

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590340

研究課題名(和文)小胞体ストレス応答におけるNrf2システムの活性化：役割とメカニズムの解明

研究課題名(英文)Activation of the Nrf2 system in response to endoplasmic reticulum stress

研究代表者

小林 麻己人(Kobayashi, Makoto)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50254941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、小胞体ストレス応答におけるNrf2システムの生理的役割と、その活性化機構解明を目的に行った。生理的役割に関しては、小胞体ストレス自然発症系統pmm2it768とNrf2突然変異系統nrf2fh318の二重突然変異系統の表現型解析を行い、Nrf2システムが小胞体ストレスを抑制することを初めて実証した。活性化機構に関しては、ゼブラフィッシュ初期胚を用いた過剰発現解析及びノックダウン解析を行い、従来予想されていたものと異なり、PERK依存的にATF4タンパク質が蓄積することによりNrf2が活性化される、との新規モデルを提出できた。

研究成果の概要(英文)：The Aim of this research was to understand physiological roles and molecular mechanism of the Nrf2 activation in response to endoplasmic reticulum stress. We used two zebrafish mutant lines pmm2it768 and nrf2fh318 for this study: pmm2it768 shows spontaneous endoplasmic reticulum stress. We prepared and analyzed pmm2it768;nrf2fh318 double mutants and found that endoplasmic reticulum stress was increased in double mutants compared with pmm2it768 single mutants, indicating that Nrf2 plays significant roles in reducing endoplasmic reticulum stress. Next, we carried out gene-overexpression and -knockdown analyses, and demonstrated that co-overexpression of PERK and ATF4, but not PERK alone, could induce Nrf2 activation. Our results suggest that Nrf2 was activated by the accumulation of ATF4 protein via the PERK pathway, which is a different hypothesis from an existing model.

研究分野：分子発生生物学

キーワード：小胞体ストレス Nrf2システム ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

Nrf2 システムは、酸化ストレス防御の中心を担うストレス応答型転写機構である。Nrf2 システムは、全ての脊椎動物に存在し、酸化ストレス防御に働くと推測される。研究代表者は、Nrf2 システムがモデル動物ゼブラフィッシュにも保存されていることを実証し、その利点を活かした解析を行い、独自の成果を挙げてきた。その結果、Nrf2 システムが、複数のシグナル特異的センサー部位をもち、小胞体ストレスにも応答するマルチストレスセンサーであることを明らかにした。

2. 研究の目的

上記研究の過程で、Nrf2 システムが、酸化ストレスだけでなく小胞体ストレスにも応答して発動することを、遺伝学的に発見した。そこで、なぜ酸化ストレス防御機構である Nrf2 システムが、小胞体ストレスに応答して発動するのかという疑問が浮かび上がった。本研究は、小胞体ストレス応答における Nrf2 システムの生理的役割と、その活性化機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

小胞体ストレスと Nrf2 システムの関係理解のため、小胞体ストレス自然発症系統 *pmm2ⁱ¹⁷⁶⁸* と Nrf2 突然変異系統 *nrf2^{fh318}* の二重突然変異系統を作製し、表現型解析と遺伝子発現解析を行い、Nrf2 が機能不全の動物個体で、小胞体ストレスに対する防御がどうなるかを遺伝学的に明らかにする。また、分子生物学的解析が簡便・迅速に行えるゼブラフィッシュ初期胚を用いて、小胞体ストレスに応答した Nrf2 システムの活性化メカニズムを分子レベルで明らかにする。

4. 研究成果

本研究の遂行により、次の 2 点を明らかにした。

(1) Nrf2 システムが小胞体ストレスの軽減に作用することの証明

小胞体ストレスを自然発症する *pmm2ⁱ¹⁷⁶⁸* と Nrf2 突然変異系統 *nrf2^{fh318}* の二重突然変異系統を作製し、その表現型を解析した。二重ヘテロ変異系統は、生存・生殖ともに可能であり、さらに *pmm2ⁱ¹⁷⁶⁸* ヘテロ *nrf2^{fh318}* ホモの変異系統も同様であった。一方、二重ホモ変異系統に関しては、単独の *pmm2ⁱ¹⁷⁶⁸* ホモ系統と同様、孵化後 10 日から二週間で致死となった。

