

筑波大学

博士（医学）学位論文

Modulation of biological defense by the use of
different Nrf2-activating compounds

(多様な Nrf2 活性化剤を活用した
生体防御機構の適正な制御)

2 0 1 7

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

布 施 雄 士

目次

目次-----	i
略語表-----	iv
第1章 序論-----	1
1-1 酸化ストレスに対する転写応答	
1-2 Nrf2 システム	
1-3 Nrf2 システム活性化による疾病の予防・治療	
1-4 Nrf2 研究におけるゼブラフィッシュモデル	
1-5 本研究の目的	
第2章 進化という観点からみた脊椎動物の Nrf2 システム-----	7
2-1 方法	
2-2 結果	
2-2-1 Nrf ファミリータンパク質のアミノ酸配列比較	
2-2-2 Keap1 のアミノ酸配列比較	
2-3 考察	
2-3-1 Nrf2 の進化	
2-3-2 Keap1 の進化	
2-3-3 ゼブラフィッシュ Nrf2 システムの特徴	
第3章 Nrf2 標的遺伝子の組織特異的誘導メカニズム-----	17
3-1 材料と方法	
3-1-1 ゼブラフィッシュおよび薬剤への曝露	
3-1-2 プラスミド構築	
3-1-3 過剰発現およびノックダウン解析	
3-1-4 遺伝子発現解析	
3-2 結果	
3-2-1 2つの Bach1 オルソログが肝臓特異的な転写誘導プロファイルに関与する	
3-2-2 ヘム濃度の減少は <i>hmox1a</i> の肝臓での誘導を減弱した	
3-2-3 ヘム濃度の上昇は <i>hmox1a</i> を異所的に誘導した	

- 3-2-4 Bach1b は *hmx1a* の一過性の誘導パターンに寄与する
- 3-3 考察
 - 3-3-1 肝臓特異的かつ一過性誘導のメカニズム
 - 3-3-2 誘導プロファイルの生理的意義
 - 3-3-3 Nrf2 活性化医療への応用

第4章 Nrf2 活性化による亜ヒ酸の毒性緩和----- 27

- 4-1 材料と方法
 - 4-1-1 ゼブラフィッシュ
 - 4-1-2 生存アッセイ
 - 4-1-3 遺伝子発現解析
 - 4-1-4 統計解析
- 4-2 結果
 - 4-2-1 亜ヒ酸毒性に対する Nrf2 依存的な生体防御
 - 4-2-2 ヒ素への抵抗性を与える遺伝子群の Nrf2 依存的な誘導
 - 4-2-3 サルフォラフェンによる亜ヒ酸の毒性軽減
 - 4-2-4 サルフォラフェンの毒性
- 4-3 考察
 - 4-3-1 亜ヒ酸の急性毒性に対する Nrf2 依存的な生体防御
 - 4-3-2 Nrf2 活性化による亜ヒ酸毒性の軽減
 - 4-3-3 亜ヒ酸とサルフォラフェンの組み合わせにより生じる複合毒性

第5章 既承認薬オーラノフィンによる Nrf2 活性化----- 34

- 5-1 材料と方法
 - 5-1-1 ゼブラフィッシュ
 - 5-1-2 生存アッセイ
 - 5-1-3 遺伝子発現解析
- 5-2 結果
 - 5-2-1 オーラノフィンは Nrf2 依存的な抗酸化作用を発揮した
 - 5-2-2 オーラノフィンは亜ヒ酸の毒性を軽減した
 - 5-2-3 重金属毒性に対する効果
- 5-3 考察
 - 5-3-1 オーラノフィンによる抗酸化力の賦与

- 5-3-2 亜ヒ酸の毒性緩和効果
- 5-3-3 オーラノフィンの毒性
- 5-3-4 オーラノフィンの薬理作用

第6章 総合考察-----	41
引用文献-----	44
図表-----	53
謝辞-----	99

略語表

abcc1/2: ATP-binding cassette, sub-family C, member 1/2

aqp9a/b: aquaporin 9a/b

ARE: antioxidant responsive element

Bach: BTB and CNC homology

BTB: broad complex-tramtrack-bric a brac

bZip: basic leucine zipper

CBP: CREB binding protein

CDDO: 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-diene-28-oic acid

CHAPS: 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate

CHD6: chromodomain helicase DNA binding protein 6

Cnc: Cap 'n' collar

CREB: cAMP response element binding protein

Cul3: Cullin 3

DEM: diethyl maleate

DGR: double glycine repeat

ECH: erythroid cell-derived protein with CNC homology

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

efl α : elongation factor 1 α

ER: endoplasmic reticulum

FA: formamide

gclc: glutamate-cysteine ligase catalytic subunit

GFP: green fluorescent protein

GSK-3 β : glycogen synthase kinase-3 β

gstp1: glutathione *S*-transferase pi 1

hmx1a: heme oxygenase 1a

IVR: intervening region

Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1

MAB: maleic acid buffer

MO: morpholino oligonucleotide

Neh: Nrf2-ECH homology

NES: nuclear export signal

NF-E2: Nuclear factor, erythroid 2
NHB1: N-terminal homology box 1
NO: nitric oxide (一酸化窒素)
NQO1: NAD(P)H quinone dehydrogenase 1
Nrf: NF-E2-related factor
ORF: open reading frame
PBS: phosphate buffered saline
PFA: paraformaldehyde
prdx1: peroxiredoxin 1
Roc1: regulator of cullin 1
RT-PCR: reverse transcription-PCR
SA: succinylacetone
SDS: sodium dodecyl sulfate
Skn-1: skinhead-1
small Maf: small musculoaponeurotic fibrosarcoma
SSC: standard saline citrate
TRAM: transcriptional adapter motif
WHO: World Health Organization
WISH: whole-mount *in situ* hybridization
Yap: yeast activator protein
15d-PGJ₂: 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂
 β -TrCP: β -transducin repeat-containing protein

第 1 章

序論

第1章 序論

1-1 酸化ストレスに対する転写応答

生命は、内部環境の恒常性を維持するために、様々な生命システムを進化させてきた。精巧にデザインされたホメオスタシス維持機構は、常に細胞内の化学的状態をモニターし、平衡が崩れた際には、元の理想的な環境を取り戻すための措置を講じる。このようなフィードバック制御は、細胞が安定的な生命活動を営むために必須のシステムである。

細胞内環境において、厳密な制御を受けているパラメータの1つが、酸化還元状態である。近年、多くの疾病・病態が酸化ストレスに関連して生じることが報告されており、基礎医学研究では重要なトピックの1つとなっている。酸化ストレス (oxidative stress) は、「酸化物 (oxidants) と抗酸化物 (anti-oxidants) のバランスが酸化物の増加側に傾くことにより、酸化還元シグナルおよび調節機構の障害や生体分子へのダメージが生じること」と定義される (Sies, 2015)。細胞内の酸化物を増加させる主な原因は、細胞呼吸のプロセスで生じる内因性のフリーラジカルや、環境中の高反応性の化学物質であるが、これらによって生じた酸化ストレスは、適切に除去されなければ、生命活動が脅かされることとなる。

真核生物は、酸化ストレスに対して、遺伝子の転写活性化をベースにした防御システムを備えている (図 1-1)。特定の転写因子が、酸化ストレスを感知したときのみ転写活性を発揮し、抗酸化機能をもった遺伝子群を誘導することにより、生理的な酸化還元状態を回復するのである。このようなシステムの進化的起源は古く、単細胞生物である出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) においても、yeast activator protein (Yap) ファミリータンパク質が酸化ストレス応答性の転写因子として存在している (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2010)。また、線虫 (*Caenorhabditis elegans*) においても、skinhead-1 (Skn-1) という酸化ストレス応答を担う転写因子が盛んに研究されている (Blackwell *et al.*, 2015)。もちろん、このような転写システムは、私たちヒトを含む哺乳類にも存在し、酸化ストレスに対する重要な生体防御を担っている。

1-2 Nrf2 システム

哺乳類において、酸化ストレス防御に重要な役割を担っているのが、Nrf2 システムである (図 1-2, 1-3)。酸化ストレスに関連した多くの病態に関与していることがわかり、

近年急激に研究が進んでいる (Suzuki and Yamamoto, 2015; Kobayashi and Yamamoto, 2006)。転写因子 NF-E2 related factor 2 (Nrf2) は、赤血球における β グロビン遺伝子の転写調節に重要な Nuclear factor, erythroid 2 (NF-E2) のホモログとして発見された (Moi *et al.*, 1994; Itoh *et al.*, 1995)。しかし、Nrf2 ノックアウトマウスには、造血に関わる表現型が見られなかったため (Chan *et al.*, 1996)、その機能は不明であった。Nrf2 の機能についての初めての報告は、NF-E2 の結合配列と抗酸化剤応答配列 (ARE: antioxidant responsive element) の類似性に気づいた伊東らの研究成果によりもたらされた (Itoh *et al.*, 1997)。ARE は、解毒代謝の第 2 相を担うグルタチオン抱合酵素群や NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1) 遺伝子などの上流に存在し、生体異物への曝露に応じた転写誘導に必要な配列であることが知られていたが、Nrf2 ノックアウトマウスでは、この誘導能が消失していたため、Nrf2 が第 2 相抱合酵素の誘導に重要な役割を果たしていることがわかった。また同時に、ARE への結合には small musculoaponeurotic fibrosarcoma (small Maf) という転写因子とのヘテロダイマー形成が必須であることも明らかにされた (Itoh *et al.*, 1997)。さらに、ARE 活性化刺激は、ヘムオキシゲナーゼ 1 やペルオキシレドキシシンなどの抗酸化遺伝子を誘導することも知られていたが、これらの誘導にも Nrf2 が重要な役割を果たしていることが発見され (Ishii *et al.*, 2000)、Nrf2 は多様なストレスに対する生体防御に関与していることが明らかになった。

多様なストレスに対する防御を担うシステムは、多様なストレスを感知する機構を持っていなければならない。Nrf2 システムにおいてこの問題は、Nrf2 と相互作用し、転写活性を抑制するタンパク質 Kelch-like erythroid cell-derived protein with CNC homology (ECH) -associated protein 1 (Keap1) の発見により急激に明らかになった (Itoh *et al.*, 1999)。ストレスのない環境下では、ユビキチンリガーゼのアダプタータンパク質である Keap1 を含む複合体は、Nrf2 をユビキチン化し、プロテアソームにおける分解を促進することで、Nrf2 のタンパク質レベルを低く保っている (Itoh *et al.*, 2003; McMahon *et al.*, 2003)。しかし、細胞がストレスに曝されると、Keap1 はこの機能を失い、Nrf2 のタンパク質レベルの増加と核移行、そして標的遺伝子の転写活性化が生じる (Kobayashi *et al.*, 2004, 2006)。ストレス時に Keap1 の機能が抑制されるのは、Keap1 分子内に存在する反応性のシステイン残基とストレスとの相互作用によって構造変化が起き、Nrf2 のユビキチン化が抑制されるからである (Wakabayashi *et al.*, 2004; Levonen *et al.*, 2004)。環境中のストレスを感知し、Nrf2 の活性を決定するという役割が解明されたことから、Keap1 は Nrf2 システムの「センサー分子」であることが明らかになった。さらに、Keap1 分子内の 3 つのシステインは、それぞれ異なる物質のセンサーとして機能しており

(Kobayashi *et al.*, 2009)、これが多様なストレスを感知するしくみであると理解されている。

1-3 Nrf2 システム活性化による疾病の予防・治療

酸化ストレスは、がん、神経変性疾患、循環器疾患、代謝性疾患など多くの病態と関連することが次々と明らかになってきているため (Poprac *et al.*, 2017; Rani *et al.*, 2016)、Nrf2 システムの医療応用は非常に興味を持たれている (Suzuki *et al.*, 2013)。

ブロッコリースプラウトなどの野菜に高濃度で含まれているサルフォラフェン (sulforaphane) は、Nrf2 研究の初期から代表的な Nrf2 システムの活性化剤として使われてきた (McMahon *et al.*, 2001; Thimmulappa *et al.*, 2002)。実験室レベルでは、化学物質によって誘発されるがんの発生を防ぐという報告が多数あり、そのメカニズムは Nrf2 活性化による第 2 相抱合酵素の誘導が、発癌性の代謝中間体の体外への排出を早めるためと考えられている (Yang *et al.*, 2016)。そのため、がんの予防効果についての臨床試験が多く行われている。さらに、心血管疾患、神経変性疾患、糖尿病などへの効果も確認されている (Yang *et al.*, 2016; <https://clinicaltrials.gov>)。食品由来成分であるため安全性が高く、安価に利用できるため、さらなる応用が期待されている。

Nrf2 システムを活性化する医薬品の研究・開発も盛んである。2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-diene-28-oic acid (CDDO) のメチルエステル誘導体である CDDO-Me は、強力な Nrf2 誘導活性と抗酸化・抗炎症作用を有している (Dinkova-Kostova *et al.*, 2005; Yates *et al.*, 2007)。この作用による病態改善効果を期待して、2 型糖尿病患者の慢性腎不全の治療薬として臨床試験が行われた。第 2 相試験では、有効性が示された (Pergola *et al.*, 2011) が、第 3 相試験において毒性が認められた (Zeeu *et al.*, 2013) ため、開発が中止になっている。現在は、肺高血圧症への適用を目指して、臨床試験が行われている (<https://clinicaltrials.gov>)。ジメチルフマル酸 (dimethyl fumarate) (商品名 Tecfidera®) は、多発性硬化症の治療薬として市販されている薬である。この薬剤が Nrf2 活性化能を持つことは実証されている (Linker *et al.*, 2011; Takaya *et al.*, 2012) が、実際に多発性硬化症の治療効果に Nrf2 活性化が関与しているかどうかは、研究室間で主張が分かれている (Linker *et al.*, 2011; Schulze-Toppoff *et al.*, 2016)。

Nrf2 システム活性化を利用した医療は、このようにすでに実用段階にあり、多くの疾病の治療に新しい選択肢を与える可能性を持っている。しかし、Nrf2 による標的遺伝子活性化の分子メカニズムは、これまで主に培養細胞を用いた実験系によって明らかにな

ってきたが、生体内における活性化のメカニズムは、完全に理解されているとはいえない。たとえば、Nrf2 による標的遺伝子活性化メカニズムには、臓器ごとに違いはないのか、という点である。臓器特異的な誘導メカニズムがあるとするれば、それを理解することによって、疾病の生じている臓器において、効果的に Nrf2 を活性化させることができるかもしれない。さらに、CDDO-Me の例に挙げられるように、Nrf2 活性化剤自体の毒性の問題は、実用化に至るプロセスにおいて避けて通れない。Nrf2 活性化剤が毒性を発揮しない条件を見つけることができれば、安全な薬剤をよりスムーズに開発できるかもしれない。しかしながら、*in vivo* において臓器特異的誘導メカニズムや、毒性が発揮される条件を探索するのは、マウスなどの哺乳類モデルでは倫理的問題があり、経済的にも難しい。

1-4 Nrf2 研究におけるゼブラフィッシュモデル

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) は、基礎医学・基礎生物学研究において急速に普及したモデル動物で、胚・稚魚の時期は皮膚が透明なため、全身における遺伝子発現解析が容易に行える。また、飼育もマウスなどと比較して安価で、産仔数も多いため、胚を用いた毒性学研究が盛んに行われている (Hahn *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2014)。創薬研究にもその有用性が認められ、ゼブラフィッシュを用いたケミカルスクリーニングなども行われるようになってきた (Bowman and Zon, 2010)。

ゼブラフィッシュは、哺乳類と高度に保存された Nrf2 システムを持っていることがわかっている。ゼブラフィッシュの Nrf2 および Keap1 は、2002 年に初めてクローニングされた (Kobayashi *et al.*, 2002)。さらに、ダイマーのパートナーである small Maf タンパク質 (Takagi *et al.*, 2004)、結合配列である ARE の機能 (Suzuki *et al.*, 2005)、Keap1 のストレスセンサーとしての機能 (Li *et al.*, 2008; Kobayashi *et al.*, 2009)、標的遺伝子のラインナップ (Nakajima *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2016) および酸化ストレスに対する防御能 (Mukaigasa *et al.* 2012) が、哺乳類と同様に備わっていることが、すでに明らかにされている。よって、実験上の利便性に加え、ゼブラフィッシュが、医療応用を見据えた Nrf2 研究において非常に有用なモデルとなることが期待される。

1-5 本研究の目的

本研究の目的は、生体内における多様な Nrf2 標的遺伝子誘導メカニズムについて理解し、Nrf2 システムの防御能が効果的に発揮される条件を明らかにすることである。ゼブラフィッシュをモデルとして用い、薬剤、臓器、標的遺伝子ごとに異なる転写活性化メカニズムや防御能誘導について理解することを試みた。

まず第 2 章では、進化という側面から Nrf2 システムを概観した。Nrf2 および Keap1 の機能ドメインの進化的起源を辿ることにより、ゼブラフィッシュ Nrf2 システムの特徴について考察した。

第 3 章では、臓器特異的な標的遺伝子誘導メカニズムに着目した。Nrf2 の代表的な標的遺伝子であるヘムオキシゲナーゼ 1 の誘導が、臓器の代謝的特性に影響されることを明らかにし、Nrf2 による転写活性化メカニズムを臓器ごとに理解する必要性を示した。

第 4 章および第 5 章では、Nrf2 活性化剤による生体防御能賦与について、新たな知見を報告する。Nrf2 活性化剤は、酸化ストレスや重金属の毒性軽減に利用できるが、ストレスサーとの組み合わせによって、複合毒性を生じてしまう事例を発見した。人体への影響を考えた場合、安全性の高い Nrf2 活性化剤の開発が期待されるが、既承認薬の中にも Nrf2 活性化による強力な防御能誘導を生じる薬剤があることを示し、Nrf2 活性化剤の実用化に向けた 1 つの道筋を提示する。

第 2 章

進化という観点からみた 脊椎動物の Nrf2 システム

第2章 進化という観点からみた脊椎動物の Nrf2 システム

地球上の動物は、さまざまなストレスと戦いながら生きている。自身の代謝によって生じる酸化ストレスや、環境中の化学物質をうまく処理する機構を持っていないければ、現在のような動物種の繁栄はなかったであろう。特に脊椎動物においては、高い代謝率や広範囲を移動できる骨格を獲得したため、出会うストレスの量、種類ともに増加したことが予想される。よって、Nrf2 システムのような多様なストレスに応答できる生体防御システムは、脊椎動物の進化にとって非常に重要であったように思えるが、その精巧な活性調節メカニズムの進化的起源はどこにあるのだろうか。

このような問いは、医学研究においても重要である。基礎研究において、現象のメカニズムを生体内で理解したい場合には、モデル生物を利用することになるが、倫理上の問題からより下等なモデル生物が好まれるようになってきた。しかし、その成果がヒトに外挿できなければ、医学研究としては成立しない。Nrf2 システムの場合、マウスやゼブラフィッシュだけでなく、ショウジョウバエ (Pitoniak and Bohmann, 2015) や線虫 (Blackwell *et al.*, 2015) においても類似のシステムの存在が知られているが、どの生物を用いれば、より効率的に医療応用につながる知見を集められるのだろうか。

本章では、公共データベース上のアミノ酸配列情報を比較することにより、Nrf2 および Keap1 タンパク質の構造が進化の過程でどのように変化してきたのか推定した。ドメイン構造や特定の機能を持つアミノ酸の獲得・喪失を明らかにすることにより、各モデル生物の Nrf2 (類似) システムの特徴を把握することが本章の目的である。

2-1 方法

Nrf2 を含む Nrf ファミリータンパク質および Keap1 タンパク質のアミノ酸配列を ensembl データベース (<https://www.ensembl.org>) より取得した。各タンパク質の構造の進化的起源を明らかにするため、後口動物 (Deuterostomes ; 脊椎動物、ホヤ、ウニを含む) および新口動物 (Protostomes ; 昆虫、軟体動物、線虫を含む) から広くアミノ酸情報を集めた。Nrf ファミリータンパク質に関しては、さらに二胚葉動物であるヒドラからも情報を取得した。

アミノ酸情報は、CLUSTALW (<http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) によるアラインメントをベースとして、保存されたドメイン構造や機能モチーフを探し、種間でどの程度保存されているかを比較した。Nrf2 の各ドメインおよびモチーフの機能は、主に哺乳類を用いた研究から明らかにされている。文献により集めた情報を図 2-1 にまとめた。さらに、Keap1 の各ドメインおよびシステインの機能について、文献情報を図 2-2 にまとめた。これらの情報をベースに、Nrf2 システムの機能的な進化について考察した。

2-2 結果

2-2-1 Nrf ファミリータンパク質のアミノ酸配列比較

Nrf ファミリー遺伝子の情報を検索した結果、脊椎動物では Nfe2、Nrf1、Nrf2、Nrf3 の 4 つが存在し、それぞれ異なるタンパク質をコードすることがわかった。一方で、無脊椎動物は Nrf ファミリー遺伝子座を 1 つしか保有していなかった。ゼブラフィッシュには Nrf2a および Nrf2b という 2 つの遺伝子座がある (Timme-Laragy *et al.*, 2012) が、哺乳類と同様の抗ストレス機能を持っているのは Nrf2a であることが確かめられている (Mukaigasa *et al.*, 2012)。ショウジョウバエのホモログは、Cnc (Cap'n'collar) という名前がつけられており、そのうち、ストレス応答に関して最もよく研究されている CncC というスプライシングバリエーション (Pitoniak and Bohmann, 2015) を、解析に用いた。取得した Nrf ファミリータンパク質の ID 番号を表 2-1 に示した。これらのアミノ酸配列をアラインメントすることで、ドメイン構造や機能モチーフを動物種間で比較した。ドメイン構造は、Itoh らが提唱した 6 つの Nrf2-ECH homology (Neh) ドメイン (Itoh *et al.*, 1999) をベースに比較を行った。アミノ酸配列の比較を図 2-3 に示した。

Neh1 ドメインは、CNC-basic leucine zipper (bZip) ドメインとも呼ばれ、DNA 結合 (CNC ドメインおよび basic region) および small Maf タンパク質とのヘテロダイマー形成

(leucine zipper) に重要な部位である。このドメインの中央に位置する塩基性領域は、種を超えて広く保存されており、これらのタンパク質が同じ起源をもち、DNA 結合能が祖先種から受け継がれてきたものであることが示唆された。線虫の Skn-1 は、ダイマー形成に必須の leucine zipper 領域を失っていたが、このことは Skn-1 が DNA にモノマーとして結合するという事実と一致する (Blackwell *et al.*, 2015)。

Neh2 ドメインは、Keap1 との相互作用ドメインであり、またユビキチン化を受ける部位でもある (Itoh *et al.*, 1999)。N 末端側の DLG モチーフおよび C 末端側の ETGE モチーフが、Keap1 と直接的に相互作用することが、Nrf2 タンパク質のユビキチン化に重要であることがわかっている (Katoh *et al.*, 2005; McMahon *et al.*, 2006; Tong *et al.*, 2007)。ヒドラの Nrf タンパク質には、Neh2 ドメインが保存されていなかったが、3 胚葉動物の Nrf タンパク質は、このドメインを持っていた。脊椎動物の Nrf ファミリータンパク質では、Nrf1 において DLG および ETGE が保存されていたが、Nfe2 および Nrf3 では失われていた。また、マウス Nrf2 において、この 2 つのモチーフの間に存在する 7 つのリジン残基は、ユビキチン化部位であることが知られている (Zhang *et al.*, 2004)。リジン残基の数は種ごとに異なっていたものの、すべての Nrf タンパク質は 2 つ以上のリジン残基を持っていた。また、マウス Nrf2 における 40 番目のセリンは protein kinase C によるリン酸化を受け、Keap1 との相互作用に影響を与えているとされている (Huang *et al.*, 2002)。このセリン残基は、ゼノパスで失われているなど例外はあるが、脊椎動物でのみみられたため、リン酸化による制御は脊椎動物の出現以降に獲得され、いくつかの種では失われたのではないかと推測される。

Nrf2 タンパク質の C 末端に位置する Neh3 ドメインは、標的遺伝子の転写活性化に重要な部位である。このドメインに存在する VFLVPK モチーフは、chromodomain helicase DNA binding protein 6 (CHD6) との相互作用部位であり、Nrf2 の転写活性化に不可欠な部位である (Nioi *et al.*, 2005)。このモチーフは、調べたすべての種において、よく保存されていた。

Neh4 および Neh5 ドメインもまた、転写活性化に重要な領域であり、転写のコアクティベータである cAMP response element binding protein (CREB) binding protein (CBP) との相互作用部位である。Neh4 に存在する transcriptional adapter motif (TRAM, FxD/ExxxL) が、この相互作用に特に重要な部位である (Katoh *et al.*, 2001)。これらと保存されたドメインは、ヒドラや新口動物にはみられず、ウニやホヤではみとめられたことから、後口動物でのみ進化したことが示唆される。マウスの Nrf ファミリータンパクをみると、不完全な TRAM が Nrf3 に存在し、他のタンパク質にはみとめられなかった。Neh5 ドメインは逆に、Nrf1 および Nfe2 に保存されていたが、Nrf3 では見つける

ことができなかった。

Neh6 ドメインは、リン酸化による Nrf2 の活性制御を担っている。N 末端側にある DSGIS モチーフは、glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) 依存的な Nrf2 のリン酸化、および引き続く β -transducin repeat-containing protein (β -TrCP) によるユビキチン化に重要である (Chowdhry *et al.*, 2013)。このモチーフは、ヒドラから保存されており、リン酸化による制御は、今回調べた種の共通祖先から保存されている、進化的に古い制御系であることが予想される。またこのモチーフは、他のマウス Nrf ファミリータンパク質にも保存されているため、これらにもリン酸化による制御があるのではないかと推測される。C 末端側にはもうひとつのリン酸化部位 (GSAPGS モチーフ) が存在するが、これはヒドラ、ショウジョウバエ、タコ、ウニおよびホヤではみられなかった。脊椎動物の Nrf2 タンパク質においては、類似の配列が認められたが、保存性は低く、この部位の機能的な重要度はよくわからない。

脊椎動物の Nrf タンパク質を比較した時に、違いが明確なのは、Nrf1 および Nrf3 の N 末端に存在する小胞体 (ER: endoplasmic reticulum) との結合ドメインである。Nrf1 においてこの部位は N-terminal homology box1 (NHB1) と呼ばれているが、これは、Nrf1 タンパク質を ER につなぎ止めておく機能を持っており、この ER 膜への結合の有無によって Nrf1 の転写活性が制御されている (Zhang *et al.*, 2007)。マウス、アフリカツメガエルおよびゼブラフィッシュの Nrf3 は、この NHB1 と高度に保存された N 末端部を持っていた。さらに、無脊椎動物の Nrf タンパク質にも、N 末端側に保存された部位が存在した。

それぞれのドメインの保存性を図 2-4 にまとめた。多様な生物種の Nrf ファミリータンパク質のうち、6 つすべてのドメインを持っていたのは、脊椎動物の Nrf2 だけであった。ホヤおよびウニの Nrf タンパク質は Nrf1 と類似したドメイン構造をもち、N 末端には NHB1 ドメインももっていた。新口動物であるショウジョウバエおよびタコの Nrf タンパク質も NHB1 ドメインをもつが、Neh4 および Neh5 ドメインを欠いていた。興味深いことに、Neh2 ドメインにおける DLG と ETGE モチーフ間のアミノ酸距離は、脊椎動物間で高度に保存されていた。しかし、この距離は、ホヤやウニでは近く、タコやショウジョウバエでは比較的遠かった。Nrf2 のユビキチン化にはこの 2 つのモチーフが Keap1 と適切な位置関係において相互作用する必要があるため、このような違いは、Keap1-Nrf2 間の結合構造が種によって異なっている可能性を示唆している。

ゼブラフィッシュの 2 つ目の Nrf2 ホモログ Nrf2b は、保存された Neh1、Neh2 および Neh3 ドメインをもっているが、Neh4 ドメインにおける転写活性化モチーフや Neh6 ドメインにおけるリン酸化部位を欠いていたため、哺乳類 Nrf2 と同様の機能を持ってい

るとは考えにくい。

2-2-2 Keap1 のアミノ酸配列比較

Nrf2 と同様に Keap1 についても系統的解析を行った (図 2-5)。解析に用いた Keap1 タンパク質の ID 番号を表 2-2 に示す。ゼブラフィッシュにおいては、2 つの Keap1 (Keap1a および Keap1b) オルソログが見つかっている。ensembl データベース上で検索できる 11 種の硬骨魚類 (アマゾンモーリー、ケイブフィッシュ、タラ、トラフグ、メダカ、プラティフィッシュ、スポッテッドガー、トゲウオ、ミドリフグおよびティラピア) はすべて 2 つの Keap1 オルソログを持っていた。この倍加の起源を調べるため、シーラカンス、グリーンアノールおよびゼノパスの遺伝子情報も参照した。シーラカンスおよびゼノパスには、2 つの Keap1 オルソログが存在していたが、は虫類であるグリーンアノールには 1 つしか存在していなかった。また、ホヤにも Keap1 遺伝子は 1 つしか存在しないことから、2 つめの Keap1 遺伝子は、脊椎動物の出現時に獲得され、羊膜類において再度失われたと考えられる。

Keap1 は図 2-2 に示すような 3 つのドメインからなるが、すべての部位が Nrf2 の活性抑制に重要であることがわかっている。broad complex-tramtrack-bric a brac (BTB) ドメインは、ホモダイマーの形成に重要であり、とくに 104 番目のセリンがその機能に重要であることが示されている (Zipper and Mulcahy, 2002)。この周辺のアミノ酸配列は、脊椎動物・無脊椎動物に広く保存されていたため、これらの祖先種の段階で Keap1 のホモダイマー形成能は既に獲得されていたと推測される。

C 末端に位置する double glycine repeat (DGR) ドメインは、Nrf2 との相互作用部位である。構造解析により、Nrf2 の DLG および ETGE モチーフと直接的に結合するアミノ酸が明らかにされている (Tong *et al.*, 2007)。これらのアミノ酸のうちほとんどが、ショウジョウバエからマウスまで保存されているか、物理化学的性質のよく似たアミノ酸に置換されていたため、Keap1-Nrf2 の相互作用は、これらの共通祖先の段階ですでに存在していたことが示唆される。

タンパク質の中央にある intervening region (IVR) ドメインは、Cullin3 (Cul3) タンパク質との相互作用部位であり、さらに regulator of cullin 1 (Roc1) を含んだ E3 リガーゼ複合体の形成に重要な役割を果たしている (Kobayashi *et al.*, 2004)。この部位には、核外排出シグナル配列 [nuclear export signal: NES, Lx(1-3)Lx(2-4)LxL] があり、細胞質への局在に重要である。この配列も、動物種間に高度に保存されており、Keap1 の細胞内局在も進化的によく保存されていることが予想される。

Keap1 タンパク質の特徴として、システインに富んだタンパク質であることが挙げら

れる。前述のように、このシステインがストレスセンサーとしての機能を持っている。図 2-6 に、マウス Keap1 が持つ 25 個のシステインを元にして、それぞれがどの程度進化的に保存されているのかをまとめた。Cys-77、Cys-171、Cys-196、Cys-297 および Cys-395 は、マウス Kelch ファミリータンパク質間に保存されていたため、Keap1 の出現よりも進化的起源の古いものと考えられる。8 つのシステイン (Cys-226、Cys-241、Cys-319、Cys-368、Cys-406、Cys-489、Cys-583 および Cys-613) は、ショウジョウバエやタコにも保存されており、祖先型の Keap1 にも存在していたと考えられる。

2-3 考察

2-3-1 Nrf2 の進化

ドメイン構造の解析を元に、Nrf タンパク質の進化の道筋を推定した (図 2-7)。Nrf2 に保存された 6 つのドメインのうち、祖先的な Nrf は Neh1、Neh3、Neh6 ドメインおよび N 末端の ER 結合領域を持っていたのではないかと推定される。ヒドラの Nrf タンパク質が Neh2 ドメインを持っておらず、また ER 結合ドメインを持っていることから、哺乳類の Nrf1 のように、ER 膜上への結合によってその活性が制御されている可能性がある。三胚葉生物における Neh2 ドメインの出現は、Keap1 に依存した活性制御および多様なストレスへの応答能をもたらしたのではないかと予想される。Neh4 および Neh5 ドメインに関しては、後口動物への進化の過程で獲得されたことが推測される。線虫においては、独特の進化がおこり、祖先タンパク質が持っていた多くのドメインを失ったと考えられる。

