

【総説】

ストレス応答転写因子 Nrf2 と ATF4 を中心とした 未病期における動的な恒常性維持機構

伊東 健、長谷川 和輝、葛西 秋宅

弘前大学大学院医学研究科附属高度先進医学研究センター分子生体防御学講座

要約

未病期は代謝障害や若干の不定愁訴はあるものの、疾患として診断されない段階として捉えることができる。未病期に共通して観察される代謝障害は生体にストレス応答を惹起し、これにより恒常性が保たれる。従って、未病期におけるダイナミックなストレス応答機構の動態を捉えることは未病の病態の可視化・把握に重要である。ミトコンドリアストレスは未病期のストレスとして代表的なもので、結果として酸化ストレスを生じる。Nrf2 と ATF4 はそれぞれ親電子性物質や活性酸素・窒素種などのチオール反応性物質、小胞体ストレス・アミノ酸飢餓ミトコンドリア障害などによって活性化し生体防御応答を指揮する。私たちは Nrf2 と ATF4 が相互作用することを見出し、それが種々の抗酸化タンパク質の遺伝子発現に関与することを明らかにした。本稿では両転写因子を中心に加齢と 2 型糖尿病を例にとって未病期の恒常性維持機構を考察する。

キーワード：Nrf2, ATF4, ISR, mitochondria, Mibyou

はじめに

未病期は、代謝障害が生じるものの疾患に分類されない段階として捉えられる(図 1 A)^[1]。また、未病は東洋学的観点および西洋学的観点から、東洋学的未病と西洋学的未病に分類される(図 1 B)。東洋学的未病とは「軽微な自覚症状はあるが検査では発見できない状態」であり、西洋学的未病は「自覚症状はないが検査値が異常を示す状態」と考えられる。本稿では話を具体的に進めるために、肥満を介して糖尿病に至る経路と加齢により疾患に至る経路を例にとって未病について考察する。前者はインスリン抵抗性や血糖値で異常を検出できるため、西洋学的未病で考えると理解しやすく、後者は東洋学的にも西洋学的にも考えうる。いずれにおいても、糖尿病に至る過程や、加齢性疾患の発症する前の未病の段階における生体内の変化を分子レベルで理解し、予防に繋げることが重要な課題である。

Nrf2 と ATF4 が指揮する遺伝子発現

NF-E2-related factor 2 (Nrf2) は親電子性物質や活性酸素・窒素種 (ROS・RNS) などの種々のチオール反応性物質に応答して活性化する転写因子である(図 2 A)^[2]。非ストレス下では、Nrf2 は Kelch-like ECH-associated protein1 (Keap1) と細胞質において結合し、ユビキチン化されてプロテアソームにより分解される。Keap1 が親電子性物質や ROS・RNS により酸化修飾を受けると Nrf2 のユビキチン化は減弱し、分解を免れた Nrf2 は核に移行し標的遺伝子群を活性化する。Nrf2 は小 Maf タンパク質とヘテロ二量体を形成して抗酸化剤応答配列 (ARE) に結合する。Nrf2 の標的遺伝子にはグルタチオン転移酵素 (GST) やキノン還元酵素 (NQO1) などの親電子性物質解毒化酵素、ヘムオキシゲナーゼ (HO-1) やチオレドキシン還元酵素などの抗酸化タンパク質、薬物トランスポーター、炎症性因子などがある。

一方、小胞体ストレス、アミノ酸飢餓、ヘム欠乏、ウイルス感染などの種々のストレスは、それぞれ特異的なキナーゼ (PERK, GCN2, HRI, PKR) を介して eIF2 α をリン酸化し、ATF4 を翻訳レベルで活性化し一連の遺伝子応答を惹起する(図 2 B)^[3]。このように ATF4 は多岐にわたるストレスにより活性化されるため、eIF2 α -ATF4 を介した遺伝子応答は統合的ストレス応答 (Integrated Stress Response) と呼ばれる。ATF4 は

連絡先：〒 036-8562 青森県弘前市在府町 5
TEL:0172-39-5158
FAX:0172-39-5157
E-mail: itohk@hirosaki-u.ac.jp

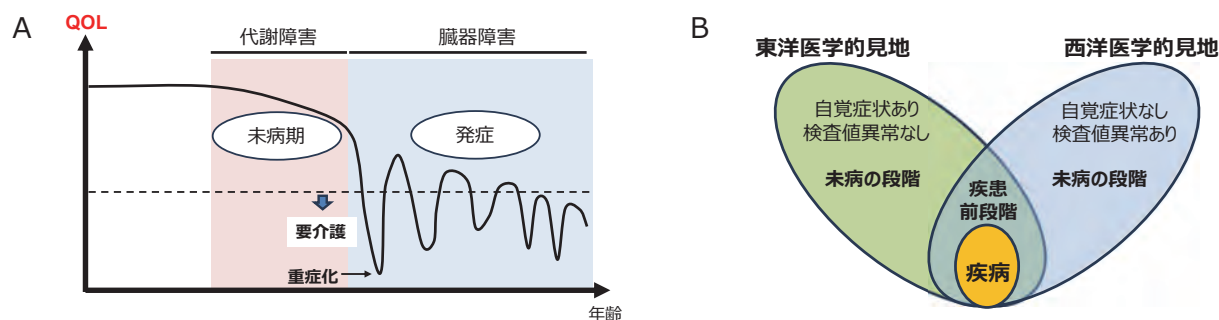


図 1

C/EBP γ または C/EBP β と相互作用してアミノ酸飢餓応答配列 (AARE) に結合し、主に細胞膜表面のアミノ酸トランスポーターやアミノ酸合成酵素、CHOP などの転写因子の遺伝子発現を活性化する^[3]。

ATF4 活性化を未病マーカーとする先制予防治療

前述のとおり ATF4 活性化は小胞体ストレス、アミノ酸飢餓などの種々の内因性ストレスにより起こる。したがって、ATF4 活性化やその標的遺伝子の発現誘導は生体のストレス度の指標となりうる。近年、ATF4 は哺乳動物におけるミトコンドリアストレスに応答する代表的な転写因子であることが確立された(図 3)^[4]。ミトコンドリアストレスによる ATF4 活性化は主に HRI あるいは GCN2 を介することが報告されている。近年、呼吸

鎖複合体 V の阻害がミトコンドリアプロテアーゼである OMA1 を活性化し、それによって切断された DELE1 (DELE1s) が HRI を活性化することが HEK293T 細胞を用いて明らかにされた^[5, 6]。また、呼吸鎖複合体 I または III の阻害が NADH/NAD⁺ 比の上昇に伴うアスパラギンの枯渇を介して GCN2 を活性化することが筋芽細胞株 C2C12 において報告された^[7]。しかしながら、複合体 I の阻害が PERK を介して ATF4 標的の遺伝子である FGF21 や GDF15 の発現を誘導するとする報告もあり^[8]、ミトコンドリアストレスの種類や細胞種によって ATF4 活性化経路が異なることが予想される^[4]。

興味深いことに、種々の病態モデルにおいて ATF4 の活性化が未病マーカーとなることが示唆されている。例えば、フラタキシン発現低下による拡張型心筋症^[9]や

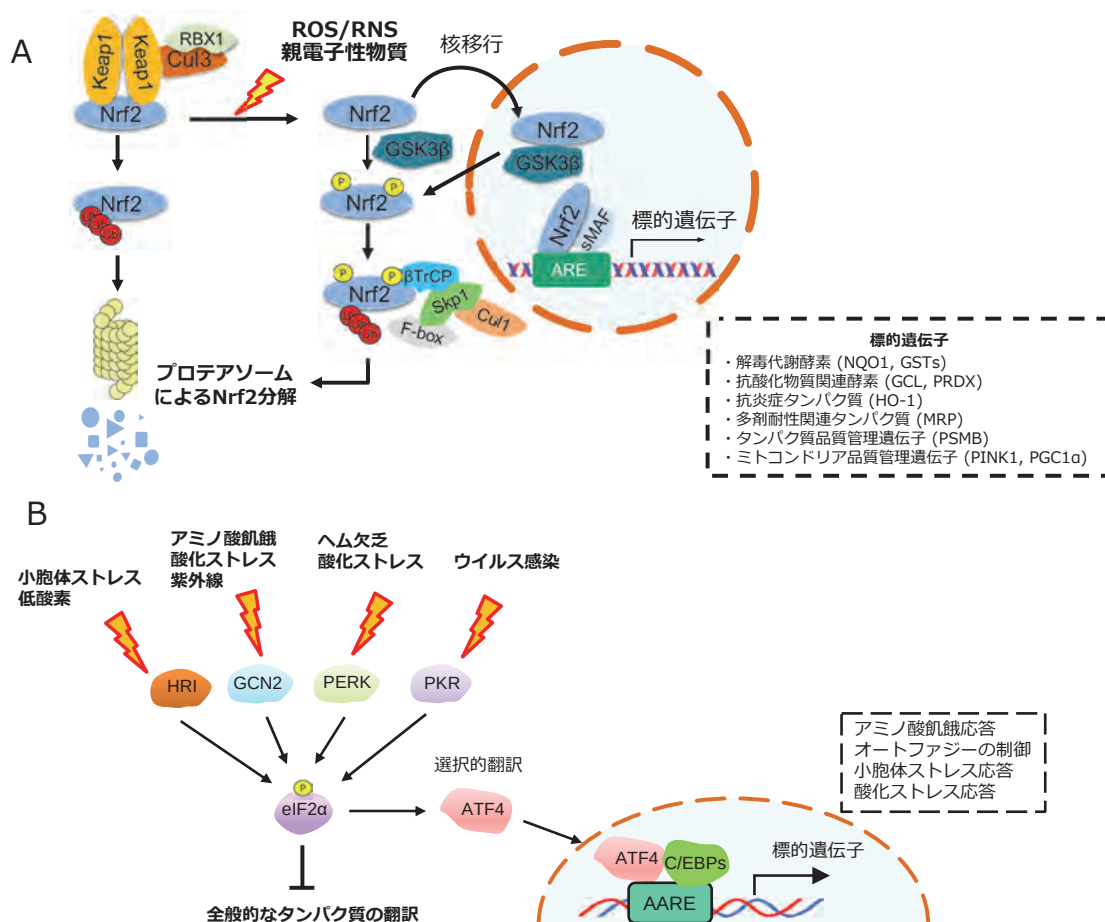


図 2

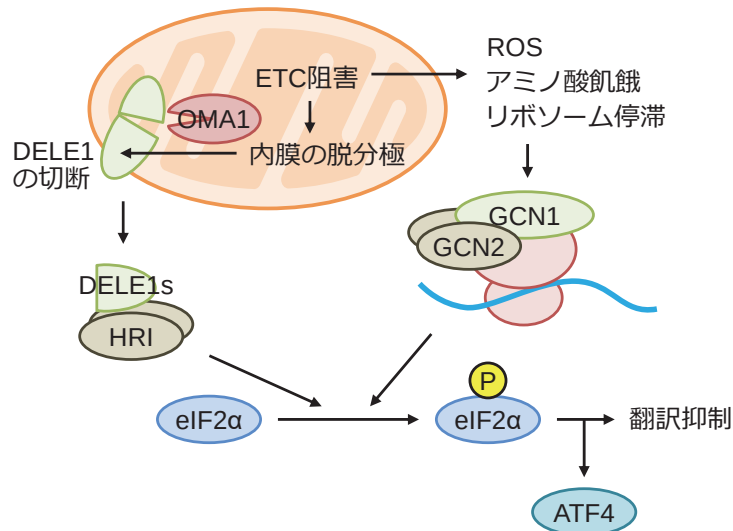


図3

複合体I阻害によるドーパミン作動性ニューロン変性モデル^[10]において、細胞の変性が観察されるかなり以前から ATF4 転写経路の発現が起こっていることが報告されている。実際、ATF4 の標的遺伝子である FGF21 や GDF15 は血中で検出されるサイトカインでありミトコンドリア病のマーカーとしても有望視されている。このような ATF4 標的遺伝子を未病マーカーとして用いることで、病態進行前の初期段階で介入する先制医療の実現につながる可能性がある。

