

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24249015

研究課題名(和文) ストレス応答性転写因子による代謝・病態制御

研究課題名(英文) Roles of stress-responsive transcription factors in health and disease

研究代表者

山本 雅之 (Yamamoto, Masayuki)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50166823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,500,000円

研究成果の概要(和文)：Nrf2を中心とした環境応答転写制御システムは、ストレス時に各種生命活動を結ぶハブとしての機能を活用し、基礎的な細胞機能制御ネットワーク形成にも大きく寄与しているという新しい仮説を提唱し、その検証と全容解明を目指して本研究を開始した。その結果、Keap1の反応性システイン残基が各種ストレスに対して選択的に利用されていることを解明した。また、内因性のシグナルがオートファジーを介してNrf2の活性を制御することを示した。さらに、Nrf2が臓器形成に重要な役割を果たす一方、これらの臓器における腫瘍や炎症などの病態進展においても鍵因子として機能していることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Transcription factor Nrf2 regulates a broad cytoprotective response to environmental stresses through induction of cellular defense enzymes. Keap1 is an adaptor protein for cullin3-based ubiquitin E3 ligase and negatively regulates Nrf2. This notion has been best demonstrated in animal models, showing that Nrf2-null mice are sensitive to a wide variety of electrophiles and reactive oxygen species (ROS). Keap1 possesses reactive cysteine residues that act as sensors for electrophilic and oxidative stresses. We have verified this model through structure biology, mouse/zebrafish genetics, and human cancer analyses. Elevated expression of NRF2 target genes confers advantages on the growth of cancer cells through the metabolic reprogramming. Thus, the Keap1-Nrf2 system opens a new avenue to the understanding of the signal transduction and regulatory processes underlying the stress response and cancer progression.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：酸化ストレス 転写制御

1. 研究開始当初の背景

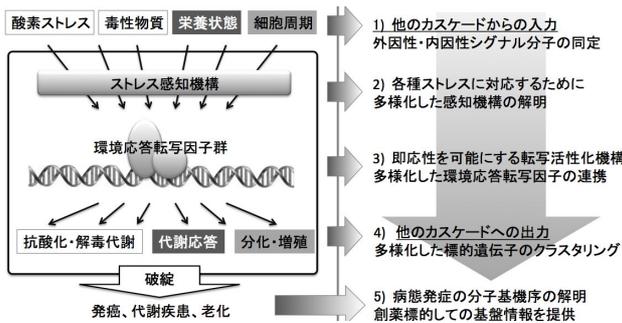
人間の産業活動によって生じた環境毒性物質、菌類・植物が産生する毒性物質、過剰な酸素が、癌や老化、生活習慣病等の発症や進展に関与することが様々な研究から示唆されていた。このような課題に対する基礎科学分野の取り組みとして、環境毒性物質や酸素ストレスが生体に及ぼす影響を正確に理解し、的確な対策を講じるための必要な分子メカニズムを解明することが学術的に重要であると考えられた。

研究代表者らは、酸素ストレスや毒性物質に応答した生体防御機構において、転写因子 Nrf2 が中心的役割を担っていることを見出し、その分子機構の解明において成果をあげていた。その研究過程において、Nrf2 による環境応答転写制御システムが、ストレス応答のみでなく、エネルギー代謝や細胞の分化・増殖などの様々な基礎的な生命活動と密接に関連していることに気づいた。

2. 研究の目的

Nrf2 を中心とした環境応答転写制御システムは、ストレス時に各種生命活動を結ぶハブとしての機能を活用し、基礎的な細胞機能制御ネットワーク形成にも大きく寄与しているという新しい仮説を提唱し、その検証と全容解明を目指して本研究を開始した。実際には、Nrf2 を中心とした転写制御ネットワーク構成の全体像を明らかにし、細胞周期や栄養状態などの各種シグナルが、どのように変換されて環境応答転写制御システムに伝達されるのか、その分子メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法



ストレス応答ネットワークの全容を明らかにする目的で、応答反応を大きく4つのステップに分類し、各ステップの分子機構の解析を行う(上図)。1) Nrf2 活性化シグナルの同定を目的に、細胞内局在の変化、安定性、リン酸化修飾等を介した Nrf2 活性化機構の解析を実施、2) 構造生物学的解析では、Keap1-Nrf2 を含むセンサー分子複合体の全容を明らかにする。3) Nrf2 の転写活性化機構に関与する因子の探索を行い、即応性の転写活性化機構を解明、4) 遺伝子発現解析、ChIP シークエンス解析を様々な細胞を用いて行い、ストレス応答性転写因子の標的遺伝子の網羅的な同定と、下流で機能する代謝等の経路を同定する。また、これら1~4)の情報を基に、5) ストレス応答機構の破綻による病態モ

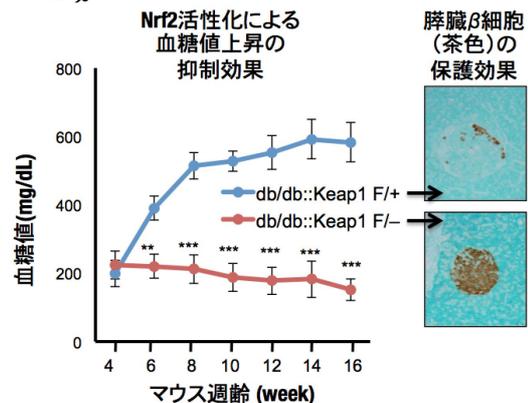
デルの解析を行い、疾患発症の分子機構を解析する。

4. 研究成果

Keap1-Nrf2 制御系の分子機構に関しては、Keap1 の反応性システイン残基の変異マウスを樹立・解析し、各種ストレスに対するシステイン残基の選択的利用の実態を個体レベルで解明した。また、Nrf2 および同族因子である Nrf1 や NF-E2 p45 のゲノム上での結合部位を ChIP-seq 法によって網羅的に同定し、標的遺伝子の選択性を解明した(Fujita et al. MCB; Tsujita et al. MCB; Hirotsu et al. MCB; Hirotsu et al. Nucleic Acid Res.)。

また、酸化ストレスのセンサー分子であり、Nrf2 の分解を促す因子 Keap1 が選択的オートファジーのシャペロンタンパク質である p62 と結合し、オートファジーにより分解されることを明らかにした(Ichimura et al. Mol Cell; Taguchi et al. PNAS)。この成果から、内因性のシグナルであるオートファジーが Nrf2 の活性を制御することが示された。

Nrf2 欠損マウスを用いた動物個体レベルの解析を行い、Nrf2 が肺や食道の臓器形成に重要な役割を果たす一方、これらの臓器における腫瘍の進展においても鍵因子として機能していることを見いだした(Shirasaki et al. Hepatology; Satoh et al. Cancer Res; Mitsuishi et al. Cancer Cell)。



db/db : 肥満モデルマウス

Keap1 F-/- : Keap1ノックダウンマウス(Nrf2恒常活性化)

Nrf2 と腫瘍以外の病態との関連を示すことにも成功した。糖尿病モデルとして iNOS-Tg マウスを用いて、Nrf2 が膵β細胞の保護や全身性の代謝制御に深く関与していることを見いだした(上図: Yagishita et al. Diabetes; Uruno et al. MCB)。また、腎臓における Nrf2 の役割を検討したところ、炎症環境において尿細管細胞を保護していることを見いだした(投稿準備中)。さらに、炎症性のマクロファージにおいては、IL-1b, IL-1a, IL-6 などのサイトカイン遺伝子の発現を Nrf2 が抑制することを明らかにした(投稿

準備中)。これまでの研究では、Nrf2 は転写活性化因子としての機能が知られていたが、本研究によって転写抑制能も有することが明らかとなった。

細胞運命決定における Nrf2 の役割を検討するために、Nrf2 および Keap1 の欠損マウスを用いて骨髓造血細胞の解析を行った。その結果、Nrf2 は造血幹細胞を減少させ、造血前駆細胞を増加させることが明らかとなった。また、骨髓球系への選択的な分化を誘導することも見いだした。このように、非ストレス環境下でも Nrf2 は細胞運命決定において必須であることが示された。

これまでに得られた成果を活用し、創薬に向けた研究も開始した。本研究中に、低酸素応答系や Keap1-Nrf2 系を標的とした化合物スクリーニング系を確立した。

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 81 件) 全て査読あり

1. de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Ahn H, Hagey LR, Romanoski CE, Lee RG, Graham MJ, Motohashi H, Yamamoto M, and Edwards PA. MAFG Is a Transcriptional Repressor of Bile Acid Synthesis and Metabolism. *Cell Metab.* 21, 298-310, 2015 (DOI: 10.1016/j.cmet.2015.01.007)
2. Nishikawa K, Iwamoto Y, Kobayashi Y, Katsuoka F, Kawaguchi S, Tsujita T, Nakamura T, Kato S, Yamamoto M, Takayanagi H, and Ishii M. DNA methyltransferase 3a regulates osteoclast differentiation by coupling to an S-adenosylmethionine-producing metabolic pathway. *Nat Med.* 21, 281-287, 2015 (DOI: 10.1038/nm.3774)
3. Taguchi K, Hirano I, Itoh T, Tanaka M, Miyajima A, Suzuki A, Motohashi H, and Yamamoto M. Nrf2 enhances cholangiocyte expansion in Pten-deficient livers. *Mol Cell Biol.* 34, 900-913, 2014 (DOI: 10.1128/MCB.01384-13)
4. Fukutomi T, Takagi K, Mizushima T, Ohuchi N, and Yamamoto M. Kinetic, thermodynamic and structural characterizations of association between Nrf2-DLGex Degron and Keap1. *Mol Cell Biol.* 34, 832-846, 2014 (DOI: 10.1128/MCB.01191-13)
5. Yagishita Y, Fukutomi T, Sugawara A, Kawamura H, Takahashi T, Pi J, Uruno A, and Yamamoto M. Nrf2 protects pancreatic β -cells from oxidative and nitrosative stress in diabetic model mice. *Diabetes.* 63, 605-618, 2014 (DOI: 10.2337/db13-0909)
6. Shirasaki K, Taguchi K, Unno M, Motohashi H, and Yamamoto M. Nrf2 promotes compensatory liver hypertrophy after portal vein branch ligation in mice. *Hepatology.* 59, 2371-2382, 2014 (DOI: 10.1002/hep.27020)
7. Yamazaki H, Suzuki M, Otsuki A, Shimizu R, Bresnick EH, Engel JD, and Yamamoto M. A remote GATA2 hematopoietic enhancer drives leukemogenesis in inv(3)(q21;q26) by activating EVI1 expression. *Cancer Cell.* 25, 415-427, 2014 (DOI: 10.1016/j.ccr.2014.02.008.)
8. Tsujita T, Peirce V, (5 名), Uruno A, Yamamoto M, and Hayes JD. Transcription factor Nrf1 negatively regulates the cystine/glutamate transporter and lipid-metabolizing enzymes. *Mol Cell Biol.* 34, 3800-3816, 2014 (DOI: 10.1128/MCB.00110-14.)
9. Suzuki N, Hirano I, Pan X, Minegishi N, and Yamamoto M. Erythropoietin production in neuroepithelial and neural crest cells during primitive erythropoiesis. *Nature Commun.* 4, 2902, 2013 (DOI: 10.1038/ncomms3902)
10. Ichimura Y, Waguri S, (16 名) Yamamoto M, and Komatsu M. Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Mol Cell.* 51, 618-631, 2013 (DOI: 10.1016/j.molcel.2013.08.003)
11. Souma T, Yamazaki S, Moriguchi T, Suzuki N, (6 名), and Yamamoto M. Plasticity of renal erythropoietin-producing cells governs fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 24, 1599-1616, 2013 (DOI: 10.1681/ASN.2013010030)
12. Yamazaki S, Souma T, Hirano I, Pan XQ, Minegishi N, Suzuki N, and Yamamoto M. A mouse model of adult-onset anaemia due to erythropoietin deficiency. *Nature Commun.* 4, 1950, 2013 (DOI: 10.1038/ncomms2950)
13. Uruno A, Furusawa Y, (3 名) Negishi T, Sugawara A, Kensler TW, and Yamamoto M. The Keap1-Nrf2 system prevents onset of diabetes mellitus. *Mol Cell Biol.* 33, 2996-3010, 2013 (DOI: 10.1128/MCB.00225-13)
14. Fujita R, Takayama-Tsujimoto M, Satoh H, Gutiérrez L, Aburatani H, Fujii S, Sarai A, Bresnick EH, Yamamoto M, and Motohashi H. NF-E2 p45 is important for establishing normal function of platelets. *Mol Cell Biol.* 33, 2659-2670, 2013 (DOI: 10.1128/MCB.01274-12)
15. Satoh H, Moriguchi T, Takai J, Ebina M, and Yamamoto M. Nrf2 prevents initiation but accelerates progression through the Kras signaling pathway during lung carcinogenesis. *Cancer Res.* 73, 4158-4168, 2013 (DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4499)
16. Suzuki T, Shibata T, Takaya K, Shiraishi K, Kohno T, Kunitoh H, Tsuta K, Furuta K, Goto K, Hosoda F,

- Sakamoto H, Motohashi H, and Yamamoto M. Regulatory nexus of synthesis and degradation deciphers cellular Nrf2 expression levels. *Mol Cell Biol*. 33, 2402-2412, 2013 (DOI: 10.1128/MCB.00065-13)
17. Hirotsu Y, Hataya N, Katsuoka F, Yamamoto M. NF-E2-related factor 1 (Nrf1) serves as a novel regulator of hepatic lipid metabolism through regulation of the Lipin1 and PGC-1 β genes. *Mol Cell Biol*. 32, 2760-2770, 2012 (DOI: 10.1128/MCB.06706-11)
 18. Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, Shibata T, Nukiwa T, Aburatani H, Yamamoto M, Motohashi H. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell*. 22, 66-79, 2012 (DOI: 10.1016/j.ccr.2012.05.016)
 19. Taguchi K, Fujikawa N, Komatsu M, (2名), Akaike T, Motohashi H and Yamamoto M. Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109, 13561-13566, 2012 (DOI: 10.1073/pnas.1121572109)
 20. Hirotsu Y, Katsuoka F, Funayama R, Nagashima T, Nishida Y, Nakayama K, Douglas Engel J, Yamamoto M. Nrf2-MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks. *Nucleic Acids Res* 40, 10228-10239, 2012 (DOI: 10.1093/nar/gks827)
 21. Harada N, Ito K, Hosoya T, (7名), Yamamoto M, and Itoh K. Nrf2 in bone marrow-derived cells positively contributes to the advanced stage of atherosclerotic plaque formation. *Free Radic Biol Med*. 53, 2256-2262, 2012 (DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.001)
- 〔学会発表〕(計 307 件)
1. 山本雅之. Keap1-Nrf2 制御系と発がん. 第 73 回日本癌学会学術総会 モーニングレクチャー, パシフィコ横浜 (横浜), 2014 年 9 月 27 日
 2. Yamamoto M. Molecular Basis of the Keap1-Nrf2 System Regulating Environmental Stress Response. The 61st Nobel Conference, Stockholm, Sweden, October 8, 2014
 3. 山本雅之. 酸素と医学, レドックスシンポジウム 特別講演, 名古屋大学 ES 総合館 ES ホール (名古屋), 2014 年 10 月 11 日
 4. Yamamoto M. Nrf2-Keap1- A regulator of redox signaling. 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International, Kyoto, March 25, 2014
 5. Yamamoto M. Renal Erythropoietin Producing Cells for Anemia and Fibrosis. International Society of Nephrology Nexus Symposium, Bergamo, Italy, April 3-7, 2014
 6. Yamamoto M. Recent progress in the Keap1-Nrf2 system. The Environmental Response, Sendai, Japan, February 28, 2014
 7. 山本雅之. 環境ストレスに対する生体応答メカニズムの解明. 第 30 回高峰カンファレンス(第 11 回高峰記念第一三共賞受賞記念講演), 東京會館 (東京), 2014 年 3 月 7 日
 8. Yamamoto M, Suzuki T, Taguchi K, Suzuki M, Motohashi H. The Keap1-Nrf2 System for Environmental Response. The 35th Naito Conference, The Ubiquitin-Proteasome System: From Basic Mechanisms to Pathophysiological Roles, Chateraise Gateaux Kingdom, Sapporo, June 9-12, 2013
 9. Yamamoto M. Biological response to oxidative stress. The 3rd International Conference on Anti-Aging Medicine, パシフィコ横浜 (横浜), June 29, 2013
 10. Yamamoto M. Inducible and Tissue-specific Erythropoietin Gene Regulation. 4th International Symposium of the Collaborative Research, Regensburg, Germany, July 19, 2013
 11. 山本雅之. 酸化ストレス応答の分子メカニズムと病態. 第 50 回日本臨床分子医学会学術集会, 東京国際フォーラム (東京), 2013 年 4 月 13 日
 12. Yamamoto M. Molecular Mechanisms of the Keap1-Nrf2 Pathway in Stress Response and Cancer Evolution. Pittsburg, USA, March 19, 2013
 13. Hirotsu Y, Katsuoka F, Funayama R, Nagashima T, Nishida Y, Nakayama K, Douglas Engel J, Yamamoto M. Genome-wide analysis of antioxidant response element dependent gene regulation mediated by the Nrf2-MafG heterodimer. The 4th EMBO Meeting Nice, France, Sep.22-25, 2012
 14. Satoh H, Moriguchi T, Ebina M, and Yamamoto M. Nrf2 deficiency reduces lung adenocarcinoma progression through suppressing Kras pathway and lung development genes expression. 第 71 回日本癌学会学術総会, ホテルロイトン札幌 (札幌), 2012 年 9 月
 15. 山本雅之. Molecular Basis Connecting Environmental Stress to Gene Expression Regulation. 第 85 回日本生化学会大会シンポジウム, 福岡国際会議場 (福岡), 2012 年 12 月 16 日
 16. 山本雅之. Keap1-Nrf2 系機能の分子および遺伝学基盤. 日本遺伝学会 84 回大会, 九州大学 (福岡), 2012 年 9 月 26 日
 17. 山本雅之. Keap1-Nrf2 システム機能の分子構造基盤. 第 71 回日本癌学会学術総会シンポジウム, ホテルロイトン札幌 (札幌), 2012 年 9 月 20 日

18. Yamamoto M. Molecular Basis of Keap1-Nrf2 System Function. 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX-VI), Sendai International Convention Center, Sendai, Japan, July 18-20, 2012
19. Yamamoto M. Keap1-Nrf2 system and hematopoiesis. The 18th Hemoglobin Switching Meeting, Asilomar Conference Grounds, California, USA, June 8-10, 2012
20. Yamamoto M. Molecular Basis of Keap1-Nrf2 System Function. Oxygen Club California Conference, Alba, Italy, June 20-23, 2012
21. Yamamoto M. Keap1-Nrf2 System: A Master Regulator of Redox Signaling. The 33rd NAITO Conference on "Oxygen Biology: Hypoxia, Oxidative Stress and Diseases." Chateraise Gateaux Kingdom SAPPORO, Sapporo, June 26-29, 2012.
22. 山本雅之. Nrf2 酸化ストレス応答系による病態制御. 第 53 回神経学会学術大会 教育講演, 東京国際フォーラム(東京), 2012 年 5 月 24 日

〔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〕

ホームページ等

<http://www.dmbc.med.tohoku.ac.jp/official/index.html>

6 . 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

勝岡 史城 (KATSUOKA, Fumiki)
東北大学 東北メディカルメガバンク機構・准教授
研究者番号 : 30447255
(平成 24 年度のみ)

(3)連携研究者

宇留野 晃 (URUNO, Akira)
東北大学 大学院医学系研究科・講師
研究者番号 : 90396474

鈴木 教郎 (SUZUKI, Norio)
東北大学 大学院医学系研究科・講師
研究者番号 : 20447254