

氏名(本籍)	やま もと た え 山 本 多 恵 (群馬県)
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	博 甲 第 3791 号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	生体の環境応答機構の解明 1. 個体における <i>Keap1</i> 遺伝子の発現・機能解析 2. <i>Maf</i> 認識配列 (MARE) の多様性が創出する転写因子との親和性の違い
主 査	筑波大学教授 医学博士 野 口 雅 之
副 査	筑波大学教授 薬学博士 永 田 恭 介
副 査	筑波大学助教授 医学博士 永 瀬 宗 重
副 査	筑波大学講師 博士 (医学) 山 中 章 弘

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

動物がエネルギー源として利用している酸素と食物は、体内で一部が親電子性物質に変化して毒性をもつ。生物は環境ストレスへ適応して、必要な遺伝子を発現して恒常性を維持しており、この適応反応は転写レベルで厳密に制御されている。そして、酸化ストレス応答ならびに第 2 相解毒酵素群異物代謝応答が共通のメカニズムを利用していることが、*nrf2* 遺伝子欠損マウスの研究から明らかになり、転写因子 Nrf2 は環境応答遺伝子群の発現制御に重要な因子であることが理解された。Nrf2 の活性化には 2 つの過程、即ち、細胞質蛋白 Keap1 の抑制性の制御から解除される過程、および核へ移行して小 Maf 群因子と協調して遺伝子群を発現誘導する過程が、特に重要と考えられる。そこで、以下の 2 つのメカニズムについて解析した。

1. 生理的条件下での Keap1 の機能

(対象と方法)

生理的な条件下での解析を行うため、トランスジェニックマウスを用いて個体レベルで解析することとした。まず、内在性制御領域を見つけるために、*keap1* 遺伝子の翻訳開始点上流約 5.7kb の領域 (KRD5.7) に、*LacZ* レポーターにつないだ構築を作製し、トランスジェニックブルーマウス法を行った。次に、KRD5.7 下に発現させた *Keap1* トランスジーンにより、*keap1* 遺伝子欠損マウス (*keap1*^{-/-}) の表現型がレスキューできるか調べた。最後に、Complementation rescue 法を用いて、個体レベルでのドメイン解析を行った。

(結果)

トランスジェニックブルーマウスでは、*keap1* 遺伝子座へ *LacZ* 遺伝子を導入したマウス (*keap1*^{+/-}) と同様な *LacZ* の発現を再現できた。KRD5.7 下に発現させた HA-Keap1 のトランスジーンにより、*keap1*^{-/-} の表現型はレスキューでき、完全にレスキューするには、野生型と同程度以上に前胃での Keap1 mRNA の発現が必要であった。以上より、KRD5.7 は機能的な Keap1 蛋白を発現させるのに十分なプロモーター活性を持つことが明らかになり、個体レベルの Keap1 機能を解析可能な Complementation rescue 法が確立できた。

そこで、培養細胞や試験管内実験でその重要性が示唆されているシステイン残基 C273, C288 に変異を加えたトランスジェニックマウスについても調べたところ、変異型 Keap1 のトランスジーンでは十分な mRNA を発現させても、*keap1*^{-/-} の表現型は全くレスキューできなかった。前胃の扁平上皮細胞では、Nrf2 は核内に蓄積し、Nrf2 標的遺伝子群は過剰に活性化していた。以上より、C273, C288 は恒常性の維持に必須であることが解った。

(考察)

KRD5.7 は、*keap1* 遺伝子の制御領域として強力なプロモーター活性を持つことが示された。しかし、*keap1*^{+/+} の LacZ 活性と比較して、トランスジェニックブルーマウスでは、筋層での発現陽性などの相違も認められ、*keap1* 遺伝子の完全な制御領域としてはさらに長い領域が必要な可能性が示唆された。また、レスキューマウスの Keap1 mRNA の発現量の比較から、前胃における Keap1 の発現量が角化の表現型に反映される可能性が示唆された。変異型 Keap1 が存在しても *keap1*^{-/-} と同様に Nrf2 は核内に蓄積していたことから、Keap1 のシステイン C273, C288 を介して、細胞質で Nrf2 を分解する制御が恒常性の維持に重要であることが明らかになった。

2. Maf 認識配列 (MARE) の多様性が創出する転写制御様式

(対象と方法)

MARE には、塩基配列多様性があり、機能的な MARE 様配列として、AP-1 の標的となる TRE 配列、赤血球・巨核球系転写制御に重要な NF-E2 配列、抗酸化剤応答性配列 ARE がある。シスエレメントの違いにより結合するトランス因子が異なるか検討するために、まず、MARE を構成する 13 塩基に網羅的に変異を加えた配列と、トランス因子として、Nrf2 と小 Maf 群因子のひとつである MafG の精製蛋白を用意した。Nrf2-MafG ヘテロ 2 量体は転写活性化に、MafG ホモ 2 量体は転写抑制に働く。解析には、表面プラズモン共鳴 (SPR) と DNA アレイの性質を併せもつ、SPR マイクロアレイ法 (Kyo M et al. Genes to Cells 9:153-164, 2004) を用いた。

(結果)

SPR マイクロアレイ法により、多様なシスエレメントと転写因子との親和性が解析可能な系を確立し、2 種類の蛋白質の混合比を変えることで、競合的に作用するヘテロ 2 量体の解析も可能になった。SPR シグナル波形の特徴と kinetics 値から、MafG ホモ 2 量体と Nrf2-MafG ヘテロ 2 量体の結合配列は異なり、親和性の違いから、MARE 配列は 5 つのグループに分類できた。MARE 配列 13 塩基内の 1 塩基の違いが、転写因子との親和性を規定した。この結果は、ゲルシフト法による結合活性と一致した。さらに、結合親和性は、培養細胞での転写活性化能にも反映された。

(考察)

PR マイクロアレイ法は、ひとつのシスエレメントに競合して作用するような転写因子の結合親和性が解析できる初めての SPR の系である。この方法では、kinetics 値に加えて、シグナル波形がトランス因子との相互作用を知るのに有用であることが示された。また、特異的なトランス因子との親和性を規定する塩基置換は、実存する遺伝子の制御領域にも広く保存されていた。*in vitro* の結合親和性は、転写活性化能に反映された。以上より、Nrf2 が特定の標的遺伝子に働く際には、それぞれの遺伝子の制御領域に存在する MARE 配列の多様性が、ひとつの制御を担っていることが示唆された。

(結論)

1. KRD5.7 は、機能的な Keap1 を発現するのに十分な発現制御領域である。
2. 個体レベルの Keap1 機能を解析できる Complementation rescue 法を確立した。
3. Keap1 のシステイン残基 C273, C288 が、Nrf2 を抑制し、恒常性の維持に貢献している。

4. MafG ホモ 2 量体と Nrf2-MafG ヘテロ 2 量体結合配列は異なり, MARE 配列内の 1 塩基の違いが, 親和性を規定している。
5. 制御領域に存在する MARE の多様性が, Nrf2 特異的に働く遺伝子のひとつの制御を創り出している。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は環境応答に重要な転写因子である Nrf2 の活性化に必要な 2 つの過程, 即ち, Keap1 の抑制性の制御から解除される過程, および核へ移行して小 Maf 群因子と協調して遺伝子群を発現誘導する過程についてその分子機構を明らかにするために行われ, 1) Keap1 のシステイン残基 C273, C288 が Nrf2 抑制に重要で, 2) 制御領域に存在する MARE の多様性が, Nrf2 特異的に働く遺伝子のひとつの制御を創り出していることを明らかにした。Keap1, Nrf2 遺伝子の分子機構の解明にせまる意義の大きい研究と考えられる。

よって, 著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。