

Nrf1によるプロテアソーム発現制御機構と神経変性

同志社大学大学院 生命医科学研究科

医生命システム専攻 遺伝情報研究室

小林 聡

1. はじめに

・CNCファミリー型転写因子Nrf1は神経の恒常性維持に関わる

Nrf1は、CNCファミリーと呼ばれる一群のbZip型転写因子から構成されるファミリーに属している(参考文献1)。本ファミリーは、p45/NF-E2、Nrf1、Nrf2、Nrf3とBach1、Bach2の6つの転写因子から構成され、前者は転写活性化因子であり、後者は転写抑制因子として機能する。これら因子はやはりbZip型転写因子である小Maf因子群とヘテロ二量体を形成し、抗酸化剤応答配列(ARE: antioxidant response element)あるいはMARE配列(Maf recognition element)を介して、遺伝子発現を制御する。すなわち1つの調節配列に対して、複数の転写因子が関与する複雑な遺伝子発現制御システムが存在することになる。

我々は、Nrf1の生理機能を解明する目的で種々のNrf1遺伝子破壊マウスを作成し解析を行っている。神経特異的なNrf1ノックアウトマウスでは、小脳プルキンエ細胞や海馬・脊髄のニューロンにおいてユビキチン陽性タンパク質の蓄積を伴う神経変性を起こすことを見出した(参考文献2)。これまでアミノ酸配列の相同性から、Nrf1は関連因子Nrf2が制御する酸化ストレス応答機構に関わると考えられてきた。しかし、興味深いこととしては、Nrf1を欠失させた神経細胞では酸化ストレス応答遺伝子の発現にはあまり変化がなく、むしろ炎症に関わる遺伝子の発現亢進が認められた。すなわち上記知見は、Nrf1が酸化ストレス応答とは異なる遺伝子の発現制御を行い、神経の恒常性維持に努めていることを強く示唆する。

・Nrf1は、通常、タンパク質分解による機能抑制を受けている

Nrf1は、通常、小胞体にとどめられ核移行が阻害されることで、転写活性が負に制御されていることがわかっていた。さらに我々は、Nrf1がタンパク質分解を受けていることを見出していた。すなわちNrf1が転写因子として遺伝子発現制御を行うためには、このタンパク質分解機構から回避することが必要となる。したがってNrf1による神経細胞の恒常性維持機構を理解するためには、このタンパク質分解機構を解明することが重要である。

研究目的

本研究課題では、神経の恒常性維持に関わる転写因子Nrf1の生理機能を解明するために、Nrf1タンパク質自体の分解機構と遺伝子発現制御機構について解明することを目的とする。

2. 方法

Nrf1分子の制御機構を解明するために、Nrf1結合因子の同定を質量分析機を用いたプロテオーム解析により行った。さらに結合因子とNrf1の機能関連は、siRNAを用いたRNA干渉法や分子生物学的手法により検討した。

3. 研究成果

(1) ユビキチン化因子 Hrd1 と β -TrCP が、Nrf1 のタンパク質分解機構に関与する (発表論文 1)

a) ユビキチン結合酵素アダプター β -TrCP が核における Nrf1 の安定性を制御する

Nrf1 結合因子のプロテオーム解析により、ユビキチン結合酵素のサブユニットである β -TrCP2 と Skp1 を同定した (産業技術総合研究所 夏目博士、家村博士との共同研究)。 β -TrCP2 は Skp1 とともに Cullin1 (Cul1) 型のユビキチン結合酵素複合体を形成し、発生に関わる β -カテニンなどをユビキチン化しプロテアソーム依存的なタンパク質分解に供することが知られている。したがって、 β -TrCP が Nrf1 のタンパク質分解を制御していることが強く示唆されたため、以下の解析を行った。

まず β -TrCP が Nrf1 のタンパク質安定性を制御していることを確認するために、 β -TrCP siRNA を用いた RNA 干渉実験により Nrf1 の安定性への影響を解析した。ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞に β -TrCP siRNA を導入後、さらに Nrf1 を一過的に発現させて、Nrf1 タンパク質の安定性をシクロヘキシミドチェイス実験で観察した。その結果、HeLa 細胞の内在性 β -TrCP をノックダウンさせると、Nrf1 が著しく安定化することがわかった。また Nrf1 分子内部の 243-463 残基が β -TrCP 依存的な Nrf1 タンパク質分解機構に関わることがわかった。この領域のアミノ酸配列を詳細に検討すると、興味深いことに CNC ファミリーの p45/NF-E2、Nrf1、Nrf2、Nrf3 に共通して存在するアミノ酸配列 DSGLS モチーフを持つことがわかった。DSGLS モチーフとは、 β -TrCP のコンセンサス配列である DpSGX_npS ($n \geq 1$, pS: リン酸化セリン残基) の非典型タイプであり、ヒトエリスロポエチンレセプター EpoR や Yap1 にも存在する。そこで DSGLS モチーフのセリン残基をアラニンに変異させた Nrf1 変異タンパク質は著しく安定化することを明らかにした。したがって、Nrf1 の分解機構は、DSGLS モチーフを介した β -TrCP によるユビキチン化によるタンパク質分解であることがわかった。