脊椎動物の出現とともに、Nrf 遺伝子は 4 つの遺伝子座に分かれ、それぞれドメイン構造が変化していった。このうち Nrf2 は、6 つの Neh ドメインを獲得すると同時に、ER 結合ドメインを失った。このことは、Nrf2 があたかも ER 膜上における活性制御から逃れ、Keap1 による制御メカニズムへと移行したようである。最近の研究により、ショウジョウバエの Cnc 遺伝子座は、選択的スプライシングにより少なくとも 16 の転写バリエーションを作り出すことがわかり、そのうちの 1 つ (CncI) は N 末端の ER 結合ドメインを欠き、構造上 Nrf2 によく似ている (Pitoniak and Bohmann, 2015)。さらに、タコおよびホヤのデータベース上にも、Nrf 遺伝子座から転写される mRNA バリエーションがそれぞれ 2 つ登録されており、ER 結合ドメインを持つものと持たないものに分かれている。線虫の Skn-1 にも膜結合ドメインを持つスプライシングバリエーション (Skn-1a) と持たないバリエーション (Skn-1c) が報告されており、Skn-1a に関しては、ER に局在するこ

とが実際に確かめられている (Glover-Cutter *et al.*, 2013)。

これらを総合すると、3 胚葉動物の出現の時点で、単一の Nrf 遺伝子座から選択的スプライシングによってさまざまなタンパク質が作り出されるという仕組みが備わったと推測される。すなわち、脊椎動物では、ゲノムの 4 倍体化に伴って、そのさまざまなバリエーションタンパク質がそれぞれの遺伝子座に割り振られ、そして、Nrf2 の遺伝子座には、Keap1 依存的な制御を受け、かつ ER における制御を受けない転写因子が割り当てられたのではないかと推察する。

2-3-2 Keap1 の進化

Keap1 タンパク質の進化について図 2-8 のように推定した。センサーシステインとしてよく研究されている 3 つのシステイン (Cys-151、Cys-273 および Cys-288) のうち、祖先型の Keap1 は Cys-273 および Cys-288 を保有していた。脊索動物 (ホヤ) の出現とともに Cys-151 が獲得された。脊椎動物になると、Keap1 遺伝子座が倍加し、そのうちの 1 つは Cys-273 を失った。条鰭綱魚類 (多くの硬骨魚類) ではさらに、Cys-288 を失った Keap1 が生まれた。しかし、肉鰭綱 (シーラカンス、四足動物の祖先) では、これらのシステインに変化はなく、羊膜類において Cys-273 を欠いたタイプの Keap1 を失い、単一の遺伝子座のみを持つようになったと推測される。

システイン残基のセンサーとしての機能は、システインそれ自身の存在だけで決まっているわけではない。マウス Keap1 の Cys-151 の機能は、その隣に存在する正に荷電したリジン残基によってもたらされていることがわかっている (Kobayashi *et al.*, 2009)。ホヤにおいては、このリジン残基が保存されていないため、Cys-151 がセンサー機能を持っているかどうか、不明である。考えられる進化のシナリオとしては、脊索動物において Cys-151 が偶然に獲得され、さらに脊椎動物の出現とともに獲得された正電荷のアミノ酸がこのシステインにセンサーとしての機能を与えたということである。

ショウジョウバエでは、Cys-151 が保存されていないにも関わらず、ショウジョウバエの Keap1-Cnc システムは、ジエチルマレイン酸に応答できるという結果が報告されている (Chatterjee and Bohmann, 2012; Pitoniak and Bohmann, 2015)。ショウジョウバエにおける親電子性物質のセンシングメカニズムは完全には理解されていないが、他のシステインがこれを感知するか、完全に異なるメカニズムによって感知されている可能性がある。内因性の伝達物質である一酸化窒素 (nitric oxide: NO) も Cys-151 を介して Nrf2 システムを活性化することが報告されている (McMahon *et al.*, 2010; Saito *et al.*, 2016) が、Cys-151 を持たないショウジョウバエなどの種において、このような刺激に Nrf2 システムが応答するのか、興味深いところである。

Cys-273 および Cys-288 は、抗炎症作用をもつプロスタグランジン 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) の感知に重要であることがよく知られている (Levonen *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2016)。ショウジョウバエ Keap1-Cnc システムにおいては、15d-PGJ₂ への応答性が調べられていないが、Cys-273/288 が保存されているため、このシグナルを感知できるのではないかと予想される。ヒ素化合物は、Cys-151、Cys-273 および Cys-288 のすべてと反応し、強力に Nrf2 を活性化することが報告されている (Saito *et al.*, 2016)。ショウジョウバエ Keap1-Cnc システムもヒ素化合物に応答することが確かめられており (Chatterjee and Bohmann, 2012; Pitoniak and Bohmann, 2015)、保存された Cys-273 および Cys-288 が重要な役割を果たしていると考えられる。

Cys-226 および Cys-613 については、過酸化水素や重金属の感知に必要であるという報告がある (McMahon *et al.*, 2010; Hourihan *et al.*, 2013)。ウニでは Cys-226 を、ショウジョウバエではこのどちらも欠いているが、それ以外の種ではこのシステインは広く保存されていた。ゼブラフィッシュの Keap1-Nrf2 システムも過酸化水素やカドミウムに対して応答することがわかっており (Kobayashi *et al.*, 2009; Mukaigasa *et al.*, 2012)、保存された Cys-226 および Cys-613 が、哺乳類と同様に機能したのだと推測される。しかしながら、ショウジョウバエ Keap1 は Cys-226 および Cys-613 を欠いているにも関わらず、過酸化水素やパラコートなどの酸化ストレスに応答することが報告されている (Sykiotis and Bohman, 2008)。このことから、酸化ストレスや重金属に対しては、ショウジョウバエは、哺乳類と異なるセンサーメカニズムを持っているのではないかと考えられる。

上述したシステインに加えて、Cys-257、Cys-297 および Cys-319 も高い反応性のチオール基を持っていることが知られている (Dinkova-Kostova *et al.*, 2002; Egger *et al.*, 2005)。Cys-257 は、シーラカンス、カエル、トカゲ、ニワトリおよびマウスにのみ保存されており、硬骨魚類の Keap1b はこれを持っていなかったため、肉鰭綱の出現時に進化したと考えられる。Cys-297 はマウスの Kelch ファミリータンパク質間に保存されたシステインであるが、ゼブラフィッシュの Keap1b をのぞき、調べた動物種間においても広く保存されていた。Cys-319 に関しては、系統学的な規則性はみとめられず、このシステインの進化的な起源を特定することはできなかった。Cys-434 は、NO 産生後に生成される内因性の親電子性物質である 8-nitro-cGMP により修飾を受けることがわかっている (Fujii *et al.*, 2010)。このシステインは、ウニおよびグリーンアノールを除いた脊椎動物間に保存されていた。このシステインの機能は、生体内においてはまだ評価されていないが、このシステインをもたない種において、8-nitro-cGMP が Nrf2 を活性化するのか興味深い。

2-3-3 ゼブラフィッシュ Nrf2 システムの特徴

本研究におけるアミノ酸配列の系統学的解析から、ゼブラフィッシュ Nrf2a は、脊椎動物の出現時に獲得された哺乳類 Nrf2 と共通のドメイン構造を持っていることが確かめられた。また、Keap1 のドメイン構造に関しても、保存されていた。さらに、Nrf2 システムの転写活性化の調節メカニズムや生体防御機能がゼブラフィッシュにも保存されていることは、序論に書いた通りである。よって、ゼブラフィッシュは、基礎医学研究のモデル動物という観点から、ヒトへの外挿性がある程度担保されたモデル動物であると言える。

さらに、進化的考察から、独立した Nrf2 遺伝子座を持っているのは、脊椎動物のみであることが明らかになった。脊椎動物以外では、単一の Nrf 遺伝子座から Nrf2 ホモログを含む複数のバリエーションを転写していることが推測されたため、Nrf2 ホモログの発現臓器や時期に偏りがある可能性がある。このような点を明らかにしていくことは、進化生物学の観点から非常に興味深いことであるが、ヒトへの外挿性を考えた場合には、やはりゼブラフィッシュなどの脊椎動物を用いて研究することが好ましいだろう。

しかし、ゼブラフィッシュの Nrf2 システムにも、哺乳類と異なる部分がある。もっとも目立つのが、2つの Keap1 オルソログを持っている点である。両オルソログは、互いに異なる反応性システインを保有しているが、哺乳類でストレスセンシングに重要であることがわかっている Cys-151、Cys-273 および Cys-288 は、いずれかのオルソログに保存されており、システム全体で考えると、哺乳類と同様な刺激のバラエティに応答できることがすでに確かめられている (Kobayashi *et al.*, 2009)。また、両オルソログとも Nrf2 の活性抑制機能を持っている (Li *et al.*, 2008)。よって、魚類におけるこのゲノムの特性は、それぞれのシステインの機能を分けて調べることができるという点で、むしろ長所と言えるかもしれない。実際に、ゼブラフィッシュの Keap1a と Keap1b のアミノ酸配列の違いに着想を得て、隣接した正電荷のアミノ酸が Cys-151 の反応性に重要であることが解明されている (Kobayashi *et al.*, 2009)。簡単に *in vivo* での薬剤曝露ができるという強みに加え、CRISPR-Cas9 などのゲノム編集技術でノックアウトやシステイン置換ゼブラフィッシュシステムを作製することで、生体内でのシステインの機能をより詳細に明らかにできるかもしれない。

第 3 章

Nrf2 標的遺伝子の組織特異的誘導メカニズム

第3章 Nrf2 標的遺伝子の組織特異的誘導メカニズム

前章では、転写活性化因子 Nrf2 とセンサー分子 Keap1 という対になる 2 つのタンパク質が、進化の過程で種を超えて受け継がれて来たことを示した。広範な刺激に応答できるセンサーを持っていることも驚くべきことであるが、多くの標的遺伝子を一度に誘導し、多様なストレスを除去できることもまた、このシステムが種を超えて保存されている理由の 1 つに違いない。

「マルチセンサー」や「多機能性」のすばらしさの裏に隠れているが、Nrf2 システムの最も基本的な性質は、「必要な状況でのみ」活性化することである。これは当たり前のようであるが、活性を「オフ」にしておく仕組みがなければ、常に余計なエネルギーを消費することになるため、生体防御システムとしてこれほどまで多様な動物種に採用されなかったかもしれない。細胞の周辺環境に依存した転写調節の研究のはじまりは Jacob と Monod の時代にまでさかのぼるが、彼らが用いたバクテリアのような単細胞生物においても、使わない遺伝子の転写を「オフ」にしておくことは、重要なことであるらしい (Jacob and Monod, 1961)。

多細胞生物は、形態・機能の異なるさまざまな臓器を持っている。そのため、ストレス応答に関与する転写因子についても、いつ転写を「オン」にし、「オフ」にするのかという基準が、臓器ごとに違っていると考えられる。私の所属研究室は、全身における遺伝子発現を簡単に評価できるゼブラフィッシュ胚を用いて、Nrf2 標的遺伝子の誘導臓器プロファイルを明らかにしてきた。ゼブラフィッシュ Nrf2a は、鼻、エラ、肝臓において高発現していたため、標的遺伝子も当然これら臓器において強く誘導されることが予想された。その予想通り、多くの Nrf2 標的遺伝子は、Nrf2 活性化剤 diethyl maleate (DEM) に応答し、鼻、エラ、肝臓で強く誘導された。しかし、同じ刺激に対して、heme oxygenase 1a (*hmox1a*) という標的遺伝子の誘導は、肝臓特異的であった (Nakajima *et al.*, 2011; 図 3-1)。この誘導プロファイルの違いは、臓器依存的 (および標的遺伝子依存的) な転写活性化メカニズムの存在を示唆しているため、これを明らかにすることによって、Nrf2 システムが転写の「オン」「オフ」を決定するロジックを理解できると考えた。また、転写を「オフ」にしておくメカニズムを理解し、一時的にその抑制を解除できれば、効率的に生体防御機能を誘導できる可能性がある。

glutathione S-transferase pi 1 (*gstp1*) などの Nrf2 標的遺伝子が肝臓以外の臓器でも誘導されたにもかかわらず、*hmox1a* が肝臓でしか誘導されない (図 3-1) ということは、*hmox1a* 特異的な転写抑制因子の存在が予想された。所属研究室の過去の研究において、Nrf2 標的遺伝子の転写活性化を抑制するという報告がある 4 分子 (Venugopal and Jaiswal,

1998; Dhakshinamoorthy and Jaiswal, 2000; Sun *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007) について、ゼブラフィッシュのオルソログ [BTB and CNC homology 1b (*bach1b*)、*nrf1b*、*mafgl* および *cfos*] をクローニングし、Nrf2a 依存的な *hmox1a* の誘導を抑制できるものを探索したところ、*Bach1b* だけがその基準に当てはまった (中島, 2012)。実際に *Bach1b* をノックダウンすると、*hmox1a* は肝臓以外でも誘導された。また、哺乳類で *Bach1* の抑制機能を解除することが知られているヘム (Ogawa *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2004; Zenke-Kawasaki *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2013) の濃度を薬理的に変化させたところ、*hmox1a* の誘導パターンが変化した (中島, 2012)。

本章の研究は、*hmox1a* 遺伝子の肝臓特異的誘導のメカニズムにおける、ヘム-*Bach1* 軸の機能をさらに詳細に解明することを目的として行った。肝臓とそれ以外の臓器の代謝特性の違いが、Nrf2 による転写活性化に制限を与えていることを報告し、この制御の生理的意義についても考察する。

3-1 材料と方法

3-1-1 ゼブラフィッシュおよび薬剤への曝露

本章の実験は、野生型 AB 系統のゼブラフィッシュを用いて行った。ゼブラフィッシュ胚は、すべて自然交配により得た。100 μ M DEM (Wako, Osaka, Japan)、0.5 mM succinylacetone (SA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) および 100 μ M ヘミン (Wako) への曝露は、培養ディッシュ内で行った。

3-1-2 プラスミド構築

bach1a のクローニングには、受精後 5 から 7 日齢のゼブラフィッシュ稚魚の total RNA から合成した cDNA を用い、PCR 反応で open reading frame (ORF) を増幅し、pBluescript II KS⁺ベクターにサブクローニングした。これを pKS*bach1a* と名付けた。

Morpholino oligonucleotide (MO) の活性確認用のプラスミドは、pCS2eGFP (Kobayashi *et al.*, 2001a) に、各 MO の標的配列を挿入することで作製した。*bach1a*MO の標的配列は、合成オリゴヌクレオチドをアニーリングさせることによって準備した。*bach1b*MO の標的配列は、cDNA から PCR 反応で増幅した。それぞれ、pCS2*bach1a*MeGFP および pCS2*bach1b*MeGFP と名付けた。

プラスミド構築に用いた PCR プライマーおよび合成オリゴヌクレオチドを表 3-1 に示す。すべてのプラスミドについて、目的の配列をクローニングできたことを、シーケンス反応によって確認した。さらに、本研究では pSK*hmox1a* (Nakajima *et al.*, 2011)、pKS*gstp1N* (Suzuki *et al.*, 2005)、pCS2*nrf2a* (Kobayashi *et al.*, 2002)、pCS2*mafG1* (Takagi *et al.*, 2004)、pKS*bach1b* (Fuse *et al.*, 2015) を使用したが、構築方法は、過去の論文に示してある通りである。

3-1-3 過剰発現およびノックダウン解析

過剰発現解析に用いた mRNA は、鋳型となる pCS2*bach1a*MeGFP および pCS2*bach1b*MeGFP を制限酵素 *Bsp120I* で消化後、SP6 mMESSAGE mMACHINE *in vitro* transcription kit (Ambion, Austin, TX) を用いて合成した。MO は、Gene Tools LLC (Philomath, OR) から購入した。各 MO の配列を表 3-2 に示す。mRNA および MO は、1 細胞期ゼブラフィッシュ胚の卵黄に、IM300 microinjector (Narishige, Tokyo, Japan) を用いて注入した。green fluorescent protein (GFP) の蛍光は、M205 FA 顕微鏡 (Leica, Wetzlar, Germany) に装着された GFP-BP フィルター下 (励起光 470 nm、蛍光 525 nm) で観察し、DFC310 FX デジタルカメラ (Leica) で記録した。

3-1-4 遺伝子発現解析

whole-mount *in situ* hybridization (WISH) 解析は研究室で過去に用いられていた方法 (Kobayashi *et al.*, 2001b) に若干の修正を加えて実施した。受精後 5 日目のゼブラフィッシュ胚を、phosphate buffered saline (PBS) に溶解した 4% paraformaldehyde (PFA) で固定した。50% および 100% メタノールでそれぞれ一度ずつ洗浄し、100% メタノール中に -20°C で一晩保管した。PBT (PBS に Tween-20 を 0.1% の終濃度で加えたもの) で 2 度洗浄後、9% 過酸化水素中で体色素を脱色した。PBTw (PBT に牛血清アルブミンを 0.2% の終濃度で加えたもの) で 2 度洗浄後、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のプロテナーゼ K を含む PBTw で 20 分間処理し、PBS に溶解した 4% PFA で 20 分間固定した。PBTw で一度洗浄した後、ハイブリダイゼーションバッファー [50% formamide (FA)、5x Standard Saline Citrate (SSC)、5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、0.1% Tween-20、0.1% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate (CHAPS)、1 mg/mL RNA from torula yeast、0.5 mg/mL heparin] 中で 62°C 、3 時間以上インキュベートし、さらにプローブを含むハイブリダイゼーションバッファー中で一晩インキュベートした。50% FA/2x SSC/0.3% CHAPS 溶液で 1 度、2x SSC/0.3% CHAPS 溶液および 0.2x SSC/0.3% CHAPS 溶液で 2 度ずつ、さらに maleic acid buffer (MAB) で一度、洗浄した後、MAB に溶解した 2% ブロッキング試薬 (Roche) で 1 時間、ブロッキングを行った。その後、2% ブロッキング試薬中で、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体 (1:2000 希釈) と、 25°C で 4 時間反応させた。PBTw で 6 回洗浄し、さらに染色バッファー [100 mM Tris-HCl (pH 9.5)、100 mM NaCl、50 mM MgCl_2 、0.1% Tween-20、1.2 mg/mL levamisol] で 2 回洗浄した後、BM パープルアルカリフォスファターゼ基質 (Roche) で染色を行った。

WISH 解析に用いた RNA プローブは、pKSgstp1N、pKSbach1a および pKSbach1b については *Bam*HI で、pSKhmox1a については *Xho*I で消化後これらを鋳型とし、DIG RNA labeling mix (Roche, Mannheim, Germany) の存在下で、T3 RNA ポリメラーゼ (Roche) によって合成した。染色後のサンプルは、MZ16 顕微鏡 (Leica) で観察し、DP73 デジタルカメラ (Olympus, Tokyo, Japan) で記録した。

reverse transcription-PCR (RT-PCR) 解析のために、QIAzol lysis reagent (Qiagen, Hilden, Germany) でゼブラフィッシュ胚から total RNA を抽出し、SuperScript II (Life Technologies, Carlsbad, CA) を用いて cDNA を合成した。PCR 解析に用いたプライマーは、表 3-3 に示した。各遺伝子の発現量は、elongation factor 1 α (*ef1a*) 遺伝子の転写産物量で補正した。

3-2 結果

3-2-1 2つの Bach1 オルソログが肝臓特異的な転写誘導プロファイルに関与する

Bach1 は、脊椎動物およびホヤ類に保存されている 2 つの Bach タンパク質 (Bach1 および Bach2) の 1 つである (図 3-2)。Bach1 は、Nrf2 と同じく bZip ドメインを持つ転写因子で、small Maf タンパク質とヘテロダイマーを形成し、転写抑制機能を発揮することが知られており (Oyake *et al.*, 1996; Igarashi and Watanabe-Matsui, 2014)、Nrf2 依存的な Hmox1 遺伝子の誘導を抑制するという報告がある (Sun *et al.*, 2002; 2004)。ゼブラフィッシュには 15 番および 10 番染色体上にそれぞれ *bach1a* および *bach1b* という 2 つの Bach1 オルソログが存在している。このうち Bach1b が肝臓特異的な誘導プロファイルに関与していることは既に明らかになっているが (中島, 2012)、両オルソログが *hmox1a* の肝臓特異的誘導プロファイルにどのように寄与しているのか、あらためて MO によるノックダウン解析をすることにより検証した。まず、*bach1a*MO および *bach1b*MO の標的配列の下流に eGFP を発現させる mRNA を合成し、初期胚にそれぞれの MO と共注入することで、特異的な翻訳抑制が生じることを確認した (図 3-3)。これら MO を 1 細胞期ゼブラフィッシュ胚に注入した後、受精後 5 日目において DEM による *hmox1a* の誘導プロファイルを WISH 解析によって評価した (図 3-4)。DEM 曝露 3 時間後、注入なしコントロール群 (n = 103) および *bach1a*MO 注入群 (n = 32) では、*hmox1a* の誘導はすべての胚で肝臓特異的であった。一方で、*bach1b*MO 注入群では、肝臓に加え、50%の胚で鼻やエラといった肝臓以外の臓器でも誘導がみとめられた (n = 26)。さらに、*bach1a*MO および *bach1b*MO を共注入した場合には、87%の胚 (n = 87) で肝臓以外での誘導がみられ、異所性の誘導が増強される傾向にあった。これらの結果より、Bach1b が肝臓以外の臓器で *hmox1a* の誘導を抑制することによって、肝臓特異的誘導プロファイル形成にメインの役割を果たしており、Bach1a は補助的な役割を持っているのではないかと考えられた。

3-2-2 ヘム濃度の減少は *hmox1a* の肝臓での誘導を減弱した

次に検証したのは、どうして肝臓における *hmox1a* の誘導は、Bach1 によって抑制されないのか、という疑問である。*bach1a* および *bach1b* の発現プロファイルを WISH 解析によって調べたところ、肝臓を含め全身で発現していた (図 3-5)。よって、Bach1 遺伝子自体の発現パターンによって、肝臓特異的誘導のメカニズムを説明できないことがわかった。そこで、Bach1 の転写抑制機能が、肝臓では解除されているのではないかと考え、Bach1 の機能を抑制するとの報告がある生体内低分子ヘムに着目した (Ogawa *et*

al., 2001; Suzuki et al., 2004; Zenke-Kawasaki et al., 2007; Tan et al., 2013)。また、肝臓はヘムが豊富に存在していることが知られている臓器である (Meyer et al., 2002) ため、肝臓では Bach1 による抑制が解除されており、Nrf2 活性化に応じて *hmox1a* が誘導されるのではないかと予想した。

これを確かめるため、ヘムの生合成阻害剤 succinylacetone (SA) を利用し、ゼブラフィッシュ胚のヘム濃度を低下させた状態で、DEM 曝露後の *hmox1a* 遺伝子の誘導プロファイル調べた (図 3-6)。DEM 単独処理群では、肝臓での *hmox1a* 誘導の強さの割合は、強誘導 80%、弱誘導 14%、誘導なし 7% (n = 44) であったが、DEM・SA 同時処理群では、強誘導 15%、弱誘導 30%、誘導なし 56% (n = 54) と、顕著に減弱していた。

この誘導現弱効果を *bach1a*MO および *bach1b*MO 共注入胚においても同様に検証した。肝臓における誘導は、DEM 単独処理群で、強誘導 74%、弱誘導 26%、誘導なし 0% (n = 19)、DEM・SA 同時処理群で、強誘導 81%、弱誘導 19%、誘導なし 0% (n = 21) と明らかな差はみとめられなかった。肝臓以外の臓器における誘導の有無も、DEM 単独処理群で 74% (n = 19)、DEM・SA 同時処理群で 90% (n = 21) と大きな差はなかった。このため、SA による誘導減弱効果は、Bach1 を介したものであることが示唆された。

これらの結果より、高い濃度で肝臓に存在しているヘムによる Bach1 抑制解除が、*hmox1a* の誘導を引き起こすために重要であることが示唆された。

3-2-3 ヘム濃度の上昇は *hmox1a* を異所的に誘導した

次は逆に、組織中のヘム濃度を上昇させることを考えた。ゼブラフィッシュ胚を、生体内でヘムに代謝変換されるヘミン (Fe³⁺結合ヘム) で処置し、*hmox1a* の誘導プロファイルへの影響を調べた。ヘムやヘミンはそれ自体 Nrf2 活性化を引き起こすことが知られている (Kim et al., 2001; Alam et al., 2003) ため、まずヘミン処理による *hmox1a* の誘導プロファイル調べた (図 3-7)。ヘミン曝露 6 時間後に、13%の胚で肝臓以外の臓器においても弱い誘導がみられた (n = 47)。この割合は *bach1a*MO および *bach1b*MO 共注入胚においてもほとんど変わらなかった (14%、n = 35)。これらの結果より、ヘムは Nrf2 を活性化するだけでなく、Bach1 による *hmox1a* の転写抑制を解除することが示唆された。

さらに、このヘム濃度上昇が DEM による *hmox1a* 誘導に及ぼす影響を調べるため、12 時間のヘミン前処理後、DEM に曝露し、誘導プロファイルの評価を行った (図 3-8)。ヘミン前処理によって、*hmox1a* は、肝臓のみならず鼻やエラでも誘導されるようになった。ヘミン前処理群では、90%の胚で肝臓以外の臓器における誘導がみとめられ (n = 29)、この割合は、*bach1a*MO および *bach1b*MO 共注入胚においてもほとんど変わらな

かった (96%、n = 23)。SA 処理実験の結果と合わせて考えると、ヘム濃度およびその情報を仲介する Bach1 が、Nrf2 活性化による *hmox1a* の肝臓特異的な誘導プロファイルに重要な役割を果たしていることが明らかになった。

3-2-4 Bach1b は *hmox1a* の一過性の誘導パターンに寄与する

hmox1a と他の Nrf2a 標的遺伝子との誘導パターンの違いで、もう 1 つ目を引く点がある。図 3-1 を見ると、*hmox1a* の誘導は、DEM への曝露後 3 時間をピークに一過性であるのに比べ、*gstp1* の誘導は少なくとも 12 時間後まで続いている。さらに、図 3-4 を見ると、*bach1a*MO および *bach1b*MO 共注入胚では、コントロールに比べ誘導時間が延びていることがわかる。各時間における肝臓での誘導の有無は、*bach1a*MO および *bach1b*MO 共注入胚においては、3 時間で 98% (n = 63)、6 時間で 100% (n = 69)、9 時間で 98% (n = 56)、12 時間で 90% (n = 59) であったのに対し、注入なしコントロール群においては、3 時間で 81% (n = 127)、6 時間で 69% (n = 124)、9 時間で 17% (n = 115)、12 時間で 11% (n = 128) であった。このことは、Bach1 が、*hmox1a* 遺伝子の一過性誘導パターンにも重要な役割を持っていることを示している。Bach1 遺伝子の発現も Nrf2 によって誘導されることが知られている (Jyrkkänen *et al.*, 2011) ため、誘導された Bach1 が *hmox1a* の発現を抑えるために、一過性の発現パターンになっているのではないかと考えた。

同様の制御がゼブラフィッシュにも存在しているか検証するため、DEM 曝露後の *bach1a* および *bach1b* の発現を WISH および RT-PCR 解析によって調べた (図 3-9)。DEM 曝露によって、両遺伝子とも誘導されたが、この誘導は *bach1b* においてより強く起きる傾向にあった。また、*bach1b* の誘導は、DEM 曝露後 12 時間まで続いており、ヘムフリーな Bach1 タンパク質が継続的に増加していることが推測される。

図 3-7 より、ヘミンによる *hmox1a* の誘導は、DEM に比べてやや長く生じる傾向にあった。各時間における肝臓での誘導の有無は、3 時間で 46% (n = 52)、6 時間で 68% (n = 47)、12 時間で 30% (n = 46) であった。また、図 3-8 より、ヘミン前処理も同様の効果を生じたことがわかる。ヘミン前処理後 DEM によって *hmox1a* を誘導した場合、各時間における肝臓での誘導の有無は、3 時間で 97% (n = 29)、6 時間で 61% (n = 31)、12 時間で 23% (n = 31) であった。この結果は、ヘミン添加により生じた過剰量のヘムが、新たに合成された Bach1 タンパク質の機能を抑制したことを示唆している。以上より、Nrf2 活性化によるヘムフリーな Bach1 の誘導と蓄積が *hmox1* 誘導においてネガティブフィードバックを形成しており、これが一過性の誘導パターンの一因となっていることが示唆された。

3-3 考察

3-3-1 肝臓特異的かつ一過性誘導のメカニズム

本研究により、ゼブラフィッシュ *hmox1a* 遺伝子の DEM に応答した肝臓特異的誘導のメカニズムが明らかになった (図 3-10)。*hmox1a* の誘導は、全身に発現している転写抑制因子 *Bach1a/b* によって抑えられているが、肝臓に高濃度で存在するヘムが、*Bach1a/b* の抑制を解除することによって、*Nrf2a* による転写活性化が起きるといふしくみである。マウスにおいても、*Hmox1* 遺伝子の発現臓器は、*Bach1* 依存的なメカニズムによって決定されているという報告がある。*Hmox1* 遺伝子の発現量はヘムが豊富に存在する肝臓や脾臓といった臓器において高く、脳や心臓といった臓器では比較的低い。この発現プロファイルが *Bach1* ノックアウトマウスではキャンセルされ、脳や心臓においても *Hmox1* が高いレベルで発現していた (Sun *et al.*, 2002)。

hmox1a の誘導パターンのもう 1 つの特徴は、他の *Nrf2a* 標的遺伝子よりも誘導時間が短く、一過性である点である。この一過性に関しても *Bach1a/b* が関与していることが本研究により明らかになった。また、*Bach1a/b* 遺伝子が DEM によって誘導され、ヘムフリーの *Bach1a/b* が供給されることで、時間経過にしたがって誘導が抑制されていくことが一因であると考えられた。このような一過性の誘導は、哺乳類 *Hmox1* 遺伝子においても報告されている (Ewing and Maines, 1993; Motterlini *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2006)。

以上のような、哺乳類 *Hmox1* 遺伝子の誘導パターンとの共通性は、ヘム-Bach1 による制御が脊椎動物間に保存されていることを示している。*Bach* ファミリータンパク質はホヤおよび脊椎動物に存在することが知られているが、*Bach1* および *Bach2* という 2 つのアイソフォームを持つのは、脊椎動物に限られている (Igarashi and Watanabe-Matsui, 2014)。ヘム-Bach1 による時空間的に精巧にデザインされた転写調節は、脊椎動物の出現とともに獲得されたものかもしれない。

しかしながら、魚類 *Bach1* がどのようにして *hmox1a* の転写を制御しているのか、疑問が残る。哺乳類では、*Hmox1* 遺伝子上流のエンハンサー領域への *Bach1* の結合が、転写抑制に必須とされている (Sun *et al.*, 2002, 2004) が、ゼブラフィッシュゲノム上には、保存された領域がみとめられなかった。このことは、結合配列以外にも、*Bach1* が転写抑制機能を発揮するための条件があることをうかがわせるため、魚類を用いた解析から、*Bach1* の新たな転写調節メカニズムが明らかになることが期待される。

3-3-2 誘導プロファイルの生理的意義

このような調節機構が Nrf2 標的遺伝子の中でもどうして Hmox1 遺伝子だけに存在するのか不思議であるが、Hmox1 の抗酸化遺伝子としてのユニークな働きにその一因があるように思われる。Hmox1 の抗酸化機能は、Hmox1 自身の酵素活性が担っているわけではなく、ヘムの分解産物であるビリルビンおよびビリベルジンが担っていると考えられている (Wegiel *et al.*, 2014)。すなわち、抗酸化機能を発揮するには、細胞内のヘムを消費しなければならない。しかし、ヘムは細胞の正常な代謝に重要な物質であるため、基底レベルのヘム濃度を消費しないために、Hmox1 遺伝子の転写を通常は「オフ」に保ち、条件を満たしたときのみ「オン」にするしくみが備わっているのではないかと考えられる。

この、「ストレス-Nrf2 軸」および「ヘム-Bach1 軸」による二重の転写制御は、ちょうど Jacob、Monod らが発見した、*lac* オペロンの転写調節と類似している。*lac* オペロンの転写は、「グルコース欠乏による細胞内 cAMP の上昇」および「ラクトースの存在による *lac* リプレッサーによる抑制解除」の 2 条件がそろったときのみ引き起こされる (Jacob and Monod, 1961)。遺伝子を誘導することに対して「慎重な」転写調節は、環境応答システムにおいては、広く生物界で採用されているのかもしれない。

3-3-3 Nrf2 活性化医療への応用

本章で明らかになったような、Nrf2 標的遺伝子の誘導が制限される条件を理解することは、医療への応用を考えたときに極めて重要である。特に、臓器特異的な活性化メカニズムが理解されていなければ、疾病の発生した臓器において Nrf2 活性化剤の治療効果を得ることは難しいだろう。逆に考えると、臓器ごとの活性化メカニズムをうまく利用できれば、標的とした臓器で効率的に防御効果を得ることができるかもしれない。実際、*hmox1a* の誘導プロファイルは、DEM 処理時には、肝臓特異的であったが、ヘミン処理時には肝臓以外でも誘導された。このことは、Nrf2 活性化剤を変えることによって、標的遺伝子が誘導される臓器を変えられることを示唆している。本研究では、ゼブラフィッシュ胚の鼻、エラおよび肝臓でのメカニズムの違いに着目したが、ヒトにおいても臓器間に活性化メカニズムの違いがあることは、十分に予想される。また、今回の解析では、臓器を構成するどのような細胞が誘導プロファイルに影響を与えているのか、明確に示せていないが、細胞種レベルでの Nrf2 活性化メカニズムの違いの理解も重要であると考えている。このような違いを包括的に理解できれば、疾病が発生している臓器ごとに効率的に防御能を誘導できる Nrf2 活性化剤を開発できるかもしれない。

第 4 章

Nrf2 活性化による亜ヒ酸の毒性緩和

第4章 Nrf2 活性化による亜ヒ酸の毒性緩和

Nrf2 システムは、ストレスを感知すればいつでも標的遺伝子の転写活性化を起こすというような単純なものではなく、臓器によって転写が抑えられている場合もあるということがわかった。このメカニズムを理解できれば、Nrf2 活性化剤によって誘導臓器を変えられることも前章の結果から示唆され、ストレスの種類や病態によって最適な Nrf2 活性化剤を探索すべきであることがわかった。しかしながら、臓器特異的な転写誘導メカニズムの全体像を把握することは、今後研究を進めていくべきことであるが、すぐに達成することは難しい。そこで、より簡単なアプローチとして、Nrf2 活性化剤が、どのようなストレスに対してより強力な防御能を誘導できるのか、知見を集めておくことが有用であると考えた。

序論でも述べたとおり、サルフォラフェンは、酸化ストレスが関与するさまざまな疾病に対する治療・予防効果がさかんに研究されている Nrf2 活性化剤である。私の所属研究室でも、サルフォラフェンが Nrf2 依存的な細胞応答を開始させることで、酸化ストレス（過酸化水素曝露）に対して強力に防御能を賦与できることを、ゼブラフィッシュを用いて示している (Mukaigasa *et al.*, 2012)。Nrf2 システムは、抗酸化タンパク質だけでなく、さまざまな解毒代謝酵素を誘導することが知られているため、サルフォラフェンを環境中の化学物質の毒性軽減に利用できないかと考えた。

本章では、亜ヒ酸の毒性軽減に、サルフォラフェンによる Nrf2 活性化が有効か、ゼブラフィッシュを用いて検証した。ヒ素化合物が水や土壌環境に高濃度で含まれる地域では、長期間の曝露による健康被害を生じている (Hughes *et al.*, 2011)。また、過去に日本でも粉ミルクへの混入 (Dakeishi *et al.*, 2006) やカレーへの混入事件 (Uede and Furukawa, 2003) が起きており、急性ヒ素中毒の事例が報告されている。本研究では、サルフォラフェンが Nrf2 活性化によって防御効果を誘導することに加え、ヒ素曝露との組み合わせによって、思いがけない効果を発揮することを発見した。

4-1 材料と方法

4-1-1 ゼブラフィッシュ

本章の実験は、野生型 AB 系統および Nrf2 変異型 (*nrf2a^{fh318}*) 系統 (Mukaigasa *et al.*, 2012) を用いて行った。ゼブラフィッシュ胚は、すべて自然交配により得た。ゲノム DNA の抽出は、ゲノム抽出バッファー [10 mM Tris-HCl (pH 8.2)、10 mM EDTA (pH 8.0)、200 mM NaCl、0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) および 400 µg/ml プロテナーゼ K] 中に胚を入れ、55°C で 4 時間以上インキュベートすることにより行った。抽出したゲノムを用いて、変異部位を含む領域を PCR によって増幅した。この増幅に用いた PCR プライマーは、5'-AGCTCAACGAAGCCCAGCTAGCGCTCGTTCGGGATATCCGCCGCC および 5'-GAAGGGAGAATTCGTTAGGC である。増幅した PCR 産物を *StyI*-HF (New England Biolabs, Ipswich, MA) で消化し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、バンドパターンの違いによって遺伝子型を判断した。このジェノタイピング方法では、野生型アレルは消化されず、*nrf2a^{fh318}* アレルは消化されるようにデザインしてある。

4-1-2 生存アッセイ

亜ヒ酸の毒性に対する生体防御機能を評価するため、生存アッセイを行った。受精後 4 日目の胚を 3 cm ディッシュに入れ、E3+ medium (5 mM NaCl、0.17 mM KCl、0.33 mM CaCl₂、0.33 mM MgSO₄ および 0.1 mg/l メチレンブルー) に溶解した亜ヒ酸ナトリウム (Wako, Osaka, Japan) に曝露した。サルフォラフェン (LKT Laboratories, St. Paul, MN) 前処理は、亜ヒ酸ナトリウム曝露前 12 時間 (受精後 3.5 から 4 日) 行い、受精後 4 日目の時点で亜ヒ酸を溶解した E3+ medium と交換した。亜ヒ酸溶液は 2 日ごとに交換した。また、実験期間中、給餌は行わなかった。生死の判定に関しては、1) ピンセットで軽く触れることへの反応消失、2) 心拍の消失の 2 条件がどちらも満たされた時に、死亡と判定した。死亡した胚は、ゲノム抽出バッファーに入れ、ジェノタイピングに供するまで -20°C で保管した。亜ヒ酸ナトリウムは蒸留水で、サルフォラフェンはエタノールでストック溶液を作製し、E3+ medium を用いて最終濃度まで希釈した。

4-1-3 遺伝子発現解析

WISH 解析は、第 3 章に記載の通り行った。ATP-binding cassette, sub-family C, member 2 遺伝子 (*abcc2*) の発現解析のために、pKS*abcc2* を構築した。受精後 5 日目のゼブラフィッシュ cDNA と、特異的な PCR プライマー (Forward: 5'-GGGGATCCAACTCATCGTTCCTGCAGCG および Reverse:

5'-GGCTCGAGTTCAGCTCCTTGGCCATCAC) を用いて遺伝子断片を増幅し、pBluescript II KS+ベクターにクローニングした。pKSabcc2 は、*Bam*HI によって消化後鋳型とし、前章 3-1-4 に記載の方法で RNA プローブを合成した。

リアルタイム定量 PCR に用いた total RNA は、QIAzol lysis reagent (Qiagen, Hilden, Germany) を使用して抽出した。これを使って、SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technologies, Carlsbad, CA) により cDNA を合成した。リアルタイム定量 PCR 反応には、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo, Osaka, Japan) を使用し、7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて解析した。*hmox1a* 遺伝子だけは、TaqMan プローブを使用し、反応には FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche Diagnostics) を用いて解析を行った。プライマーおよび TaqMan プローブの配列を表 4-1 に示す。それぞれの遺伝子の発現量は、*ef1a* の発現レベルによって補正した。

4-1-4 統計解析

生存アッセイのデータは、log-rank 検定によって比較した。遺伝子発現量の比較には、Student の *t* 検定 (両側) を利用した。p 値が 0.05 未満の場合に、統計的に有意であると判定した。

4-2 結果

4-2-1 亜ヒ酸毒性に対する Nrf2 依存的な生体防御

まず、受精後 4 日目のゼブラフィッシュ胚に対する亜ヒ酸ナトリウムの毒性を、野生型胚を用いて確かめた (図 4-1, 4-2)。8 mM の亜ヒ酸曝露では 12 時間後にすべての胚が死亡した。また、0.125 mM では、すべての胚に曝露による影響がみられなかった。0.25 から 4 mM の濃度において、生存率は亜ヒ酸の用量依存的であった。

この濃度の中から 1 mM を選択し、Nrf2 システムが亜ヒ酸曝露時の生体防御に果たす役割を確かめるため、Nrf2 ヘテロ変異型 (*nrf2a*^{fh318/+}) 同士の掛け合わせから得た胚を用いて生存アッセイを行った (図 4-3)。野生型およびヘテロ変異型 (*nrf2a*^{fh318/+}) の胚は、ホモ変異型 (*nrf2a*^{fh318/fh318}) よりも有意に生存時間が長かった (log-rank 検定; $p < 0.001$)。よって、ゼブラフィッシュ Nrf2 システムは、亜ヒ酸ナトリウムの急性毒性に対して重要な生体防御を担っていることが明らかになった。

4-2-2 ヒ素への抵抗性を与える遺伝子群の Nrf2 依存的な誘導

ヒ素に対する Nrf2 依存的な防御のメカニズムを明らかにするため、ヒ素の抵抗性に関連する遺伝子群 (Kumagai and Sumi, 2007) の発現量を調べた。解析した遺伝子は、抗酸化タンパク質をコードする peroxiredoxin 1 (*prdx1*) および glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (*gclc*)、ヒ素の解毒酵素 *gstp1* (Wang and Lee, 1993; Leslie *et al.*, 2004)、ヒ素の排出に関わるトランスポーター *abcc1* および *abcc2* (Leslie *et al.*, 2004; Leslie, 2012)、ヒ素の取り込みに関わるチャネルタンパク質 aquaporin 9a および 9b (*aqp9a* および *aqp9b*) (Liu *et al.*, 2002; Leung *et al.*, 2007) である。受精後 4 日目の野生型および *nrf2a^{fh318/fh318}* 胚を 1 mM の亜ヒ酸ナトリウムに 12 時間曝露し、これらの遺伝子の発現をリアルタイム定量 PCR によって調べた (図 4-4)。*prdx1*、*gclc* および *gstp1* の発現量は、野生型では、それぞれ 27.8、5.5 および 4.5 倍と強力に誘導されたが、*nrf2a^{fh318/fh318}* 胚ではそれぞれ 13.4、2.9 および 1.0 倍と野生型に比べて有意に弱い誘導であった。*abcc1* および *abcc2* はいずれも亜ヒ酸曝露によって誘導された。このうち、*abcc2* の誘導は、野生型で 2.5 倍、*nrf2a^{fh318/fh318}* で 1.6 倍であり、Nrf2 依存的な誘導であったが、*abcc1* の誘導は、野生型で 1.8 倍、*nrf2a^{fh318/fh318}* で 2.0 倍と Nrf2 非依存的な誘導であった。*aqp9a* および *aqp9b* の発現は亜ヒ酸曝露後、むしろ抑制される傾向にあった。

Nrf2 依存的な誘導がみられた *prdx1*、*gclc*、*gstp1* および *abcc2* の 4 遺伝子について、さらに誘導プロファイル調べた。Nrf2 ヘテロ変異型同士の掛け合わせから得た胚を 1 mM 亜ヒ酸に 12 時間曝露した後、WISH 解析によって誘導プロファイルを解析した (図 4-5)。野生型およびヘテロ変異型 (*nrf2a^{fh318/+}*) 胚では、*prdx1* および *gstp1* が、鼻、エラおよび肝臓で、*gclc* がエラおよび肝臓で誘導された。この誘導は、ホモ変異型 (*nrf2a^{fh318/fh318}*) ではみとめられず、Nrf2 依存的な誘導であることが再確認された。*abcc2* の誘導は肝臓のみでみられ、この誘導もまた Nrf2 依存的であった。これらの結果から、亜ヒ酸に対する Nrf2 依存的な生体防御は、ヒ素の抵抗性に関わる遺伝子群の誘導によってもたらされることが示唆された。

4-2-3 サルフォラフェンによる亜ヒ酸の毒性軽減

以上の結果より、Nrf2 システムの活性化によって、亜ヒ酸の毒性を軽減できることが期待された。そこで、Nrf2 活性化剤サルフォラフェン前処理によって亜ヒ酸の毒性を軽減できるのか検証した。野生型 AB 系統の受精後 3.5 日目胚に対して、12 時間のサルフォラフェン前処理を行い、受精後 4 日目の時点から亜ヒ酸に曝露し、生存率を解析した (図 4-6)。40 μ M のサルフォラフェン前処理は、2 mM の亜ヒ酸曝露後の生存時間を有

意に延長した。20 および 30 μM のサルフォラフェン前処理は、やや生存時間を延長する傾向にあったものの、統計的有意差はなかった。

このサルフォラフェンによる毒性軽減効果の Nrf2 依存性を調べるため、Nrf2 変異型系統を使って同様の実験を行った (図 4-7)。野生型胚では、統計的有意差はなかったものの、サルフォラフェンによる生存時間延長傾向がみとめられた (log-rank 検定; $p = 0.062$)。ヘテロ ($nrf2a^{fh318/+}$) およびホモ ($nrf2a^{fh318/fh318}$) 変異型では、この毒性軽減効果はみとめられなかった (log-rank 検定; $p = 0.943$ および 0.836)。

さらに、サルフォラフェンによる抵抗性上昇のメカニズムを調べるため、ヒ素への抵抗性に関与する遺伝子群の発現量を調べた。野生型胚を、前処理と同条件 (受精後 3.5 日から 4 日) で 12 時間サルフォラフェン処理し、遺伝子発現量をリアルタイム定量 PCR によって解析した (図 4-8)。*prdx1*、*gstp1*、*gclc* および *abcc2* の発現量は、サルフォラフェン処理によって有意に上昇しており、このような遺伝子の発現上昇によって、亜ヒ酸に対する抵抗性が誘導されたと考えられる。

4-2-4 サルフォラフェンの毒性

図 4-6 では、サルフォラフェンが 2 mM の亜ヒ酸に対して抵抗性を与えることを示したが、同様の実験を 1 mM の亜ヒ酸で実施した場合には、サルフォラフェン前処理群の方が、生存率が低くなる傾向にあった (図 4-9)。亜ヒ酸曝露後 48 時間までの毒性は、サルフォラフェンによってやや軽減される傾向にあったが、それ以降の生存率がサルフォラフェン前処理群で悪くなっていた。よって、この毒性は、48 時間の時点でほとんどすべての胚が死んでしまう 2 mM という条件ではみられなかった可能性がある。この結果より、サルフォラフェンは、亜ヒ酸曝露との組み合わせによって複合毒性を発揮することが示唆された。

4-3 考察

4-3-1 亜ヒ酸の急性毒性に対する Nrf2 依存的な生体防御

本研究結果により、Nrf2 システムは、亜ヒ酸曝露時の生体防御に重要な役割を持っていることが明らかになった。過去のマウスを使った研究では、6 週間の亜ヒ酸ナトリウムの飲水投与や、14 日間の三酸化二ヒ素の吸入曝露によって生じる組織学的傷害は、野生型と比較して Nrf2 ノックアウトマウスでより深刻に生じたという報告がある (Jiang *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2012)。このような研究成果に比べ、本研究の曝露

条件は、急性期の毒性を評価したものであり、合わせて考えると、Nrf2 システムのヒ素化合物に対する防御機能は、急性・慢性どちらの毒性に対しても有効であることが示唆された。また、ゼブラフィッシュの Nrf2 システムにもマウスと同じような毒性軽減機能が備わっていることがわかり、脊椎動物間に保存された解毒機構の存在が明らかになった。

4-3-2 Nrf2 活性化による亜ヒ酸毒性の軽減

このような、解毒機構を活性化することができれば、汚染地域で生じている健康被害を軽減することができるかもしれない。世界保健機関（World Health Organization: WHO）の推計によると、バングラデシュでは、人工の約半分にあたる人々が、高濃度のヒ素に汚染された水を日常的に使用している（<http://www.who.int/ipcs/en>）。これほどまで多くの人に対して安全な水や食料をすぐに確保することは難しいため、代替案が必要となるが、Nrf2 活性化が 1 つの候補戦略となるだろう。実際、本研究においても、サルフォラフェンが Nrf2 依存的に亜ヒ酸の毒性を緩和する傾向をみとめることができた。よって、Nrf2 活性化戦略によってヒ素による健康被害を軽減することは、一案として考慮する価値が十分にあるだろう。

4-3-3 亜ヒ酸とサルフォラフェンの組み合わせにより生じる複合毒性

しかしながら、本研究ではサルフォラフェンが毒性を発揮する局面があることも発見した。48 時間までは、毒性軽減効果がみとめられたものの、それ以降になると亜ヒ酸曝露との組み合わせにより、複合毒性を発揮した。この毒性が発揮される濃度は、毒性軽減効果のある用量よりも低かった。また、このような複合毒性は、過酸化水素曝露との組み合わせではみられなかった（Mukaigasa *et al.*, 2012）ため、亜ヒ酸曝露時のみ見られる毒性である。過去にも、三酸化二ヒ素の毒性をサルフォラフェンが増強する可能性があることが報告されており（Doudican *et al.*, 2012）、本研究でも同様の現象をとらえた可能性がある。この毒性発揮メカニズムは、いまのところ解明されていないが、Nrf2 活性化剤が毒性を発揮する可能性があるということに関しては、十分に注意が必要である。

このコンセプトをさらに拡大して考えると、生体がストレス状況下にある場合、薬の毒性が増強されてしまう場合があるということである。Nrf2 システムは、その多機能性ゆえにさまざまな疾病の治療・予防に応用が期待されているが、1 つの Nrf2 活性化剤が万能に使えるわけではなく、疾病・ストレスと相性の良いものを探索しなければならぬことが、本研究から示唆された。

第 5 章

既承認薬オーラノフィンによる Nrf2 活性化

第5章 既承認薬オーラノフィンによる Nrf2 活性化

前章では、生体にストレスがかかった状況下においては、Nrf2 活性化剤が毒性を発揮する可能性があることを示した。もともと、Nrf2 システムは、反応性の高い化学物質に応答する機構であるため、Nrf2 活性化剤の候補となる薬剤も生体分子と強力に相互作用し、毒性を示す可能性が高い。実際に序論で示した CDDO-Me の例にもある通り、Nrf2 を安全に活性化することは、簡単ではない。このような薬の毒性の問題は、Nrf2 活性化剤に限ったことではないが、新薬開発において常に障害となる。

毒性発現のリスクを下げることのできる手段の1つが、既存薬再開発 (drug repositioning) である (Novac, 2013; Ashburn and Thor, 2004)。既存薬の中から目的の活性を持つものを見つかることができれば、市販までのプロセスを大幅に短縮することができる。Nrf2 活性化剤については、2つの候補が挙げられる。1つめは、ジメチルフマル酸である。この薬 (商品名 Tecfidera) は、多発性硬化症の治療薬として既に市販されており、Nrf2 活性化能も示されている (Linker *et al.*, 2011; Takaya *et al.*, 2012) ため、他の疾病の治療薬としても利用できる可能性がある。2つめは、オーラノフィンである。この薬は、抗炎症作用を持ち、関節リウマチの薬として使用されてきた (Kean and Kean, 2008; Papp and Shear, 1992)。Nrf2 活性化能が示されている (Kataoka *et al.*, 2001) ものの、その後ほとんど研究がなされておらず、生体防御機能を誘導するかどうかわかっていない。

本章では、市販薬の成分であるジメチルフマル酸およびオーラノフィンが、Nrf2 依存的な細胞応答を安全に開始させ、生体の抗酸化機能を誘導できるか調べた。この目的のため、化合物の薬効および毒性の両方を評価できるゼブラフィッシュモデルを活用した。さらに、前章では、サルフォラフェンとの組み合わせにより毒性が増強された亜ヒ酸や、重金属曝露への効果についても検証し、オーラノフィンの薬理作用について考察した。

5-1 材料と方法

5-1-1 ゼブラフィッシュ

本章の実験は、野生型 AB 系統および Nrf2 変異型 (*nrf2a^{fh318}*) 系統 (Mukaigasa *et al.*, 2012) を用いて行った。*nrf2a^{fh318}* 系統のジェノタイピング方法は、前章 4-1-1 に記述の通り実施した。

5-1-2 生存アッセイ

前章 4-1-2 に記述の通り実施した。オーラノフィン、ジメチルフマル酸および過酸化水素は、Wako より購入した。

5-1-3 遺伝子発現解析

WISH 解析は、第 3 章に記載の通り行い、*gstp1* 遺伝子の発現を解析した。

5-2 結果

5-2-1 オーラノフィンは Nrf2 依存的な抗酸化作用を発揮した

ジメチルフマル酸およびオーラノフィンの抗酸化作用を評価するため、これらの薬剤で受精後 3.5 日目のゼブラフィッシュ胚を 12 時間前処理した後、過酸化水素に曝露し生存率を解析した (図 5-1, 5-2)。オーラノフィン前処理は、2 mM の過酸化水素曝露後の生存率を明らかに改善させた。一方で、ジメチルフマル酸前処理では、明瞭な生存率の改善はみられなかった。オーラノフィン前処理の効果は、0.5 から 5 μ M の範囲で統計的有意差をみとめ (log-rank 検定, 0.5 μ M: $p < 0.05$; 1-5 μ M: $p < 0.001$)、2 μ M のときに最も顕著な効果が得られた。オーラノフィン自身の毒性も評価したところ、10 μ M 以上になると毒性が現れたが、5 μ M 以下では毒性が見られないことを確認した (図 5-3)。

オーラノフィンの抗酸化作用が、Nrf2 活性化によるものであるか確認するため、まず、オーラノフィン前処理後の Nrf2 標的遺伝子 *gstp1* の誘導を確かめた。*nrf2a^{fh318}* 系統胚に対して、生存アッセイと同じ条件で 2 μ M オーラノフィン前処理 (および 40 μ M サルフォラフェン前処理) を行い、12 時間後の *gstp1* の誘導を WISH 法によって確かめた (図 5-4)。野生型およびヘテロ変異型 (*nrf2a^{fh318/+}*) 胚では、鼻、エラおよび肝臓において、*gstp1* が誘導されたが、ホモ変異型 (*nrf2a^{fh318/fh318}*) 胚では、誘導がみられなかった。この結果より、本研究の実験系において、オーラノフィンが Nrf2 活性化によ

る標的遺伝子誘導を引き起こしていることを確認できた。

さらに、オーラノフィンによって誘導された酸化ストレス抵抗性が Nrf2 依存的なものであるか調べるため、*nrf2a*^{fh318} 系統胚を用いて生存アッセイを行った (図 5-5)。受精後 3.5 日胚に対して 2 μ M オーラノフィン前処理を 12 時間行い、その後 2 mM の過酸化水素に曝露し生存率を解析した。野生型およびヘテロ変異型 (*nrf2a*^{fh318/+}) 胚では、オーラノフィンによる生存率の改善がみられた (log-rank 検定, $p < 0.001$) が、この効果はホモ変異型 (*nrf2a*^{fh318/fh318}) 胚ではみられなかった (log-rank 検定, $p > 0.05$)。これらの結果より、オーラノフィンは、Nrf2 依存的に酸化ストレスに対する生体防御機構を活性化することが明らかになった。

5-2-2 オーラノフィンは亜ヒ酸の毒性を軽減した

次に、前章ではサルフォラフェンによってその毒性が増強されてしまった、亜ヒ酸について、オーラノフィンが安全に毒性軽減効果を発揮するのか検証した。野生型の受精後 3.5 日目胚を、2 μ M のオーラノフィンおよび 40 μ M のサルフォラフェンで 12 時間前処理した後、1.5 または 1 mM の亜ヒ酸ナトリウムに曝露し、生存率を解析した (図 5-6)。前章の通り、サルフォラフェン前処理は、亜ヒ酸曝露開始後 48 時間までは抵抗性を賦与したが、それ以降になると複合毒性が発揮された。一方で、オーラノフィン前処理は、亜ヒ酸との複合毒性を示さず、120 時間の実験期間を通じて亜ヒ酸の毒性軽減効果が持続的にみとめられた (log-rank 検定, 亜ヒ酸濃度 1.5 mM、1 mM ともに $p < 0.001$)。

さらに、*nrf2a*^{fh318} 系統を用いて、オーラノフィンの毒性軽減効果の Nrf2 依存性を検証した (図 5-7)。2 μ M のオーラノフィン前処理は、野生型 (log-rank 検定, $p < 0.01$) および *nrf2a*^{fh318/+} 胚 (log-rank 検定, $p < 0.01$) において、1.5 mM 亜ヒ酸曝露後の生存率を有意に改善した。この効果は、*nrf2a*^{fh318/fh318} 胚ではみとめられなかった (log-rank 検定, $p > 0.05$)。これらの結果より、オーラノフィンは、Nrf2 依存的な生体防御機能を活性化し、また複合毒性なく、亜ヒ酸の毒性を軽減することが明らかになった。

5-2-3 重金属毒性に対する効果

オーラノフィンの抗酸化機能についてさらに調べるため、さまざまな重金属の毒性軽減効果について調べた。重金属の主な毒性発現機序の一つが、活性酸素種の生成だと考えられている (Wu *et al.*, 2016) ため、オーラノフィンによって毒性を軽減できると予想した。そこで、カドミウム、水銀、鉛の 3 種類の重金属の毒性を、オーラノフィンが軽減できるか検証した。野生型胚を用いて、2 μ M のオーラノフィン前処理の後、2 μ M カドミウム (CdCl_2)、1 μ M 無機水銀 (HgCl_2) および 20 μ M の鉛 (PbCl_2) に曝露し、

生存率を解析した (図 5-8)。オーラノフィン前処理は、有意にカドミウム曝露後の生存率を改善した (log-rank 検定, $p < 0.01$)。しかし、無機水銀との組み合わせでは、毒性を増強する傾向にあった (log-rank 検定, $p < 0.001$)。また、鉛の毒性もやや軽減する傾向にあったが、その効果はわずかであり、生存時間の中央値はオーラノフィン前処理の有無に関わらず同じ (24 時間) であった。

オーラノフィンがもつカドミウムの毒性軽減効果および無機水銀の毒性増強効果について、Nrf2 依存性を確かめるため、*nrf2a^{fh318}* 系統を用いて同様の生存実験を行った (図 5-9, 5-10)。カドミウム毒性の軽減効果は、統計的有意差はなかったものの、*nrf2a^{fh318/fh318}* 胚においても再現よくみとめられた。また、無機水銀毒性の増強効果は、*nrf2a^{fh318/fh318}* 胚においても有意にみとめられた (log-rank 検定, $p < 0.001$)。よって、これらオーラノフィンの毒性軽減・増強効果は、Nrf2 非依存的なメカニズムによって生じていることが示唆された。

5-3 考察

5-3-1 オーラノフィンによる抗酸化力の賦与

本研究により、オーラノフィンは Nrf2 依存的なメカニズムにより、生体に酸化ストレス抵抗性を賦与することが明らかになった。近年の研究により、Nrf2 システムは、2 型糖尿病 (Uruno *et al.*, 2013; Yagishita *et al.*, 2014)、鎌状赤血球症による組織傷害 (Keleku-Lukwete *et al.*, 2015)、神経変性疾患 (Yamazaki *et al.*, 2015) などの酸化ストレス関連疾患の発症や病態進行を抑制することがわかってきた。本研究成果は、これら疾病の発症や病態悪化に関わる酸化ストレスの消去に、オーラノフィンを利用できる可能性を示すものである。今後は、疾患モデルマウスや、ヒトでの臨床試験でその効果が実証されることが期待される。

5-3-2 亜ヒ酸の毒性緩和効果

ヒ素化合物の毒性は、Nrf2 活性化によって軽減できる可能性があることは、サルフォラフェンを用いた前章の研究で示した通りであるが、オーラノフィンによる Nrf2 活性化もまた、ヒ素化合物の毒性軽減に有効であった。さらに、オーラノフィンには、サルフォラフェン前処理でみられたような複合毒性がなかったため、Nrf2 活性化自体には毒性増強効果はなく、サルフォラフェンの毒性は他の特性による作用であることがわかれる。

5-3-3 オーラノフィンの毒性

オーラノフィンに関しても、無機水銀との組み合わせにより Nrf2 非依存的な毒性が現れた。このメカニズムは不明であるが、酸化還元ホメオスタシスに重要な酵素であるチオレドキシシンレダクターゼの阻害作用 (Gromer *et al.*, 1998) がその毒性メカニズムを説明するかもしれない。無機水銀の毒性メカニズムの 1 つもまた、強力なチオレドキシシンレダクターゼの阻害作用によることが示されている (Carvalho *et al.*, 2008; Cai *et al.*, 2012) ため、オーラノフィンおよびチオレドキシシンレダクターゼの作用が組み合わせられた場合には、強力にこの酵素のはたらきが阻害され、深刻な酸化還元破綻が起きたのかもしれない。

現在行われている、オーラノフィンの再開発は、この毒性をベースにしており (Roder and Thomson, 2015)、その酸化還元破綻効果は、がん細胞を死滅させる目的で応用が検討されている。慢性リンパ性白血病、小リンパ球性リンパ腫および前駆細胞性白血病の患者を対象としたフェーズ 1 および 2 の臨床試験 (<https://clinicaltrials.gov>、NCT01419691) がすでに完了しており、小細胞肺癌に対する有効性が現在調べられている (NCT01737502)。さらに、寄生虫症 (Andrade and Reed, 2015) や細菌感染 (Harbut *et al.*, 2015) に対する効果も検討されており、アメーバ症およびジアルジア症 (NCT02736968) および結核 (NCT02968927) に対する臨床試験も現在患者を集めている。本研究の結果は、オーラノフィンの効果が、状況によって変化し、ある時は生体防御機能を活性化し、またある時は毒性を発揮することを示している。これがどのようなコンテキストによって決定されるものなのか、[細胞のタイプ (正常細胞またはがん細胞) あるいは動物種 (脊椎動物または原虫・細菌) など] 理解することが、オーラノフィンの治療効果を正しく応用するためには必要だろう。

5-3-4 オーラノフィンの薬理作用

オーラノフィンの薬理作用については、まだ未解明な点が多い。1 つは、オーラノフィンがどのように Nrf2 を活性化するのか分からない点である。多くの Nrf2 活性化剤は、Keap1 の反応性システイン (Cys-151、Cys-273 および Cys-288) と相互作用することで、Nrf2 タンパク質を安定化する (Kobayashi *et al.*, 2009; Saito *et al.*, 2016)。しかし、オーラノフィンに関しては、相互作用する Keap1 上のシステインが特定されていない (Kobayashi *et al.*, 2009)。可能性として挙げられるのは、オーラノフィンのチオレドキシシンレダクターゼの阻害効果である。多くの研究が、チオレドキシシンレダクターゼの阻害により Nrf2 システムが活性化されたことを示しており (Cebula *et al.*, 2015)、このこ

とが、オーラノフィンによる Nrf2 活性化メカニズムを説明するかもしれない。しかし、チオレドキシシンシステムの酸化還元情報がどのように Nrf2 システムに伝達されるのかは未解明であり、今後研究していくべき課題である。

もう 1 つわからないことは、オーラノフィンによるカドミウムの毒性軽減効果である。過去の研究では、オーラノフィンが、カドミウムなどの金属の解毒に重要な役割を果たしているメタロチオネイン (Klaassen *et al.*, 2009) の発現レベルを上昇させたという報告があり (Monia *et al.*, 1986)、これが一因かもしれない。この Nrf2 非依存的な生体防御のメカニズムを解明することにより、オーラノフィンのさらなる応用範囲を広げることになるだろう。

第 6 章

総合考察

第6章 総合考察

Nrf2 活性化は、酸化ストレス関連の病態改善効果が非常に期待されているが、本研究では、これを実現するために解決すべき新たな課題や、実用化を推し進めるためのヒントを提示することができた。特に重要なのは、各 Nrf2 活性化剤の薬理的・毒性学的特性を理解し、対処したい状況（ストレスの種類や病態）によって使い分ける必要性である。

Nrf2 システムは、多くの遺伝子を標的とする多機能な機構である。しかし、特定の条件下では、転写活性化が起きないようなメカニズムも同時に存在していることが明らかになった。これは、生物がエネルギーや体内のリソースを余分に消費しないために進化させてきたしくみであるが、Nrf2 活性化による予防・治療効果を効率的に得るためには、このようなブレーキとなるメカニズムを解除することが必要かもしれない。本研究に関連した部分では、ヘムの代謝に作用する薬や、Bach1 の阻害剤を Nrf2 活性化剤と併用することによって、Hmox1 による抗酸化作用をより広い臓器に誘導できるだろう。

また、本研究は、このような臓器特異的な転写活性化メカニズムを、ゼブラフィッシュというモデルを利用することで明らかにすることができた。今後は、この臓器特異的な誘導メカニズムが、*hmox1a* だけでなく他の標的遺伝子にも存在するのか、調べたいと考えている。具体的には、多様な Nrf2 活性化剤による標的遺伝子群の誘導プロファイルを網羅的に調べ、標的遺伝子特異的および臓器特異的な誘導メカニズムを探索・抽出したい。*in vivo* での薬剤処理と遺伝子発現のアッセイに優れたゼブラフィッシュモデルを引き続き利用することで、新たなメカニズムの発見ができると予想している。

特定の化合物が、どのように Nrf2 システムを活性化するか、という点は非常に重要であるが、それぞれの化合物が持つ Nrf2 活性化以外の作用もまた、実用化を考えた時には無視できない。化合物は、その用量如何によって毒にも薬にもなるというのは、有名な話であるが、本研究が明らかにしたのは、生体が受けている「ストレスの種類」によって、ある化合物が毒にも薬にもなりうるということである。本研究において、そのメカニズムまでは明らかにすることができなかったが、Nrf2 活性化剤が、Nrf2 非依存的なメカニズムによって、毒性を発揮する場合があった。疾病の予防・治療に応用するためには、このような作用を正確に把握しておく必要がある。

しかしながら、Nrf2 活性化による医療をスピーディに実用化に結びつけるアプローチも同時に必要である。本研究では、既承認薬であるオーラノフィンが Nrf2 活性化による強力な抗酸化活性をもつことが明らかになった。毒性に関する知見が蓄積された既存薬の中から強い活性を持つものが見つかったことで、Nrf2 活性化医療を急速に推し進め

ることができることを期待している。安全な薬をなるべく早く患者に届けつつ、疾病に応じた効率的な Nrf2 活性化をもたらすメカニズムを基礎研究が明らかにしていく、という二段構えの戦略によって、Nrf2 活性化医療を継続的に発展させていくことができるだろう（図 6-1）。

引用文献

引用文献

- Alam, J., Killeen, E., Gong, P., Naquin, R., Hu, B., Stewart, D., Ingelfinger, J.R. and Nath, K.A. Heme activates the heme oxygenase-1 gene in renal epithelial cells by stabilizing Nrf2. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* (2003) 284: F743-F752.
- Andrade, R.M. and Reed, S.L. New drug target in protozoan parasites: the role of thioredoxin reductase. *Front. Microbiol.* (2015) 6: 975.
- Ashburn, T.T. and Thor, K.B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* (2004) 3: 673-683.
- Blackwell, T.K., Steinbaugh, M.J., Hourihan, J.M., Ewald, C.Y. and Isik, M. SKN-1/Nrf, stress responses, and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic. Biol. Med.* (2015) 88: 290-301.
- Bowman, T.V. and Zon, L.I. Swimming into the future of drug discovery: *in vivo* chemical screens in zebrafish. *ACS Chem. Biol.* (2010) 5: 159-161.
- Cai, W., Zhang, L., Song, Y., Wang, B., Zhang, B., Cui, X., Hu, G., Liu, Y., Wu, J. and Fang, J. Small molecule inhibitors of mammalian thioredoxin reductase. *Free Radic. Biol. Med.* (2012) 52: 257-265.
- Carvalho, C.M.L., Chew, E., Hashemy, S.I., Lu, J. and Holmgren, A. Inhibition of the human thioredoxin system: a molecular mechanism of mercury toxicity. *J. Biol. Chem.* (2008) 283: 11913-11923.
- Cebula, M., Schmidt, E.E. and Arnér, E.S.J. TrxR1 as a potent regulator of the Nrf2-Keap1 response system. *Antioxid. Redox Signal.* (2015) 23: 823-853.
- Chan, K., Lu, R., Chang, J.C. and Kan, Y.W. NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1996) 93, 13943-13948.
- Chatterjee, N. and Bohmann, D. A versatile Φ C31 based reporter system for measuring AP-1 and Nrf2 signaling in *Drosophila* and in tissue culture. *PLoS ONE* (2012) 7: e34063.
- Chowdhry, S., Zhang, Y., McMahon, M., Sutherland, C., Cuadrado, A. and Hayes, J.D. Nrf2 is controlled by two distinct β -TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity. *Oncogene* (2013) 32: 3765-3781.
- Dai, Y., Jia, Y., Chen, N., Bian, W., Li, Q., Ma, Y., Chen, Y. and Pei, D. Zebrafish as a model system to study toxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* (2014) 33: 11-17.
- Dakeishi, M., Murata, K. and Grandjean, P. Long-term consequences of arsenic poisoning during infancy due to contaminated milk powder. *Environ. Health* (2006) 5: 31.
- Dhakshinamoorthy, S. and Jaiswal, A.K. Small Maf (MafG and MafK) proteins negatively regulate antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *J. Biol. Chem.* (2000) 275: 40134-40141.
- Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M. and Talalay, P. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2002) 99: 11908-11913.
- Dinkova-Kostova, A.T., Liby, K.T., Stephenson, K.K., Holtzclaw, W.D., Gao, X., Suh, N., Williams, C., Risingsong, R., Honda, T., Gribble, G.W., Sporn, M.B. and Talalay, P. Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: correlations of protection against oxidant and inflammatory stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2005) 102:

4584-4589.

- Doudican, N., Wen, S.Y., Mazumder, A. and Orlow, S.J. Sulforaphane synergistically enhances the cytotoxicity of arsenic trioxide in multiple myeloma cells via stress-mediated pathways. *Oncol. Rep.* (2012) 28: 1851-1858.
- Eggler, A.L., Liu, G., Pezzuto, J.M., van Breemen, R.B. and Mesecar, A.D. Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2005) 102: 10070-10075.
- Ewing, J.F. and Maines, M.D. Glutathione depletion induces heme oxygenase-1 (HSP32) mRNA and protein in rat brain. *J. Neurochem.* (1993) 60: 1512-1519.
- Fujii, S., Sawa, T., Ihara, H., Tong, K.I., Ida, T., Okamoto, T., Ahtesham, A.K., Ishima, Y., Motohashi, H., Yamamoto, M. and Akaike, T. The critical role of nitric oxide signaling, via protein S-guanylation and nitrated cyclic GMP, in the antioxidant adaptive response. *J. Biol. Chem.* (2010) 285: 23970-23984.
- Fuse, Y., Nakajima, H., Nakajima-Takagi, Y., Nakajima, O. and Kobayashi, M. Heme-mediated inhibition of Bach1 regulates the liver specificity and transience of the Nrf2-dependent induction of zebrafish heme oxygenase 1. *Genes Cells* (2015) 20: 590-600.
- Glover-Cutter, K.M., Lin, S. and Blackwell, T.K. Integration of the unfolded protein and oxidative stress responses through SKN-1/Nrf. *PLoS Genet.* (2013) 9: e1003701.
- Gromer, S., Arscott, L.D., Williams Jr., C.H., Schirmer, R.H. and Becker, K. Human placenta thioredoxin reductase: Isolation of the selenoenzyme, steady state kinetics, and inhibition by therapeutic gold compounds. *J. Biol. Chem.* (1998) 273: 20096-20101.
- Hahn, M.E., Timme-Laragy, A.R., Karchner, S.I. and Stegeman, J.J. Nrf2 and Nrf2-related proteins in development and developmental toxicity: Insights from studies in zebrafish (*Danio rerio*). *Free Radic. Biol. Med.* (2015) 88: 275-289.
- Harbut, M.B., Vilchèze, C., Luo, X., Hensler, M.E., Guo, H., Yang, B., Chatterjee, A.K., Nizet, V., Jacobs Jr., W.R., Schultz, P.G. and Wang, F. Auranofin exerts broad-spectrum bactericidal activities by targeting thiol-redox homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2015) 112: 4453-4458.
- Hourihan, J.M., Kenna, J.G. and Hayes, J.D. The gasotransmitter hydrogen sulfide induces Nrf2-target genes by inactivating the Keap1 ubiquitin ligase substrate adaptor through formation of a disulfide bond between Cys-226 and Cys-613. *Antioxid. Redox Signal.* (2013) 19: 465-481.
- Huang, H.C., Nguyen, T. and Pickett, C.B. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* (2002) 277: 42769-42774.
- Hughes, M.F., Beck, B.D., Chen, Y., Lewis, A.S. and Thomas, D.J. Arsenic exposure and toxicology: A historical perspective. *Toxicol. Sci.* (2011) 123: 305-332.
- Igarashi, K. and Watanabe-Matsui, M. Wearing red for signaling: The heme-Bach axis in heme metabolism, oxidative stress response and iron immunology. *Tohoku J. Exp. Med.* (2014) 232: 229-253.
- Ishii, T., Itoh, K., Takahashi, S., Sato, H., Yanagawa, T., Katoh, Y., Bannai, S. and Yamamoto, M. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J. Biol. Chem.* (2000) 275: 16023-16029.
- Itoh, K., Igarashi, K., Hayashi, N., Nishizawa, M. and Yamamoto, M. Cloning and characterization of a novel erythroid cell-derived CNC family transcription factor

- heterodimerizing with the small Maf family proteins. *Mol. Cell. Biol.* (1995) 15: 4184-4193.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M. and Nabeshima, Y. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1997) 236: 313-322.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D. and Yamamoto, M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* (1999) 13: 76-86.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., O'Connor, T. and Yamamoto, M. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells* (2003) 8: 379-391.
- Jacob, F. and Monod, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* (1961) 3: 318-356.
- Jiang, T., Huang, Z., Chan, J.Y. and Zhang, D.D. Nrf2 protects against As(III)-induced damage in mouse liver and bladder. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2009) 240: 8-14.
- Jyrkkänen, H., Kuosmanen, S., Heinäniemi, M., Latinen, H., Kansanen, E., Mella-Aho, E., Leinonen, H., Ylä-Herttua, S. and Levonen, A. Novel insights into the regulation of antioxidant-response-element-mediated gene expression by electrophiles: induction of the transcriptional repressor BACH1 by Nrf2. *Biochem. J.* (2011) 440: 167-174.
- Kataoka, K., Handa, H. and Nishizawa, M. Induction of cellular antioxidative stress genes through heterodimeric transcription factor Nrf2/small Maf by antirheumatic Gold(I) compounds. *J. Biol. Chem.* (2001) 276: 34074-34081.
- Katoh, Y., Itoh, K., Yoshida, E., Miyagishi, M., Fukamizu, A. and Yamamoto, M. Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes Cells* (2001) 6: 857-868.
- Katoh, Y., Iida, K., Kang, M., Kobayashi, A., Mizukami, M., Tong, K.I., McMahon, M., Hayes, J.D., Itoh, K. and Yamamoto, M. Evolutionary conserved N-terminal domain of Nrf2 is essential for the Keap1-mediated degradation of the protein by proteasome. *Arch. Biochem. Biophys.* (2005) 433: 342-350.
- Kean, W.F. and Kean, I.R.L. Clinical pharmacology of gold. *Inflammopharmacology* (2008) 16: 112-125.
- Keleku-Lukwete, N., Suzuki, M., Otsuki, A., Tsuchida, K., Katayama, S., Hayashi, M., Naganuma, E., Moriguchi, T., Tanabe, O., Engel, J.D., Imaizumi, M. and Yamamoto, M. Amelioration of inflammation and tissue damage in sickle cell model mice by Nrf2 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2015) 112: 12169-12174.
- Kim, Y., Masutani, H., Yamaguchi, Y., Itoh, K., Yamamoto, M and Yodoi, J. Hemin-induced activation of the thioredoxin gene by Nrf2: a differential regulation of the antioxidant responsive element by a switch of its binding factors. *J. Biol. Chem.* (2001) 276: 18399-18406.
- Klaassen, C.D., Liu, J. and Diwan, B.A. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2009) 238: 215-220.
- Kobayashi, M., Nishikawa, K. and Yamamoto, M. Hematopoietic regulatory domain of *gata1* gene is positively regulated by GATA1 protein in zebrafish embryos. *Development* (2001a) 128: 2341-2350.

- Kobayashi, M., Nishikawa, K., Suzuki, T. and Yamamoto, M. The homeobox protein Six3 interacts with the groucho corepressor and acts as a transcriptional repressor in eye and forebrain formation. *Dev. Biol.* (2001b) 232: 315-326.
- Kobayashi, M., Itoh, K., Suzuki, T., Osanai, H., Nishikawa, K., Katoh, Y., Takagi, Y. and Yamamoto, M. Identification of the interactive interface and phylogenetic conservation of the Nrf2-Keap1 system. *Genes Cells* (2002) 7: 807-820.
- Kobayashi, A., Kang, M., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K. and Yamamoto, M. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* (2004) 24: 7130-7139.
- Kobayashi, M. and Yamamoto, M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Advan. Enzyme Regul.* (2006) 46: 113-140.
- Kobayashi, A., Kang, M., Watai, Y., Tong, K.I., Shibata, T., Uchida, K. and Yamamoto, M. Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol. Cell. Biol.* (2006) 26: 221-229.
- Kobayashi, M., Li, L., Iwamoto, N., Nakajima-Takagi, Y., Kaneko, H., Nakayama, Y., Eguchi, M., Wada, Y., Kumagai, Y. and Yamamoto, M. The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. *Mol. Cell. Biol.* (2009) 29: 493-502.
- Kumagai, Y. and Sumi, D. Arsenic: Signal transduction, transcription factor, and biotransformation involved in cellular response and toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* (2007) 47: 243-262.
- Leslie, E.M., Haimeur, A. and Waalkes, M.P. Arsenic transport by the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1): Evidence that a tri-glutathione conjugate is required. *J. Biol. Chem.* (2004) 279: 32700-32708.
- Leslie, E.M. Arsenic-glutathione conjugate transport by the human multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs). *J. Inorg. Biochem.* (2012) 108: 141-149.
- Leung, J., Pang, A., Yuen, W., Kwong Y. and Tse, E.W.C. Relationship of expression of aquaglyceroporin 9 with arsenic uptake and sensitivity in leukemia cells. *Blood* (2007) 109: 740-746.
- Levonen, A., Landar, A., Ramachandran, A., Ceaser, E.K., Dickinson, D.A., Zanoni, G., Morrow, J.D. and Darley-Usmar, V.M. Cellular mechanisms of redox cell signaling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defenses in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem. J.* (2004) 378: 373-382.
- Li, L., Kobayashi, M., Kaneko, H., Nakajima-Takagi, Y., Nakayama, Y. and Yamamoto, M. Molecular evolution of Keap1: Two Keap1 molecules with distinctive intervening region structures are conserved among fish. *J. Biol. Chem.* (2008) 283: 3248-3255.
- Linker, R.A., Lee, D., Ryan, S., van Dam, A.M., Conrad, R., Bista, P., Zeng, W., Hronowsky, X., Buko, A., Chollate, S., Ellrichmann, G., Brück, W., Dawson, K., Goelz, S., Wiese, S., Scannevin, R.H., Lukashev, M. and Gold, R. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain* (2011) 134: 678-692.
- Liu, Z., Shen, J., Carbrey, J.M., Mukhopadhyay, R., Agre, P. and Rosen, B.P. Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2002) 99: 6053-6058.

- McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., Chanas, S.A., Henderson, C.J., McLellan, L.I., Wolf, C.R., Cavin, C. and Hayes, J.D. The cap 'n' collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Res.* (2001) 61: 3299-3307.
- McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J.D. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J. Biol. Chem.* (2003) 278: 21592-21600.
- McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J.D. Dimerization of substrate adaptors can facilitate Cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a "tethering" mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. *J. Biol. Chem.* (2006) 281: 24756-24768.
- McMahon, M., Lamont, D.J., Beattie, K.A. and Hayes, J.D. Keap1 perceives stress via three sensors for the endogenous signaling molecules nitric oxide, zinc, and alkenals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2010) 107: 18838-18843.
- Meyer, R.P., Podvynec, M. and Meyer, U.A. Cytochrome P450 CYP1A1 accumulates in the cytosol of kidney and brain and is activated by heme. *Mol. Pharmacol.* (2002) 62: 1061-1067.
- Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A. and Kan, Y.W. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the β -globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994) 91: 9926-9930.
- Monia, B.P., Butt, T.R., Ecker, D.J., Mirabelli, C.K. and Crooke, S.T. Metallothionein turnover in mammalian cells: implications in metal toxicity. *J. Biol. Chem.* (1986) 261: 10957-10959.
- Motterlini, R., Foresti, R., Bassi, R. and Green, C.J. Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* (2000) 28: 1303-1312.
- Mukaigasa, K., Nguyen, L.T.P., Li, L., Nakajima, H., Yamamoto, M. and Kobayashi, M. Genetic evidence of an evolutionarily conserved role for Nrf2 in the protection against oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* (2012) 32: 4455-4461.
- Nakajima, H., Nakajima-Takagi, Y., Tsujita, T., Akiyama, S., Wakasa, T., Mukaigasa, K., Kaneko, H., Tamaru, Y., Yamamoto, M. and Kobayashi, M. Tissue-restricted expression of Nrf2 and its target genes in zebrafish with gene-specific variations in the induction profiles. *PLoS ONE* (2011) 6: e26884.
- 中島瞳. Nrf2 標的遺伝子の組織特異的な発現誘導. 筑波大学大学院 人間総合科学研究科 修士論文 (2012)
- Nguyen, V.T., Fuse, Y., Tamaoki, J., Akiyama, S., Muratani, M., Tamaru, Y. and Kobayashi, M. Conservation of the Nrf2-mediated gene regulation of proteasome subunits and glucose metabolism in zebrafish. *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2016) 2016: 5720574.
- Nioi, P., Nguyen, T., Sherratt, P.J. and Pickett, C.B. The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* (2005) 25: 10895-10906.
- Novac, N. Challenges and opportunities of drug repositioning. *Trends Pharmacol. Sci.* (2013) 34: 267-272.
- Ogawa, K., Sun, J., Taketani, S., Nakajima, O., Nishitani, C., Sassa, S., Hayashi, N., Yamamoto,

- M., Shibahara, S., Fujita, H. and Igarashi, K. Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. *EMBO J.* (2001) 20: 2835-2843.
- Oyake, T., Itoh, K., Motohashi, H., Hayashi, N., Hoshino, H., Nishizawa, M., Yamamoto, M. and Igarashi, K. Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site. *Mol. Cell. Biol.* (1996) 16: 6083-6095.
- Papp, K.A. and Shear, N.H. Systemic gold therapy. *Clin. Dermatol.* (1992) 9: 535-551.
- Pergola, P.E., Raskin, P., Toto, R.D., Meyer, C.J., Huff, J.W., Grossman, E.B., Krauth, M., Ruiz, S., Audhya, P., Christ-Schmidt, H., Wittes, J. and Warnock, D.G. *N. Engl. J. Med.* (2011) 365: 327-336.
- Pitoniak, A. and Bohmann, D. Mechanisms and functions of Nrf2 signaling in *Drosophila*. *Free Radic. Biol. Med.* (2015) 88: 302-313.
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C.J. and Valko, M. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* (2017) 38: 592-607.
- Rani, V., Deep, G., Singh, R.K., Palle, K. and Yadav, U.C.S. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci.* (2016) 148: 183-193.
- Roder, C. and Thomson, M.J. Auranofin: Repurposing an old drug for a golden new age. *Drugs R D* (2015) 15: 13-20.
- Rodrigues-Pousada, C., Menezes, R.A. and Pimentel, C. The Yap family and its role in stress response. *Yeast* (2010) 27: 245-258.
- Saito, R., Suzuki, T., Hiramoto, K., Asami, S., Naganuma, E., Suda, H., Iso, T., Yamamoto, H., Morita, M., Baird, L., Furusawa, Y., Negishi, T., Ichinose, M. and Yamamoto, M. Characterizations of three major cysteine sensors of Keap1 in stress response. *Mol. Cell. Biol.* (2016) 36: 271: 284.
- Schulze-Topphoff, U., Varrin-Doyer, M., Pekarek, K., Spencer, C.M., Shetty, A., Sagan, S.A., Cree, B.A.C., Sobel, R.A., Wipke, B.T., Steinman, L., Scannevin, R.H. and Zamvil, S.S. Dimethyl fumarate treatment induces adaptive and innate immune modulation independent of Nrf2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2016) 113: 4777-4782.
- Sies, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* (2015) 4: 180-183.
- Sun, J., Hoshino, H., Takaku, K., Nakajima, O., Muto, A., Suzuki, H., Tashiro, S., Takahashi, S., Shibahara, S., Alam, J., Taketo, M.M., Yamamoto, M. and Igarashi, K. Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J.* (2002) 21: 5216-5224.
- Sun, J., Brand, M., Zenke, Y., Tashiro, S., Groudine, M. and Igarashi, K. Heme regulates the dynamic exchange of Bach1 and NF-E2-related factors in the Maf transcription factor network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2004) 101: 1461-1466.
- Suzuki, H., Tashiro, S., Hira, S., Sun, J., Yamazaki, C., Zenke, Y., Ikeda-Saito, M., Yoshida, M. and Igarashi, K. Heme regulates gene expression by triggering Crml-dependent nuclear export of Bach1. *EMBO J.* (2004) 23: 2544-2553.
- Suzuki, T., Takagi, Y., Osanai, H., Li, L., Takeuchi, M., Katoh, Y., Kobayashi, M. and Yamamoto, M. Pi class glutathione S-transferase genes are regulated by Nrf2 through an evolutionarily conserved regulatory element in zebrafish. *Biochem. J.* (2005) 388: 65-73.
- Suzuki, T., Motohashi, H. and Yamamoto, M. Toward clinical application of the Keap1-Nrf2

- pathway. *Trends Pharmacol. Sci.* (2013) 34: 340-346.
- Suzuki, T. and Yamamoto, M. Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radic. Biol. Med.* (2015) 88: 93-100.
- Sykiotis, G.P. and Bohmann, D. Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in *Drosophila*. *Dev. Cell* (2008) 14: 76-85.
- Takagi, Y., Kobayashi, M., Li, L., Suzuki, T., Nishikawa, K. and Yamamoto, M. MafT, a new member of the small Maf protein family in zebrafish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2004) 320: 62-69.
- Takaya, K., Suzuki, T., Motohashi, H., Onodera, K., Satomi, S., Kensler, T.W. and Yamamoto, M. *Free Radic. Biol. Med.* (2012) 53: 817-827.
- Tan, M.M., Lim, H., Bennett, E.J., Shi, Y. and Harper, J.W. Parallel SCF Adaptor capture proteomics reveals a role for SCF^{FBXL17} in NRF2 activation via BACH1 repressor turnover. *Mol. Cell* (2013) 52: 9-24.
- Thimmulappa, R.K., Mai, K.H., Srisuma, S., Kensler, T.W., Yamamoto, M. and Biswal, S. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res.* (2002) 62: 5196-5203.
- Timme-Laragy, A.R., Karchner, S.I., Franks, D.G., Jenny, M.J., Harbeitner, R.C., Goldstone, J.V., McArthur A.G. and Hahn, M.E. Nrf2b, novel zebrafish paralog of oxidant-responsive transcription factor NF-E2-related factor 2 (NRF2). *J. Biol. Chem.* (2012) 287: 4609-4627.
- Tong, K.I., 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.* (2007) 27: 7511-7521.
- Uede, K. and Furukawa, F. Skin manifestations in acute arsenic poisoning from the Wakayama curry-poisoning incident. *Br. J. Dermatol.* (2003) 149: 757-762.
- Urano, A., Furusawa, Y., Yagishita, Y., Fukutomi, T., Muramatsu, H., Negishi, T., Sugawara, A., Kensler, T.W. and Yamamoto, M. The Keap1-Nrf2 system prevents onset of diabetes mellitus. *Mol. Cell. Biol.* (2013) 33: 2996-3010.
- Venugopal, R. and Jaiswal, A.K. Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene* (1998) 17: 3145-3156.
- Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Kang, M., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Kensler, T.W. and Talalay, P. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: Fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2004) 101: 2040-2045.
- Wang, H. and Lee, T. Glutathione S-transferase π facilitates the excretion of arsenic from arsenic-resistant Chinese hamster ovary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1993) 192: 1093-1099.
- Wang, W., Kwok, A.M. and Chan, J.Y. The p53 isoform of Nrf1 is a dominant negative inhibitor of ARE-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* (2007) 282: 24670-24678.
- Wegiel, B., Nemeth, Z., Correa-Costa, M., Bulmer, A.C. and Otterbein, L.E. Heme oxygenase-1: A metabolic nuke. *Antioxid. Redox Signal.* (2014) 20: 1709-1722.
- Wu, X., Cobbina, S.J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z. and Yang, L. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2016) 23: 8244-8259.
- Yagishita, Y., Fukutomi, T., Sugawara, A., Kawamura, H., Takahashi, T., Pi, J., Urano, A. and

- Yamamoto, M. Nrf2 protects pancreatic β -cells from oxidative and nitrosative stress in diabetic model mice. *Diabetes* (2014) 63: 605-618.
- Yamazaki, H., Tanji, K., Wakabayashi, K., Matsuura, S. and Itoh, K. Role of the Keap1/Nrf2 pathway in neurodegenerative diseases. *Pathol. Int.* (2015) 65: 210-219.
- Yang, L., Palliyaguru, D.L. and Kensler, T.W. Frugal chemoprevention: targeting Nrf2 with foods rich in sulforaphane. *Semin. Oncol.* (2016) 43: 146-153.
- Yates, M.S., Tauchi, M., Katsuoka, F., Flanders, K.C., Liby, K.T., Honda, T., Gribble, G.W., Johnson, D.A., Johnson, J.A., Burton, N.C., Guilarte, T.R., Yamamoto, M., Sporn, M.B. and Kensler, T.W. Pharmacodynamic characterization of chemopreventive triterpenoids as exceptionally potent inducers of Nrf2-regulated genes. *Mol. Cancer Ther.* (2007) 6: 154-162.
- Zeeuw, D., Akizawa, T., Audhya, P., Bakris, G.L., Chin, M., Christ-Schmidt, H., Goldsberry, A., Houser, M., Krauth, M., Heerspink, H.J.L., McMurray, J.J., Meyer, C.J., Parving, H., Remuzzi, G., Toto, R.D., Vaziri, N.D., Wanner, C., Wittes, J., Wrolstad, D. and Chertow, G.M. *N. Engl. J. Med.* (2013) 369: 2492-2503.
- Zenke-Kawasaki, Y., Dohi, Y., Katoh, Y., Ikura, T., Ikura, M., Asahara, T., Tokunaga, F., Iwai, K. and Igarashi, K. Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor Bach1. *Mol. Cell. Biol.* (2007) 27: 6962-6971.
- Zhang, D.D. and Hannink, M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* (2003) 23: 8137-8151.
- Zhang, D.D., Lo, S., Cross, J.V., Templeton, D.J. and Hannink, M. Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol. Cell. Biol.* (2004) 24: 10941-10953.
- Zhang, J., Ohta, T., Maruyama, A., Hosoya, T., Nishikawa, K., Maher, J.M., Shibahara, S., Itoh, K. and Yamamoto, M. BRG1 interacts with Nrf2 to selectively mediate *HO-1* induction in response to oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* (2006) 26: 7942-7952.
- Zhang, Y., Lucocq, J.M., Yamamoto, M. and Hayes, J.D. The NHB1 (N-terminal homology box 1) sequence in transcription factor Nrf1 required to anchor it to the endoplasmic reticulum and also to enable its asparagine-glycosylation. *Biochem. J.* (2007) 408: 161-172.
- Zheng, Y., Tao, S., Lian, F., Chau, B.T., Chen, J., Sun, G., Fang, D., Lantz, R.C. and Zhang, D.D. Sulforaphane prevents pulmonary damage in response to inhaled arsenic by activating the Nrf2-defense response. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2012) 265: 292-299.
- Zipper, L.M. and Mulcahy, R.T. The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm. *J. Biol. Chem.* (2002) 277: 36544-36552.

