **34**:505-513.
- [61] Takii R, Inouye S, Fujimoto M, Nakamura T, Shinkawa T, Prakasam R, Tan K, Hayashida N, Ichikawa H, Hai T, Nakai A. (2010) Heat shock transcription factor 1 inhibits expression of IL-6 through activating transcription factor 3. *J Immunol.* **184**:1041-1048.
- [62] Acs P, Bögi K, Lorenzo PS, Marquez AM, Bíró T, Szállási Z, Blumberg PM. (1997) The catalytic domain of protein kinase C chimeras modulates the affinity and targeting of phorbol ester-induced translocation. *J Biol Chem.* **272**:22148-22153.
- [63] Azzi A, Boscoboinik D, Hensey C. (1992) The protein kinase C family. *Eur J Biochem.* **208**:547-557.
- [64] Hartman ZC, Appledorn DM, Amalfitano A. (2008) Adenovirus vector induced innate immune responses: impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications. *Virus Res.* **132**:1-14.
- [65] Hirotsu Y, Katsuoka F, Funayama R, Nagashima T, Nishida Y, Nakayama K, Engel JD, Yamamoto M. (2012) Nrf2-MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks. *Nucleic Acids Res.* **40**:10228-10239.
- [66] Wruck CJ, Streetz K, Pavic G, Götz ME, Tohidnezhad M, Brandenburg LO, Varoga D, Eickelberg O, Herdegen T, Trautwein C, Cha K, Kan YW, Pufe T. (2011) Nrf2 induces interleukin-6 (IL-6) expression via an antioxidant response element within the IL-6 promoter. *J Biol Chem.* **286**:4493-4499.
- [67] Fujita K, Maeda D, Xiao Q, Srinivasula SM. (2011) Nrf2-mediated induction of p62 controls Toll-like receptor-4-driven aggresome-like induced structure formation and autophagic degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**:1427-1432.

6. 謝辞

博士学位論文および本研究を遂行するにあたり、ご指導いただきました同志社大学大学院生命医科学研究科・小林 聡教授に感謝致します。

本研究に対する貴重なご助言ならびにご指導いただきました同志社大学生命医科学部・谷口 浩章助教に御礼申し上げます。また、修士課程より研究を見守ってくださった同志社大学生命医科学部・土谷 佳樹助教 (現 京都府立医科大学生理学教室統合生理学部門 講師) に心より感謝申し上げます。Nrf1 結合因子の網羅的解析においては産業技術総合研究所・夏目 徹博士ならびに、家村 俊一郎博士に多大なるご協力を頂きましたこと、御礼申し上げます。Nrf1 の標的遺伝子解析の際には McGill University 三浦 尚博士にご教授頂きましたこと、深く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、アドバイスや励ましの言葉を下さった方々、様々な形でご協力を頂いた遺伝情報研究室のメンバーや技術員の方々に感謝致します。

最後に、優しく見守ってくれた方々や家族に心より感謝致します。