

みにれびゅう

プロテアソームリカバリーにおける転写因子 Nrf1 (NFE2L1) の遺伝子発現機構

小林 聡, 土谷 佳樹

1. はじめに

プロテアソームリカバリーとは、プロテアソームのタンパク質分解活性が阻害されたときに、プロテアソーム遺伝子群を発現誘導することで細胞内タンパク質の恒常性 (proteostasis) を維持する生体応答のことである。プロテアソームの機能破綻は、変性タンパク質の蓄積により神経変性疾患、がん、老化などの病態につながるため、その制御機構の解明は重要である。最近、転写因子 Nrf1 (NFE2L1) がプロテアソームリカバリーにおける遺伝子発現を制御していることが明らかにされた。本稿では、多重制御による Nrf1 のプロテアソーム発現機構について概説する。

2. 33 サブユニットからなるプロテアソーム遺伝子群の発現機構 —プロテアソームリカバリーを制御する転写因子 Nrf1

プロテアソームの主要フォームである 26S プロテアソームは、20S プロテアソームと二つの 19S 複合体から構成され、さらにそれぞれは 19, 14 サブユニットから構成される (図 1A)¹⁾。すなわちプロテアソームは、合計 33 サブユニットからなる巨大タンパク質複合体になる。各サブユニットは個々の遺伝子座から過不足なく転写翻訳される。これほど多くの遺伝子群を協調的に発現させるためには、特異的な制御機構の存在が想起される。

プロテアソーム遺伝子の発現機構については、酵母では転写因子 Rpn4 が制御する。Rpn4 自身がプロテアソームにより分解されるため、この発現機構にはネガティブフィードバックループが存在する (図 1B)。すなわち、これはプロテアソームリカバリーそのものであり、プロテア

ソームリカバリーが酵母にも存在する生体応答システムであることがわかる。

高等真核生物では、転写因子 Nrf1 がプロテアソームリカバリーにおける誘導的な遺伝子発現を制御している²⁻⁴⁾。図 1C は、プロテアソーム阻害剤 MG132 で処理したヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞での各サブユニットの発現誘導を示すデータである。この誘導は siRNA による Nrf1 ノックダウンでキャンセルされることから、Nrf1 依存적であることがわかる。一方、Nrf1 関連因子である Nrf2 は、酸化ストレスによるプロテアソーム遺伝子の誘導に関わる⁵⁾。しかし Nrf2 が HeLa 細胞でのプロテアソームリカバリーに関与しないことは、図 1C のデータから読み取れる。これは図 2 に示す制御システムの違いに起因するのであろう。

Nrf1 は塩基性ロイシンジッパー型の転写因子であり、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) に結合して転写を活性化する⁶⁾。この ARE 配列は、各プロテアソームサブユニットの遺伝子上流に存在し、Nrf1 が結合する。またショウジョウバエのオルソログである CncC も、プロテアソーム遺伝子の発現を制御する⁷⁾。したがって、Nrf1 によるプロテアソームリカバリーの生理的重要性が強く示唆される。

3. 神経特異的 Nrf1 ノックアウトマウスはユビキチン化タンパク質の蓄積を伴う神経変性疾患を発症する

それでは Nrf1 の機能破綻は、プロテアソームの発現低下によりユビキチン化タンパク質の蓄積につながるのか？この問題に対して、筆者と海外のグループが異なるストラテジーで神経特異的 Nrf1 ノックアウトマウスを解析している^{8,9)}。筆者らが作製した Nestin-Cre トランスジェニックマウスを用いた神経特異的 Nrf1 ノックアウトマウスは、ユビキチン化タンパク質の蓄積を伴う神経変性疾患を発症し生後 3 週齢で致死となる。一方、海外のグループが作製した Camk2-Cre トランスジェニックマウスを用いた Nrf1 ノックアウトマウスも、症状はマイルドではあるが同様にユビキチン化タンパク質の蓄積と神経変性疾患を発症す

同志社大学大学院生命医科学研究科遺伝情報研究室 (〒610-0394 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3)

Gene regulation of the proteasome recovery pathway by the transcription factor Nrf1 (NFE2L1)

Akira Kobayashi and Yoshiki Tsuchiya (Laboratory for Genetic Code, Doshisha University, Graduate School of Life and Medical Sciences, 1-3 Tatara Miyakodani, Kyotanabe, Kyoto 610-0394, Japan)

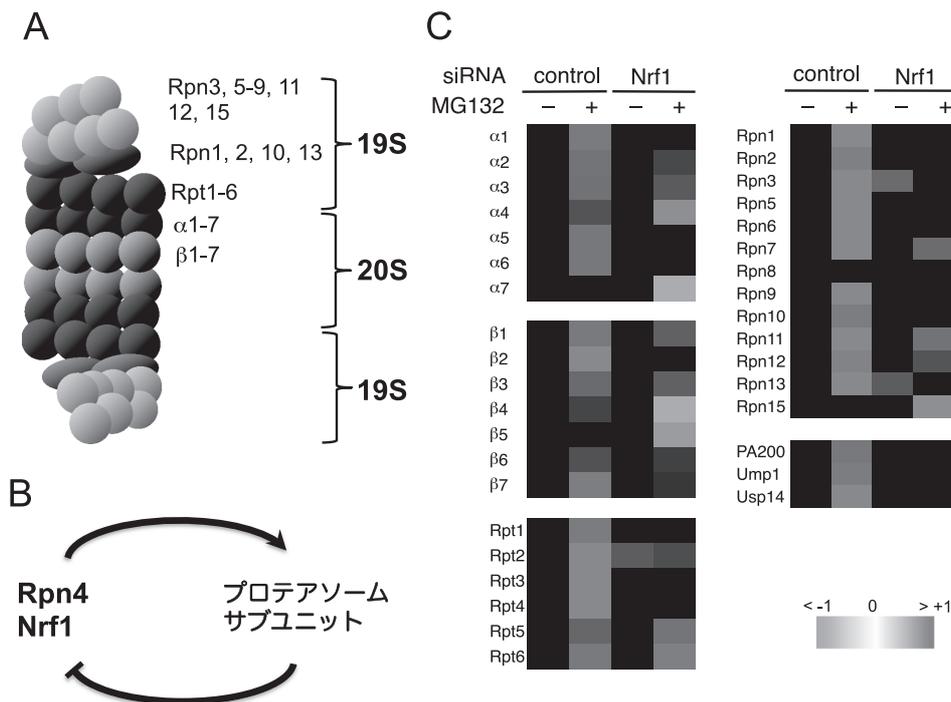


図1 プロテアソーム構造とプロテアソームリカバリー

(A) 26S プロテアソームのサブユニット構造。(B) Nrf1 あるいは酵母 Rpn4 によるプロテアソーム遺伝子発現におけるネガティブフィードバック機構。(C) Nrf1 によるプロテアソームリカバリー。HeLa 細胞をプロテアソーム阻害剤 MG132 で 1 μM, 16 時間処理した後に、プロテアソームサブユニット遺伝子群の発現変動をリアルタイム PCR により解析した。この誘導は Nrf1 siRNA によるノックダウンにより消失することから、Nrf1 依存的な発現であることがわかる。

る。また変性タンパク質の蓄積はプロテアソーム遺伝子の発現低下によることを報告している。

4. Nrf1 機能発現における多重制御機構

1) 細胞質と核における二つの Nrf1 タンパク質分解機構

プロテアソームリカバリーを発動するために、Nrf1 はどのように活性制御されているのであろうか？ Nrf1 は、アミノ末端のドメインを介して通常小胞体にアンカーされ核移行が阻害されている¹⁰⁾。すなわち Nrf1 が活性化（核移行）するためには、小胞体からの解離が必要になる。ところで、筆者はこれまで関連因子 Nrf2 の酸化ストレス応答機構の実態は、Cul3 型ユビキチン結合酵素による Nrf2 タンパク質分解の阻害にあることを明らかにしてきた（図 2B）¹¹⁾。そこで Nrf1 活性化機構もまたタンパク質分解制御にあると仮説を立て解析した結果、Nrf1 は細胞質と核でのタンパク質分解系の制御下にあることを見いだした¹²⁾。

通常小胞体に局在する Nrf1 は、さらに ERAD のユビキチン結合酵素 Hrd1 によるタンパク質分解を受けていることを、筆者と海外のグループが独自に発見した^{3,12)}。Hrd1 によりユビキチン化された Nrf1 は、p97/VCP を介してプ

ロテアソームにより分解され、過剰に遺伝子発現しないよう抑制されている。

一方、プロテアソーム阻害あるいは未同定のストレスにより、Nrf1 は核移行しプロテアソームを誘導するが、ユビキチン結合酵素アダプター β-TrCP によるタンパク質分解を受ける。おそらく、この核における分解システムはプロテアソームリカバリーによりプロテアソーム活性が復帰した後に、Nrf1 の活性をオフにしているのだろう。β-TrCP は、β-カテニンや IκB をユビキチン化する Cul 1 型ユビキチン結合酵素のアダプターである。β-TrCP の基質認識には、分解責任ドメイン内の Ser/Thr 残基のリン酸化が必要である。実際 β-TrCP 依存的な Nrf1 分解には、DSGLSL モチーフの二つのセリン残基を必要とする。したがってリン酸化の関与が予想されるが、まだリン酸化酵素は同定できていない。Nrf2 も β-TrCP 依存的にタンパク質分解を受けるが、ここでは GSK3 によるリン酸化が関わる。さらに我々は、核に局在する Nrf1 は脱ユビキチン化酵素 Usp15 により安定化することも見いだしており、ユビキチン化における拮抗的な制御機構が存在する¹³⁾。

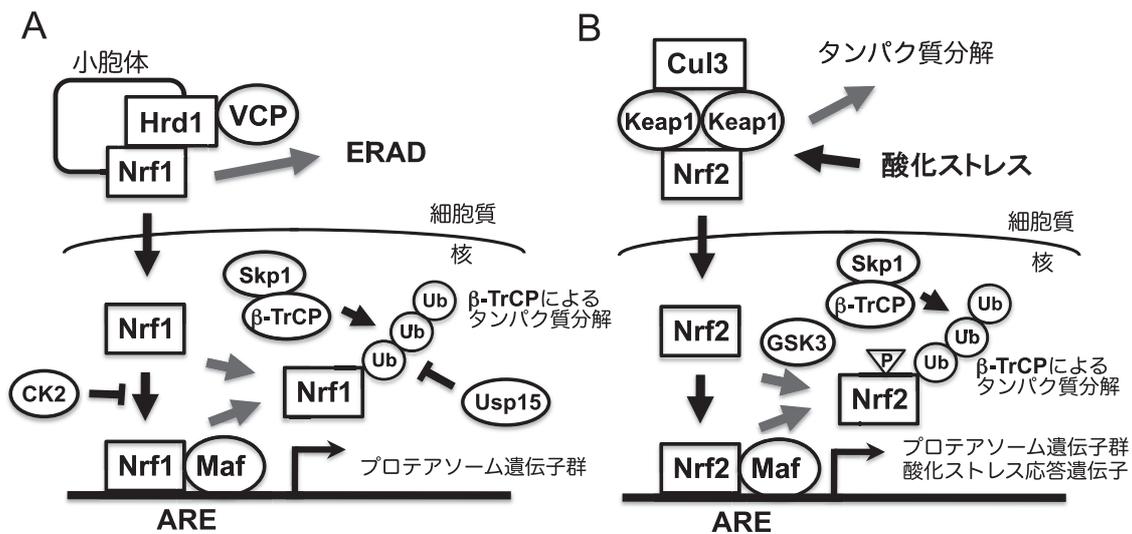


図2 Nrf1とNrf2の活性制御機構の相違

(A) ユビキチン鎖の着脱によるタンパク質分解制御とリン酸化によるNrf1の多重制御機構。通常Nrf1は小胞体にアンカーし、さらにERADユビキチン結合酵素Hrd1によりユビキチン-プロテアソーム依存的なタンパク質分解を受ける。プロテアソーム阻害により核移行したNrf1は、プロテアソーム遺伝子群を誘導する。一方、核移行したNrf1はβ-TrCPによりユビキチン化を受け、タンパク質分解される。またUsp15によるNrf1の脱ユビキチン化による安定化機構も存在する。さらにリン酸化酵素CK2は、Nrf1のDNA上への結合を阻害する。(B) タンパク質分解の抑制による関連因子Nrf2の酸化ストレス応答機構。Nrf2は、非ストレス下ではCul3-Keap1ユビキチン結合酵素によりタンパク質分解されている。酸化ストレス下では、酸化ストレスセンサーまたはユビキチン結合酵素のアダプターでもあるKeap1がストレスを感知することでユビキチン化活性が低下し、それにより安定化したNrf2が核移行し酸化ストレス応答遺伝子の発現を活性化させる。

2) CK2によるリン酸化を介したNrf1抑制機構

Nrf1はリン酸化酵素CK2により活性阻害も受ける⁴⁾。

CK2は、Nrf1のSer497をリン酸化することでARE配列への結合を阻害し転写活性を抑制する。

5. 今後の課題

1) Nrf1の核移行メカニズムと生理的な活性化シグナル

小胞体から核へのNrf1移行メカニズムは、Hrd1依存的なタンパク質分解機構の抑制にあるのか、まだ決着がつかない。Nrf1が核移行するためには、転写因子SREBPで明らかにされたようなタンパク質切断機構RIP (regulated intramembrane proteolysis) がさらに関与するであろうと筆者らは考えている。なぜなら核移行した内在性Nrf1は、電気泳動上の分子量がわずかに減少するからである。

またプロテアソーム阻害のほかにも、Nrf1を活性化する生理的シグナル/ストレスが存在するはずである。すでに酸化ストレス(親電子性物質)、小胞体ストレス、アスコルビン酸がNrf1を活性化するという報告もあるが、詳細な検討が必要である。Nrf1活性化シグナルを同定するためには、Nrf1標的遺伝子の生理機能が重要なヒントになるかもしれない。プロテアソーム以外のNrf1標的遺伝子としては、脂質代謝関連遺伝子PGC1βやLipin1が同定されている^{14,15)}。

2) プロテアソーム遺伝子群を協調的に誘導する転写機構の特異性

巨大タンパク質複合体であるプロテアソームの発現機構には、一般的な遺伝子とは異なる特異的な転写機構が存在する可能性がある。すでにNrf1結合因子として、いくつかのエピジェネティクス関連因子が同定されており、これらの解析から、この可能性が検証されるかもしれない。

6. おわりに

抗がん剤ボルテゾミブ(ベルケード)の作用機序は、プロテアソーム阻害にある。おそらくNrf1は、ボルテゾミブによりプロテアソームリカバリーを発動するため、ボルテゾミブ耐性をもたらしていることが予想される。Nrf1によるプロテアソームリカバリーの全容解明はproteostasisに対する理解を深めるだけでなく、ボルテゾミブの併用化学療法の開発につながることを期待される。

謝辞

本研究成果は、産業技術総合研究所 夏目徹先生と同志社大学生命医科学部 谷口浩章助教、森田智子博士をはじめとする遺伝情報研究室のメンバーとの共同研究によりなされました。厚く感謝致します。