次に、 β -TrCP による Nrf1 分解の細胞内場を解析した。 β -TrCP siRNA によりノックダウンさせて変異体の安定性を解析したところ、興味深いことに、核局在型 Nrf1 のみが安定化し、細胞質局在型 Nrf1 は依然としてタンパク質分解されることを見出した。すなわち、この知見は、Nrf1 は細胞質と核において異なるタンパク質分解を受けていること、そして β -TrCP は核における分解機構を制御していることが明らかとなった。

b) ERAD ユビキチン結合酵素 Hrd1 が細胞質における Nrf1 タンパク質の安定性を制御する

細胞質における Nrf1 分解機構について解析を進めた。仮説としては、Nrf1 は通常小胞体に局在していることが知られているので、Nrf1 は小胞体関連タンパク質分解機構 (ERAD: ER-associated degradation) により分解されていると考え、ERAD に関わるユビキチン結合酵素との関連を RNA 干渉法により調べた。その結果、Hrd1 siRNA が Nrf1 変異体を安定化することが示された。以上の結果から、細胞質における Nrf1 のタンパク質分解機構は、ERAD のユビキチン結合酵素 Hrd1 により制御されていることが明らかになった。なお海外のグループから同様な報告がされ、本研究結果を支持している (参考文献 3, 4)。

(2) Nrf1 はプロテアソームサブユニット PSMC4, PSMB6 遺伝子の発現を制御する

Nrf1 による神経の恒常性維持機構を解明するために、Nrf1 が直接制御する標的遺伝子を探索した結果、プロテアソームサブユニット遺伝子 PSMC4 ならびに PSMB6 を同定した。ゲノム配列を解析したところ、プロテアソーム遺伝子の調節領域に Nrf1 結合配列である ARE 配列が存在することを見出した。ここで、Nrf1 は構成的なプロテアソーム遺伝子の発現ではなく、プロテアソーム活性が阻害された時にプロテアソーム遺伝子が発現亢進するプロテアソームリカバリー経路に関わっていた。すなわち HeLa 細

胞を、プロテアソーム阻害剤で処理すると、内在性 Nrf1 は核移行し、標的遺伝子であるプロテアソームサブユニット PSMC4 遺伝子のプロモーターに存在する ARE 配列へ結合して遺伝子発現を活性化していることを、クロマチン免疫沈降実験、RNA 干渉実験そしてリアルタイム PCR 法で確認した。さらに Nrf1 は、ほぼすべてのプロテアソームサブユニット遺伝子を発現制御することを確認した（発表論文 2、校閲中）。

4. 考察

本研究により、Nrf1は細胞質と核において、それぞれHrd1と β -TrCPによるタンパク質分解を受け、機能抑制されていることを明らかにした。さらにプロテアソーム活性の低下した際にプロテアソーム遺伝子の発現を亢進させるプロテアソームリカバリー経路に、Nrf1が関与していることが明らかになった。これらの知見が、Nrf1による神経の恒常性維持機構にどのように関与するかは、今後さらに研究が必要となる。現時点での考察では、Nrf1は未同定のストレスによって活性化するストレス応答型転写因子であり、そのストレスによって変性したタンパク質を神経細胞から除去するために、プロテアソーム遺伝子の発現を活性化しているのであろうと考えている。

さらに、この知見から次の課題が浮かび上がる。1) Nrf1を活性化するストレスは何か？ 2) その活性化ストレスを感知するセンサーは何か？ 3) これらNrf1活性化ストレスとセンサーが、どのようにNrf1を活性化し、プロテアソーム遺伝子の発現を亢進させるのか？、という3つの問題である。おそらくNrf1は、活性化ストレスによりHrd1依存的なユビキチン化機構を回避することで安定化し、小胞体あるいはゴルジ体に存在するタンパク質切断酵素により限定分解を受けることで核移行するメカニズムを考えている。参考にするモデルは、コレステロール合成に関わる転写因子SREBPや小胞体ストレス応答に関わるATF6の制御機構である。Nrf1はいわば「オーファン転写因子」でありこの機能を解明できれば、神経の恒常性維持機構の解明とともに、その破綻により発症する神経変性疾患への治療法の創出にもつながることが期待される。

5. 発表論文、

1) Tsuchiya, Y., Morita, T., Kim, M., Iemura, S., Natsume, T., Yamamoto, M. and **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.

2) Tsuchiya, Y., Ito, Y., Iemura, S-i., Natsume, T., Nishida, E., **Kobayashi, A.** The CK2-Nrf1 axis controls the clearance of ubiquitinated proteins by regulating proteasome gene expression. **Mol. Cell. Biol.** under revision.

参考文献

1) Sykiotis, G. P., and D. Bohmann. 2010. Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. **Sci. Signal.** 3:re3.

2) **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. and Yamamoto, M. (2011) Central nervous system-specific deletion of transcription factor Nrf1 causes progressive motor neuronal dysfunction. **Genes Cells** 16, 692-703.

3) Radhakrishnan, S. K., C. S. Lee, P. Young, A. Beskow, J. Y. Chan, and R. J. Deshaies. 2010. Transcription factor Nrf1 mediates the proteasome recovery pathway after proteasome inhibition in mammalian cells. **Mol. Cell** 38:17-28.

4) Steffen, J., M. Seeger, A. Koch, and E. Kruger. 2010. Proteasomal degradation is transcriptionally controlled by TCF11 via an ERAD-dependent feedback loop. **Mol. Cell** 40:147-158