

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

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

研究成果の概要（和文）：生体は、環境ストレスに適切に応答して恒常性を維持している。本研究は、酸化ストレス・異物に対するセンサーである Keap1-Nrf2 システムを検証し、ストレス感知の新たな分子機構、疾患との関連を明らかにした。また、低酸素ストレスについては、エリスロポエチン遺伝子の発現制御を通じて、組織ごとに異なる多様な低酸素応答に対する遺伝子発現制御機構について新たな知見を得た。

研究成果の概要（英文）：Environmental stress response system allows organisms to keep cellular homeostasis. In this study, we examined Keap1-Nrf2-mediated oxidative and xenobiotic defense system, and identified novel molecular mechanisms for stress-sensing system and their association with diseases. We also identified diverse and elaborate gene regulatory mechanisms in response to hypoxic stress through the comprehensive analysis of erythropoietin gene regulatory regions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	53,700,000	16,110,000	69,810,000
2008年度	85,600,000	25,680,000	111,280,000
2009年度	89,500,000	26,850,000	116,350,000
2010年度	89,500,000	26,850,000	116,350,000
2011年度	80,600,000	24,180,000	104,780,000
総計	398,900,000	119,670,000	518,570,000

研究分野：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. 研究開始当初の背景

私たちの体は、摂取している食物および酸素の内包する毒性やそれらの過不足、すなわち、環境ストレスに対して、機敏に応答して恒常性を維持している。生体が環境変化を感知し、それらに反応して、恒常性維持のための防御システムを発動させる仕組みの解明は、多くの疾病の病態解明に繋がる重要課題である。環境変化を感知した細胞では、センサーから

の指令を受けて転写因子が活性化され、応答に必要な遺伝子群の転写を活性化する。ここでの重要知見は、これらの環境応答の分子基盤を形成しているのは、誘導的な遺伝子発現であること、即ち、生体防御酵素群の誘導発現はまさに環境応答の中心的役割を担うシステムであることである。したがって、上述の転写因子群は「環境応答転写因子」とも呼ばれる。

食餌性毒物（「親電子性物質」）や酸化スト

レスは DNA 損傷を引き起こすことから、癌や老化に深く関与することが示唆されてきた。しかし、これらのストレスを感知するセンサーやそれに応答する転写因子は長く不明であったため、本ストレス応答系の解析は停滞していた。研究開始までに、我々は遺伝子改変マウスを用いた実証的な解析により、親電子性物質や酸化ストレスに対する応答系では Keap1-Nrf2 が環境応答転写因子の役割を果たしていることを明らかにしてきた。しかし、分子メカニズムの解明は、さらに十分に検証・解明される必要があった。また、低酸素応答に関わる新規のシステムが腎臓の特有の細胞に存在することが示されていたが、その詳細も不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究は、(1) 酸化ストレス・異物に対する応答機構の解明と、(2) 低酸素ストレスに対する応答機構の解明という、大きな2つのテーマに焦点を当てて実施された。

(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いての重要性、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、マウス個体レベルで包括的に解析する。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。

## 3. 研究の方法

(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

①構造生物学的解析による Keap1 複合体の機能の解明：Keap1 は Cul3 と E3 ユビキチンリガーゼ複合体を形成し、Nrf2 をプロテアソーム依存的に分解する。Keap1 は、反応性の高い

システイン残基を複数有しており、これらが親電子性物質に対するセンサーとして機能している。Keap1 全長、および Keap1 を含むタンパク質複合体の構造を、X 線結晶構造解析、NMR 解析等の手法で解析し、センサー分子としての、また、Nrf2 の分解酵素複合体としての構造機能相関を解析する。

### ②マウス個体を用いた Keap1 の機能解明

個体レベルでの Keap1 分子の機能評価系を樹立し、Keap1 分子が有するシステイン残基の機能貢献を明らかにする。複数存在するシステイン残基は、様々な親電子性物質に対して応答するため、システインコードの存在が示唆されるので、これを検証する。

③Nrf2-Keap1 システムと疾患との関連 Keap1 遺伝子、および Nrf2 遺伝子の変異と、肺癌等の様々な疾患との関連が示唆されている。Keap1-Nrf2 システムの破綻による疾患モデルを作製し、その表現型や癌発症について解析する。また、ヒト疾患に対する Keap1-Nrf2 システムの寄与を明らかにする。

(2) Epo 遺伝子制御機構と新規低酸素感知機構の解明

### ①腎における Epo 遺伝子制御機構の解明

Epo は、肝実質細胞ならびに腎臓の間質に存在する特殊な細胞において極めて特異的発現している。また、その遺伝子発現は、貧血、低酸素等の刺激により誘導される。この遺伝子発現制御機構を解析するために、プラスミドを用いた一般的なトランスジェニックマウスだけでなく、大腸菌人工染色体 (BAC) を用いたトランスジェニックレポーターマウスを作製し、レポーター遺伝子の細胞特異性、低酸素応答性を検証する。これらの解析によって、新規の低酸素応答制御機構をシステムレベルで、また、そこに作用するトランス因子の同定を試み、新規の低酸素応答系を明らかにする。

### ②腎 Epo 産生細胞の単離と性状の解明

腎 Epo 産生細胞は、成人においての主な Epo 産生細胞として機能しており、その性状解析は重要である。上記のレポーターマウスを用いることで、Epo 産生細胞を単離し、その発生過程における由来や、性状を明らかにする。単離した細胞の株化を実施して、成人における Epo 遺伝子発現誘導における、低酸素応答能の分子機構を解明する。

#### 4. 研究成果

(1) Nrf2-Keap1 システムによるストレス感知機構の解析：

① 構造生物学的解析による Keap1 複合体の機能の解明：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、オートファジーは、プロテアソームと並ぶ、細胞内の分解系の主要な経路であるが、オートファジーで蓄積する p62 タンパク質が Keap1 に結合し、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。また、この結合を X 線結晶構造解析によって、明らかにした (図 1: Nature Cell Biol, 2010)

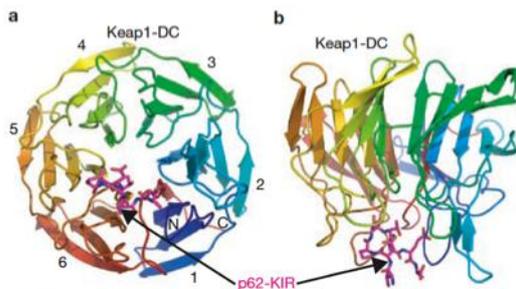


図1 p62はKeap1のNrf2結合部位と同じ部位に結合しNrf2の結合を阻害する

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。センサーとして機能する活性化型システイン残基を含む領域が、Nrf2 認識ドメインである DC ドメインを囲むように配置されていることが明らかとなり、ストレスによってシステイン残基が修飾され、DC ドメインの構造変化へとつながり、Nrf2 の活性化が引き起こされる可能性が示唆された。(図 2)

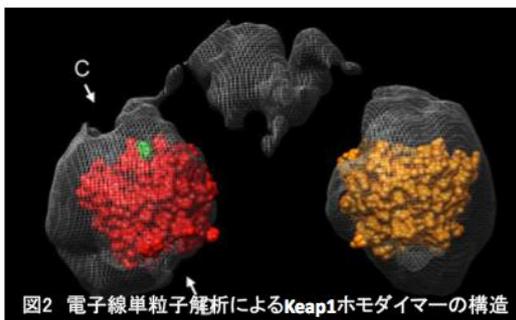


図2 電子線単粒子解析によるKeap1ホモダイマーの構造

② マウス個体を用いた Keap1 分子機能の解明：Keap1 遺伝子の上流 5.7kbp の制御領域が、Keap1 遺伝子の発現を再現できることを確認し、この制御領域で外来性の Keap1 分子

を発現するトランスジェニックマウスを作製した。このマウスを Keap1 欠損マウスと交配することで、内在性の Keap1 を欠失し、外来性の Keap1 のみを発現するマウスを作製した(トランスジェニック相補レスキュー解析系の樹立)。このマウス個体での Keap1 分子の解析系を用いて、Keap1 分子のストレスセンサーとして重要なシステイン残基の機能を検討した。その結果、Keap1 分子の 273 番目と 288 番目のシステイン残基は、Nrf2 の抑制に必須であることを示した (MCB, 2008)。また、Keap1 ホモダイマーを形成する BTB ドメインの 151 番目のシステイン残基 (Cys151) の重要性を検討し、BTB の二量体化が Nrf2 の抑制に必須であることを (MCB, 2008)、Nrf2 活性化に Cys151 を必須とする親電子性物質と、そうでないものがあることを明らかにし、システインコードの一端を示した(投稿中)。また、このようなセンサー機構の分子基盤を理解する目的で、BTB ドメインの結晶構造解析を実施し、成功している(投稿準備中)。

ゼブラフィッシュを用いたミュータジェネシス解析によって、Keap1/Nrf2 の活性化機構には、少なくとも 6 経路存在することが示され、活性化メカニズムの多様性が、様々なストレスに対する反応性を獲得したと考えられた (MCB, 2009)。これらモデルは、p62 タンパク質蓄積による競合的な Nrf2 活性化機構などの多様な Nrf2 活性化機構を事前に予測していたと言える。

③ 疾患との関連性：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を実証し、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することを示した (Cancer Res, 2008)。また、野生型の Keap1 と変異型 Keap1 の二量体には、Nrf2 抑制能がないことを示し、がん細胞では Keap1 ヘテロ変異でも恒常的な Nrf2 の活性化がおきることを示した (Cancer Res, 2011)。Nrf2 の活性化が、がん細胞の機能にどのように貢献しているか検討した結果、Nrf2 は、生体防御機構を活性化するのに加えて、NADPH 産生を亢進させ、核酸・脂質合成等に必要な還元力を供給していることを明らかにした。さらに、がん細胞は、通常の細胞と比較してグルコース・グルタミンの取り込み・代謝を大きく変化させることにより、増殖に有利な細胞内環境を実現していることが示された (Cancer Cell, 2012)。

構造生物学的解析の欄にも記載したが、Keap1-Nrf2 システムが、オートファジースト

レスを検知していることが明らかとなり、また、肝細胞癌、肺癌細胞では、オートファジーの基質である p62 タンパク質の蓄積がしばしば観察され、これによって活性化した Keap1-Nrf2 システムもまた、癌細胞の生存等に寄与していることを明らかにした (CancerSci, 2012、他)。

## (2) 低酸素感知機構の解析

① *Epo* 遺伝子制御機構の解明：*Epo* 遺伝子の制御機構を包括的に明らかにするために、同遺伝子を含む 180kbp の BAC に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を挿入し、これをマウスに導入し BAC トランスジェニックマウスを作製した。その結果、180kbp の領域には、腎臓、ならびに肝臓での *Epo* 遺伝子の組織特異的な低酸素応答に関与する制御領域が含まれていることを確認した。また、制御領域の十分性を検証するため、同 BAC 構築で *Epo* 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作製した。本マウスは交配によって、*Epo* 遺伝子欠損マウスの貧血等の表現型をレスキューできる事が明らかとなり、BAC 構築が *Epo* 遺伝子の制御領域を包括的に含むことが機能的にも示された (投稿準備中)。

過去の報告から、GATA 因子が *Epo* 遺伝子の発現を抑制することで、同遺伝子の組織特異的な発現に寄与していることが示唆されていた。同遺伝子のプロモーター領域の GATA 配列について BAC トランスジェニックマウスで検証した結果、同 GATA 配列は、尿細管等における *Epo* 遺伝子の非特異的の抑制に寄与していることが示された。また、ChIP 解析で、この GATA 配列に GATA2, GATA3 が結合していることを示し、GATA 因子が *Epo* 遺伝子の組織特異的な発現に重要であることをマウス個体レベルで実証した (Blood, 2008)。

腎臓特異的な *Epo* 遺伝子の制御領域の探索をマウス個体において実施し、上流 17kbp の範囲にあることを突き止めていた。本構築を基に様々な制御領域の欠失構築作製、トランスジェニックマウスによる解析を実施した結果、腎臓特異的な *Epo* 遺伝子制御領域を約 1kbp の範囲に特定した。同領域に作用するトランス因子としては、HIF2 または、HIF3 の可能性が高く (下記参照)、現在、その詳細を解析している。今後、同定した領域を更に解析していくことで、腎性貧血の病態解明につながると思われる。

肝臓特異的な *Epo* 遺伝子の制御領域の解析

をマウス個体において実施し、同遺伝子の 3' の領域 (EpoE-3') が、肝臓での *Epo* 遺伝子の低酸素応答的な発現に必要かつ十分であることが明らかとなった。また EpoE-3' 領域は、胎生 14.5 日以降の肝臓における *Epo* 遺伝子の発現に重要であり、胎仔肝での二次造血を維持する *Epo* 遺伝子の発現に重要であることが示された (MCB, 2011)。一方、EpoE-3' 領域を用いて肝臓でのみ *Epo* 遺伝子を発現するマウスを作成する過程で、生存・生殖可能であるが、重度の貧血症状を示す系統が得られた。このマウス (ISAM と命名) は、腎性貧血のモデルマウスとして位置づけられ、恒常的な低酸素状態が個体に与える影響を解析できる有用なマウスモデルとして期待される (特許出願中)。

② 腎臓 *Epo* 産生細胞 (REP) の単離と性状の解明：REP 細胞の形態は、共焦点顕微鏡等による観察で、突起を伸長した神経細胞あるいは、線維芽細胞に類似していることが明らかとなった。免疫組織解析の結果、*Epo* 産生細胞は、内皮細胞のマーカーとは一致せず、神経細胞のマーカーである、MAP2 や NFL と一致することが明らかとなった (Blood, 2008)。更なる解析の結果、*Epo* 産生細胞の多くが、腎皮質線維芽細胞 (CD73 陽性) であることが明らかとなった。また、REP 細胞を FACS にて単離し、遺伝子発現をマイクロアレイ法で解析した。その結果、REP 細胞では、線維芽系、神経系の遺伝子の発現が豊富であり、また、*Hif2a*, *Hif3a* 遺伝子の発現が高いことが明らかとなった (PLoS One, 2011)。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らなかった。

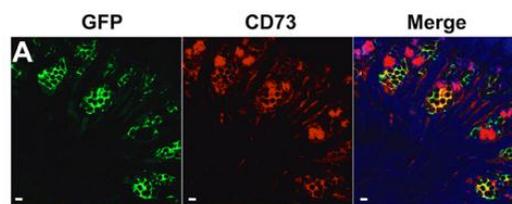


図3 腎Epo産生細胞の多くがCD73陽性である

(3) 当初の計画になかった解析 (Nrf2 と Nrf1 の個体における機能的差異)

Nrf2 と同じ CNC ファミリーに属する Nrf1 は、当初、Nrf2 と同じ解毒化酵素群、抗酸化酵素群の遺伝子の発現を制御していると考えられていた。しかし、遺伝子破壊マウスの解析などの結果から、Nrf2 とは異なる遺伝子

群を制御している可能性が示唆されていたため、当初の計画になかったが、Nrf2 と Nrf1 の機能的差異を詳細に解析する必要があると考えた。この目的で、Nrf1 肝臓特異的、神経細胞特異的な欠損マウスを作製して、その表現型を解析した。その結果、Nrf1 肝臓特異的遺伝子破壊マウスは、ヒトの非アルコール性肝炎様の症状を示し、Nrf1 は Nrf2 とは異なる遺伝子を制御していることを明らかにした (JBC, 2008)。また、Nrf1 が脂質代謝の制御因子である Lipin1, PGC-1a を直接制御することを報告した (MCB, 2012)。一方、Nrf1 の神経特異的遺伝子破壊マウスは、小 Maf 群因子複合欠失マウスで報告されている神経変性に極めて類似した表現型を示すことを明らかにし、Nrf1/Maf のヘテロ二量体が同組織の恒常性の維持に重要であることを示した (Genes Cells, 2011)。

#### 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 166 件)

1. Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, Shibata T, Nukiwa T, Aburatani H, Yamamoto M and Motohashi H. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell* 査読有、印刷中 (2012)
2. Pan X, Suzuki N, Hirano I, Yamazaki S, Minegishi N, and Yamamoto M. Isolation and Characterization of renal erythropoietin-producing cells from genetically produced anemia mice. *PLoS One* 査読有 6, E25839 (2011)
3. Suzuki T, Maher JM, and Yamamoto M. Select heterozygous Keap1 mutations have a dominant-negative effect on wild-type Keap1 in vivo. *Cancer Res* 査読有 71, 1700-1709 (2011)
4. Hirotsu Y, Katsuoka F, Itoh K, and Yamamoto M. Nrf2 degraon-fused reporter system: a new tool for specific evaluation of Nrf2 inducers. *Genes Cells* 査読有 16, 406-415 (2011)
5. Suzuki N, Obara N, Pan X, Watanabe M, Jishage K, Minegishi N, and Yamamoto M. Specific contribution of the Erythropoietin gene 3' enhancer to hepatic erythropoiesis after late embryonic stage. *Mol Cell Biol* 査読有 31, 3896-3905 (2011)
6. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, Sou YS, Ueno I, Sakamoto A, Tong KI, Kim M, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Ueno T, Kominami E, Motohashi H, Tanaka K, and Yamamoto M. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nature Cell Biol* 査読有 12, 213-223 (2010)
7. 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* 査読有 285, 5417-5427 (2010)
8. Ohtsuji 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* 査読有 283, 33554-33562 (2008)
9. 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* 査読有 111, 5223-5362 (2008)
10. Yamamoto T, Suzuki T, Kobayashi A, Wakabayashi J, Maher J, Motohashi H, and Yamamoto M. Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity. *Mol Cell Biol* 査読有 28, 2758-2770 (2008)
11. 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* 査読有 27, 7511-7521 (2007)

[学会発表] (計 163 件)

1. Yamamoto M. Hypoxia-inducible and tissue-specific erythropoietin gene regulation, Keystone Symposium: Advances in Hypoxic Signaling. 2012年2月2日, バンフ (カナダ)
2. 山本雅之, EPO 研究のフロンティアと新しい EPO の可能性, 第 19 回腎とエリスロポエ

- チン研究会, 2010年11月21日 品川
3. Katsuoka F. Molecular basis of CNC and small Maf dimer function in neural tissues. Jornada Científica-Regulatory mechanisms in inflammatory processes. 2010年10月15日, バレンシア(スペイン)
  4. Tong T, 他, Keap1 recruits Nrf2 to Cul3-based E3 ligase by two-site substrate recognition: a hinge and latch mechanism for oxidative/electrophilic stress response. Oxygen Club of California 2008 World Congress 2008年3月12日 サンタバーバラ(米国)
  5. Yamamoto M. Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. Adjunct Professor Lecture at Johns Hopkins University Bloomberg School of Public Health, 2007年10月31日, ボルチモア(米国)

[図書] (計11件)

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

1. 名称: Nrf1 調節剤のスクリーニング方法  
発明者: 山本雅之、古澤祐樹  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特願 2012-11833  
出願年月日: 2012年1月24日  
国内外の別: 国内
2. 名称: うつ病の予防または治療剤  
発明者: 山本雅之、村松裕行  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特願 2011-283379  
出願年月日: 2011年12月9日  
国内外の別: 国内
3. 名称: Epo 欠損 GFPtg 貧血マウス  
発明者: 山本雅之、峯岸直子、山寄瞬  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特願 2011-83664  
出願年月日: 2011年4月5日  
国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

2回の国際学術集会を主催  
(2009年2月, 2010年11月)

## 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・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 30447255

### (3) 連携研究者

峯岸 直子 (MINEGISHI NAOKO)  
東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 40271895

本橋 ほづみ (MOTOHASHI HOZUMI)  
東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 00282351

黒河 博文 (KUROKAWA HIROFUMI)  
東北大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号: 80359546

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

森口 尚 (MORIGUCHI TAKASHI)  
東北大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号: 10447253

鈴木 隆史 (SUZUKI TAKAFUMI)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 70508308

田口 恵子 (TAGUCHI KEIKO)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 20466527