図表

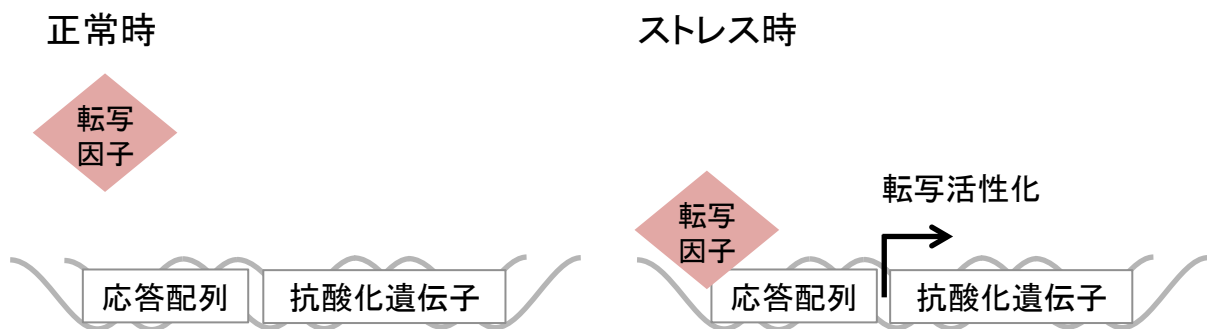


図1-1 真核生物における転写活性化をベースにした酸化ストレスに対する防御機構
 真核生物は、酸化ストレスに応答して抗酸化遺伝子群を誘導する転写因子を持っている。代表的なものは、出芽酵母のYap、線虫のSkn-1、哺乳類のNrf2である。これらストレス応答性の転写因子は、ストレス曝露に応じてプロモーターやエンハンサー領域に存在する応答配列に結合し、抗酸化遺伝子の転写を活性化する。

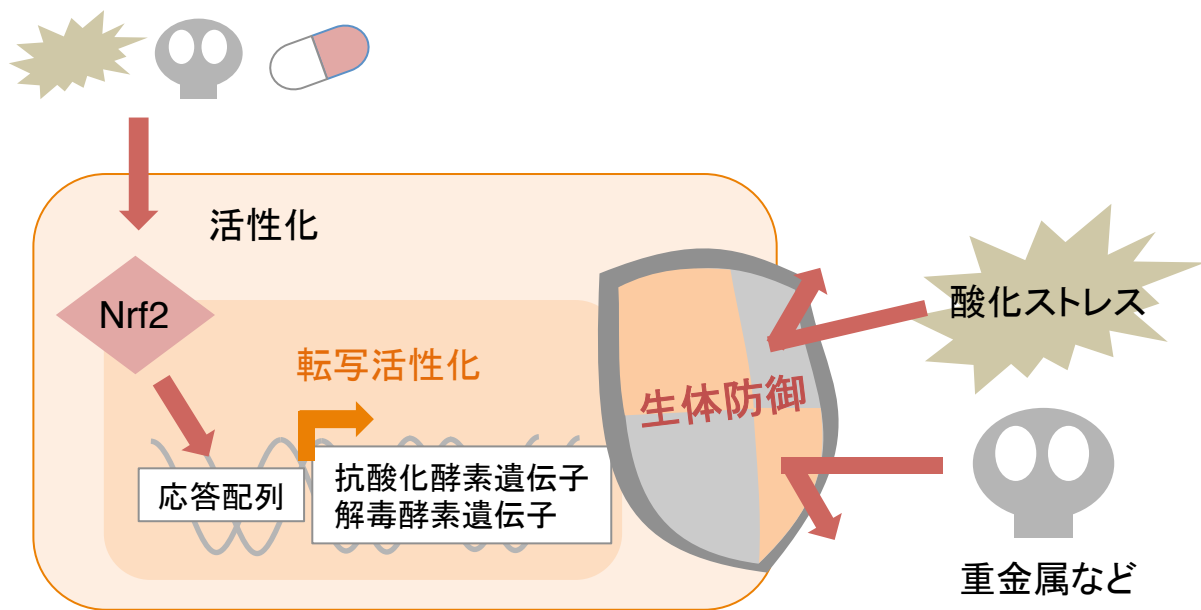
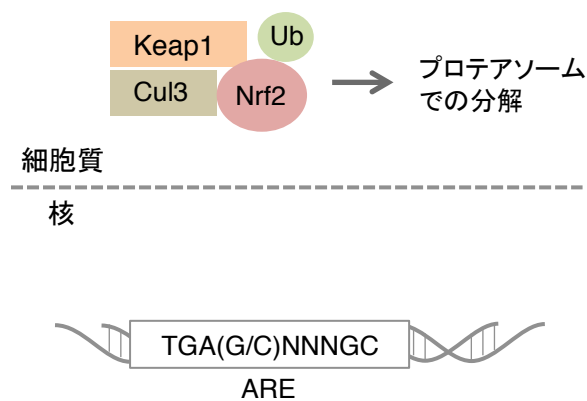


図1-2 Nrf2システムによる生体防御

Nrf2システムは、酸化ストレスや化学物質に対する生体防御機構である。ストレス曝露時には、抗酸化酵素や解毒酵素を誘導することによって、細胞をストレスから守る役割を持っている。また、薬や食品成分によるNrf2活性化は、多くの酸化ストレス関連疾病の予防・治療に応用できることが期待されている。

正常時



ストレス時

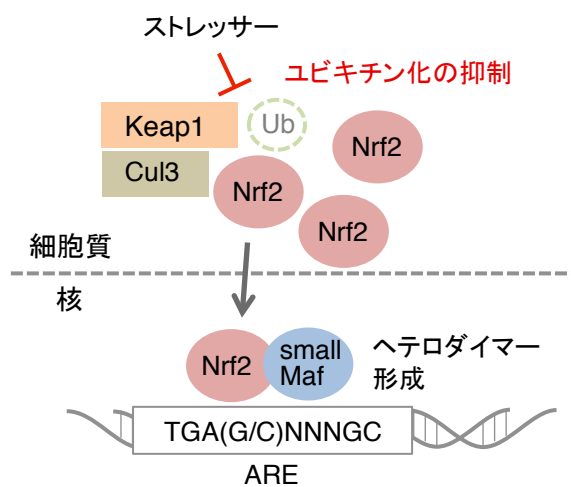


図1-3 Nrf2システムの活性制御メカニズム

正常時には、Keap1やCul3を含むユビキチンリガーゼ複合体のはたらきにより、Nrf2がユビキチン化されており、プロテアソームで分解されることによって、タンパク質レベルが低く保たれている。一方でストレス時には、ストレッサーがKeap1の機能を阻害することにより、Nrf2のユビキチン化が阻害され、タンパク質レベルの上昇が起きる。核へと入ったNrf2は、small Mafとヘテロダイマーを形成して抗酸化剤応答配列（ARE）に結合し、下流の標的遺伝子を転写活性化する。

表 2-1 Nrf2 タンパク質のアミノ酸情報

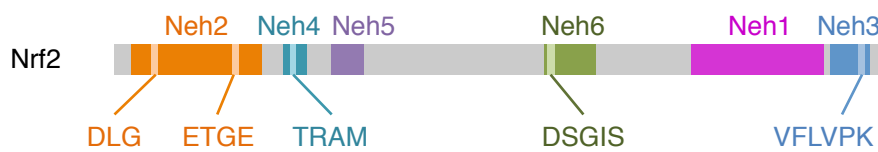
Nrf2	<i>Mm</i> Nrf2	ENSMUSP00000099733
	<i>Gg</i> Nrf2	ENSGALP00000032649
	<i>Xt</i> Nrf2	ENSXETP00000003783
	<i>Dr</i> Nrf2a	ENSDARP00000062853
	<i>Dr</i> Nrf2b	ENSDARP00000106581
Nrf1	<i>Mm</i> Nrf1	ENSMUSP00000080467
	<i>Gg</i> Nrf1	ENSGALP00000035379
	<i>Xt</i> Nrf1	ENSXETP00000047513
	<i>Dr</i> Nrf1a	ENSDARP00000094757
	<i>Dr</i> Nrf1b	ENSDARP00000127352
Nrf3	<i>Mm</i> Nrf3	ENSMUSP00000005103
	<i>Xt</i> Nrf3	ENSXETP00000026569
	<i>Dr</i> Nrf3	ENSDARP00000015027
Nfe2	<i>Mm</i> Nfe2	ENSMUSP00000122476
	<i>Xt</i> Nfe2	ENSXETP00000057159
	<i>Dr</i> Nfe2	ENSDARP00000002745
無脊椎動物 Nrf	<i>Ci</i> Nrf	ENSCINP00000024999
	<i>Sp</i> Nrf	XP_011683763
	<i>Ob</i> Nrf	XP_014784776
	<i>Dm</i> CncC, CncI	NP_732833.1, NP_001247258.1
	<i>Hm</i> Nrf	XP_002160548.1
	<i>Ce</i> Skn-1a, Skn-1c	NP_741404.1, NP_741405

Mm: *Mus musculus* (マウス)、*Gg*: *Gallus gallus* (ニワトリ)、*Xt*: *Xenopus tropicalis* (ゼノパス)、*Dr*: *Danio rerio* (ゼブラフィッシュ)、*Ci*: *Ciona intestinalis* (カタユウレイボヤ)、*Sp*: *Strongylocentrotus purpuratus* (ムラサキウニ)、*Ob*: *Octopus bimaculoides* (タコ、California two-spot octopus)、*Dm*: *Drosophila melanogaster* (ショウジョウバエ)、*Hm*: *Hydra magnipapillata* (ヒドラ)、*Ce*: *Caenorhabditis elegans* (線虫)

表 2-2 Keap1 タンパク質のアミノ酸情報

脊椎動物 Keap1	<i>Mm</i> Keap1	ENSMUSP00000131029
	<i>Gg</i> Keap1	ENSGALP00000046666
	<i>Ac</i> Keap1	ENSACAP00000008820
	<i>Xt</i> Keap1	ENSXETP00000063060
	<i>Lc</i> Keap1	ENSLACP00000008916
Keap1b	<i>Dr</i> Keap1b	ENSDARP00000124228
	<i>Ol</i> Keap1b	ENSORLP00000004762
	<i>Tn</i> Keap1b	ENSTNIP00000007190
Keap1a	<i>Xt</i> Keap1a	ENSXETP00000049635, Xenbase (http://www.xenbase.org)
	<i>Lc</i> Keap1a	ENSLACP00000018705
	<i>Dr</i> Keap1a	ENSDARP00000045763
	<i>Ol</i> Keap1a	ENSORLP00000017543
	<i>Tn</i> Keap1a	ENSTNIP00000020338
無脊椎動物 Nrf	<i>Ci</i> Keap1	ENSCINP00000017048
	<i>Sp</i> Keap1	XP_003724241.1
	<i>Ob</i> Keap1	XP_014782077.1
	<i>Dm</i> Keap1	NP_788685.1

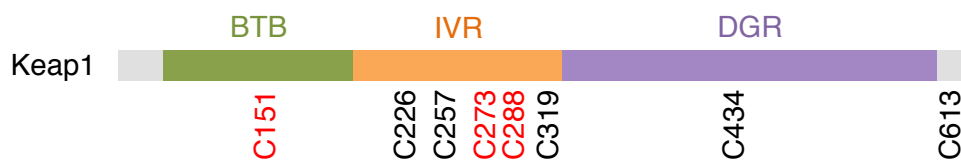
Mm: *Mus musculus* (マウス)、*Gg*: *Gallus gallus* (ニワトリ)、*Ac*: *Anolis carolinensis* (グリーンアノール) *Xt*: *Xenopus tropicalis* (ゼノパス)、*Lc*: *Latimeria chalumnae* (シーラカンス) *Dr*: *Danio rerio* (ゼブラフィッシュ)、*Ol*: *Oryzias latipes* (メダカ)、*Tn*: *Tetraodon nigroviridis* (ミドリフグ)、*Ci*: *Ciona intestinalis* (カタユウレイボヤ)、*Sp*: *Strongylocentrotus purpuratus* (ムラサキウニ)、*Ob*: *Octopus bimaculoides* (タコ、California two-spot octopus)、*Dm*: *Drosophila melanogaster* (ショウジョウバエ)



ドメイン	機能部位・モチーフ	機能	文献
Neh1	CNC-bZip	DNA結合 small Mafとのヘテロダイマー形成	Itoh <i>et al.</i> , 1995
Neh2	DLGモチーフ ETGEモチーフ	Keap1との相互作用 ユビキチン化	Itoh <i>et al.</i> , 1999; Katoh <i>et al.</i> , 2005; McMahon <i>et al.</i> , 2006; Tong <i>et al.</i> , 2007
Neh3	VFLVPKモチーフ	転写活性化ドメイン CHD6との相互作用	Nioi <i>et al.</i> , 2005
Neh4	TRAM (Transcriptional adapter motif)	転写活性化ドメイン CBPとの相互作用	Katoh <i>et al.</i> , 2001
Neh5	—	転写活性化ドメイン CBPとの相互作用	Katoh <i>et al.</i> , 2001
Neh6	DSGISモチーフ	GSK-3βによるリン酸化部位 β-TrCPとの相互作用	Chowdhry <i>et al.</i> , 2013

図2-1 Nrf2タンパク質のドメイン構造

これまでに明らかになっている、Nrf2タンパク質の各ドメインおよびモチーフを図示し、その機能をまとめた。



ドメイン	機能	文献
BTB (broad complex-tramtrack-bric a brac)	ホモダイマー形成	Zipper & Mulcahy, 2002
IVR (intervening region)	Cul3との相互作用、 ユビキチンリガーゼ複合体形成	Kobayashi <i>et al.</i> , 2004; Cullinan <i>et al.</i> , 2004
GDR (double glycine repeat)	Nrf2との相互作用	Itoh <i>et al.</i> , 1999; Tong <i>et al.</i> , 2007

システイン残基	応答する化学物質	文献
Cys-151	tBHQ, sulforaphane, diethyl maleate, D3T, 1,2-NQ, ebselen, dimethyl fumarate, NO, arsenic, iodoacetamide	Zhang & Hannink, 2003; Egger <i>et al.</i> , 2005; Kobayashi <i>et al.</i> , 2009; McMahon <i>et al.</i> , 2010; Takaya <i>et al.</i> , 2012; Saito <i>et al.</i> , 2016
Cys-226	zinc, cadmium, arsenic, selenium, H ₂ O ₂	McMahon <i>et al.</i> , 2010; Hourihan <i>et al.</i> , 2013
Cys-257	dexamethasone	Dinkova-Kostova <i>et al.</i> , 2002
Cys-273	15d-PGJ ₂ , PGA ₂ , arsenic, 4HNE, OA-NO ₂ , dexamethasone	Dinkova-Kostova <i>et al.</i> , 2002; Kobayashi <i>et al.</i> , 2009; Saito <i>et al.</i> , 2016
Cys-288	15d-PGJ ₂ , acrolein, 4-hydroxynonenal, arsenic, dexamethasone, iodoacetamide	Dinkova-Kostova <i>et al.</i> , 2002; Egger <i>et al.</i> , 2005; McMahon <i>et al.</i> , 2010
Cys-297	dexamethasone, iodoacetamide	Dinkova-Kostova <i>et al.</i> , 2002; Egger <i>et al.</i> , 2005
Cys-319	iodoacetamide	Egger <i>et al.</i> , 2005
Cys-434	8-nitro-cGMP	Fujii <i>et al.</i> , 2010
Cys-613	zinc, cadmium, arsenic, selenium, H ₂ O ₂	McMahon <i>et al.</i> , 2010; Hourihan <i>et al.</i> , 2013

図2-2 Keap1タンパク質のドメイン構造およびシステイン残基の機能

これまでに明らかになっている、Keap1タンパク質の各ドメインの機能および各システイン残基が応答する化学物質についてまとめた。

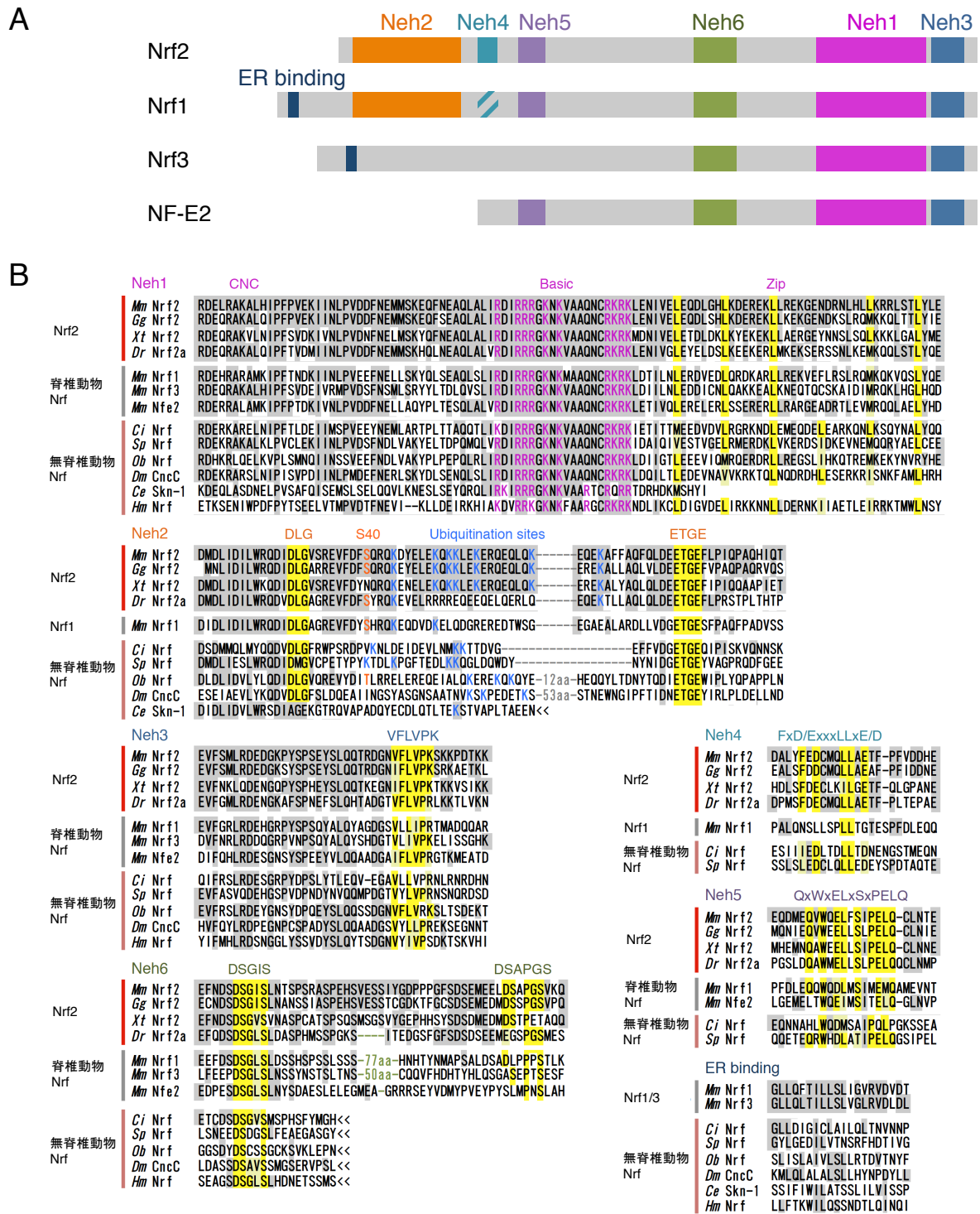


図2-3 Nrfファミリータンパク質の構造比較

A: 4つの哺乳類Nrfファミリータンパク質をNrf2のNehドメインをベースに比較した。斜線は、Neh4ドメインと部分的に保存されていることを示す。ER結合ドメイン（NHB1）についても示した。

B: Nrf/Cnc転写因子のアミノ酸配列の比較。マウスNrf2と同一のアミノ酸には灰色の影をつけた。Neh1ドメインにおいてジッパー構造を形成するロイシン残基、Neh2のDLGおよびETGEモチーフ、Neh3のVFLVPKモチーフ、Neh4のFxD/ExxxLLx/D配列、Neh5のQxWxELxSxPELQ配列、およびNeh6のDSGIS・DSAPGSモチーフには黄色の影をつけた。Neh1のbasic region、Neh2のDLGとETGEの間にあるリジン残基（ユビキチン化部位）およびNeh2のセリン/スレオニン残基（リン酸化部位）はそれぞれ、ピンク、青およびオレンジの文字で示した。動物種の略号は以下の通りである。Mm: マウス、Gg: ニワトリ、Xt: ゼノパス、Dr: ゼブラフィッシュ、Ci: ホヤ、Sp: ウニ、Ob: タコ、Dm: ショウジョウバエ、Ce: 線虫、Hm: ヒドラ。

		ER binding	Neh2		Neh4	Neh5	Neh6		Neh1			Neh3
			DLG	length	ETGE		DSGIS	DSAPGS	CNC	Basic	Zip	VFLVPK
Nrf2	<i>Mm</i> Nrf2	x	◎	47 aa	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
	<i>Gg</i> Nrf2	x	◎	47 aa	◎	◎	◎	○	◎	◎	◎	◎
	<i>Xt</i> Nrf2	x	◎	47 aa	◎	○	○	△	◎	◎	◎	◎
	<i>Dr</i> Nrf2a	x	◎	47 aa	◎	◎	○	△	◎	◎	◎	◎
	<i>Dr</i> Nrf2b	x	◎	45 aa	◎	x	○	△	△	◎	◎	○
Nrf1	<i>Mm</i> Nrf1	◎	◎	47 aa	◎	x	○	○	x	◎	◎	○
	<i>Gg</i> Nrf1	◎	◎	47 aa	◎	△	○	○	x	◎	◎	○
	<i>Xt</i> Nrf1	◎	◎	39 aa	◎	△	○	○	x	◎	◎	x
	<i>Dr</i> Nrf1a	◎	x		x	○	○	○	x	◎	◎	x
	<i>Dr</i> Nrf1b	x	◎	45 aa	◎	x	○	△	x	◎	◎	○
Nrf3	<i>Mm</i> Nrf3	◎	x		x	△	x	○	x	◎	◎	○
	<i>Xt</i> Nrf3	◎	x		x	x	x	○	x	◎	◎	x
	<i>Dr</i> Nrf3	◎	x		x	○	x	○	x	◎	◎	x
Nfe2	<i>Mm</i> Nfe2	x	x		x	x	○	○	x	◎	◎	○
	<i>Xt</i> Nfe2	x	x		x	x	△	○	x	◎	◎	x
	<i>Dr</i> Nfe2	x	x		x	x	○	○	x	◎	◎	x
無脊椎動物 Nrf	<i>Ci</i> Nrf	○	◎	34 aa	◎	○	△	○	x	◎	◎	△
	<i>Sp</i> Nrf	○	○	36 aa	◎	○	○	△	x	◎	◎	△
	<i>Ob</i> Nrf	○	◎	59 aa	◎	x	x	△	x	◎	◎	◎
	<i>Dm</i> CncC	○	◎	100 aa	◎	x	x	△	x	◎	◎	○
	<i>Dm</i> CncI	x	◎	100 aa	◎	x	x	△	x	◎	◎	○
	<i>Hm</i> Nrf	○	x		x	x	x	○	x	◎	◎	○
Skn-1	<i>Ce</i> Skn-1a	○	x		x	x	x	x	x	◎	◎	x
	<i>Ce</i> Skn-1c	x	x		x	x	x	x	x	◎	◎	x

図2-4 Nrf/Cnc転写因子のドメイン構造の保存性

保存されたNehドメインの有無を以下のように示した。◎: 高度に保存されている、○: 保存されている、△: 部分的に保存されている、x: 保存されていない。モチーフについては、マウスNrf2のアミノ酸配列と完全に一致したときのみ「高度に保存されている」と判定した。DLGおよびETGEモチーフ間のアミノ酸距離も示した。動物種の略号は以下の通りである。*Mm*: マウス、*Gg*: ニワトリ、*Xt*: ゼノパス、*Dr*: ゼブラフィッシュ、*Ci*: ホヤ、*Sp*: ウニ、*Ob*: タコ、*Dm*: ショウジョウバエ、*Ce*: 線虫、*Hm*: ヒドラ。

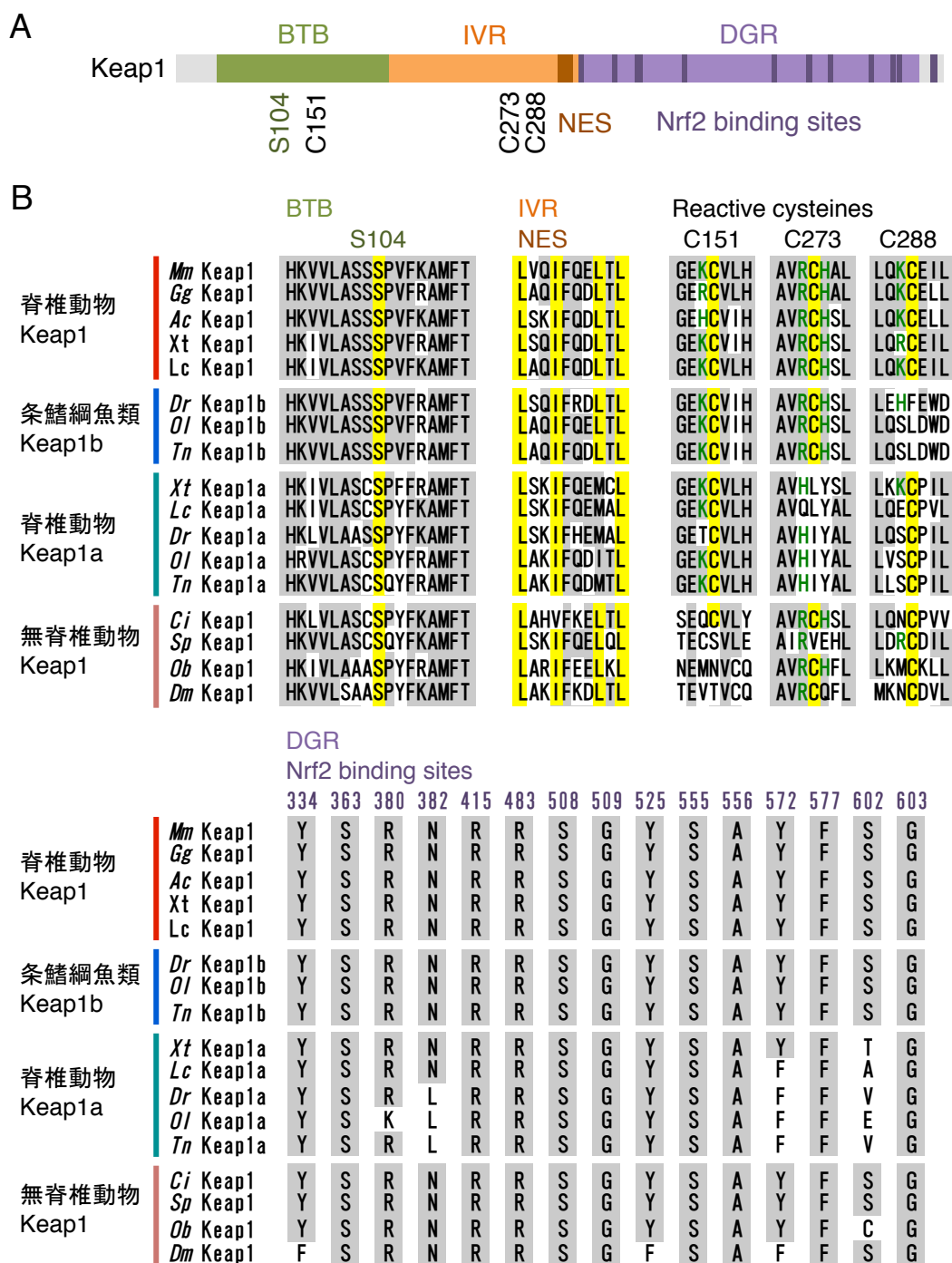


図2-5 Keap1の構造比較

A: Keap1のドメイン構造

B: Keap1のアミノ酸配列比較。マウスKeap1と同一のアミノ酸は灰色に影をつけた。BTBドメインのホモダイマー形成に重要なセリン残基、IVRドメインのNESコンセンサス配列およびストレス応答に重要な3つの反応性システイン残基を黄色に影をつけた。動物種の略号は以下の通りである。*Mm*: マウス、*Gg*: ニワトリ、*Ac*: アノールリザード、*Xt*: ゼノパス、*Lc*: シーラカンス、*Dr*: ゼブラフィッシュ、*Ol*: メダカ、*Tn*: ミドリフグ、*Ci*: ホヤ、*Sp*: ウニ、*Ob*: タコ、*Dm*: ショウジョウバエ。

	Cysteine (mouse)	23	38	77	151	171	196	226	241	249	257	273	288	297	319	368	395	406	434	489	513	518	583	613	622	624		
脊椎動物 Keap1	<i>Mm</i> Keap1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
	<i>Gg</i> Keap1	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○	○	○	
	<i>Ac</i> Keap1	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○	○	○	○	
	<i>Xt</i> Keap1	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	×	×
	<i>Lc</i> Keap1	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○	○	×	×
条鰭綱魚類 Keap1b	<i>Dr</i> Keap1b	×	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	×	×	×	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○	
	<i>Ol</i> Keap1b	×	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	△	×	
	<i>Tn</i> Keap1b	×	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	×	×	
脊椎動物 Keap1a	<i>Xt</i> Keap1a	×	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	○	○	×	○	×	×	×	○	×	×	○	○	○	×	○	
	<i>Lc</i> Keap1a	×	×	○	○	○	○	○	○	○	×	×	○	○	×	○	○	○	×	×	○	×	×	○	○	×	×	
	<i>Dr</i> Keap1a	×	×	○	○	○	○	○	○	○	×	×	○	○	×	○	○	○	×	×	×	△	×	○	○	×	×	
	<i>Ol</i> Keap1a	×	×	○	○	○	○	○	○	○	×	×	○	○	×	○	○	○	×	×	×	△	×	○	○	×	×	
	<i>Tn</i> Keap1a	×	×	○	○	○	○	○	○	○	×	×	○	○	×	○	○	○	×	×	×	△	×	○	○	×	×	
無脊椎動物 Keap1	<i>Ci</i> Keap1	×	○	○	○	○	○	○	△	×	○	○	○	○	×	○	△	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	
	<i>Sp</i> Keap1	×	×	○	△	○	×	×	○	○	×	×	○	○	×	×	×	×	○	○	×	×	×	○	○	×	×	
	<i>Ob</i> Keap1	×	×	○	△	○	○	○	○	×	×	○	○	○	○	○	×	○	×	○	×	×	×	○	○	×	×	
	<i>Dm</i> Keap1	×	×	×	△	○	○	×	×	×	×	○	○	○	×	×	×	○	×	○	×	×	×	×	△	×	×	

図2-6 Keap1分子中のシステイン残基の保存性

マウスKeap1をベースに保存されたシステイン残基の有無を以下の基準で示した。○: 保存されている、△: 保存されていないが3アミノ酸以内にシステインが存在している、×: 保存されていない。ストレスセンサーとしてよく研究されている3つのシステインを赤で、マウスKelchファミリータンパク質間で保存されているシステイン残基をオレンジ色で影をつけた。

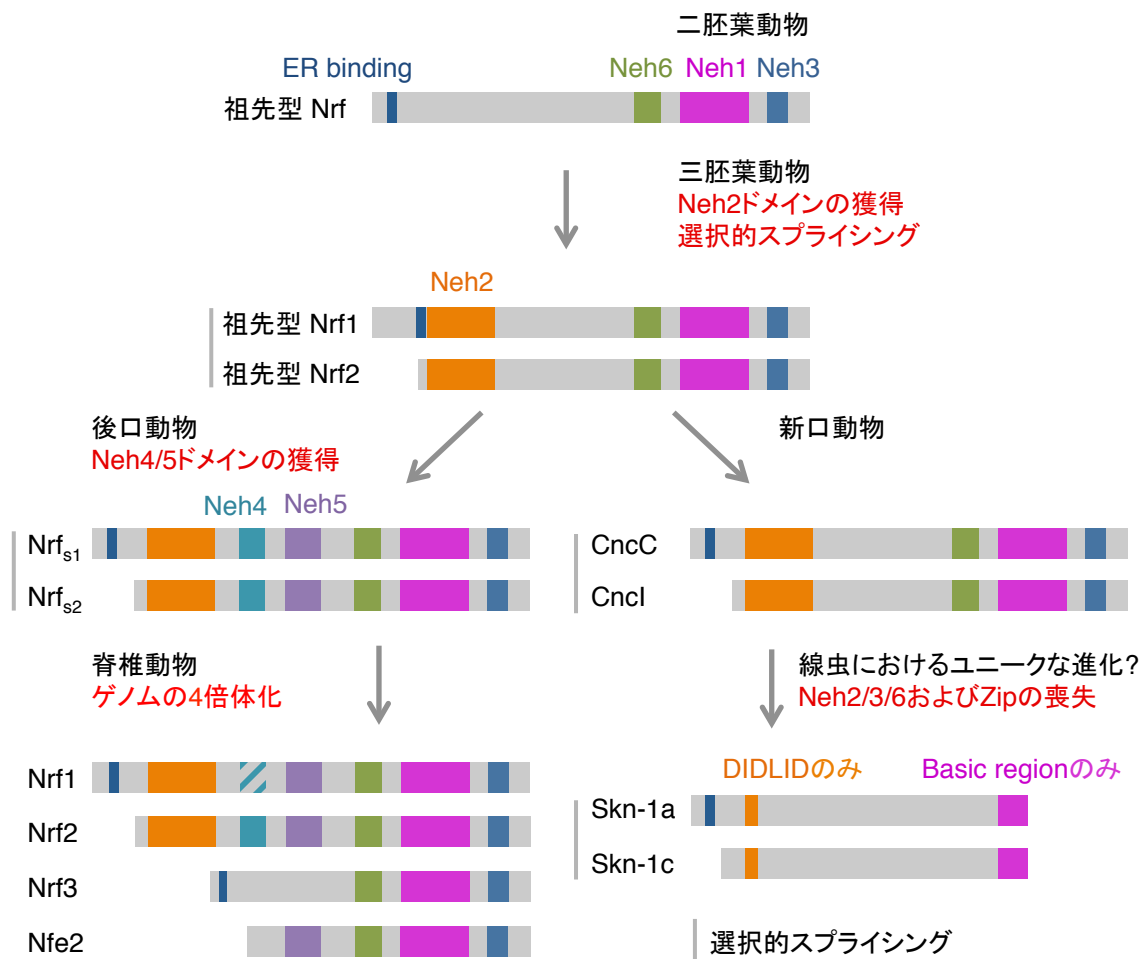


図2-7 アミノ酸配列から推定したNrf/Cnc転写因子の進化

灰色の線および下付き文字 (s1およびs2) は、選択的スプライシングにより生じる遺伝子産物を示す。

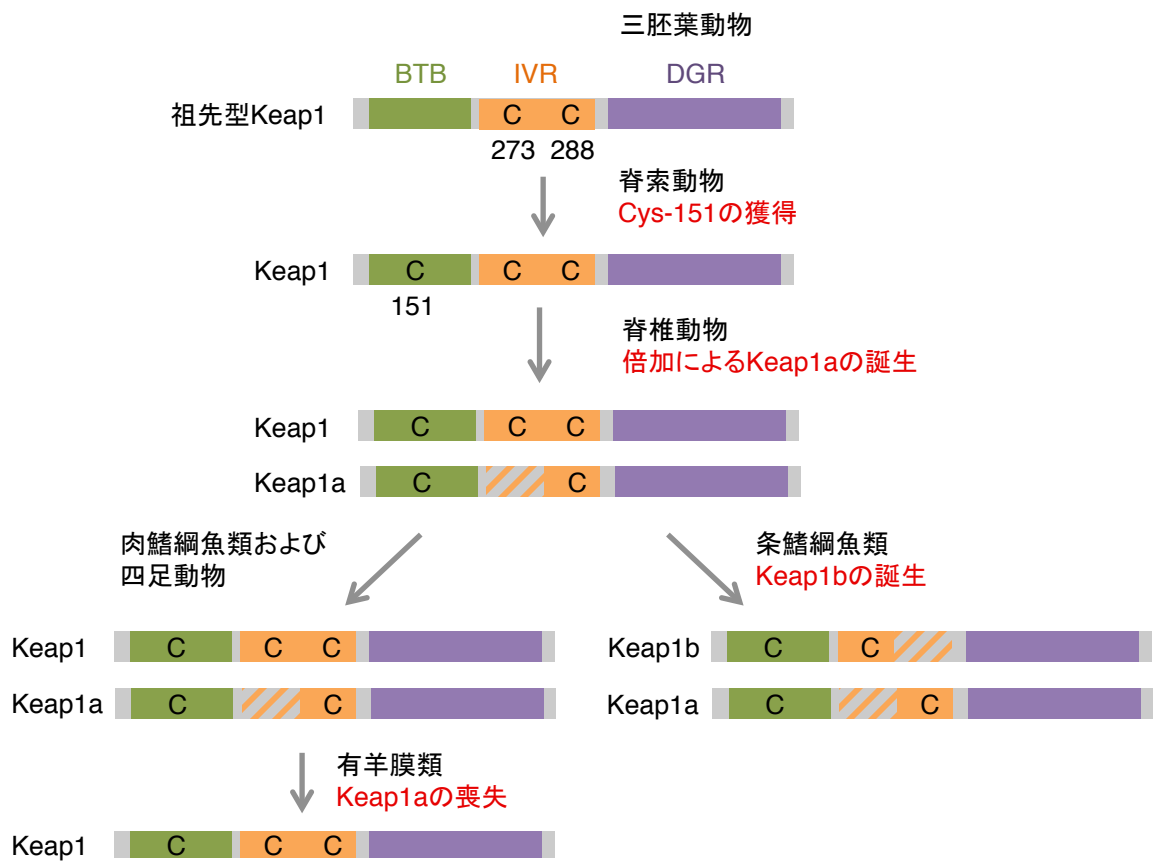


図2-8 アミノ酸配列から推定したKeap1の進化

表 3-1 プラスミド構築に用いたプライマー（合成オリゴヌクレオチド）

プラスミド	プライマー配列
pKSbach1a	5'-GGGGATCCACACTGCGAAACTTCACTTCAC
	5'-GGCTCGAGTGCTTCGTTTCATTGCTGCTATC
pCS2bach1aMeGFP (annealing oligo)	5'-GATCAGCTAAAGCCCTGCGTCATGTCTGTGGATGGCCCCCG
	5'-CATGCGGGGGCCATCCACAGACATGACGCAGGGCTTTAGCT
pCS2bach1bMeGFP	5'-GGGGATCCGTATCAAATCCAACCTTATTAC
	5'-GGGGATCCACGCGTTTAAATGACTTTGAGCTTCC

表 3-2 モルフォリノオリゴヌクレオチドの配列

モルフォリノ名	配列
<i>bach1a</i> MO	5'-CATCCACAGACATGACGCAGGGCTT
<i>bach1b</i> MO	5'-AGCTTCCACCGACATCTTGAGTTA

表 3-3 RT-PCR 解析に用いたプライマー

遺伝子	プライマー配列
<i>bach1a</i>	5' -AAGTCCAGAGGAAATGCTGC
	5' -CAGACAGTTGAGACCGGAG
<i>bach1b</i>	5'-AAGTCCAGAGGAAATGCTGC
	5'-CAGACAGTTGAGACCGGAG
<i>ef1a</i>	5' -GCCCCTGCCAATGTA
	5' -GGGCTTGCCAGGGAC

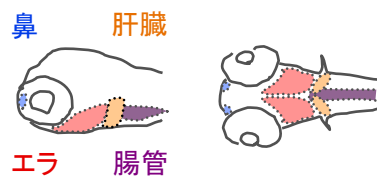
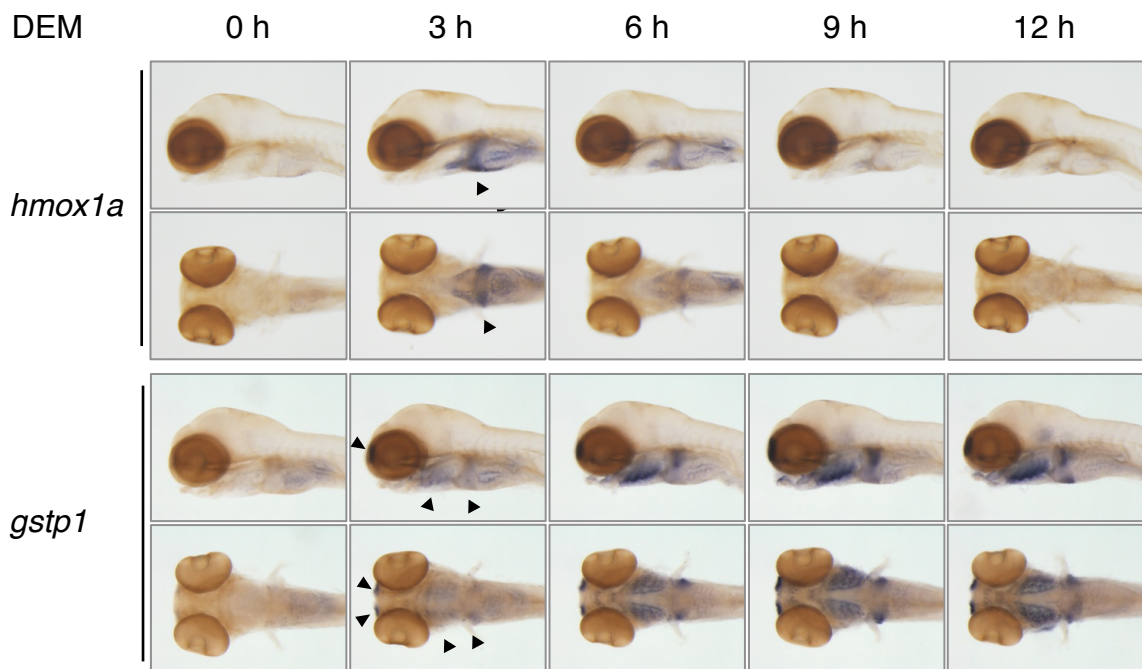


図3-1 *hmox1a*の肝臓特異的な誘導

受精後5日目のゼブラフィッシュ胚を100 μ MのDEMで表記の時間処理した後、*hmox1a*および*gstp1*の発現プロファイルをWISH解析によって調べた。上側に側面像を、下側に腹側像をそれぞれ示した。*hmox1a*の誘導は肝臓特異的であり、*gstp1*の誘導と比較して一過性であった。矢頭は、鼻、エラおよび肝臓における誘導がみられたことを示す。

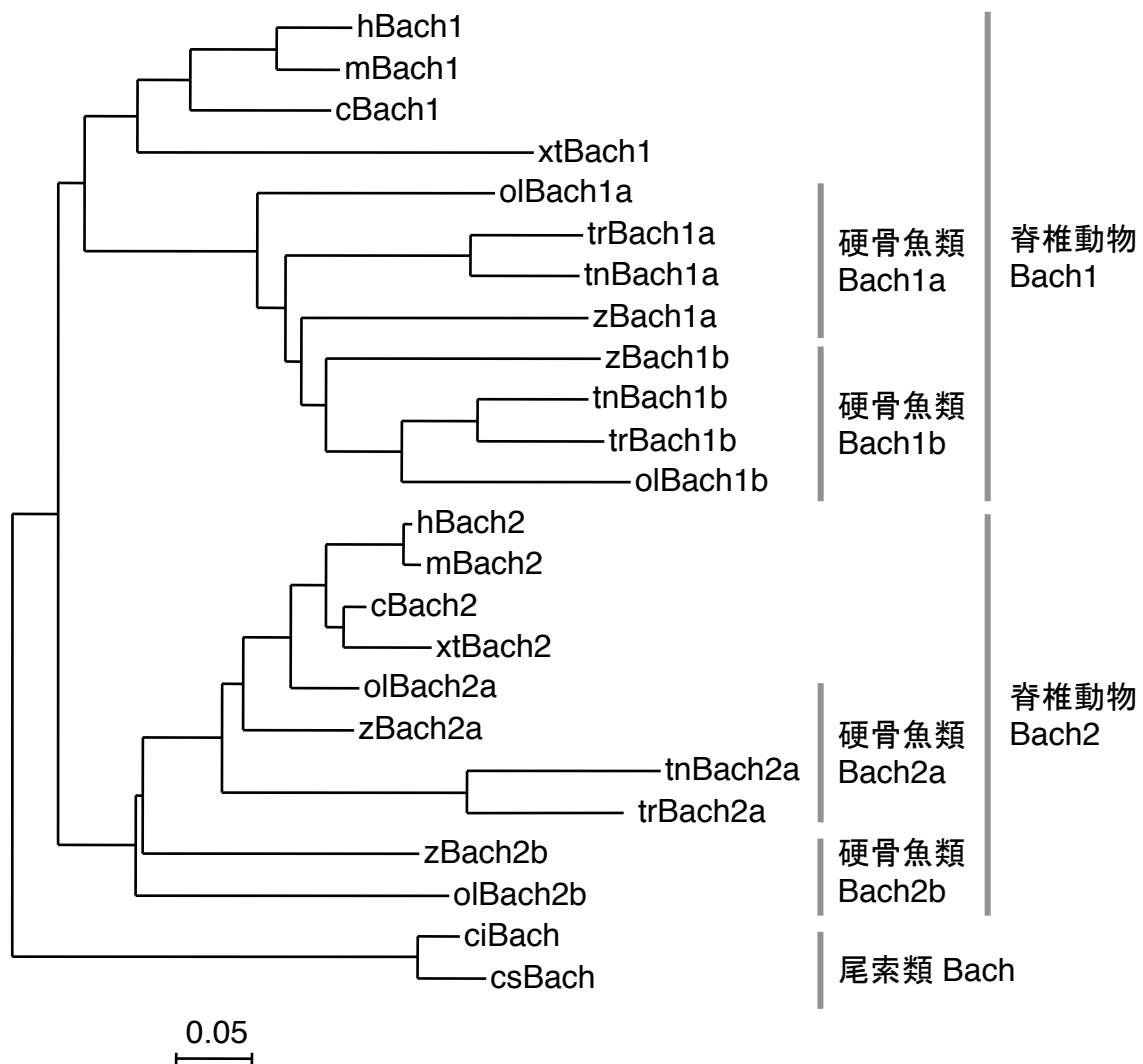


図3-2 Bachファミリータンパク質の系統樹

各タンパク質のCNCドメインのアミノ酸配列を元に系統樹を作成した。ClustalWおよびNJ plot (version 2.2) のプログラム上で、近隣結合法を用いて作成した。スケールバーは、遺伝的距離を示す。動物種の略号は以下の通りである。c: ニワトリ、ci: カタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*)、cs: ユウレイボヤ (*Ciona savignyi*)、h: ヒト、m: マウス、ol: メダカ、tn: ミドリフグ、tr: トラフグ、xt: ゼノパス、z: ゼブラフィッシュ。

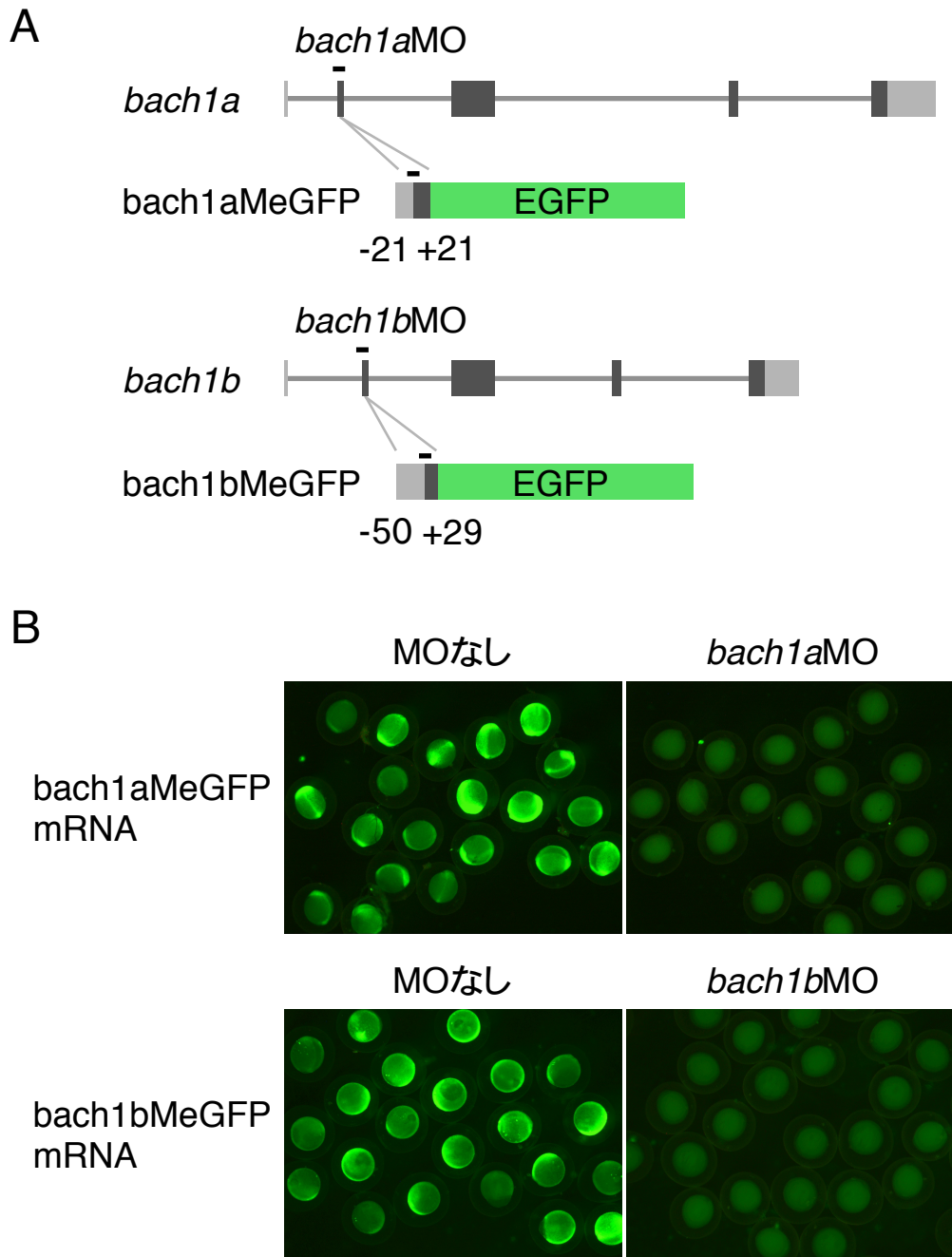


図3-3 *bach1a*MOおよび*bach1b*MOによる特異的な翻訳抑制

A: *bach1a*MOおよび*bach1b*MOの標的配列を持つGFPレポーター構築を図解した。*bach1a*MOおよび*bach1b*MOは、*bach1a*および*bach1b*のmRNAの翻訳を抑制するようにデザインされている。図中上側には、各遺伝子を図示してあり、四角はエクソンを、線はイントロンを示す。濃い灰色の部分には、*bach1a*および*bach1b*遺伝子のORFを示す。MOの標的配列を含んだ配列をeGFPの上流にクロニングしたものを、*bach1a*MeGFPおよび*bach1b*MeGFPと名付けた。

B: *bach1a*MeGFPまたは*bach1b*MeGFPのmRNA (150 pg) を、それぞれ*bach1a*MOおよび*bach1b*MO (1 pmole) と同時に、1細胞期胚に注入した。10時間後、GFPの蛍光によってmRNAの翻訳を評価した。

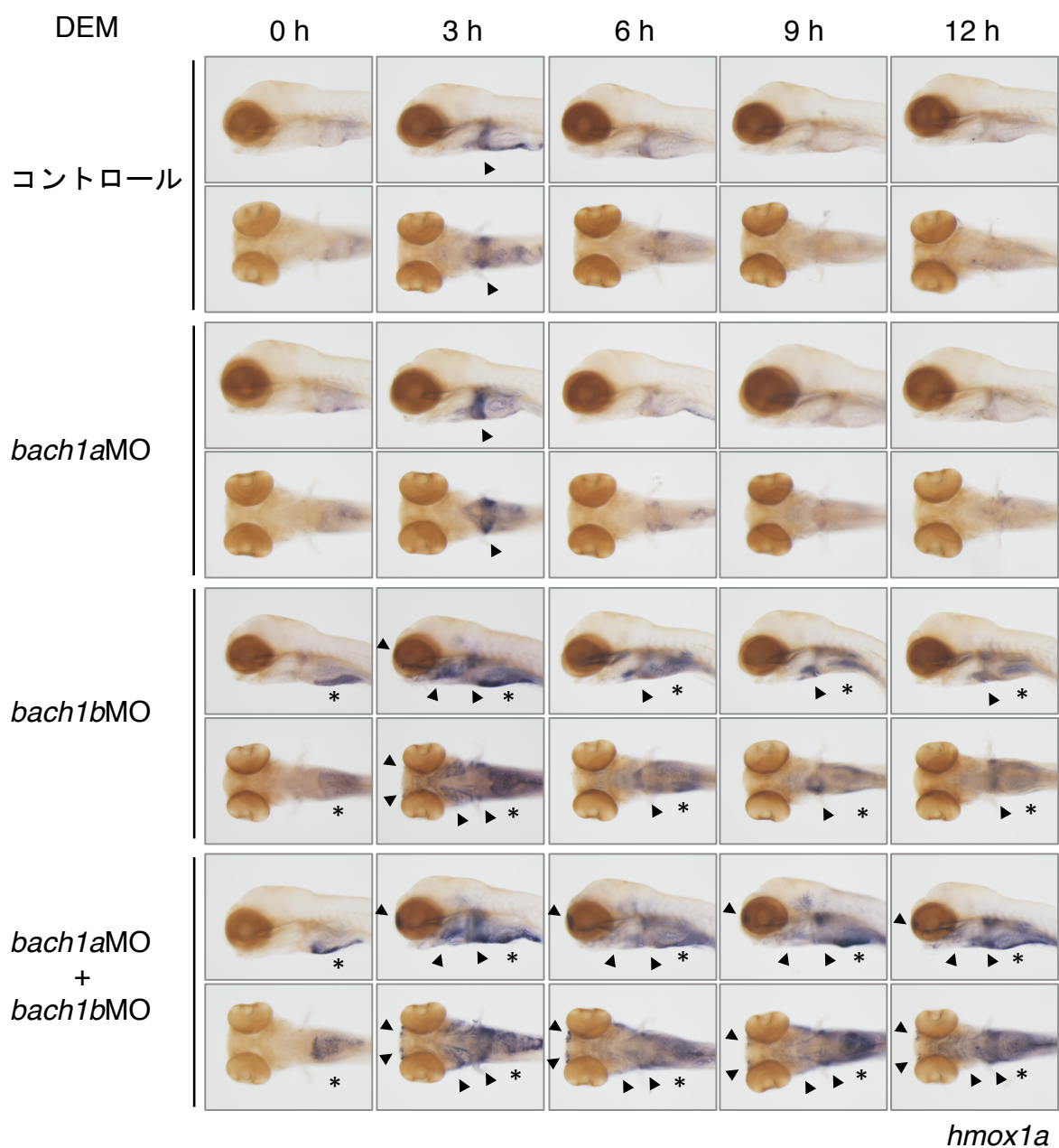
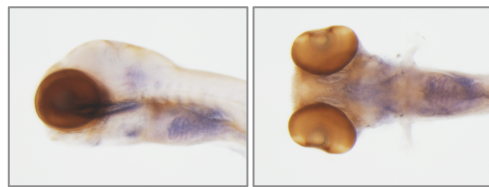
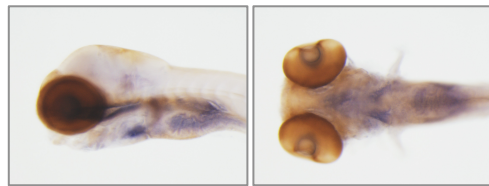


図3-4 Bach1ノックダウン胚における異所性かつ延長した*hmx1a*の誘導

*bach1a*MOおよび*bach1b*MOのどちらかまたは両方（それぞれ1 pmole）を注入した受精後5日目胚を、100 μMのDEMで表記の時間処理した後、*hmx1a*の発現プロファイルを調べた。*bach1b*MO注入胚および*bach1a*MO+*bach1b*MOの両方を注入した胚では、鼻やエラで異所性の誘導がみられた。また、これらの条件では、*hmx1a*の誘導が延長する傾向にあった。矢頭は、鼻、エラおよび肝臓における誘導がみられたことを示す。*印は、腸管における基底レベルの発現を示す。



bach1a



bach1b

図3-5 ゼブラフィッシュBach1遺伝子の発現プロファイル

受精後5日目胚における*bach1a*および*bach1b*の発現プロファイルをWISH解析により調べた。両オルソログとも全身で発現していた。

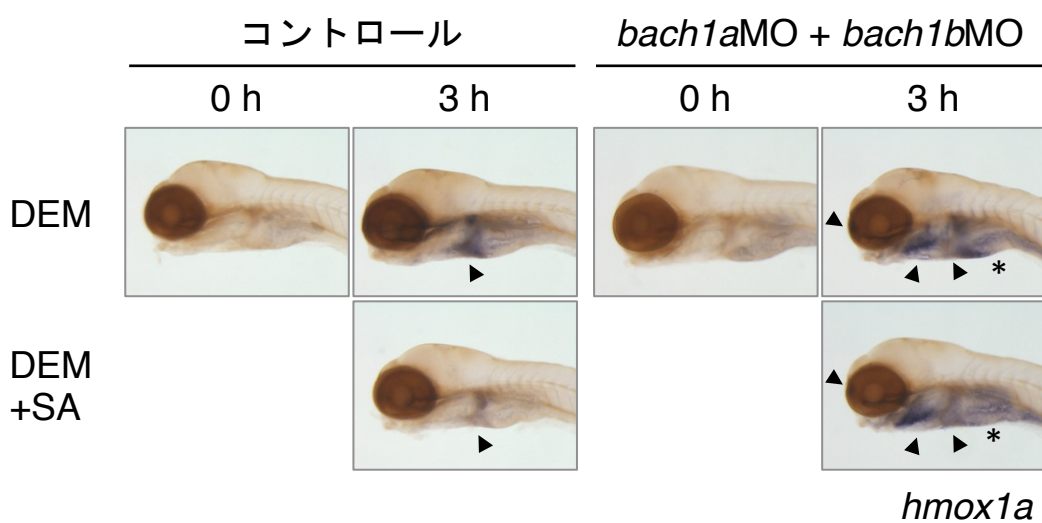


図3-6 内因性ヘムレベルの減少が*hmox1a*の誘導プロファイルに与える影響

受精後5日目のゼブラフィッシュ胚を100 μ MのDEMおよび0.5 mMのsuccinylacetone (SA)で3時間処理した後、*hmox1a*の誘導をWISH法で調べた。SAで同時に処理した場合には、DEMによる肝臓での*hmox1a*の誘導が减弱した。*bach1a*MOおよび*bach1b*MO注入胚では、この誘導减弱効果はみられなかった。矢頭は、鼻、エラおよび肝臓における誘導がみられたことを示す。*印は、腸管における基底レベルの発現を示す。

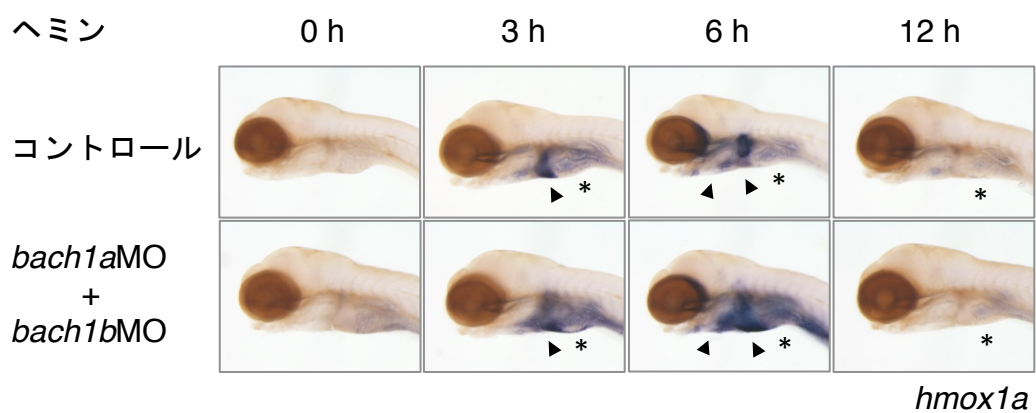


図3-7 ヘミン処理による*hmx1a*誘導プロファイル

受精後5日目のゼブラフィッシュ胚を100 μ Mのヘミンで表記の時間処理した後、*hmx1a*の誘導をWISH法で調べた。*hmx1a*は、肝臓だけでなく鼻やエラでも誘導された。矢頭は、鼻、エラおよび肝臓における誘導がみられたことを示す。*印は、腸管における基底レベルの発現を示す。

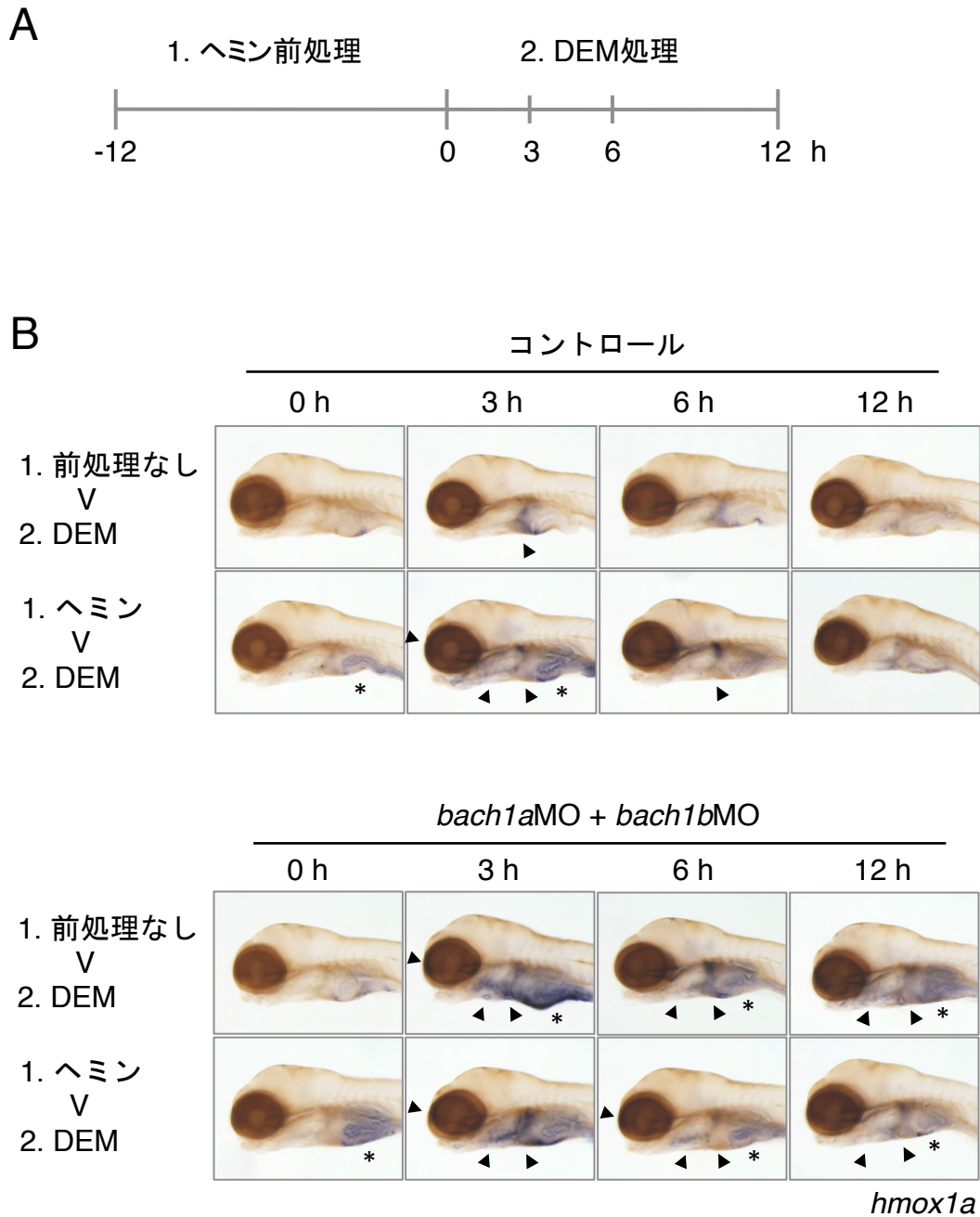
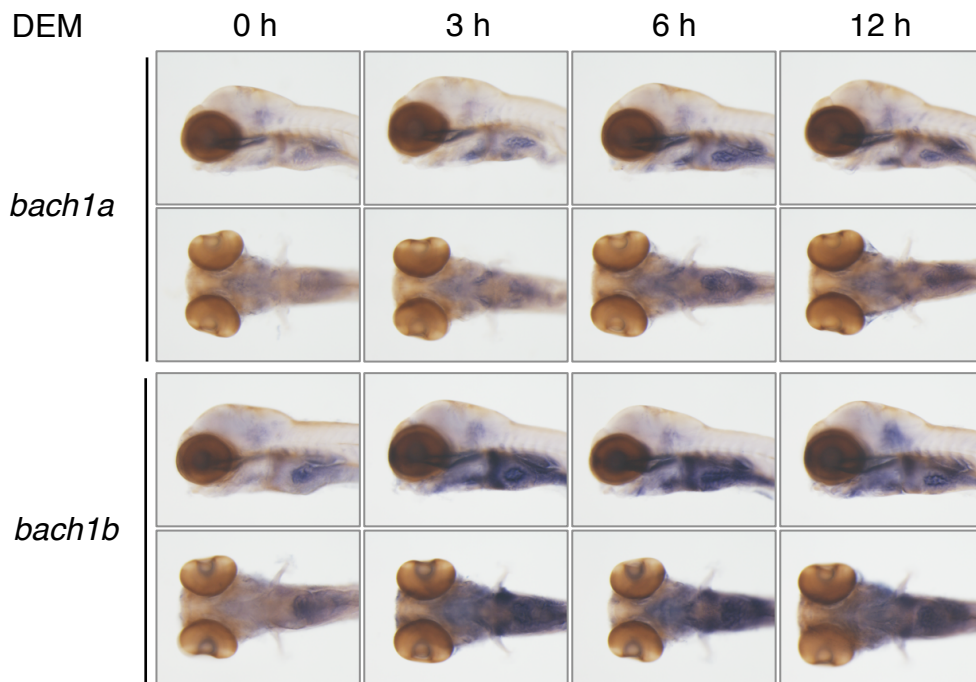