これらのことは、*pmm2ⁱ¹⁷⁶⁸* の致死性に対し、Nrf2 の機能破壊が影響しないことを示す。小胞体ストレスの状況を BiP 遺伝子発現などで解析したところ、*pmm2ⁱ¹⁷⁶⁸* 単独ホモ変異幼魚よりも、二重ホモ変異系統の方が、強い小胞体ストレスを発症していることがわかった。こ

れらの結果は、Nrf2 システムが小胞体ストレス抑制に何らかの機能を発揮しているものと推測させた。小胞体ストレスに対して、Nrf2 システムが応答することは知られていたが、抑制的に機能することは初めての観察であり、Nrf2 システムの新しい生体機能を見出したと言える。

(2) 小胞体ストレスによる Nrf2 システムの活性化は、PERK-ATF4 経路を介することの証明

小胞体ストレスによる Nrf2 システムの活性化は、従来リン酸化タンパク PERK による Nrf2 の直接リン酸化と予想されていた。ゼブラフィッシュ PERK 分子を単離し、過剰発現解析及びノックダウン解析を行った結果、活性化した PERK だけでは Nrf2 システムを活性化できないことがわかった。

次に、ゼブラフィッシュ ATF4 分子を単離し、過剰発現解析及びノックダウン解析を行った。その結果、PERK 依存的な ATF4 タンパク質の蓄積が、Nrf2 システムの活性化につながるとのモデルを提出できた。

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 8 件)

Tsujita, T., Li, L., Nakajima, H., Iwamoto, N., Nakajima-Takagi, Y., Ohashi, K., Kawakami, K., Kumagai, Y., Freeman, B. A., Yamamoto, M., Kobayashi, M. (2011) Nitro-fatty acids and cyclopentenone prostaglandins share strategies to activate the Keap1-Nrf2 system: a study using green fluorescent protein transgenic zebrafish. *Genes Cells* 16: 46-57. (doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01466.x) 査読有

Nakajima, H., Nakajima-Takagi, Y., Tsujita, T., Akiyama, S., Wakasa, T., Mukaigasa, M., Kaneko, H., Tamaru, Y., Yamamoto, M., Kobayashi, M. (2011) Tissue-restricted induction of Nrf2 and its target genes in zebrafish with gene-specific variations in the induction profiles. *PLoS ONE* 6: e26884. (doi:10.1371/journal.pone.0026884) 査読有

Ishitobi, H., Wakamatsu, A., Liu, F., Azami, T., Hamada, M., Matsumoto, K., Kataoka, H., Kobayashi, M., Choi, K., Nishikawa, S., Takahashi, S., Ema, M. (2011) Molecular basis for *Fik1* expression in hemato-cardiovascular

progenitors in the mouse. *Development* 138: 5357-5368.

(doi:10.1242/dev.065565) 査読有
田中 佐代子、小林 麻己人、三輪 佳宏。
(2012) 科学者によるサイエンスイラストレーション作成の実態。 *芸術研究報* 32: 59-70. 査読有

Mukaigasa, K., Nguyen, L.T.P., Li, L., Nakajima, H., Yamamoto, M., Kobayashi, M. (2012) Genetic evidence of an evolutionarily conserved role for Nrf2 in the protection against oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* 32: 4455-4461. (doi:

10.1128/MCB.00481-12) 査読有
田中 佐代子、小林 麻己人、三輪 佳宏。
(2014) 「科学者のためのビジュアルデザインハンドブック」の有用性と問題点。 *芸術研究報* 34: 35-46. 査読有

Ichijo, H., Hamada, M., Takahashi, S., Kobayashi, M., Nagai, T., Toyama, T., Kawaguchi, M. (2015) Lateralization, maturation, and anteroposterior topography in the lateral habenula revealed by ZIF268/EGR1

immunoreactivity and labeling history of neuronal activity. *Neurosci. Res.* 95: 27-37. (doi:

10.1016/j.neures.2015.01.005.)

査読有

Fuse, Y., Nakajima, H., Nakajima-Takagi, Y., Nakajima, O., Kobayashi, M. (2015) Heme-mediated inhibition of Bach1 regulates the liver specificity and transience of the Nrf2-dependent induction of zebrafish heme oxygenase 1. *Genes Cells* in press. (doi:

10.1111/gtc.12249.) 査読有

[学会発表](計 17 件)

向笠勝貴、Nguyen Linh Thi Phuong、李麗、中島瞳、小林麻己人: 酸化ストレスに対して高い感受性を示す Nrf2 変異ゼブラフィッシュ, 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011 年 12 月 13 日-16 日.

