

平成21年 6月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007 ～ 2008
課題番号：19500261
研究課題名（和文） マスターキータンパク質を介するニューロン保護のノックアウトマウスを用いた証明
研究課題名（英文） Keap1/Nrf2 System Regulates Neuronal Survival as Revealed through Study of *keap1* Gene Knockout Mice
研究代表者
佐藤 拓己 (SATOH TAKUMI)
岩手大学・工学部・准教授
研究者番号：10300831

研究成果の概要：

Keap1/Nrf2 システムはニューロンにおいて、酸化ストレスに反応して、抗酸化酵素群を誘導する。この防御機構は、酸化ストレス条件下では、ニューロンの生存を決めると申請者は仮説を立てた。この仮説を、Keap1 のノックアウトマウスを用いて直接証明した。すなわち Keap1 は脳保護剤のターゲットとして最適であることを証明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：(1) Keap1 (2) Nrf2 (3) 親電子性物質 (4) 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

ニューロンには、転写を介した、酸化ストレスに対する防御機構が想定されているが、その「実体」は明らかではない。申請者は、転写因子 Nrf2 の活性化が、「実体のひとつ」ではないかと考えている (Sato T et al, PNAS 103:768-773, 2006)。Nrf2 は、活性酸素を消去する酵素（抗酸化酵素）群の誘導に中心的

な役割を果たす転写因子であるため、しばしば「マスターキータンパク質」と呼ばれる。マスターキータンパク質 Nrf2 は、活性酸素に脆弱であるニューロンの生存に必須であると考えられるが、未だ直接証明はない (Sato T and Lipton SA, Trends in Neurosci, *in press*)。「転写因子 Nrf2 を介した抗酸化

酵素群の誘導が、ニューロンの酸化ストレスに対する内因性の防御機構の実体である」ことを証明するためには、ノックアウトマウスを用いるのが最も直接的である。本研究はこのコンセプトに従って、マスターキータンパク質 Nrf2 及びその結合タンパク質 Keap1 のノックアウトマウスを用いて、マスターキータンパク質 Nrf2 がニューロンの生存の維持に必須であることを証明する。通常 Nrf2 は Keap1 と結合しているために Nrf2 は核内には移行できない。しかし酸化ストレスに暴露されると、Keap1 と Nrf2 は解離するため、Nrf2 は抗酸化酵素群を誘導することが可能になる（下図にシステムの概略を示した）。申請者は、この抗酸化酵素群の誘導が酸化ストレスに対する、ニューロンにおいて内因性の防御機構として機能すると考えている。

2. 研究の目的

ニューロンには、転写を介した、酸化ストレスに対する防御機構が想定されているが、その「実体」は明らかではない。申請者は、転写因子 Nrf2 の活性化が、「実体のひとつ」ではないかと考えている (Satoh T et al, PNAS 103:768-773, 2006)。Nrf2 は、活性酸素を消去する酵素（抗酸化酵素）群の誘導に中心的な役割を果たす転写因子であるため、しばしば「マスターキータンパク質」と呼ばれる。マスターキータンパク質 Nrf2 は、活性酸素に脆弱であるニューロンの生存に必須であると考えられるが、未だ直接証明はない (Satoh T and Lipton SA, Trends in Neurosci, 30:37-45 [2007])。「転写因子 Nrf2 を介した抗酸化酵素群の誘導が、ニューロンの酸化ストレスに対する内因性の防御機構の実体である」ことを証明するためには、ノックアウトマウスを用いるのが最も直接的である。本研究は Keap1 及び Nrf2 ノックアウトマウスを用いてこれを証明する。

3. 研究の方法

Keap1/Nrf2 システム（下図参照）はニューロンにおいて、酸化ストレスに暴露されたとき、抗酸化酵素群を誘導すると考えられる (Satoh T and Lipton SA, Trends in Neurosci, *in press*)。この防御機構は、ニューロンの生存を決める重要なシステムであると申請者は考えている。この仮説は創製分子 NEPP11 の研究を通じて得られたものだが (Satoh T et al, PNAS 103:768-773, 2006)、この仮説を、Keap1 及び Nrf2 のノックアウトマウスを用いて直接証明したい。通常 Keap1 は Nrf2 と結合して、Nrf2 の核内移行を抑制している。従って Keap1 ノックアウトマウスでは Nrf2 の恒常的な活性化が起こる。逆に Nrf2 ノックアウトマウスではこのシステムの恒常的な抑制が起こる。両ノックアウトマウスともに、ホモでは系統を維持できない。従ってヘテロで系統を維持しながら、ヘテロ同士を掛け合わせて、ホモの Embryo を得る必要がある。一腹の妊娠マウスから 1-2 匹のホモの Embryo しか得られないため、実験が計画よりも遅延する可能性がある。このときは Keap1 ノックアウトマウスを優先する。

4. 研究成果

Keap1 ノックアウトマウス由来の大脳皮質ニューロンにおいて以下のような性質を確認した。

(1) Keap1 はニューロンに発現していた。免疫染色によって、Keap1 蛋白質はニューロンに発現していることを確認した。

(2) Nrf2 は恒常的に核内移行していた。すなわち Nrf2 が恒常的に活性化していることを確認した

(3) Phase2 酵素群は恒常的に発現していた。Nrf2 が活性化するため、その制御下にある phase2 酵素群の発現が増加していることを確認した。

(4) 酸化ストレスに対して耐性が増加していた。Phase2 酵素群の殆どはレドックス調節に関与する酵素なので、酸化ストレスに対して耐性を獲得することを確認した。

以上の結果から、Keap1/Nrf2 経路はニューロン保護作用の創薬ターゲットとなることを証明した。

5. 主な発表論文等

(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3件)

1. Satoh T, Saitoh S, Hosaka M, Kosaka K. Simple ortho- and para-hydroquinones as compounds neuroprotective against oxidative stress in a manner associated with specific transcriptional activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 379: 537-541, 2009. 査読有
2. 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
3. Takahashi T, Tabuchi T, Tamaki Y, Kosaka K, Takikawa Y, Satoh T. Carnosic acid and carnosol inhibit adipocyte differentiation in mouse

3T3-L1 cells through induction of phase2 enzymes and activation of glutathione metabolism. *Biochem Biophys Res Commun.* 382(3):549-554 2009. 査読有

[学会発表] (計5件)

1. Takumi Satoh “Carnosic acid, a catechol-type electrophilic compound, protects neurons both in vitro and in vivo through activation of the Keap1/Nrf2 pathway via S-alkylation of targeted cysteines” Hirosaki Internatioal Forum of Medical Science. 2009年3月27日—28日 弘前大学医学部コミュニケーションセンター
2. Takahito Tabuchi, Toshiyuki Takahashi, Yousei Tamaki and Takumi Satoh “Stimulation of glutathione metabolism may be critical for the inhibition of adipocyte differentiation by carnosic acid and carnosol” Hirosaki Internatioal Forum of Medical Science. 2009年3月27日—28日 弘前大学医学部コミュニケーションセンター
3. Yousei Tamaki, Toshiyuki Takahashi, Takahito Tabuchi and Takumi Satoh “Carnosic acid protected HT22 cells against oxidative stress through the induction of phase2 enzymes and stimulation of glutathione metabolism” Hirosaki Internatioal Forum of Medical Science. 2009年3月27日—28日 弘前大学医学部コミュニケーションセンター
4. Toshiyuki Takahashi, Takahito Tabuchi, Yousei Tamaki and Takumi Satoh “Carnosic acid inhibited adipocytes differentiation through the induction of phase2 enzymes that regulate glutathione metabolism” Hirosaki

International Forum of Medical Science.
2009年3月27日—28日 弘前大学医学
部コミュニケーションセンター

5. Takumi Satoh “Carnosic acid, a catechol-type electrophilic compound, protects neurons both in vitro and in vivo through activation of the Keap1/Nrf2 pathway via S-alkylation of targeted cysteines”
Lipid peroxidation 2008. 2008年10月
15日—17日 軽井沢プリンスホテル

〔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〕

ホームページ

<http://www.wel.iwate-u.ac.jp/satoh/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 拓己 (SATOH TAKUMI)
岩手大学・工学部・准教授
研究者番号：10300831

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし