

氏名(本籍)	おお つじ まきこ 大 辻 摩希子 (北海道)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 5100 号		
学位授与年月日	平成 21 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	Nrf1 and Nrf2 Play Distinct Roles in Activation of Antioxidant Response Element-dependent Genes (転写因子 Nrf1 と Nrf2 は抗酸化剤応答配列を介した遺伝子の活性化において異なる機能を果たす)		
主 査	筑波大学教授	博士(理学)	入 江 賢 児
副 査	筑波大学教授	博士(医学)	檜 澤 伸 之
副 査	筑波大学教授	博士(医学)	松 井 裕 史
副 査	筑波大学講師	博士(農学)	蕨 栄 治

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

転写因子は、DNA 結合モチーフなどの構造により様々なファミリーに分類される。それぞれのファミリーを形成する転写因子は、進化上 1 つの因子から分子進化し、しばしば共通の機能に加え、独自の機能を持つことで多様性を獲得してきたと考えられる。CNC ファミリーを形成する転写因子 Nrf1, Nrf2, Nrf3, p45NF-E2 も共通の機能に加え、それぞれ独自の機能を獲得してきたと考えられる。Nrf2 は、酸化ストレスや親電子性物質によって誘導され、小 Maf 群因子とヘテロ 2 量体を形成することで、抗酸化剤応答配列・親電子性物質応答配列 (ARE/EpRE) に結合し、ストレス応答・生体防御遺伝子群の発現を制御している。Nrf1 は、Nrf2 と相同性が高く、同様に広範な組織で発現することから、Nrf2 と重複して標的遺伝子の発現を制御すると報告されている。しかし、*Nrf2* 遺伝子破壊マウスは、定常状態において肝障害を示さないのに対し、肝臓特異的 *Nrf1* 遺伝子破壊マウスは、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 様の症状を呈する。このことから、Nrf1 は、Nrf2 とは異なる機能をもつことが予想されるが、その詳細は明らかではなかった。本研究では、肝実質細胞特異的 *Nrf1* 遺伝子破壊 (Nrf1 cKO) マウスを作製し、Nrf1 独自の機能をマウス個体レベルで明らかにすることを目的とした。

(対象と方法)

条件付き遺伝子破壊マウスの作製は、Cre/loxP システムを用いて実施した。ES 細胞を用いた相同組換えにより、Nrf1 の DNA 結合ドメインを含む第 4 エクソンを loxP 配列で挟み、さらに 3' 側に IRES-EGFP を挿入して Nrf1 発現細胞で EGFP を発現するマウスを作製した。同マウスを、アルブミン遺伝子プロモーター制御下に Cre 組換え酵素を発現するマウスと交配し、肝実質細胞特異的 *Nrf1* 遺伝子破壊マウス (Nrf1 cKO) を樹立した。本マウスの肝臓を用いて、組織観察およびマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。また、マイクロアレイ解析の結果に基づき、Nrf1 依存性の遺伝子の中で制御領域に ARE 配列をもつ遺伝子を選択し、Nrf1, Nrf2 の同配列に対するゲルシフトアッセイおよびレポーター遺伝子の一過性導入実験

による転写活性化能の評価を行った。

(結果)

8週齢のNrf1 cKOマウスの肝臓では、脂肪蓄積、および炎症の指標であるアラニンアミノ基転移酵素(ALT)の値の上昇を認め、NASH様の症状を呈することを確認した。これは、Nrf2遺伝子破壊マウスでは観察されない表現型であることからNrf1独自の機能を反映した表現型と考えられた。次に、Nrf1の標的遺伝子を明らかにする目的で、マイクロアレイ解析を行ったところ、Nrf1 cKOマウス肝臓においてNrf2/ARE依存的遺伝子群の発現が上昇していることが明らかとなった。この発現上昇は、Nrf1とNrf2の二重欠損マウスにより観察されなくなることから、Nrf2依存的であることが示された。

マイクロアレイ解析により、Nrf1に依存した遺伝子は、異物代謝酵素、糖付加酵素、シャペロンタンパク質など、多岐にわたっていることが明らかとなった。Nrf1依存性の遺伝子の中で、制御領域にARE配列を持つことが報告されていたのは、重金属応答タンパク質であるメタロチオネイン(Metallothionein; MT)-1,2遺伝子であった。MT1遺伝子のARE(MT1 ARE)配列は線虫からヒトまで種間で広く保存されており、機能的なARE配列であると考えられた。ゲルシフトアッセイにおいて、Nrf1とNrf2はMT1 AREに対して同様に結合した。一方、レポーター遺伝子の一過性導入実験において、Nrf1とNrf2のMT1 AREを介した転写活性化能を評価した結果、MT1 AREを介した遺伝子発現は、Nrf2ではなく、Nrf1によってより強く活性化されることが示された。さらに、Nrf2が恒常的に活性化しているKeap1ノックダウンマウスにおいて、MT1遺伝子の発現の上昇はみられなかった。従って、MT1遺伝子は、Nrf2ではなく、Nrf1によって転写活性化されるARE依存的な標的遺伝子であることが示唆された。

(考察)

Nrf1 cKOマウス肝臓では、Nrf2/ARE依存的遺伝子群の発現が上昇することが示された。この発現上昇は、Nrf1の標的遺伝子の発現減少や、脂肪蓄積による肝臓の障害により生じる内在性のストレスにより、Nrf2が活性化することに起因すると考えられた。

マウスMT1遺伝子のARE配列を介した遺伝子発現は、レポーター遺伝子を用いた解析においてNrf2ではなくNrf1に強く依存していた。一方、Nrf2の標的遺伝子であるNAD(P)H-キノン酸化還元酵素1(NQO1)遺伝子の発現に重要なARE配列は、Nrf1ではなく、Nrf2に強く依存していた。一方、ゲルシフト解析において、Nrf1とNrf2は、両遺伝子のARE配列に対して同様の親和性で結合することが示された。これらの結果から、Nrf1とNrf2の標的遺伝子に対する転写制御機構の差異は、DNA結合能の違いではなく、形成する転写活性化複合体の違いによるものと考えられた。

MT1, 2は、重金属応答だけではなく、細胞の恒常性を保つために様々な機能を果たしている。その機能の一つとして、細胞内のエネルギーバランスを保つことが報告されている。しかし、MT1, 2遺伝子破壊マウスではNASH様の症状を示さないことから、Nrf1 cKOマウスが示す表現型は、MT1, 2を含む多岐にわたるNrf1標的遺伝子の減少が原因であると考えられた。

審査の結果の要旨

本研究では、CNCファミリーを形成する転写因子Nrf1, Nrf2について、Nrf1独自の機能をマウス個体レベルで明らかにすることを目的として、肝実質細胞特異的Nrf1 cKOマウスの作製・解析が行われた。Nrf1 cKOマウスの肝臓では、脂肪蓄積およびALTの値の上昇が認められ、NASH様の症状を呈することが示された。この表現型はNrf2遺伝子破壊マウスでは観察されない表現型であり、Nrf1独自の機能を反映した表現型と考えられた。次に、Nrf1の標的遺伝子を明らかにする目的でマイクロアレイ解析が行われ、Nrf1 cKOマウス肝臓においてNrf2/ARE依存的遺伝子群の発現が上昇していることが明らかにされた。またマイ

クロアレイ解析により、Nrf1 に依存した遺伝子は、異物代謝酵素、糖付加酵素、シャペロンタンパク質など、多岐にわたっていることが明らかにされた。Nrf1 依存性の遺伝子の中で、重金属応答タンパク質である *MT1* 遺伝子は、Nrf2 ではなく、Nrf1 によって転写活性化される ARE 依存的な標的遺伝子であることが示された。さらに、Nrf1 と Nrf2 の標的遺伝子に対する転写制御機構の差異は、DNA 結合能の違いではなく、形成する転写活性化複合体の違いによるものであることが示された。これらの研究成果は、転写因子 Nrf1 の個体レベルでの機能を解明し、またファミリーを形成する構造上類似した転写因子 Nrf1, Nrf2 の異なる機能を明らかにしたものであり、高く評価される。

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。