中島瞳、中島やえ子、小林麻己人: Nrf2 によるゼブラフィッシュヘムオキシゲナーゼ 1 の肝臓特異的な発現誘導, 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011 年 12 月 13 日-16 日.

Mukaigasa, K., Nguyen, L. T. P., Li, L., Nakajima, H., Kobayashi, M.: Genetic

evidences of an evolutionarily conserved role for Nrf2 in the protection against oxidative stress, UK-Japan Research Exchange Symposium "Molecular Mechanisms of Stress Response in Disease", Tsukuba, April 6-7, 2012.

Kobayashi, M.: Evolutionary aspects of Nrf2 in anti-oxidant strategies, UK-Japan Research Exchange Symposium "Molecular Mechanisms of Stress Response in Disease", Tsukuba, April 6-7, 2012.

Kobayashi, M., Watanabe, M., Takeuchi, M.: Histone demethylase LSD1 navigates hematopoietic commitment of the hemangioblast. 第 43 回日本発生生物学会第 64 回日本細胞生物学会合同年会, 神戸, 2012 年 5 月 28 日-31 日. Mukaigasa, K., Nguyen, L. T. P., Li, L., Nakajima, H., Kobayashi, M.: The zebrafish *nrf2* mutant: a novel genetic model for oxidative stress, 第 18 回小型魚類研究会, 京都, 2012 年 9 月 22 日-23 日.

Mukaigasa, K., Nguyen, P. T. L., Li, L., Nakajima, H., Kobayashi, M.: A novel zebrafish model of antioxidant defense mechanism. The Leading Graduate Schools International Conference 2012, Tsukuba, November 1-2, 2012.

Mukaigasa, K., Nguyen, P. T. L., Li, L., Nakajima, H., Kobayashi, M.: Nrf2-dependent indirect antioxidant effects of sulforaphene are conserved among vertebrates. 第 35 回日本分子生物学会年会, 博多, 2012 年 12 月 11 日-14 日.

小林麻己人: ゼブラフィッシュ研究. 第 7 回 XCIJ-MA 研究集会, 和光, 2013 年 3 月 10 日.

Mukaigasa, K., Nguyen, L. T. P., Li, L., Nakajima, H., Kobayashi, M.: The zebrafish *nrf2* mutant: a novel genetic model for oxidative stress. 第 44 回日本発生生物学会年会, 松江, 2013 年 5 月 28 日-31 日.

Mizumoto, K., Yamauchi, Y., Takeuchi, M., Hybertson, B. M., Kobayashi, M.: A dietary supplement Protandim protects zebrafish larvae against oxidative stress by activating the

Nrf2-ARE pathway. 第 19 回小型魚類研究会, 仙台, 2013 年 9 月 20 日-21 日.
Kobayashi, M.: Endoplasmic reticulum stress-dependent Nrf2 activation in a zebrafish model of human congenital disorder of glycosylation. International Conference on Environmental Response IV, Sendai, March 1-2, 2014
Kobayashi, M.: Study of the anti-multiple stress system Keap1-Nrf2 using zebrafish. 17th Transcription Assembly Meeting, Bangalore, India, March 17-18, 2014
Fuse, Y., Nakajima, H., Nakajima-Takagi, Y., Kobayashi, M. : Liver-specific induction of heme oxygenase 1 is mediated by heme and Bach1 in zebrafish. 第 20 回小型魚類研究会, 東京, 2014 年 9 月 20 日-21 日.
小林麻己人: ゼブラフィッシュを用いた医生物学研究. 第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム「マウス以外のモデル動物を使った医生物学研究」, 京都, 2014 年 10 月 16 日-18 日.
Fuse, Y., Nakajima, H., Nakajima-Takagi, Y., Kobayashi, M. : Bach1 and heme are involved in liver-specific and transient induction of heme oxygenase 1 in zebrafish. 第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014 年 11 月 25 日-27 日.
布施雄士、中島瞳、中島やえ子、小林麻己人: Nrf2 活性化時における転写抑制因子 Bach1 の機能解析および 2 種類の魚類 Bach1 ホモログの比較解析. 転写研究会 冬の若手ワークショップ 2015, 伊香保, 2015 年 2 月 5 日-7 日.

〔図書〕(計 1 件)

南山堂「医学大辞典」第 20 版(2015)分筆(秋澤忠男ら編)南山堂.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.md.tsukuba.ac.jp/MDBiology/mdbiol.index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 麻己人(KOBAYASHI, MAKOTO)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号: 50254941

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: