

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19890035
 研究課題名(和文) 転写因子 Nrf2 および小 Maf 群因子のドメイン構造・機能相関の解明
 研究課題名(英文) Functional domain analysis of Nrf2 and small Maf proteins
 研究代表者
 勝岡 史城 (KATSUOKA FUMIKI)
 東北大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：30447255

研究成果の概要：bZIP 型転写因子である小 Maf 群因子は、Nrf2 と二量体となり、抗酸化剤応答配列(Antioxidant response element)に結合し、酸化ストレス応答・異物代謝系酵素群の遺伝子の転写を正に制御している。本研究では、小 Maf 群因子の一つ MafG を発現するトランスジェニックマウスを作製し、小 Maf 群因子三重欠失マウスの表現型をレスキュー(トランスジェニック相補レスキュー)することに成功した。また MafG の SUMO 化部位変異体を発現するトランスジェニックマウスに相補レスキュー解析の結果、同修飾は、MafG の個体の発生、生存には必須ではないことを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,320,000	0	1,320,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態医化学

キーワード：転写制御 環境 ストレス 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

生命は、個体の発生、分化、生存において、常に外界の環境の変化に対応し、時には、外界の環境ストレスだけではなく、内因性の様々ストレスから自己を防御することで、その活動を維持している。その環境に対する適応の破綻が、様々な疾患の発症の原因となる。従って、このようなストレスに対する生体防御機構の解明は、研究開始当初だけでなく、現在においても極めて重要な研究テーマである。

このような生体防御系は、しばしば遺伝子

の発現制御レベル(転写レベル)で厳密に制御されている。Basic region-leucine zipper (bZIP)型転写因子である Nrf2 と小 Maf 群因子は、生体防御遺伝子の発現制御において、中心的な役割をするタンパク質である。遺伝学的な解析によって、Nrf2 欠失マウスでは、酸化ストレスや異物代謝系に関わる酵素群の遺伝子の一群の発現が著明に減少していることを報告されている。また、研究代表者らは、小 Maf 群三重欠失マウスを作製・解析し報告している。小 Maf 群因子三重欠失マウスは、胎生 11.5 日周辺で致死である。胎

仔線維芽細胞を樹立し、酸化ストレス・異物代謝酵素群の発現を解析したところ、ストレスに対する誘導能が完全に消失していることを明らかにした。これらの結果は、Nrf2 と小 Maf 群因子のヘテロ二量体が、生体防御関連遺伝子の発現誘導に極めて重要な役割を果たしていることを示している。

遺伝子破壊マウスの解析結果が集積された当時、研究代表者は、次ぎなる課題は、Nrf2 と小 Maf 群因子のドメインの構造・機能相関の解析であると考えた。ドメインとは、タンパク質の機能に、あるいは、他の DNA・タンパク質との相互作用に重要な領域のことを指す。これまでの解析で、Nrf2 には、転写活性化に重要なドメインが複数あることが示されていたが、その詳細は不明であった。また、小 Maf 群因子は、その N 末側に Small Ubiquitin-related modifier (SUMO) の修飾部位があり、実際に SUMO 化修飾されることが明らかにされていた。しかし、この SUMO 化修飾部位のマウス個体における機能は、明らかに。

2. 研究の目的

(1) Nrf2、小 Maf 群因子の各ドメインの機能貢献をマウス個体レベルでの解析を実施することを目的に、Nrf2 欠失マウスの肝臓特異的相補レスキュー系の確立と、小 Maf 群因子三重欠失マウスの相補レスキュー系を確立することを当初の目的とした。相補レスキューとは、内在性の遺伝子を破壊したマウスに、外来性の遺伝子を導入して相補的にレスキューする手法である。

(2) Nrf2、小 Maf 群因子の野生型分子によって、それぞれの遺伝子欠失マウスの表現型がレスキューされた場合、相補レスキューが確立されたと見なされる。よって、構築された相補レスキュー系を用いて、ドメインの変異体による相補レスキューを実施し、表現型の解析から、ドメインのマウス個体における機能貢献を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 食道上皮などでの Nrf2 の恒常的な活性化は、過角化によってマウスが致死となることが報告されている。一方、肝臓での Nrf2 の恒常的な活性化は、致死とならない。相補レスキューの際に、Nrf2 変異体が恒常的な活性化体になる可能性も視野にいれ、肝臓特異的相補レスキュー系の確立を計画した。アルブミン遺伝子の制御領域は、肝臓特異的な遺伝子発現を再現することが報告されている。同制御領域で Nrf2 を発現するトランスジェニックマウスを作製し、Nrf2 欠失マウスと交配することで、肝臓特異的 Nrf2 欠損相補レスキューを実施する。

