

## 自己評価報告書

平成 23 年 5 月 23 日現在

機関番号：11101

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20117010

研究課題名（和文） 活性酸素シグナルの転写制御機構の解明

研究課題名（英文） Transcriptional regulation by reactive oxygen species

研究代表者

伊東 健 (KEN ITOH)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10323289

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：酸化ストレス応答、転写因子、活性酸素

## 1. 研究計画の概要

本計画研究の目的は活性酸素による転写調節機構を明らかにし、それが生理機能や病態制御に果たす役割を解明することによって、新たな抗酸化治療戦略の分子基盤を構築することである。目的を達成するために（1）酸化シグナルに応答した転写調節機構が生理機能や病態制御に果たす役割を明らかにし、（2）活性酸素により変動する細胞内シグナリングが細胞核で情報統合されて機能発現する分子機構を解析する。さらに（3）核内における活性酸素の産生機構およびそれが転写調節などに果たす役割を明らかにする。

## 2. 研究の進捗状況

（1）Nrf2 の動脈硬化症における役割を解析するために、ApoE 遺伝子と Nrf2 遺伝子の二重欠損マウス [ApoE (-/-) : Nrf2 (-/-) マウス] を作成して、Nrf2 の動脈硬化巣形成への影響を解析した。このマウスに High fat high cholesterol (HFHC) 食を 12 週間投与し大動脈に形成された動脈硬化巣を解析すると ApoE (-/-) : Nrf2 (-/-) マウスにおいては ApoE (-/-) : Nrf2 (+/+) マウスと比較して、動脈硬化巣形成が約 10% まで減少していた。Nrf2 の動脈硬化症の進行における役割を経時的に解析するために HFHC 食投与後、5 週および 12 週で病巣を解析してみたところ、Nrf2 KO マウスと野生型マウスの比較において、5 週においては病巣の大きさに差は観察されなかったが、12 週においては Nrf2 KO マウスにおいて病巣の減弱が観察された。大動脈弁起部で組織切片を用いて解析したところ Nrf2 KO マウスにおいては、fatty streak

のステージから necrotic core が形成されるまでのあいだで病気の進行が減弱していることが明かになった。また、骨髄移植の実験から、骨髄細胞および非骨髄細胞両方の Nrf2 が病巣の進行に関与していることが明らかになった（投稿準備中）。

（2）Nrf2 の N 末端領域 (Nrf2-NT) と Gal4 DNA 結合ドメインとの融合タンパク質 (Gal4-Nrf2-NT) を大腸菌に発現・精製し HeLa 細胞の核抽出液を用いて、Nrf2-NT と特異的に相互作用する複数のタンパク質を同定した。新規に同定したタンパク質の 1 つである KAP1 に関して機能解析を行なった。NIH3T3 細胞と Gal4 レポーターを用いた一過性過剰発現実験により解析すると、KAP1 は Nrf2 の転写活性化能を増強した。さらに KAP1 をノックダウンした NIH3T3 細胞では親電子性物質であるジエチルマレイン酸による Nrf2 標的遺伝子の発現誘導が減弱していた。また、KAP1 をノックダウンした細胞では tBHQ (ターシャルブチルヒドロキノン) や過酸化水素に対する感受性が増強した。以上のことから、KAP1 は新しい Nrf2 の共役因子であることを明らかにした。さらに、Nrf2 の細胞内複合体を精製するために、FLAG タグを融合した Nrf2 をテトラサイクリン誘導的に発現する細胞を作製し、抗 FLAG 抗体による精製を行い、予備的な結果を得ている。

（3）核で活性酸素を産生するヒストン脱メチル化酵素 LSD1 について、Nrf2 による遺伝子発現に対する効果を解析した。テトラサイクリン誘導性に Nrf2 を発現するヒト細胞株 293 細胞において LSD1 をノックダウンして解析したが Nrf2 の標的遺伝子である HO-1 の発現には有意な変化は観察されなかった。今後、種々の細胞を用いるなどしてさらに解析を

行う予定である。

3. 現在までの達成度

②Éおおむね順調に進展している。

(理由)

研究計画の(3)「核内における活性酸素の産生機構およびそれが転写調節などに果たす役割」の課題の解析は遅れ気味であるが、その他の研究課題についてはおおむね順調に進展しているためこのように判断した。

4. 今後の研究の推進方策

遅れている課題「核内における活性酸素の産生機構およびそれが転写調節などに果たす役割」の解析を優先して行っていく予定である。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計35件)

- ① Mimura J, Kosaka K, Maruyama A, Satoh T, Harada N, Yoshida H, Satoh K, Yamamoto M, Itoh K. Nrf2 regulates NGF mRNA induction by Mimura J, Kosaka K, Maruyama A, Satoh T, Harada N, Yoshida H, Satoh K, Yamamoto M, Itoh K. Nrf2 regulates NGF mRNA induction by carnosic acid in T98G glioblastoma cells and normal human astrocytes. J Biochem. 2011, in press. 査読有り。
- ② Maruyama A, Nishikawa K, Kawatani Y, Mimura J, Hosoya T, Harada N, Yamamoto M and Itoh K. The novel Nrf2-interacting factor KAP1 regulates susceptibility to oxidative stress by promoting the Nrf2-mediated cytoprotective response. Biochemical J. 436, 387-397, 2011. 査読有り。
- ③ Harada N, Kanayama M, Maruyama A, Yoshida A, Tazumi K, Hosoya T, Mimura J, Toki T, Maher JM, Yamamoto M, Itoh K. Nrf2 regulates ferroportin 1-mediated iron efflux and counteracts lipopolysaccharide-induced ferroportin 1 mRNA suppression in macrophages. Arch Biochem Biophys. 508, 101-109, 2011. 査読有り。
- ④ Itoh K, Mimura J, Yamamoto M. Discovery of the negative regulator of Nrf2, Keap1: A historical overview. Antioxid Redox Signal. 13, 1665-1678, 2010. 査読有り。
- ⑤ Satoh T, Harada N, Hosoya T, Tohyama K, Yamamoto M, Itoh K. Keap1/Nrf2 system

regulates neuronal survival as revealed through study of keap1 gene-knockout mice. Biochem Biophys Res Commun. 380, 298-302, 2009. 査読有り。

[学会発表] (計5件)

- ① 丸山 敦史、伊東 健. Nrf2 はヒト HO-1 遺伝子プロモーター領域の Z-DNA 形成を誘導する. 第83回日本生化学会大会, 神戸ポートアイランド. 2010年12月7日(火)~10日(金).
- ② Ken Itoh. Nrf2 co-activator for HO-1 gene regulation. 6<sup>th</sup> International Congress on Heme Oxygenases. September 30-October 4, 2009, Miami Beach, Florida.
- ③ Ken Itoh. Role of Nrf2 in neural protection and differentiation. SFRR International Free Radical School in Japan, 2009. September 2<sup>nd</sup>-6<sup>th</sup> 2009. JOETSU KOKUSAI SKI RESORT.
- ④ 伊東 健. Nrf2-HO-1 経路の制御機構と生理機能. 第6回 Heme Oxygenase 研究フォーラム. 京都府立大学・青蓮会館. 2009年8月28日(金)
- ⑤ 伊東 健. Nrf2 経路を介した活性酸素シグナル制御機構の解析. 第82回日本生化学会大会, 神戸ポートアイランド. 2009年10月21日(水)~24日(土).

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

特になし。