Nrf2 と ATF4 の相互作用による転写制御

酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより Nrf2 と ATF4 が相互作用することが、我々を含む複数のグループによって見出された^[11] [著者ら未発表データ]。Nrf2 と ATF4 は抗酸化酵素や神経栄養因子 (NGF) の転写を協調的に誘導する (図 4)^[12, 13]。ATF4 は CHOP の発現を誘導する一方、Nrf2 は CHOP の転写制御領域への ATF4 結合を阻害してこの発現を抑制する^[14]。こ

のようなことから、老化などに伴うミトコンドリアの変調により ATF4 が活性化される際、Nrf2 との相互作用による ATF4 の機能修飾が老化を抑制する因子となり得る。また、未病での ATF4 活性化を指標として Nrf2 を活性化することで HO-1 や xCT といった抗酸化酵素やグルタチオン合成に関わる酵素の発現を増強するとともに、CHOP による細胞死を抑制することが推察される (図 3)。

Aging における Nrf2 と ATF4 の役割

Nrf2 は加齢に伴いその発現 / 活性が低下するという複数の報告がなされている^[15]。この低下は、ラットにおいては心臓や筋肉で Nrf2 遺伝子の発現低下を伴い、肝臓では Nrf2 遺伝子の発現低下は伴わずに miRNA の発現増加が寄与するという報告があるので、多様な分子機構の存在が示唆される^[16]。また、ビタミン様の補酵素である α -リポ酸は Nrf2 活性化能を有し、老化による Nrf2 低下を抑制する^[17]。加えて、カロリー制限は種を超えて最大寿命を延長することが知られており、Nrf2 はカロリー

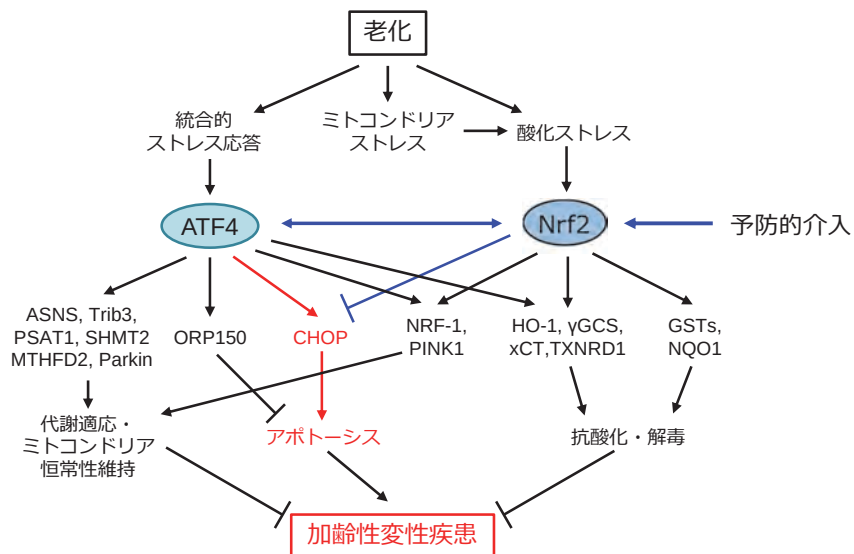


図4

制限による最大寿命の延長には必要ではない一方で、抗癌活性には重要であることが示されている^[18]。さらに近年、C57BL/6 雄マウスにおいて Nrf2 の欠失は通常飼育下の最大寿命を短縮することが明らかになった^[19]。私たちは最近、Nrf2 の発現に関わるプロモーター領域の SNP が血管の老化指標である血管硬化度 (baPWV) の年齢依存的な老化速度に影響することを明らかにした^[20]。このように Nrf2 は Aging の制御因子としても近年注目を浴びつつある。一方、ATF4 についても、ラットでは多くの組織で加齢に伴いタンパク質レベルで発現が低下するという報告がある^[21]。しかしながら ATF4 がミトコンドリア障害や小胞体ストレスによって活性化すること、ミトコンドリア障害は年齢に伴って増加することを考えると、加齢に伴うストレスにより ATF4 の活性は増加することが予想される (図 4)。また、種々の病態モデルの解析から、ATF4 活性化が加齢に伴う神経変性症や網膜疾患、筋萎縮に関わることが報告され^[22, 23]、ATF4 による細胞生存と細胞死誘導の切り替えの制御が各臓器の機能維持に重要であることが示唆される。したがって Nrf2 活性化剤により Nrf2 と ATF4 が制御する転写ネットワークのバランスを変換することは健康な加齢の実現に重要である可能性がある (図 4)。

2 型糖尿病における Nrf2 と ATF4 の役割

2 型糖尿病は複数の遺伝的素因と環境要因が複雑に絡み合いながら発症する (図 5)。さらに、肝臓、脂肪細胞などの代謝関連臓器はエネルギー代謝において密接にクロストークし、脂肪などの特定の臓器で起きたインスリン抵抗性が全身性のインスリン抵抗性を引き起こすことも報告されている^[24]。また、種々の解析により、脂肪組織に隔離できなくなったトリグリセリドが遊離脂肪酸として血中に漏出し組織に蓄積する脂肪毒性がインスリン抵抗性の原因であることが示唆されている。このような背景から、エネルギー貯蔵及び内分泌臓器 (アディポカイン産

生など) である脂肪組織のインスリン抵抗性が未病を考える上で注目されている^[24]。一方、分枝鎖アミノ酸の異化代謝が低下することが 2 型糖尿病の発症早期に観察され、この結果生じる血中分枝鎖アミノ酸の上昇が糖尿病発症の予見に重要であることが報告されている^[25]。興味深いことに 2 型糖尿病モデルマウスにおける分枝鎖アミノ酸の異化代謝遺伝子の低下は脂肪組織で最も顕著である。インスリン抵抗性の原因としては、セラミドの蓄積などをはじめとする種々の原因によるミトコンドリアの ROS 産生が関与することが報告されている^[24]。ATF4 は高脂肪食投与マウスの肝臓や膵臓 β 細胞などで活性化することが報告されている^[26, 27]。さらに脂肪細胞あるいは褐色脂肪細胞における ATF4 の活性化は高脂肪食投与による肥満や糖代謝の悪化を改善する^[28, 29]。一方で、Nrf2 活性化物質であるスルフォラファンは 2 型糖尿病の発症を抑制することが報告されている^[30-32]。FGF21 はインスリン抵抗性改善などに寄与するサイトカインとして知られているが、ATF4 と Nrf2 の両方によって制御されることが報告されている^[33]。2 型糖尿病の発症における Nrf2 と ATF4 の相互作用の詳細はよくわかっていないが今後解析されるべき課題である。

おわりに

私たちは ATF4 活性化を病態マーカーとした Nrf2 活性化の介入がミトコンドリア障害による細胞変性を伴う疾患の予防に有効である可能性があることをこれまでに提案してきた^[4]。アルツハイマー病やパーキンソン病などの変性疾患においてはミトコンドリア機能障害が病態の背景にあることを考えると、未病期からの Nrf2 活性化剤による介入がこれらの疾患の予防に重要である可能性がある。一方で、Nrf2 および ATF4 の動態は、未病期における恒常性維持機構のごく一部を捉えているに過ぎず、網羅的なオミックス解析や AI の活用などにより全体像を描き出していくことが今後重要である。

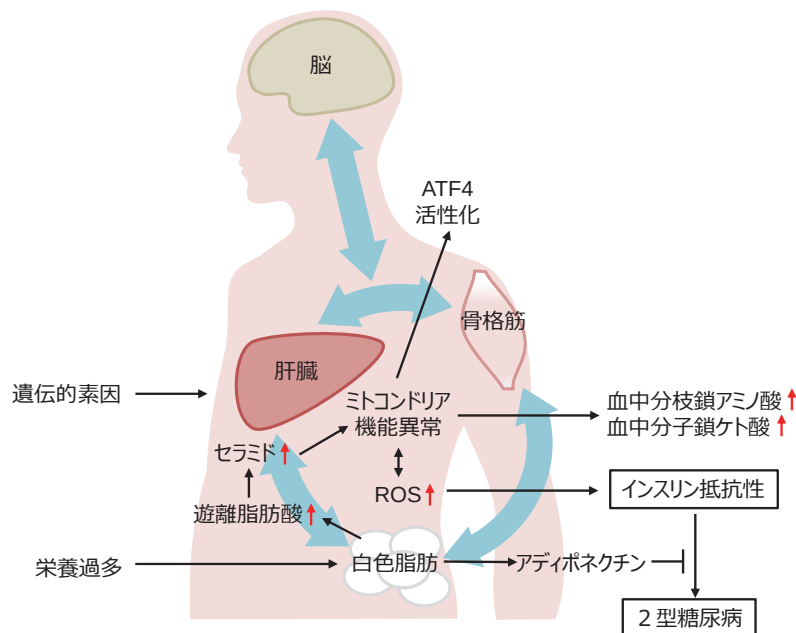


図 5

参考文献

1. 吉裕 福. 現代における未病医学とは. 金芳堂：京都市, 2006.
2. Itoh K, Mimura J, Yamamoto M, et al. Discovery of the negative regulator of Nrf2, Keap1 : a historical overview. *Antioxid Redox Signal*, 13(11):1665-1678, 2010.
3. Ameri K and Harris AL. Activating transcription factor 4. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(1):14-21, 2008.
4. Kasai S, Yamazaki H, Tanji K, et al. Role of the ISR-ATF4 pathway and its cross talk with Nrf2 in mitochondrial quality control. *J Clin Biochem Nutr*, 64(1):1-12, 2019.
5. Guo X, Aviles G, Liu Y, et al. Mitochondrial stress is relayed to the cytosol by an OMA1-DELE1-HRI pathway. *Nature*, 579(7799):427-432, 2020.
6. Fessler E, Eckl EM, Schmitt S, et al. A pathway coordinated by DELE1 relays mitochondrial stress to the cytosol. *Nature*, 579(7799):433-437, 2020.
7. Mick E, Titov DV, Skinner OS, et al. Distinct mitochondrial defects trigger the integrated stress response depending on the metabolic state of the cell. *Elife*, 9, 2020.
8. Patel S, Alvarez-Guaita A, Melvin A, et al. GDF15 Provides an Endocrine Signal of Nutritional Stress in Mice and Humans. *Cell Metab*, 29(3):707-718. e8, 2019.
9. Huang ML, Sivagurunathan S, Ting S, et al. Molecular and functional alterations in a mouse cardiac model of Friedreich ataxia: activation of the integrated stress response, eIF2 α phosphorylation, and the induction of downstream targets. *Am J Pathol*, 183(3):745-757, 2013.
10. Krug AK, Gutbier S, Zhao L, et al. Transcriptional and metabolic adaptation of human neurons to the mitochondrial toxicant MPP(+). *Cell Death Dis*, 5:e1222, 2014.
11. He CH, Gong P, Hu B, et al. Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. *J Biol Chem*, 276(24):20858-20865, 2001.
12. Mimura J, Inose-Maruyama A, Taniuchi S, et al. Concomitant Nrf2- and ATF4-activation by Carnosic Acid Cooperatively Induces Expression of Cytoprotective Genes. *Int J Mol Sci*, 20(7):1706, 2019.
13. Ye P, Mimura J, Okada T, et al. Nrf2- and ATF4-dependent upregulation of xCT modulates the sensitivity of T24 bladder carcinoma cells to proteasome inhibition. *Mol Cell Biol*, 34(18):3421-34, 2014.
14. Zong ZH, Du ZX, Li N, et al. Implication of Nrf2 and ATF4 in differential induction of CHOP by proteasome inhibition in thyroid cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 1823(8):1395-1404, 2012.
15. Schmidlin CJ, Dodson MB, Madhavan L, et al. Redox regulation by NRF2 in aging and disease. *Free Radic Biol Med*, 134:702-707, 2019.
16. Shilovsky GA. Lability of the Nrf2/Keap/ARE Cell Defense System in Different Modes of Cell Aging and Age-Related Pathologies. *Biochemistry (Mosc)*, 87(1):70-85, 2022.
17. Suh JH, Shenvi SV, Dixon BM, et al. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(10):3381-3386, 2004.
18. Pearson KJ, Lewis KN, Price NL, et al. Nrf2 mediates cancer protection but not longevity induced by caloric restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(7):2325-2330, 2008.
19. Pomatto LCD, Dill T, Carboneau B, et al. Deletion of Nrf2 shortens lifespan in C57BL6/J male mice but does not alter the health and survival benefits of caloric restriction. *Free Radic Biol Med*, 152:650-658, 2020.
20. Shimizu S, Mimura J, Hasegawa T, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the NRF2 promoter with vascular stiffness with aging. *PLoS One*, 15(8):e0236834, 2020.
21. Hussain SG and Ramaiah KV. Reduced eIF2 α phosphorylation and increased proapoptotic proteins in aging. *Biochem Biophys Res Commun*, 355(2):365-370, 2007.
22. Pitale PM, Gorbatyuk O and Gorbatyuk M. Neurodegeneration : Keeping ATF4 on a Tight Leash. *Front Cell Neurosci*, 11:410, 2017.
23. Adams CM, Ebert SM and Dyle MC. Role of ATF4 in skeletal muscle atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 20(3):164-168, 2017.
24. James DE, Stöckli J and Birnbaum MJ. The aetiology and molecular landscape of insulin resistance. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 22(11):751-771, 2021.
25. Zhou M, Shao J, Wu CY, et al. Targeting BCAA Catabolism to Treat Obesity-Associated Insulin Resistance. *Diabetes*, 68(9):1730-1746, 2019.
26. Liu S, Yuan J, Yue W, et al. GCN2 deficiency protects against high fat diet induced hepatic steatosis and insulin resistance in mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1864(10):3257-3267, 2018.
27. Kanno A, Asahara SI, Furubayashi A, et al. GCN2 regulates pancreatic β cell mass by sensing intracellular amino acid levels. *JCI Insight*, 5(9):

- e128820, 2020.
28. Bjorkman SH, Marti A, Jena J, *et al.* ATF4 Expression in Thermogenic Adipocytes is Required for Cold-Induced Thermogenesis in Mice via FGF21-Independent Mechanisms. *bioRxiv*, 2023.
 29. Miyake M, Zhang J, Yasue A, *et al.* Integrated stress response regulates GDF15 secretion from adipocytes, preferentially suppresses appetite for a high-fat diet and improves obesity. *iScience*, 24(12):103448, 2021.
 30. Xirouchaki CE, Jia Y, McGrath MJ, *et al.* Skeletal muscle NOX4 is required for adaptive responses that prevent insulin resistance. *Sci Adv*, 7(51): eabl4988, 2021.
 31. Nagata N, Xu L, Kohno S, *et al.* Glucoraphanin Ameliorates Obesity and Insulin Resistance Through Adipose Tissue Browning and Reduction of Metabolic Endotoxemia in Mice. *Diabetes*, 66(5):1222-1236, 2017.
 32. Zhang Y, Wu Q, Liu J, *et al.* Sulforaphane alleviates high fat diet-induced insulin resistance via AMPK/Nrf2/GPx4 axis. *Biomed Pharmacother*, 152:113273, 2022.
 33. Furusawa Y, Uruno A, Yagishita Y, *et al.* Nrf2 induces fibroblast growth factor 21 in diabetic mice. *Gene Cells*, 19(12):864-878.

Novel disease prevention strategy in Mibyou stage based on the interaction of stress-inducible proteins Nrf2 and ATF4

Ken Itoh, Kazuki Hasegawa and Shuya Kasai

Department of Stress Response Science, Center for Advanced Medical Research, Hirosaki University Graduate School of Medicine

Abstract

Mibyou can be considered as state of the people who have metabolic disturbance and slight physical complaints, but are not diagnosed with disease. Metabolic disturbance during Mibyou period evokes stress response in the subjects to maintain homeostasis. Thus, it is critical to measure the dynamic stress response to visualize and capture the state of Mibyou. Mitochondrial stress is one such stress that potentially leads to the generation of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress. Nrf2 and ATF4 respond to electrophiles/ROS/reactive nitrogen species and ER stress/amino acid starvation etc., respectively. We previously found that Nrf2 interacts with ATF4 to cooperatively induce a set of antioxidant genes. In this review article, we discuss the role of stress response and homeostasis during Mibyou period by focusing on Nrf2 and ATF4 in aging and type 2 diabetes.

Keywords : Nrf2, ATF4, ISR, mitochondria, Mibyou