図3-8 ヘムレベルの増加が*hmox1a*誘導プロファイルに与える影響

A: 実験プロトコルを図解した。受精後4.5日目の胚を12時間ヘミンで前処理し、その後100 μ MのDEMで表記の時間処理し、*hmox1a*の誘導をWISH法で調べた。

B: *hmox1a*の誘導プロファイル。コントロール群、*bach1a*MOおよび*bach1b*MO注入群の両方で、肝臓以外での異所性の誘導および誘導の延長がみられた。矢頭は、鼻、エラおよび肝臓における誘導がみられたことを示す。*印は、腸管における基底レベルの発現を示す。

A



B

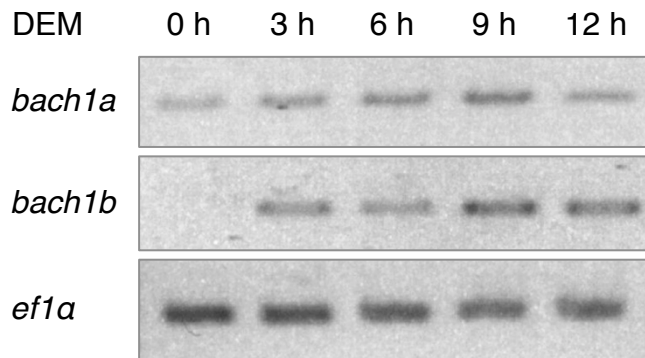


図3-9 DEM処理胚における*bach1a*および*bach1b*の誘導

A: 受精後5日目のゼブラフィッシュ胚を100 μMのDEMで表記の時間処理した後、*bach1a*および*bach1b*の発現プロファイルをWISH法で調べた。

B: Aと同様に薬剤処理を施した胚について、*bach1a*および*bach1b*の発現量RT-PCRで調べた。cDNA量は、*ef1a*の発現量をもとにそろえた。

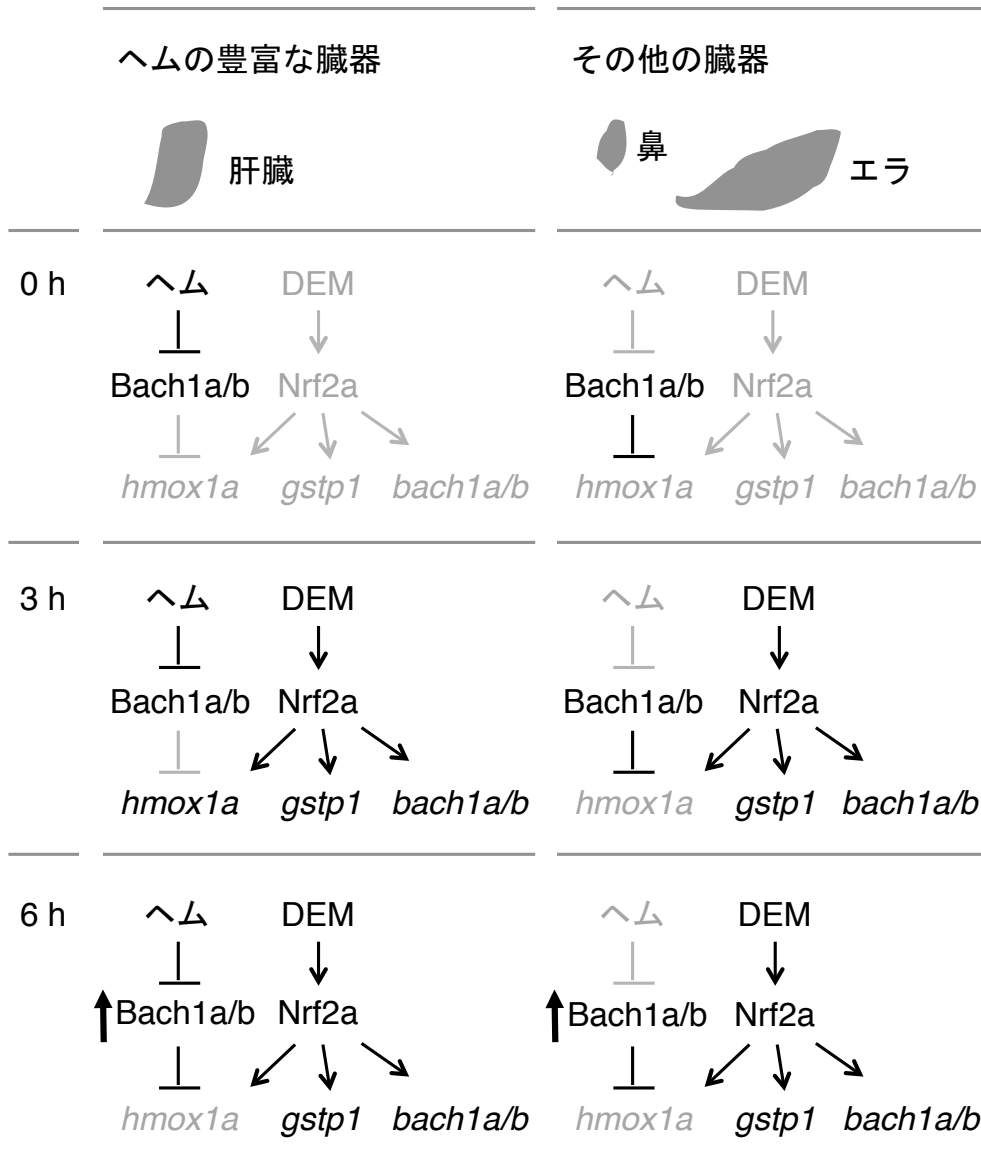


図3-10 肝臓特異的および一過性の*hmx1a*誘導のメカニズム

ヘムの豊富な肝臓では、ヘムがBach1a/bによる転写抑制を解除しているため、*hmx1a*が誘導されるが、ヘム量の比較的小さいその他の臓器では、Bach1a/bによる抑制のため誘導が起きない。また肝臓においても、Nrf2a活性化による転写誘導により、ヘムフリーのBach1a/bが増加し、*hmx1a*の誘導は一過性に終わる。*gstp1*など他のNrf2a標的遺伝子は、この制御を受けない。

表 4-1 リアルタイム定量 PCR に用いたプライマー

遺伝子	プライマー配列
<i>gstp1</i>	5'-CAACGCCATGCTGAGACATC
	5'-GAAGATCTTCAACGCCGTCG
<i>gclc</i>	5'-GGCCACTTTCTGTCCCATAG
	5'-CCACAGATGCAGAGATAACACC
<i>abcc1</i>	5'-AGATCATGCACGCACTGAATG
	5'-TGGTCAGACAAGCAGGCAAG
<i>abcc2</i>	5'-AGTTCGCACAGCTATCATGGC
	5'-ACATCAGGTTTACAATCTCTCC
<i>aqp9a</i>	5'-GATGGTGATTCTGGGGAAGC
	5'-GTGAACTCCATGAAGGCGTC
<i>aqp9b</i>	5'-ATCATATCCACGTGAAGGACTC
	5'-TCCTTTAGGTGCTCCAATGTTC
<i>nrf2b</i>	5'-CCCTTCATCTGTGAACTCTC
	5'-ACAAGGGATTCTGGGTAACAG
<i>ef1a</i>	5'-CGTGGTAATGTGGCTGGAGA
	5'-CTGAGCGTTGAAGTTGGCAG
<i>hmox1a</i>	5'-ACACCGATATGCACAGAGACTGA
	5'-GCGTGCGCCACCAGA
	5'-AGAGATTGGCAAGAGCAGTCCCGAGC (TaqMan probe)

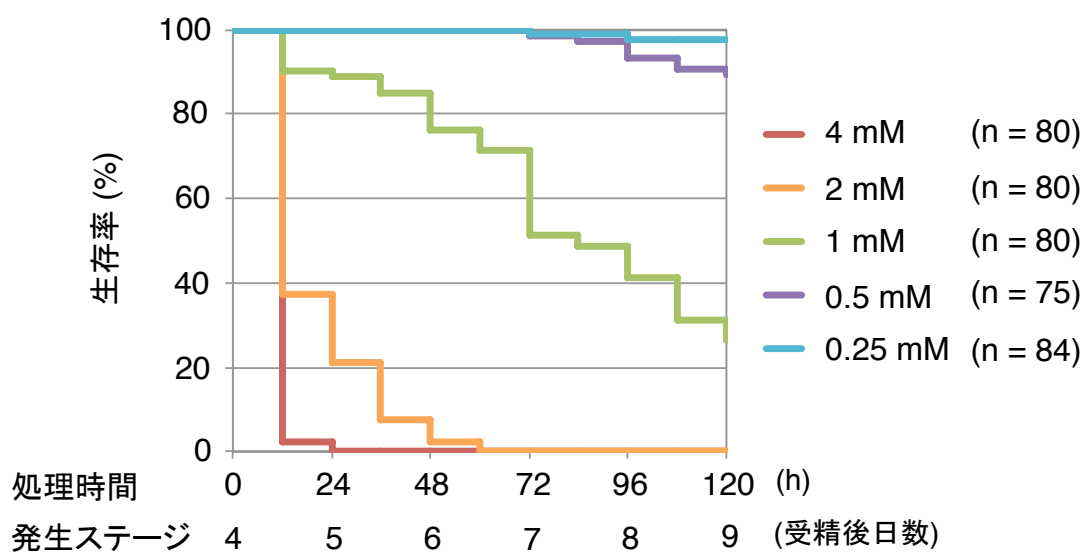


図4-1 亜ヒ酸曝露後の野生型胚の生存率

受精後4日目において、野生型胚を0.25-4 mMの亜ヒ酸ナトリウムで処理し、受精後9日目まで12時間ごとに生存を確認した。データは、2つの独立した実験の結果を合わせたものである。

A

	0 mM	0.125 mM	0.25 mM	0.5 mM	1 mM
24 h	0/60	0/60	0/60	5/60	16/38
48 h	0/60	0/60	0/60	11/60	7/19
72 h	0/60	0/60	0/60	12/60	3/13
96 h	0/60	0/60	1/60	5/48	1/7
120 h	0/60	0/60	0/58	5/44	1/4

B

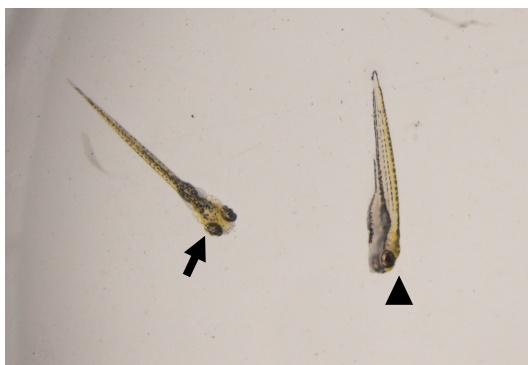


図4-2 ゼブラフィッシュ胚に対する亜ヒ酸ナトリウムの毒性

A: 受精後4日目の野生型胚を表記の亜ヒ酸ナトリウム濃度で各60匹処理し、12時間ごとに生存と行動を観察した。分母に生存数、分子に弱って横たわっていた胚の数を示した。

B: 正常な行動（矢印）および横たわっている（矢頭）胚の例。

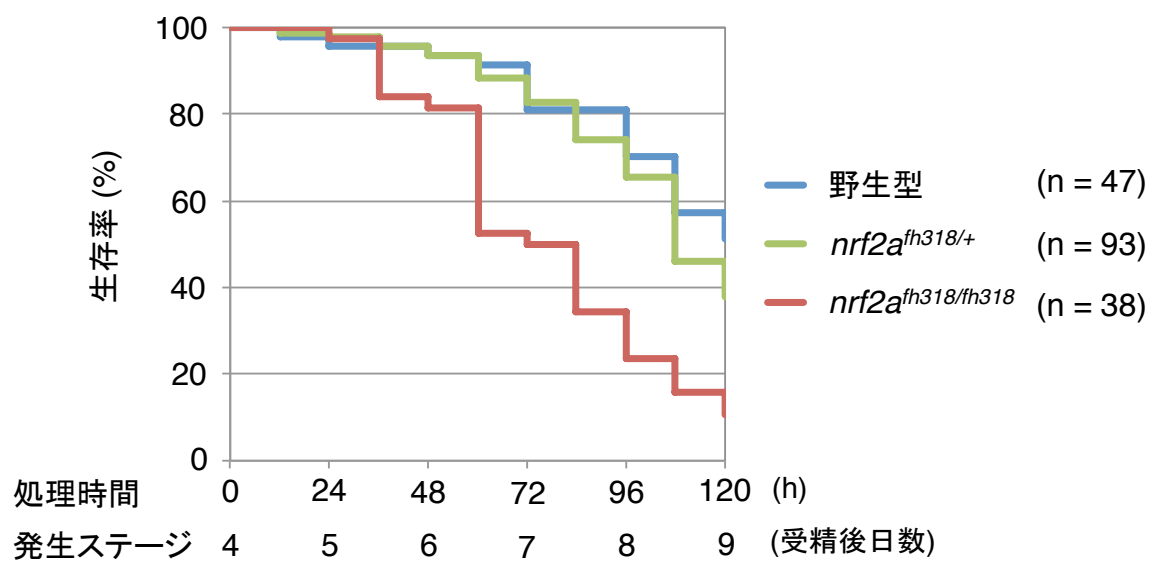


図4-3 亜ヒ酸ナトリウム曝露後の*nrf2a^{fh318}*変異型胚の生存率
 受精後4日目において、*nrf2a^{fh318}*変異型胚を1 mMの亜ヒ酸ナトリウムで処理し、受精後9日目まで12時間ごとに生存を確認した。それぞれの遺伝子型ごとに生存率を示した。データは、3つの独立した実験の結果を合わせて示してある。

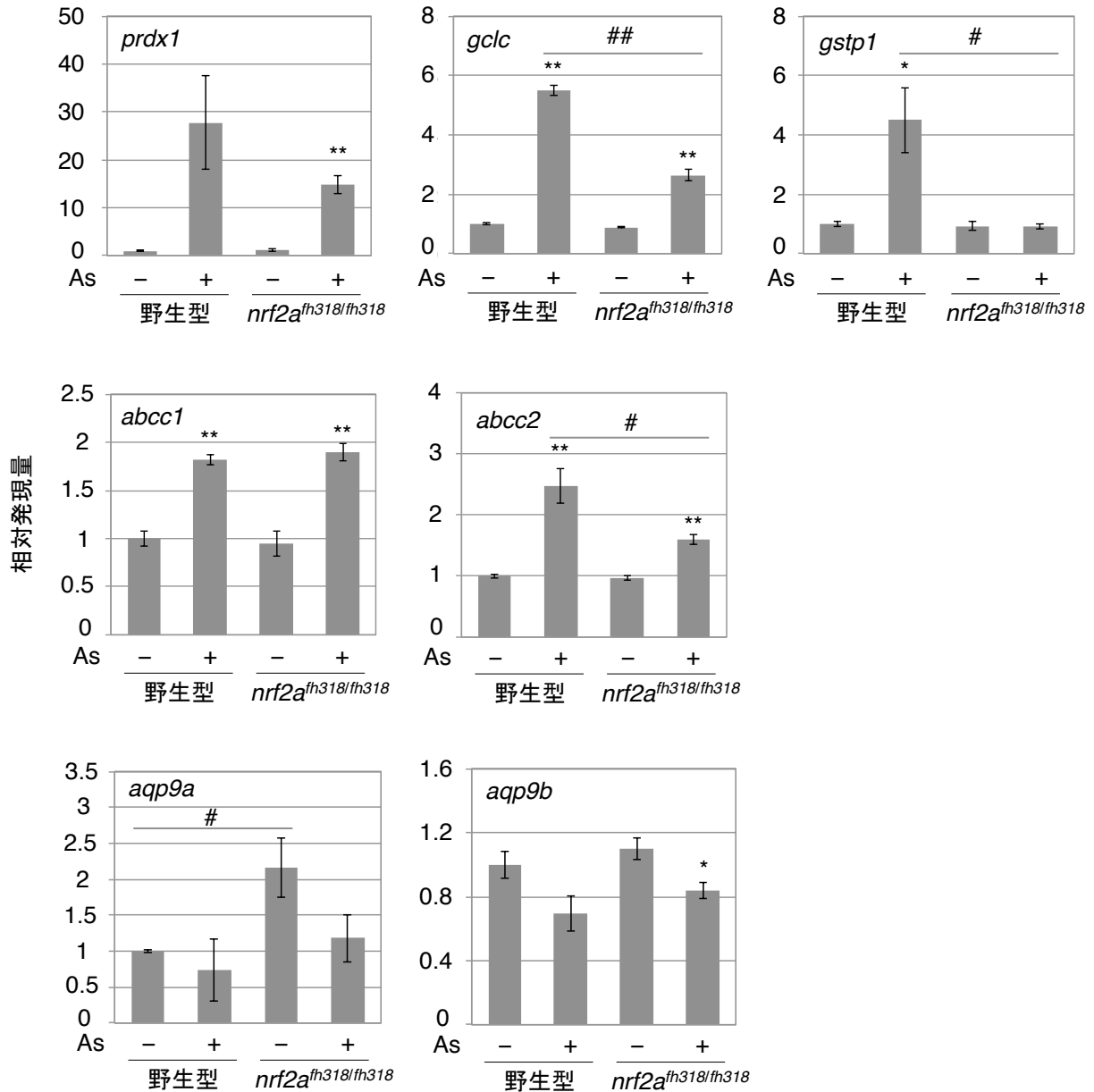


図4-4 亜硝酸ナトリウム曝露後のヒ素抵抗性に関連した遺伝子群の発現

野生型胚 (AB系統) および *nrf2a^{fh318/fh318}* 胚 (受精後4日目) を1 mMの亜硝酸ナトリウム (As) に12時間曝露し、cDNA合成のために20匹を1サンプルとして回収した。各遺伝子の発現量をリアルタイム定量PCRによって調べた。遺伝子発現量は *ef1a* の発現量で補正し、任意の単位で示した。*印およびシャープは統計的有意差を示す。(As+ 対 As-, *: p<0.05, **: p<0.01; 野生型対 *nrf2a^{fh318/fh318}*, #: p<0.05, ##: p<0.01; Studentの*t*検定, 各群n = 3)

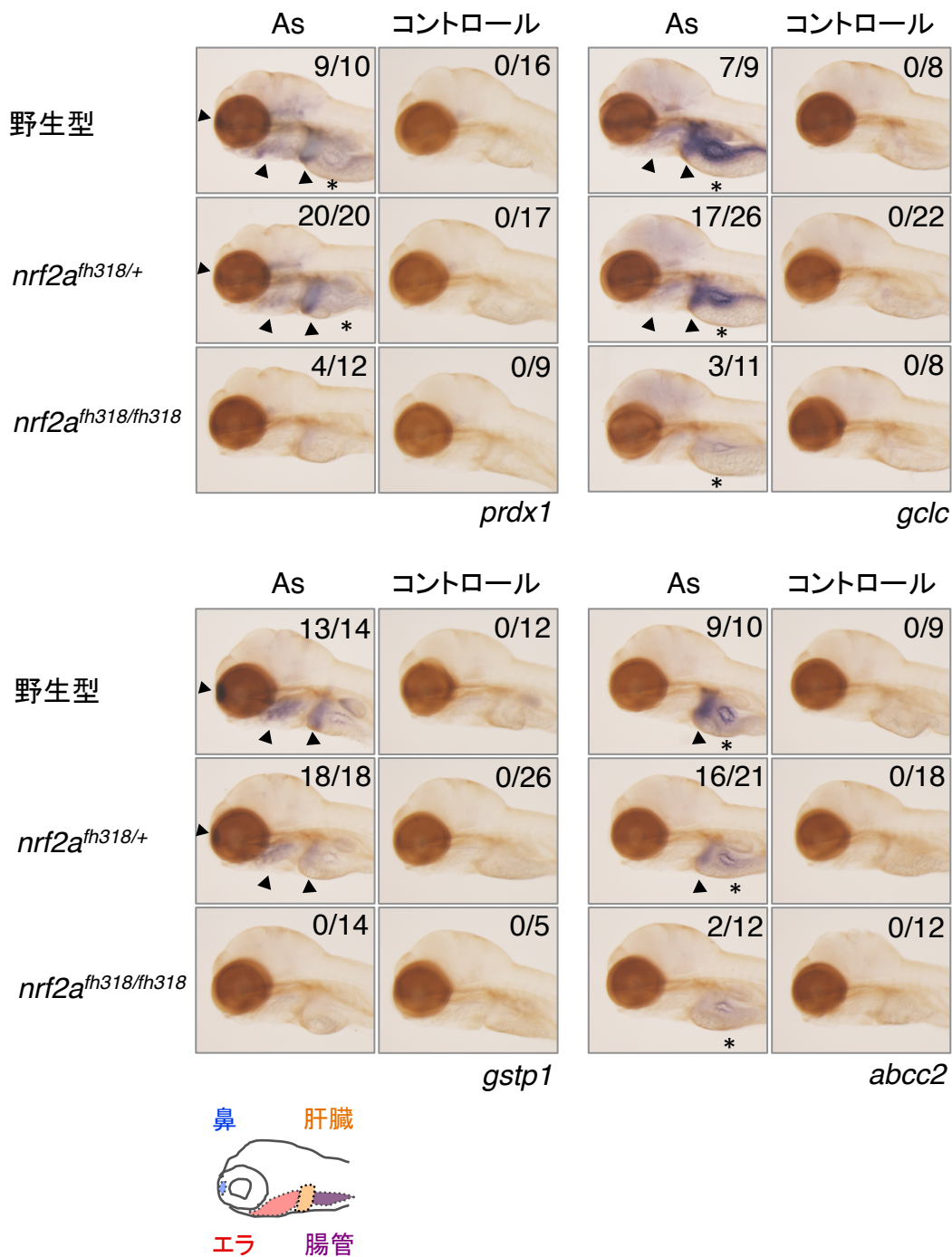


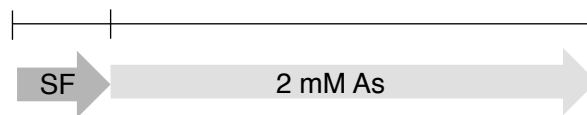
図4-5 ヒ素抵抗性関連遺伝子の誘導プロファイル

nrf2a^{fh318} 胚（受精後4日目）を用いて、1 mM亜ヒ酸ナトリウム（As）12時間曝露後の4遺伝子（*prdx1*、*gclc*、*gstp1*および*abcc2*）の誘導プロファイルをWISH法を用いて調べた。矢頭は、鼻、エラおよび肝臓における誘導がみられたことを示す。*印は、腸管における基底レベルの発現を示す。写真内の数字は、誘導のあった胚の数/調べた胚の数を示す。

A

系統: 野生型 (AB)

処理時間	-12	0	120 (h)
発生ステージ	3.5	4	9 (受精後日数)



B

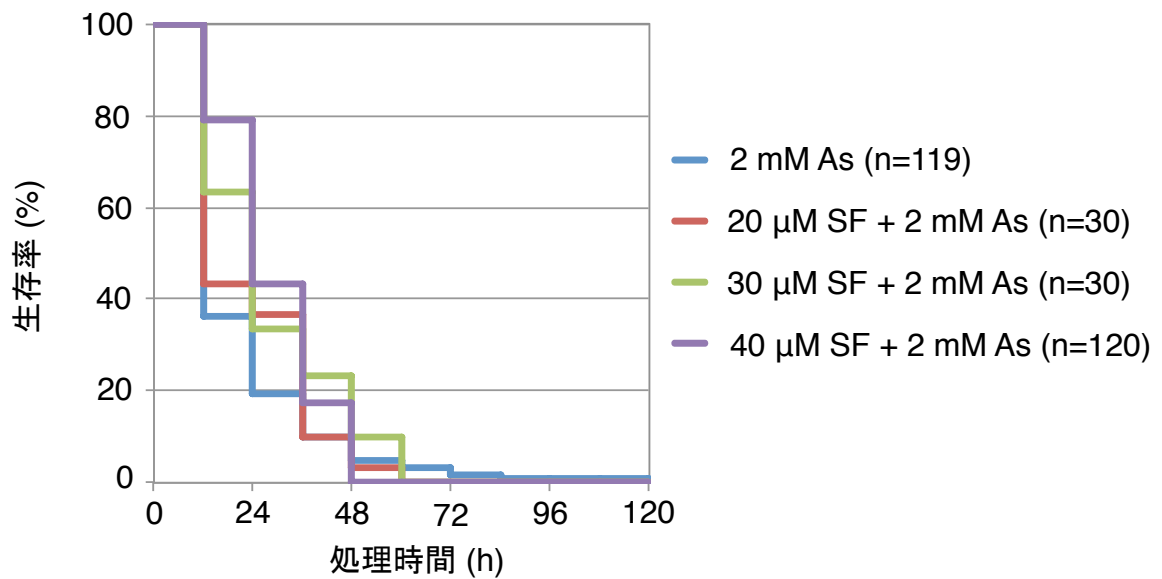


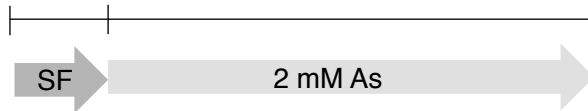
図4-6 2 mM亜ヒ酸ナトリウム曝露に対するサルフォラフェン前処理の効果

受精後4日目の野生型胚を、0-40 μMのサルフォラフェン (SF) で12時間前処理した後に、2 mMの亜ヒ酸ナトリウム (As) に曝露し、12時間ごとに生存を確かめた。各前処理群の生存時間を、前処理なし群と比較したところ、20および30 μM SF前処理では有意差がみとめられなかった ($p > 0.05$, log-rank検定) もの、40 μM SF前処理では有意に生存時間が長かった ($p < 0.001$, log-rank検定)。

A

系統: *nrf2a^{fh318}*

処理時間	-12	0	120 (h)
発生ステージ	3.5	4	9 (受精後日数)



B

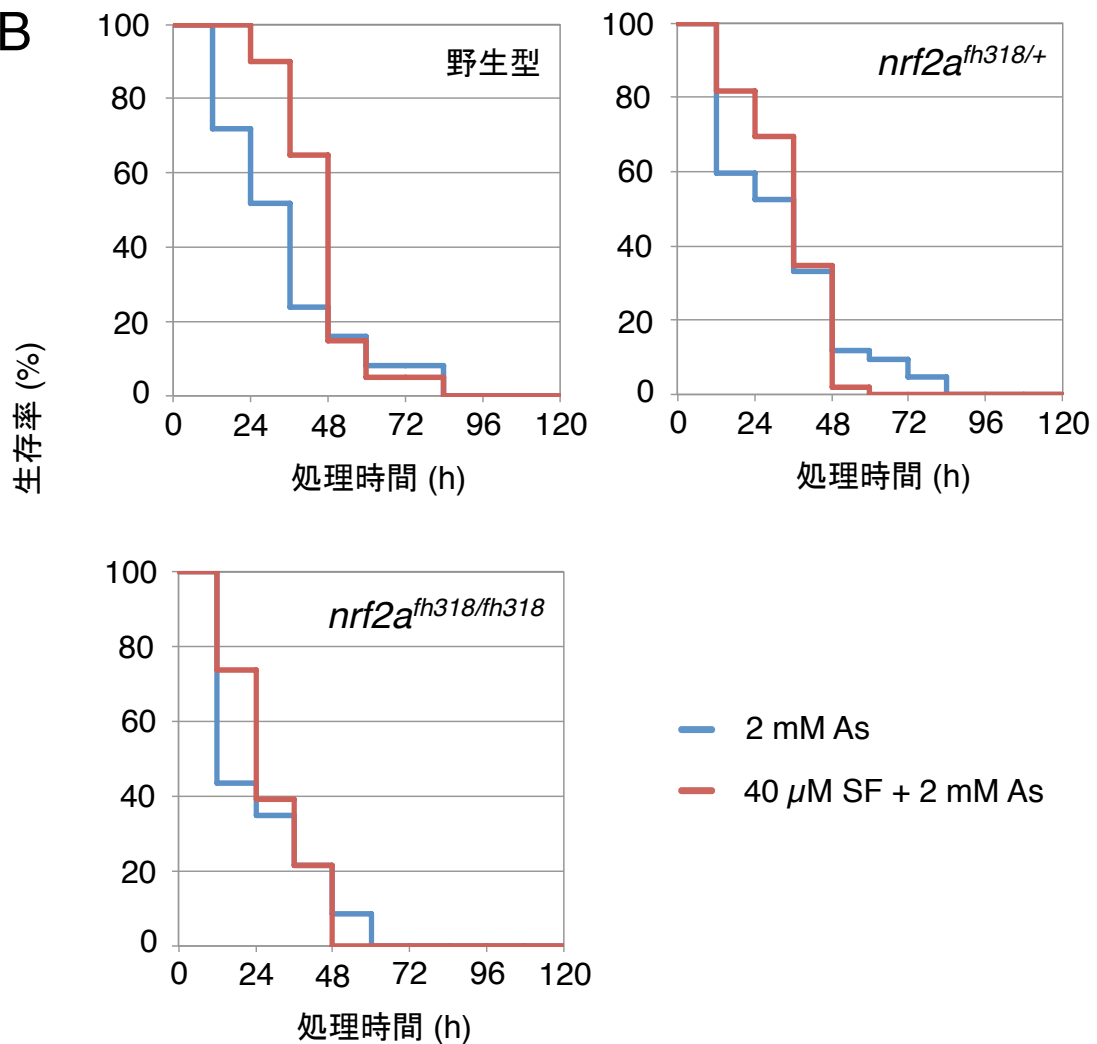


図4-7 *nrf2a^{fh318}*胚におけるサルフォラフェン前処理の効果

A: 実験方法の図解。受精後4日目の*nrf2a^{fh318}*胚を、40 μMのサルフォラフェン (SF) で12時間前処理した後に、2 mMの亜ヒ酸ナトリウム (As) に曝露し、12時間ごとに生存を確認した。
 B: *nrf2a^{fh318}*胚の生存率。野生型 (2 mM As: n = 25, 40 μM SF + 2 mM As: n = 20)、*nrf2a^{fh318/+}* (2 mM As: n = 42, 40 μM SF + 2 mM As: n = 49)、*nrf2a^{fh318/fh318}* (2 mM As: n = 23, 40 μM SF + 2 mM As: n = 23) の結果を分けて示した。データは、2つの独立した実験の結果を合わせたものである。

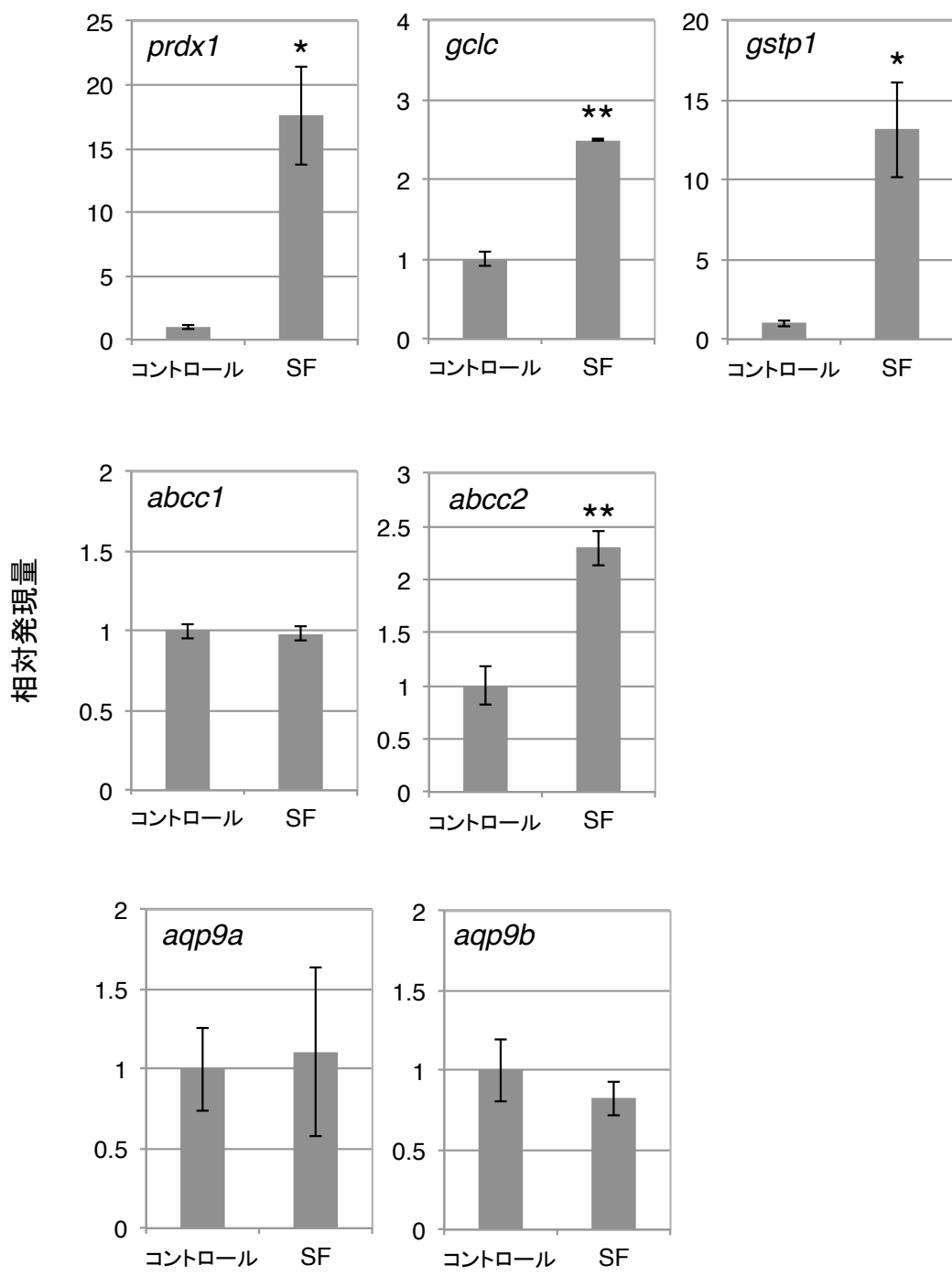


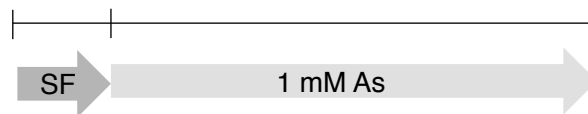
図4-8 サルフォラフェンによるヒ素抵抗性関連遺伝子の誘導

野生型胚（受精後3.5日目）を40 μ Mのサルフォラフェン（SF）に12時間曝露し、cDNA合成のために20匹を1サンプルとして回収した。各遺伝子の発現量をリアルタイム定量PCRによって調べた。遺伝子発現量は*efla*の発現量で補正し、任意の単位で示した。*印は統計的有意差を示す。（*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$; Studentの*t*検定, 各群n = 3）

A

系統: 野生型 (AB)

処理時間	-12	0	120 (h)
発生ステージ	3.5	4	9 (受精後日数)



B

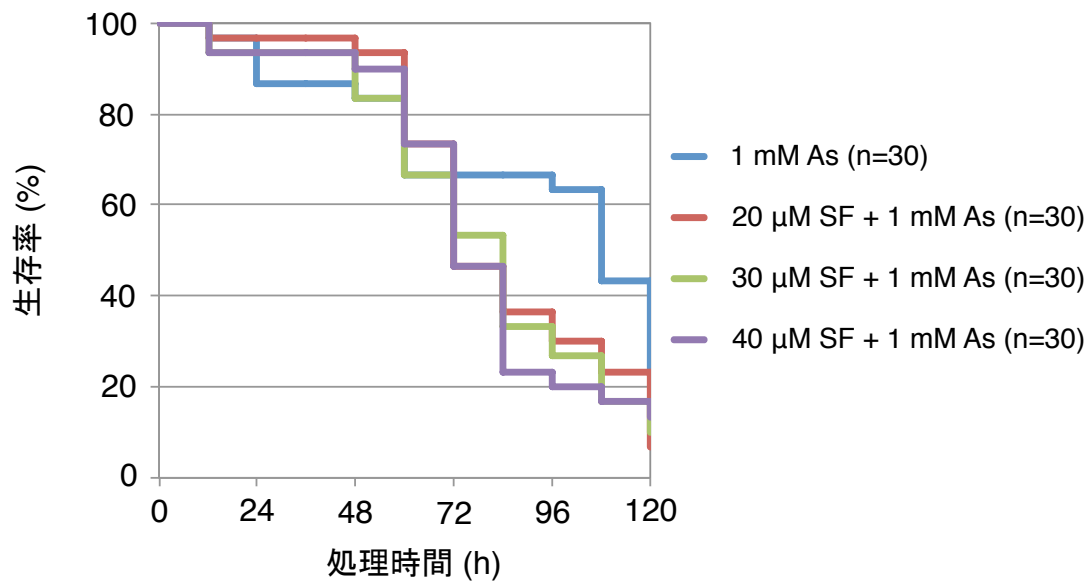
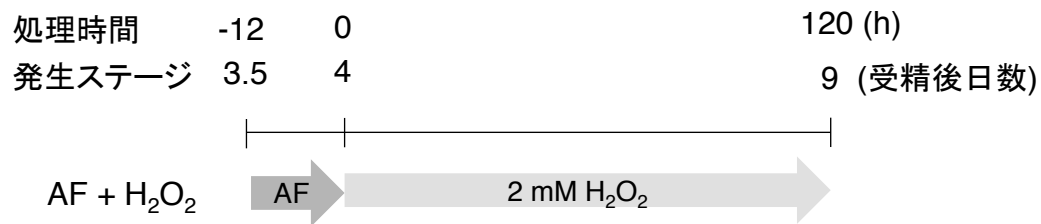


図4-9 1 mM亜ヒ酸ナトリウム曝露に対するサルフォラフェン前処理の効果

受精後4日目の野生型胚を、0-40 μ Mのサルフォラフェン (SF) で12時間前処理した後に、1 mMの亜ヒ酸ナトリウム (As) に曝露し、12時間ごとに生存を確かめた。各前処理群の生存率を、前処理なし群の生存率と比較したところ、30 μ M SF前処理では有意に生存時間が短く ($p < 0.05$, log-rank検定) 20および40 μ M SF前処理群でも統計的有意差はなかったものの生存時間が短い傾向にあった (それぞれ $p = 0.062$ および $p = 0.067$, log-rank検定)。

A

系統: 野生型 (AB)



B

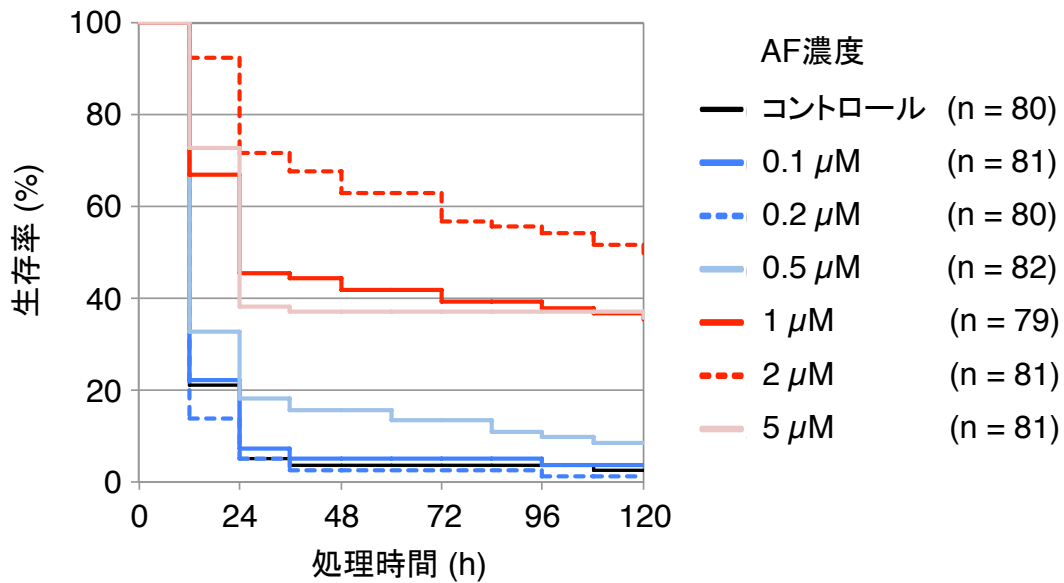


図5-1 過酸化水素曝露後の生存率に対するオーラノフィン前処理の効果

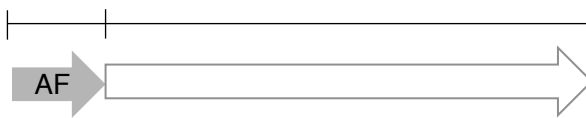
A: 実験方法の図解。受精後3.5日目の野生型胚を、0.1-5 μMのオーラノフィン (AF) で12時間前処理した後に、2 mMの過酸化水素 (H₂O₂) に曝露し、12時間ごとに生存を確かめた。

B: 過酸化水素曝露後の生存率。データは、2つの独立した実験の結果を合わせたものである。

A

系統: 野生型 (AB)

処理時間	-12	0	120 (h)
発生ステージ	3.5	4	9 (受精後日数)



B

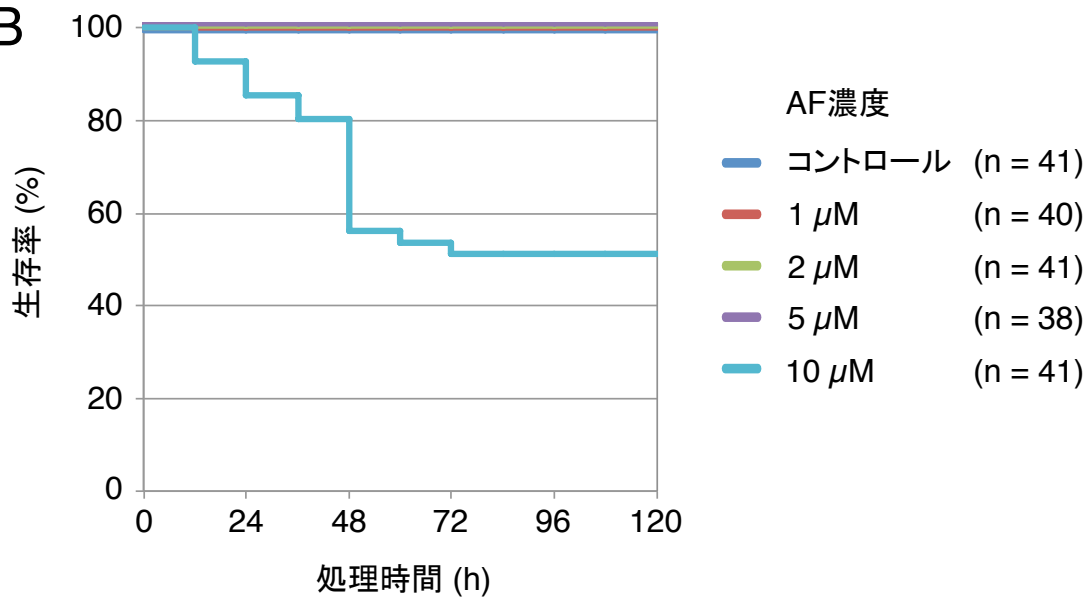


図5-3 オーラノフィンの毒性

A: 実験方法の図解。受精後3.5日目の野生型胚を、1-10 μMのオーラノフィン (AF) で12時間処理した、その後の生存を12時間ごとに確かめた。

B: オーラノフィン処理後の生存率。データは、2つの独立した実験の結果を合わせたものである。

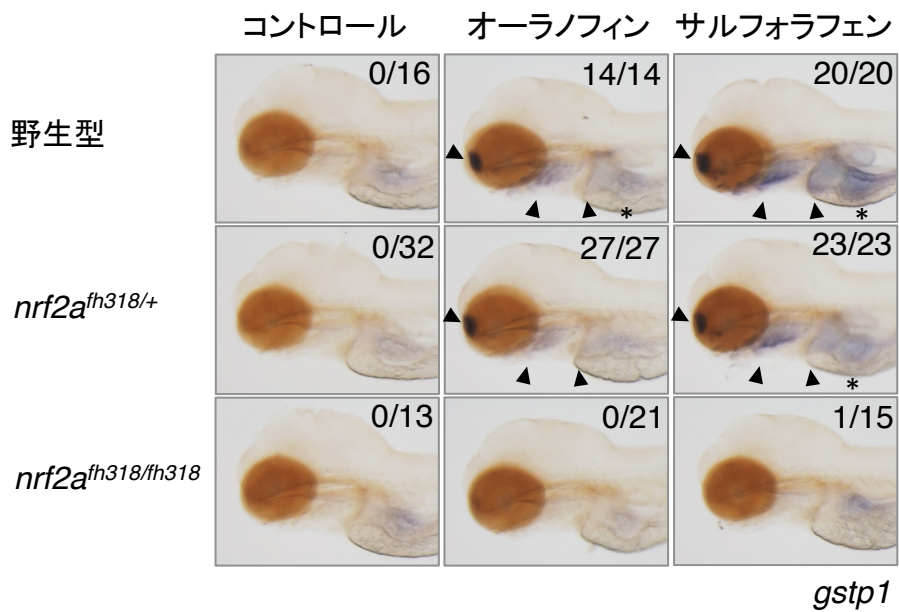
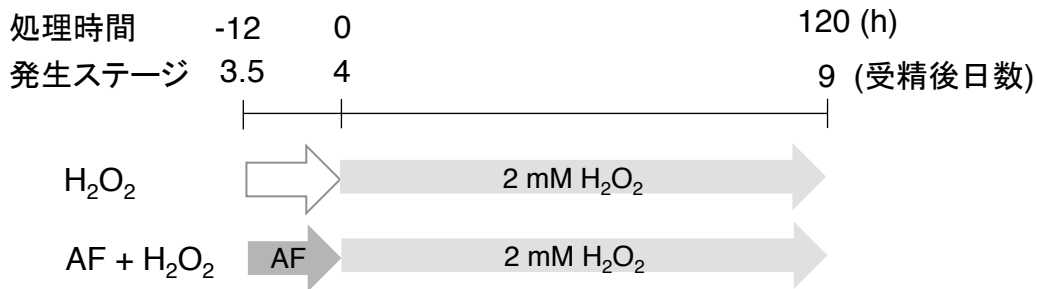


図5-4 オーラノフィンに応答したNrf2標的遺伝子の誘導

*nrf2^{fh318}*胚（受精後3.5日目）を用いて、2 μ Mオーラノフィンおよび40 μ Mサルフォラフェン12時間曝露後の*gstp1*の誘導プロファイルをWISH法を用いて調べた。矢頭は、鼻、エラおよび肝臓における誘導がみられたことを示す。*印は、腸管における基底レベルの発現を示す。写真内の数字は、誘導のあった胚の数/調べた胚の数を示す。

A

系統: *nrf2a^{fh318}*



B

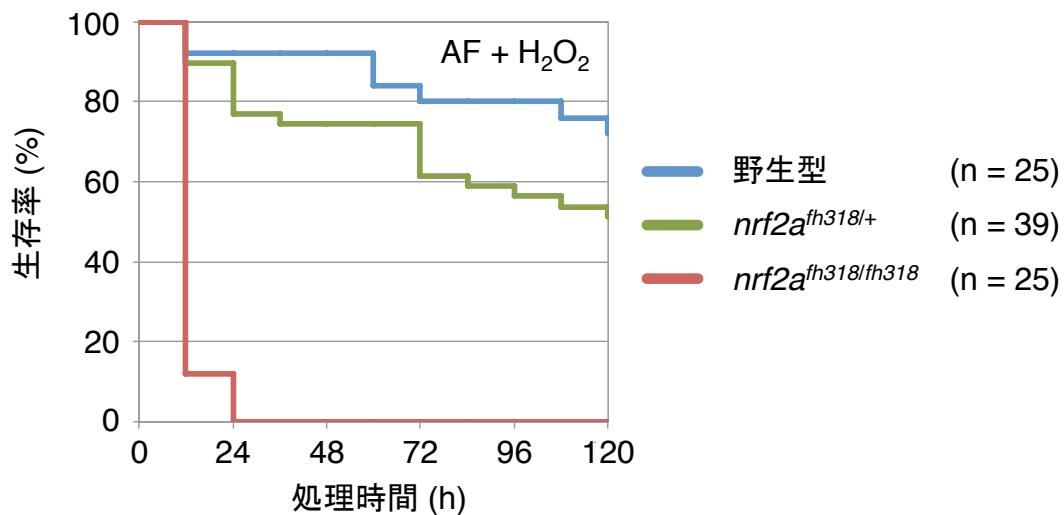
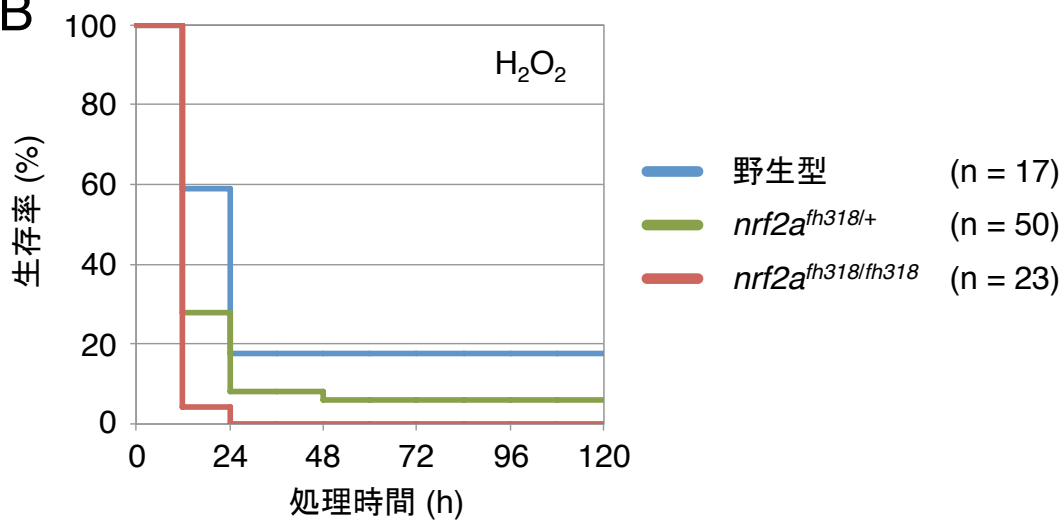


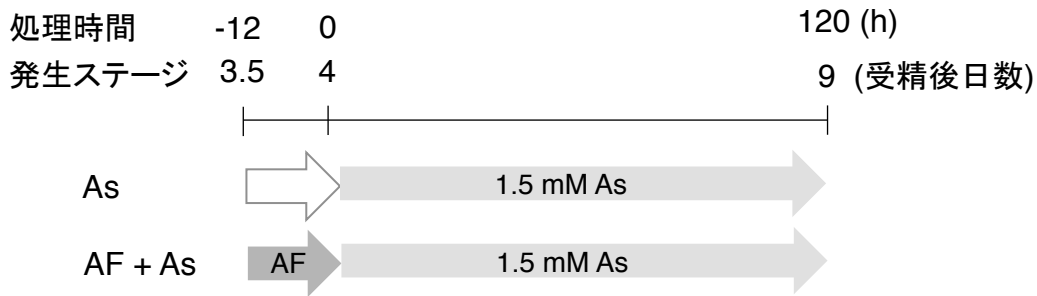
図5-5 オーラノフィンが誘導する過酸化水素に対する抵抗性のNrf2依存性

A: 実験方法の図解。受精後3.5日目の*nrf2a^{fh318}*胚を、2 μMのオーラノフィン (AF) で12時間前処理した後に、2 mMの過酸化水素 (H₂O₂) に曝露し、12時間ごとに生存を確かめた。

B: *nrf2a^{fh318}*胚の生存率。コントロール群 (H₂O₂) およびオーラノフィン前処理群 (AF + H₂O₂) の結果を分けて示した。データは、2つの独立した実験の結果を合わせたものである。

A

系統: *nrf2a^{fh318}*



B

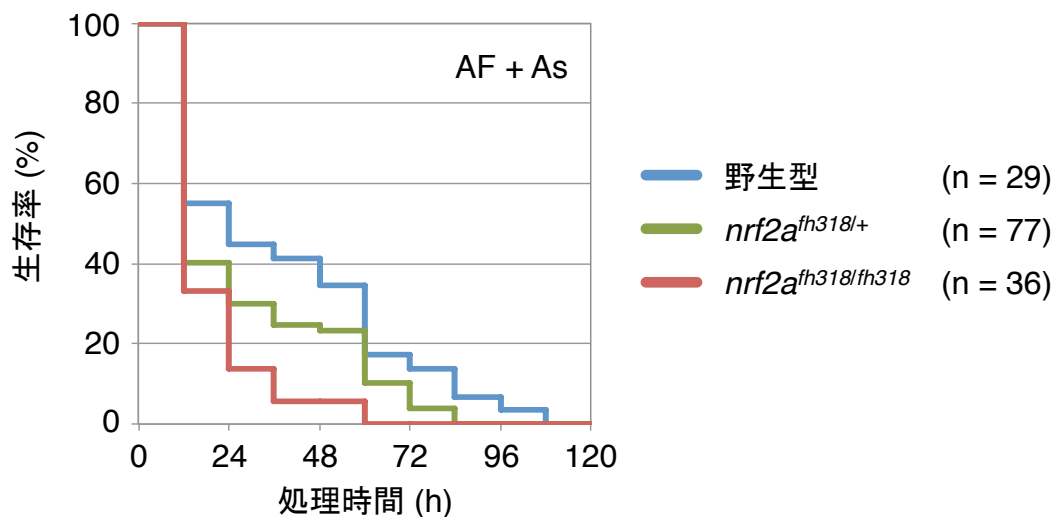
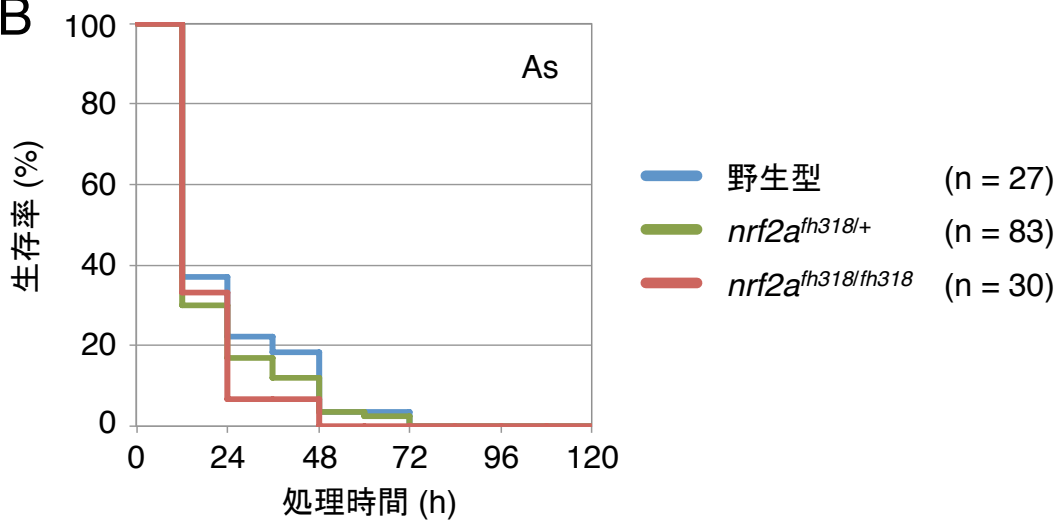


図5-7 オーラノフィンが誘導する亜ヒ酸ナトリウムに対する抵抗性のNrf2依存性

A: 実験方法の図解。受精後3.5日目の*nrf2a^{fh318}*胚を、2 μ Mのオーラノフィン (AF) で12時間前処理した後に、1.5 mMの亜ヒ酸ナトリウムに曝露し、12時間ごとに生存を確かめた。

B: *nrf2a^{fh318}*胚の生存率。コントロール群 (As) およびオーラノフィン前処理群 (AF + As) の結果を分けて示した。データは、3つの独立した実験の結果を合わせたものである。

A 系統: 野生型 (AB)

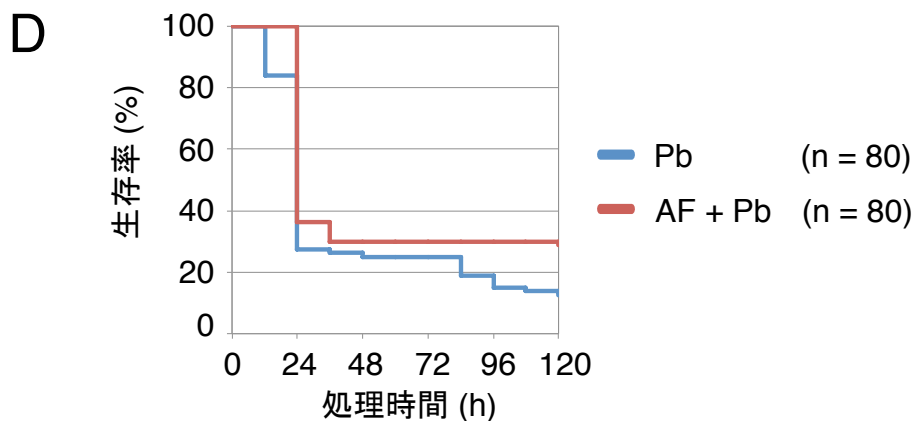
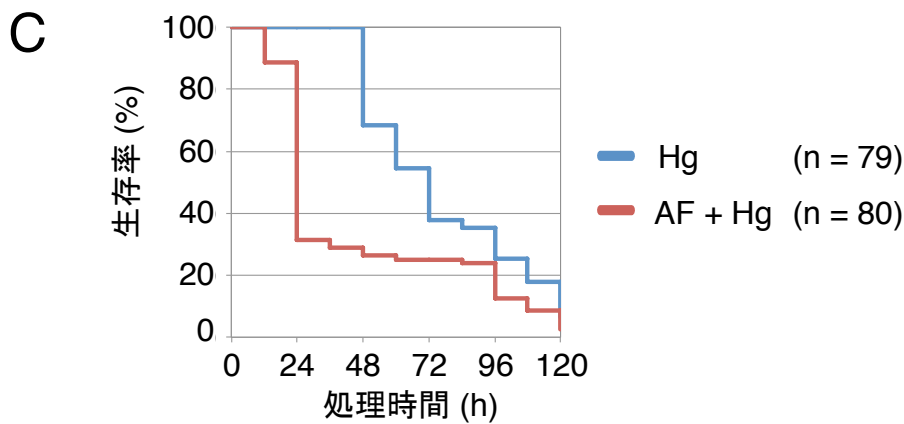
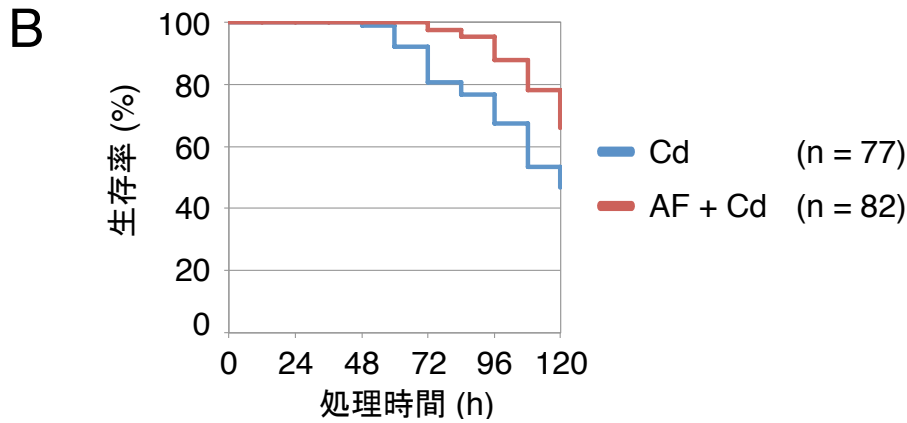
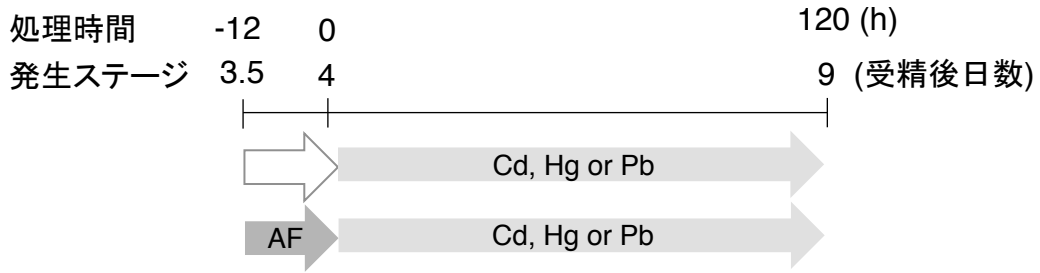
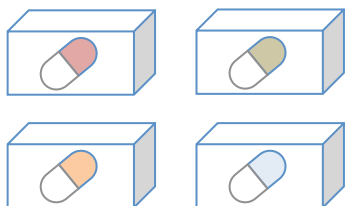


図5-8 種々の重金属曝露後の生存率に対するオーラノフィン前処理の効果

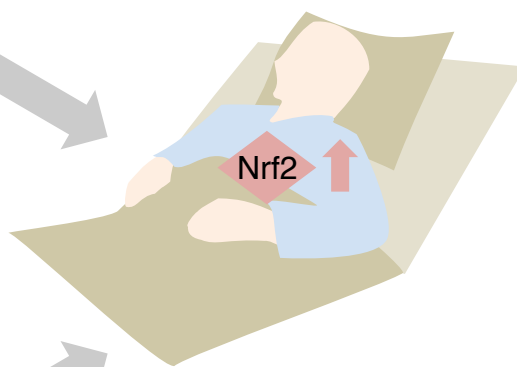
A: 実験方法の図解。受精後3.5日目の野生型胚を、2 μ Mのオーラノフィン (AF) で12時間前処理した後に、2 μ Mの塩化カドミウム (Cd) 1 μ Mの塩化水銀 (Hg) または20 μ Mの塩化鉛 (Pb) に曝露し、12時間ごとに生存を確かめた。

B, C, D: Cd (B) Hg (C) およびPb (D) 曝露後の生存率。データは、それぞれ2つの独立した実験の結果を合わせたものである。

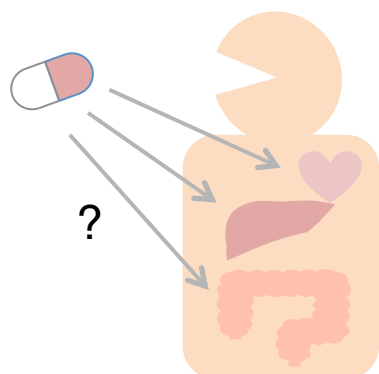
安全なNrf2活性化剤として
既存薬を探索



スピーディーな治療法開発



臓器ごとに異なる
転写活性化メカニズムの解明



疾病に特異的な治療法開発

図6-1 Nrf2活性化医療を促進する研究戦略

既存薬再開発によって安全なNrf2活性化剤を探索し、速やかに患者に治療法を届ける一方、臓器ごとに異なる生体防御遺伝子の転写活性化メカニズムを理解し、各疾病に応じた適切な活性化方法を探していくことが必要である。

謝辭

謝辞

4年間にわたり、研究全般に関してご指導・激励をいただきました小林麻己人講師に深く感謝いたします。

へム関連の実験に関してアドバイスと協力をいただきました山形大学遺伝子実験施設の中島修教授、進化学的解析についてご指導をいただきました筑波大学生命環境系の和田洋教授に感謝いたします。

また、所属した分子発生生物学研究室におきましては、論文投稿に際してアドバイスをいただきました中島瞳様および中島やえ子博士、*in situ* hybridization やジェノタイプングを教えていただきました竹内美保様、ゼブラフィッシュの飼育管理をしていただきました米田未雪様、実験に協力していただきました Vu Thanh Nguyen 様および遠藤優佳様、論文改稿を手伝っていただきました Christina-Sylvia Andrea 様に感謝いたします。