- 1) Schmidt, M. & Finley, D. (2013) *Biochim. Biophys. Acta*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.08.012>
- 2) Radhakrishnan, S.K., Lee, C.S., Young, P., Beskow, A., Chan, J.Y., & Deshaies, R.J. (2010) *Mol. Cell*, **38**, 17-28.
- 3) Steffen, J., Seeger, M., Koch, A., & Kruger, E. (2010) *Mol. Cell*, **40**, 147-158.
- 4) Tsuchiya, Y., Taniguchi, H., Ito, Y., Morita, T., Karim, M.R., Ohtake, N., Fukagai, K., Ito, T., Okamuro, S., Iemura, S., Natsume, T., Nishida, E., & Kobayashi, A. (2013) *Mol. Cell Biol.*, **33**, 3461-3472.
- 5) Kwak, M.K., Wakabayashi, N., Greenlaw, J.L., Yamamoto, M., & Kensler, T.W. (2003) *Mol. Cell Biol.*, **23**, 8786-8794.
- 6) Sykietis, G.P. & Bohmann, D. (2010) *Sci. Signal.*, **3**, re3.
- 7) Grimberg, K.B., Beskow, A., Lundin, D., Davis, M.M., & Young, P. (2011) *Mol. Cell Biol.*, **31**, 897-909.
- 8) 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) *Genes Cells*, **16**, 692-703.
- 9) Lee, C.S., Lee, C., Hu, T., Nguyen, J.M., Zhang, J., Martin, M. V., Vawter, M.P., Huang, E.J. & Chan, J.Y. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 8408-8413.
- 10) Zhang, Y., Lucocq, J.M., Yamamoto, M., & Hayes, J.D. (2007) *Biochem. J.*, **408**, 161-172.
- 11) Kobayashi, A., Kang, M.I., Watai, Y., Tong, K.I., Shibata, T., Uchida, K., & Yamamoto, M. (2006) *Mol. Cell Biol.*, **26**, 221-229.
- 12) Tsuchiya, Y., Morita, T., Kim, M., Iemura, S., Natsume, T., Yamamoto, M., & Kobayashi, A. (2011) *Mol. Cell Biol.*, **31**, 4500-4512.
- 13) 深谷恒介, 谷口浩章, 夏目 徹, 小林 聡 (2013) 第86回日本生化学会大会, 2P-338.
- 14) Hirotsu, Y., Hataya, N., Katsuoka, F., & Yamamoto, M. (2012) *Mol. Cell Biol.*, **32**, 2760-2770.
- 15) Ohtsuji, M., Katsuoka, F., Kobayashi, A., Aburatani, H., Hayes, J.D., & Yamamoto, M. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 33554-33562.

著者寸描

●小林 聡 (こばやし あきら)



同志社大学大学院生命医科学研究科教授。博士 (理学)。

■略歴 1967年宮城県仙台市に生る。91年早稲田大学理工学部化学科卒業。97年東北大学大学院理学研究科博士課程修了。同年東北大学医学部助手。2002年筑波大学基礎医学系講師。07年東北大学大学院

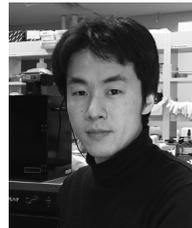
医学系研究科准教授。11年より現職。

■研究テーマと抱負 恒常性維持システムの破綻による神経変性疾患やがんの発症機構の解明。

■ホームページ <http://akobayas.wix.com/genetic-code-lab>

■趣味 読書, 歴史, 息子・ネコと遊ぶ, 楽天イーグルス応援。

●土谷佳樹 (つちや よしき)



京都府立医科大学大学院医学研究科統合生理学部門講師。博士 (生命科学)。

■略歴 1977年大阪府に生る。2000年京都大学理学部卒業, 05年同大学院生命科学研究科博士課程修了, 05~08年同博士研究員, 08~12年同志社大学生命医科学部助教, 12年より現職。

■研究テーマと抱負 転写因子 Nrf1 による恒常性維持機構・プロテアソーム発現制御機構 (08~12)。哺乳類概日リズム形成の分子機構, 概日時計の発症機構など (現在)。

■趣味 フットサル。美味しいものを食べること。