(2) 小 Maf 群因子は、その存在量が、転写に対して大きく影響することが知られている。従って、相補レスキュー系に用いる遺伝子発現制御領域は、小 Maf 群因子自身のものを用いることが望ましい。この目的で、MafG 遺伝子の制御領域 (MafG gene regulatory domain: MGRD) を単離し、同制御領域の下で β ガラクトシダーゼ (LacZ) 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作製する。LacZ の発現が内在性の発現を再現していることが確認された場合は、同制御領域で外来性の MafG を発現するトランスジェニックマウス MGRD-MafG を作製し、小 Maf 群因子三重欠失マウスとの交配により、相補レスキューを試みる (図 1)。G1KOFO とは、MafG 遺伝子をヘテロに持ち、MafK、MafF 遺伝子がホモで欠失したマウスを言う。このマウスは、正常に出生し、交配可能であることを確認している。

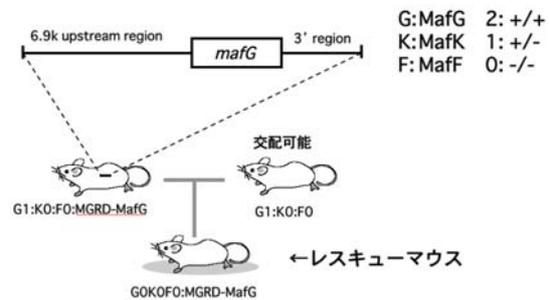


図1 小Maf群因子三重欠失マウス相補レスキュー系

4. 研究成果

(1) 肝臓特異的な制御領域として、アルブミン遺伝子の制御領域を利用して、Nrf2 を発現するトランスジェニックマウスを作製した。しかし、肝臓における外来性の Nrf2 の発現をウェスタンブロットで解析した結果、同制御領域では、Nrf2 を充分量発現させることが困難であることが明らかとなった。従って、本申請期間内に、Nrf2 欠失マウスの相補レスキュー系の確立には至らなかった。本研究に関しては、条件付きに Nrf2 変異体を発現するような遺伝子構築作製し、内在性の Nrf2 遺伝子座に ES 細胞を用いた相同組換えの手

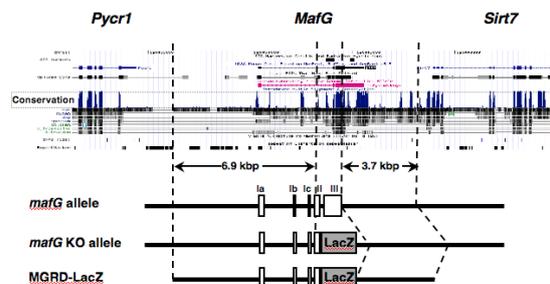


図2 mafG 遺伝子制御領域を用いたトランスジェニック構築の作成

法によって導入し、マウス個体での Nrf2 のドメイン機能解析を計画している

(2) MafG 遺伝子の制御領域として、同遺伝子転写開始地点上流 6.9kbp、及び下流領域 3.7kbp を、マウスファージゲノムライブラリーより単離し MGRD とした (図 2)。MGRD によって、LacZ 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作製し、LacZ 染色を実施した結果、LacZ 染色部位は、これまでに報告されている MafG 遺伝子の発現部位とほぼ一致することが明らかとなった。よって、単離した制御領域 MGRD に、内在性の MafG の発現を再現するために十分な領域が含まれていることが明らかとなった。次に、MGRD によって、野生型の MafG を発現するトランスジェニックマウス MGRD-MafG を複数系統樹立した。MGRD-MafG マウスは、外来性の MafG を内在性



←GOKOFO :MGRD-MafG

←G2KOFO

解析した 総匹数	GOKOFO		期待される 匹数
	MGRD-MafG (-)	MGRD-MafG (+)	
系統1	26	5	3.3
系統2	86	13	10.8
系統3	85	16	10.6

図3 MGRD-MafGにより小Maf群因子三重欠失マウスの致死性は回避される

の MafG の発現分布、発現量をほぼ再現して発現すること、各組織より抽出したタンパク質を用いたウェスタンブロットにて確認した。また、同マウスによって小 Maf 群因子の三重欠失マウスの致死性の表現型をレスキューできることを確認した (図 3)。

また、組織学的な解析、血液学的な解析によっても、明らかな表現型は観察されなかった。従って、小 Maf 群因子三重欠失マウス相補レスキュー系の確立に成功したと言える。

(3) 次に、魚類からヒト・マウスまで進化上保存された小 Maf 群因子の SUMO 化修飾部位の重要性を上記相補レスキュー系を用いて検討した (図 4)。SUMO 化部位である 14 番目のリジン残基をアラニン残基に置換した変異 MafG を発現するトランスジェニックマウスを複数系統樹立した。野生型と同様に小 Maf 群因子三重欠失との交配による相補レスキュー解析を実施したところ、小 Maf 群因子の致死性を完全に回避することが明らかとなった。また、このレスキューマウスは、成獣において著しい表現型を示さなかった。したがって、小 Maf 群因子の SUMO 化修飾は、個体の発生・生存には必須ではないことが示

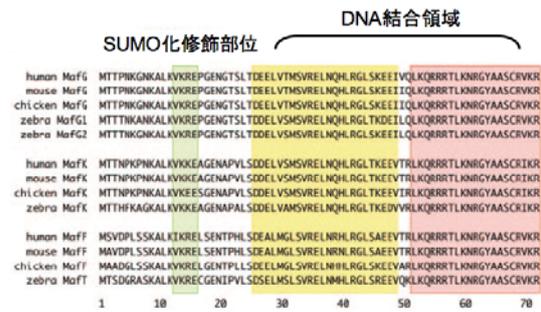


図4 進化上保存された小Maf群因子のSUMO化修飾部位

唆された。SUMO 化修飾のうち、特に SUMO-2/3 修飾は、ストレス刺激で誘導されると報告されている。申請者らは、先に、小 Maf 群因子の SUMO 化修飾が、SUMO-2/3 化であることを同定している。従って、小 Maf 群因子の SUMO 化修飾が、定常状態では必須ではないが、ストレス時により重要となる可能性が充分考えられる。現在、各種ストレス負荷に対する SUMO 化部位変異 MafG レスキュー個体の反応性を詳細に解析することを計画している。

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 4 件)

①Makiko Ohtsuji, Fumiki Katsuoka (以下 4 名省略) Nrf1 and Nrf2 play distinct roles in activation of antioxidant response element-dependent genes. *Journal of Biological Chemistry*. 283, 33554-33562 (2008) 査読有り

②Takashi Mamiya, Fumiki Katsuoka (以下 8 名省略) Hepatocyte-specific deletion of heme oxygenase-1 disrupts redox homeostasis in basal and oxidative environments. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 216, 331-339 (2008) 査読有り

③Melinda S Yates, Masafumi Tauchi, Fumiki Katsuoka (以 11 名省略) Pharmacodynamic characterization of chemopreventive triterpenoids as exceptionally potent inducers of Nrf2-regulated genes. *Molecular Cancer Therapeutics*. 6, 154-62 (2007) 査読有り

④Momoko Kimura, Tae Yamamoto, Jianyong Zhang, Ken Itoh, Motoki Kyo, Terue Kamiya, Hiroyuki Aburatani, Fumiki Katsuoka (以下 4 名省略) Molecular basis distinguishing the DNA binding profile of Nrf2-Maf heterodimer from that of Maf

homodimer. Journal of Biological Chemistry 282, 33681-33690 (2007) 査読有り
〔学会発表〕(計4件)

①中山博未, 勝岡史城, 山本雅之. マウス個体を用いた小Maf群因子の機能解析. 遺伝情報DECODE・転写研究会共催冬のワークショップ 2009, 2009年1月19日 湯沢

②勝岡史城, 中山博未, 本橋ほづみ, 山本雅之. 小Maf群因子三重欠失細胞レスキュー系を用いた小Maf群因子の機能解析 第31回日本分子生物学会年会, 第81回日本生化学会大会・合同大会 2008年12月11日 神戸

③中山博未, 勝岡史城, 山本雅之. 小Maf群因子三重欠失マウスレスキュー系による小Maf因子の標的遺伝子抑制機構の検討 第31回日本分子生物学会年会, 第81回日本生化学会大会・合同大会 2008年12月11日 神戸

④勝岡史城, 中山博未, 本橋ほづみ, 山本雅之. Nrf2の核安定局在化における小Maf群因子の重要性の検討 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会・合同大会 2007年12月12日 横浜

〔図書〕(計1件)

①勝岡史城, 山本雅之, 他 転写因子. タンパク質の辞典 (朝倉書店) 2008年07月10日 分担執筆

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝岡 史城 (KATSUOKA FUMIKI)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 30447255

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし