

平成 22 年 4 月 15 日現在

研究種目：学術創成研究費

研究期間：2007～2011

課題番号：19GS0312

研究課題名（和文） 酸素や食物が内包する毒性に対する細胞の適応・応答の分子機構の解明

研究課題名（英文） Molecular Mechanisms of Adaptive Responses to Food and Oxygen

研究代表者

山本 雅之 (YAMAMOTO MASAYUKI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50166823

研究代表者の専門分野：生化学、分子生物学、分子発生生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：環境応答、Nrf2、Keap1、酸化ストレス、低酸素、エリスロポエチン

## 1. 研究計画の概要

生体は、食物および酸素の内包する毒性やそれらの過不足に由来するストレスに対して、適切に応答して恒常性を維持している。これまでの解析によって、このようなストレスに対する防御系は、遺伝子の発現レベルで制御されていることが明らかとなっている。本研究は、環境ストレスに応答して転写制御が行われる際のセンサー機能の分子機構を明らかにすることを目的として、以下の2つのテーマで研究を実施している。

(1) Nrf2-Keap1 システムによるストレス感知機構および同システムと発癌との関連性の解析：Keap1 は、酸化ストレス・親電子性毒物に対するセンサー分子として機能し、転写因子 Nrf2 の活性化を制御している。Nrf2 と Keap1 のセンサーとしての分子機能を構造学的手法で明らかにする。また、これら分子のマウス個体での評価系を確立し、Keap1 のセンサーとして重要なシステイン残基の個体における重要性、Nrf2 の機能ドメインの解析を実施する。また、Keap1-Nrf2 システムの疾患との関連を明らかにする。

(2) エリスロポエチン (Epo) 遺伝子制御機構と低酸素感知機構の解析：低酸素に応答して遺伝子発現が誘導される Epo 遺伝子の制御機構を、大腸菌人工染色体を用いたトランスジェニックマウスの手法を用いて解明する。特に、腎臓での Epo 遺伝子の発現に注目し、その細胞特異的転写制御機構、産生細胞の同定、及びその株化を試みることで、新規の低酸素応答機構を解明する。

## 2. 研究の進捗状況

(1) Nrf2-Keap1 システムによるストレス感知機構および同システムと発癌との関連性の解析：構造生物学解析の成果として、Nrf2 が Keap1 分子と結合する際に、静電ポテンシャルの異なる2カ所の部位で相互作用することを明らかにした。また、オートファジーで蓄積する p62 タンパク質が Keap1 に結合する様子を明らかにし、その結果、Nrf2-Keap1 システムを活性化することを明らかにした。これは、新たな Nrf2-Keap1 システムを活性化させる分子機構として注目されている。また、電子線単粒子解析によって、2量体化した Keap1 分子全長の構造を可視化した。これにより、Keap1 のセンサーであるシステイン残基の配置について、重要な情報が得られた。マウス個体の解析として、外来性の Keap1 分子によって Keap1 欠失マウスをレスキューする解析系を樹立し、Keap1 分子のセンサーとして重要なシステイン残基の機能を個体レベルで明らかにした。Keap1 に存在する複数のシステイン残基は、親電子性物質の種類によって使い分けられており、その一端がこれらマウスの解析で明らかにされた。疾患との関連性では、喫煙による肺気腫に対して、Nrf2 が防御系として重要であること実証し、一方、肺がん細胞では、Keap1 と Nrf2 分子のそれぞれに本系を恒常的に活性化させる体性変異が高頻度に存在し、Nrf2-Keap1 系が癌細胞の増殖・生存に大きく寄与していることを明らかにした。また、当初の計画には含まれない成果として、Nrf2 と同じファミリーに属する Nrf1 の標的遺伝子の解析を実施し、これまでの予想と異なり、Nrf1 は Nrf2 とは異なる独自の遺伝子群を制御していることを、Nrf1 の遺伝子破

