

氏名(本籍)	なか しま 中 島 やえ子 (埼玉県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第5106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	生体防御の基盤となる Nrf2-Keap1 システムの分子機構の解明
主査	筑波大学教授 理学博士 岡村直道
副査	筑波大学教授 医学博士 浦山修
副査	筑波大学教授 博士(医学) 榊正幸
副査	筑波大学講師 医学博士 石井幸雄

### 論文の内容の要旨

(目的) Nrf2-Keap1 システムの持つ、感知機構と標的遺伝子発現様式の多様性は如何に生み出されるのか、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

(対象と方法) Nrf2-Keap1 システムに関わる未知因子の探索を順遺伝学的手法で試みることにし、Nrf2-Keap1 システムが保存された脊椎動物でありながら比較的簡便に順遺伝学的手法を行うことの出来るゼブラフィッシュを対象として用いることにした。

まず、突然変異剤 ENU 処理により、ゲノム中にランダムに突然変異が導入されたゼブラフィッシュ変異体プールを作製した。次にそのプールのなかから、ホールマウント in situ ハイブリダイゼーションを用いて、Nrf2 活性化剤 DEM と AF に対する Nrf2 の標的遺伝子 *gstp1* の発現が異常となる突然変異体をスクリーニングした。

変異体が単離された後は、その責任遺伝子の同定をポジショナルクローニング法で行った。また、変異体の表現型解析を行い、変異体の責任遺伝子が Nrf2-Keap1 システムのどのような局面に寄与しているか検討を行った。

(結果) ゼブラフィッシュ変異体プールである F2 ファミリーを 797 ファミリー解析した結果、10 の変異系統が見出された。そのうち、it275 系統と it567 系統の解析を行った。

it275 系統は DEM による発現誘導は残っているが AF による発現誘導が著しく減弱した系統として単離された。責任遺伝子は 21 番染色体に存在することが明らかとなった。11 種類の Nrf2 活性化剤による *gstp1* 遺伝子の発現誘導応答を解析したところ、4 種類の活性化剤では発現誘導応答が見られたが、残り 7 種類の活性化剤では発現誘導応答が見られなかった。また、*gstp1* 遺伝子以外の Nrf2 標的遺伝子でも、DEM による発現誘導は残っているが AF による発現誘導が著しく減弱しており、*gstp1* 遺伝子特異的なものではなかった。

it567 系統は DEM による発現誘導も AF による発現誘導も減弱した系統として単離された。責任遺伝子は 5 番染色体に存在する DNA ヘリカーゼ Tip49b であることが明らかとなり、進化的に保存された 328 番目

のアミノ酸スレオニンをイソロイシンにかえる突然変異が起きていることがわかった。DEM と AF 以外の Nrf2 活性化剤に対する gstp1 遺伝子の発現誘導応答を解析したが、すべての活性化剤に対する応答が減弱していた。また、DEM による gstp1 遺伝子以外の Nrf2 標的遺伝子の発現誘導を調べたところ、gstp1 遺伝子と同様に減弱しているものと減弱していないものがあることが明らかとなった。

(考察) it275 系統のような一部の Nrf2 活性化剤による標的遺伝子の発現誘導が減弱した系統が単離されたことより、Nrf2-Keap1 システムの感知機構は複数存在していると考えられる。また、it275 系統の責任遺伝子が存在する 21 番染色体には既知の関連因子は存在しておらず、感知機構に関わる新規制御因子が見出されると予想される。

DNA ヘリカーゼ Tip49b は Nrf2 の標的遺伝子転写活性化過程に関わるが、そこには遺伝子特異性が見られた。このことから Nrf2 は標的遺伝子によりコファクターを使い分けていると考えられる。また、Tip49b はクロマチンリモデリング複合体やヒストンアセチル化酵素複合体のサブユニットとして知られており、このような複合体が Nrf2 による転写活性化に必要である可能性がある。

(結論) Nrf2-Keap1 システムの感知機構は複数経路存在し、そのうちの一つの経路は it275 系統の責任遺伝子依存性である。

また、Nrf2 の標的遺伝子転写制御の機構は、コファクターの使い分けなど、一様ではなく、それが標的遺伝子発現様式の多様性を生み出している。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、Nrf2-Keap1 システムに異常をきたしたゼブラフィッシュの突然変異体を複数分離し、それらの責任遺伝子を解析することによって、同システムの環境応答に認められる多様性のメカニズムを明らかにすることを目的として行われたものである。2 系統の突然変異体の詳細な解析により、Nrf2 活性化剤の感知機構にも、また、Nrf2 の標的遺伝子の発現様式にも複数の経路があることを明らかにした。この 2 系統をはじめとして本研究で単離された変異体は、Nrf2-Keap1 システムの全体像の解明に非常に有用であり、研究成果の一部は既に国際専門誌に発表されて高い評価を得ている。

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。