

科学研究費補助金（学術創成研究費）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成 19 年度採択分

平成 22 年 4 月 1 日現在

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



推薦の観点：創造的・革新的・学際的学問領域を創成する研究

研究の概要：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。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、酸化ストレス応答、低酸素応答の2つのテーマで研究を実施している。

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

食物や酸素が内包する毒性に対する防御系は、遺伝子の発現レベルで制御され、その破綻は、様々な疾患の発症と強く結びついている。これらストレスに対する防御機構「環境応答」を分子レベルで解明することは、疾患予防や、疾患の治療の新規の道を開くことが期待される

2. 研究の目的

環境ストレスを感知するセンサー機構の分子基盤から、応答・適応の個体レベルでの統合的制御メカニズムまでを包括的に解明すること目的としている。特に、1) 酸化ストレス・親電子性ストレスに対する防御系である Nrf2-Keap1 系のストレスセンサーとしての分子メカニズムの解明、2) 転写因子 HIF 系によるエリスロポエチン (*Epo*) 遺伝子の発現制御解析を通じて、新規の低酸素応答制御系を解明する。また、このようなストレス応答系の破綻がもたらす生体への影響、疾患との関連を明らかにする。

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の解析：酸化ストレス・親電子性毒物に対するセンサー分子である Keap1 および Nrf2 の応答機構を構造学的手法で解析する。また、Nrf2

と Keap1 分子の機能のマウス個体での評価系を確立し、両分子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。

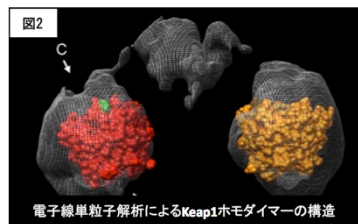
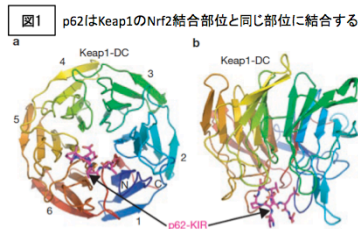
(2) エリスロポエチン遺伝子制御機構と低酸素感知機構の解析：低酸素に応答して遺伝子発現が誘導される *Epo* 遺伝子の制御機構を、大腸菌人工染色体を用いたトランスジェニックマウスの手法を用いて解明する。特に、腎臓での *Epo* 遺伝子の発現に注目し、その細胞特異的転写制御機構、産生細胞の同定、及びその株化を試みることで、新規の低酸素応答機構を解明する。

4. これまでの成果

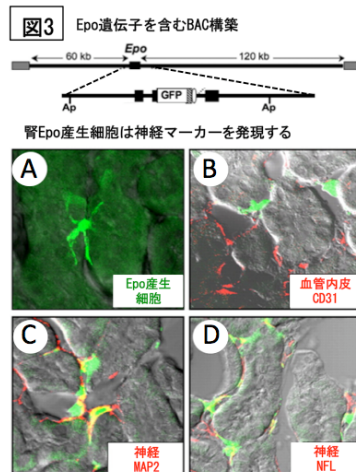
(1) Nrf2-Keap1 システムによるストレス感知機構および同システムと発癌との関連性の解析：構造生物学解析の成果として、Nrf2 が Keap1 分子と結合する際に、静電ポテンシャルの異なる2カ所の部位で相互作用することを明らかにした。また、オートファジーで蓄積する p62 タンパク質が Keap1 に結合する様子を明らかにし、その結果、Nrf2-Keap1 システムを活性化することを明らかにした (図1)。さらに、電子線単粒子解析によって2量体化した Keap1 分子全長の構造を可視化した (図2)。マウス個体の解析として、外来性の Keap1 分子によって Keap1 欠失マウスをレスキュー

〔4. これまでの成果 (続き)〕

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。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た。一方、肺癌細胞では、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・生存に寄与していることを明らかにした。



(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) 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 (図3)。また、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。一方、*Epo* 産生 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。



5. 今後の計画

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。低酸素ストレス応答の分子機構については、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ことで、低酸素応答機構の分子機構を明らかにする。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

(研究代表者は二重、研究分担者は一重、連携研究者は点線)

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)

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)

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* 283, 33554-33562 (2008)

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)

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)

受賞 2008年 日産科学賞

ホームページ

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