壊マウスの解析で明らかにした。

(2) Epo 遺伝子制御機構と低酸素感知機構の解析：腎臓において、Epo 遺伝子は間質に存在する極めて特殊な細胞 (REP 細胞) に特異的に発現していること、その特異性には、プロモーター近傍に存在する GATA 配列が重要であることを、大腸菌人工染色体 (BAC) のトランスジェニックマウスを用いた解析で明らかにした。腎臓での Epo 遺伝子特異的な発現制御領域の同定を、マウス個体レベルでの解析を実施し、細胞特異的な発現には、複数の制御領域が関与する可能性があることを明らかにした。また、Epo 産生 REP 細胞を単離し、遺伝子発現解析を通じて、その性質の解明を実施した。一方、単離した REP 細胞の株化を T 抗原の導入によって試みたが、本法では株化細胞樹立には至っていない。

### 3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

酸素センサーである Keap1 分子の構造学的解析を主要な計画として立案し、実際に Nrf2 分子との相互作用のメカニズムの詳細が明らかとなった。また、p62 分子による新たな Nrf2-Keap1 系活性化機構についても構造学的に実証した。当初の計画に従い、Keap1 分子機能のマウス個体での評価系を確立し、重要なシステインの同定に至った。さらに、Nrf2 と共通とされていた Nrf1 の標的遺伝子が異なるとする知見を得たことで、Nrf2 を含む CNC 因子群の標的遺伝子の選択性について、新たなモデルを提唱することができた。Epo 遺伝子の発現制御領域の解析では、腎臓の Epo 産生 REP 細胞特異的な発現制御機構の同定を試み、大きな進展があった。大腸菌人工染色体を用いたトランスジェニックマウスの解析がさらに進行中である。

### 4. 今後の研究の推進方策

当初の計画に従い、今後も構造学的解析とマウス個体レベル解析を併用することによって、Keap1 分子を含むタンパク質複合体のセンサー分子としての機能、Nrf2 分解複合体としての機能の両面を明らかにしていく予定である。また、Nrf2 分子のドメイン構造のマウス個体における解析を実施する。Nrf1 及び Nrf2 の標的遺伝子の際、その分子機構の解明についても、更なる検討を実施していく。

低酸素ストレス応答の分子機構については、現在作製中のトランスジェニックマウスの解析による重要エレメントの同定と腎臓 Epo 産生細胞の機能解析を継続する。低酸素応答機構の分子機構の一端が明らかにできるものと期待する。

### 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 122 件)

1. Tong KI, Padmanabhan B, Kobayashi A, Shang C, Hirotsu Y, Yokoyama S, and Yamamoto M. Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response. *Mol Cell Biol* **27**, 7511-7521 (2007) 査読有り
2. Yamamoto T, Suzuki T, Kobayashi A, Wakabayashi J, Mahe J, Motohashi H, and Yamamoto M. Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity. *Mol Cell Biol* **28**, 2758-2770 (2008) 査読有り
3. Obara N, Suzuki N, Kim K, Nagasawa T, Imagawa S, and Yamamoto M. Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood* **111**, 5223-5362 (2008) 査読有り
4. Ohtsui M, Katsuoka F, Kobayashi A, Aburatani H, Hayes JD, and Yamamoto M. NRF1 and NRF2 play distinct roles in activation of antioxidant response element-dependent genes. *J Biol Chem* **283**, 33554-33562 (2008) 査読有り
5. Ogura T, Tong KI, Mio K, Maruyama Y, Kurokawa H, Sato C, and Yamamoto M. Keap1 homodimer is a forked-stem structure with two large spheres enclosing the intervening, double glycine repeat, and C-terminal domains. *Proc Natl Acad Sci USA* **285**, 5417-5427 (2010) 査読有り
6. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, Sou Y.S., Ueno I, Sakamoto A, Tong K.I., Kim M, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Ueno T, Kominami E, Motohashi H, Tanaka K, Yamamoto M. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1 *Nature Cell Biol* **12**, 213-223 (2010) 査読有り

[学会発表] (202 件、うち国際学会 63 件、招待講演 68 件、)

[図書] (計 11 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] 国際学術集会を主催 (2009 年 2 月)