

独立行政法人 科学技術振興機構
ERATO 山本環境応答プロジェクト 中間研究報告会
(兼 中間評価会)

平成 18 年 2 月 28 日 筑波大学総合研究棟 D 116 公開講義室

12 : 40 ~ 13 : 30

山本雅之 (グループ 1)

「活性酸素応答と低酸素応答の個体レベルでの解析」

外部環境の変化に迅速に適応するために、生体は様々な臓器に固有の応答系を稼働させる。例えば、低酸素環境に曝された際には、造血臓器において酸素を運搬する赤血球が増産される。赤血球の増殖シグナルは、低酸素環境を感知した腎臓と肝臓で産生されるエリスロポエチンである。また、心拍数や呼吸数を増加させ、体内への酸素供給効率を亢進させる。このように、環境応答は個体全体のネットワークを使った生体の生存戦略であり、その過程では遺伝子発現の転写レベルでの制御が重要な役割を担っている。したがって、環境応答機構を理解するためには、転写制御機構について、個体レベルでの総合的な解析を行う必要がある。本グループでは、主として遺伝子改変マウスを用いた環境応答転写因子群の機能解析研究を行っているが、マウス遺伝学を駆使した実験系はプロジェクト全体の研究目標においても重要な位置を占めている。個体を用いた研究成果は、長い解析期間や大きな設備を必要とするものの、信頼性の高い、しかも、人間への応用の可能とするデータが得られる。すなわち、マウス個体を用いて、生理学的側面を十分に検証できるような研究を実施し、生体内で真に働いている環境応答機構の分子メカニズムの解明を目指している。

本グループでは、特に、1) 低酸素応答転写因子群の遺伝子改変マウスを用いた機能解析、2) エリスロポエチン遺伝子の低酸素誘導的発現制御機構の解析、3) 酸化ストレス応答を制御する Nrf2-Keap1 系の個体レベルでの機能解析、に取り組んでおり、それぞれのテーマにおいて、独創性の高い研究成果を得つつある。これらのデータを得るための主な実験基盤は、遺伝子導入マウスおよび遺伝子破壊マウスの樹立と解析であり、速攻性と簡便性を兼ね備えたマイクロインジェクションシステムを導入し、外来 DNA を受精卵に高い頻度で導入することができるシステムを開発・利用している。また、遺伝子改変マウスの解析系として、マウスに負荷を与えるための酸素分圧制御マウス飼育箱やγ線照射装置の他、In Vivo 高感度イメージングシステムを用いた非侵襲的遺伝子発現検出系を確立し、マウスを屠殺せずに環境応答の遺伝子発現変化を解析できるように試みている。

ERATO

独立行政法人 科学技術振興機構
ERATO 山本環境応答プロジェクト 中間研究報告会
(兼 中間評価会)

平成 18 年 2 月 28 日 筑波大学総合研究棟 D 116 公開講義室

13 : 50 ~ 14 : 40

小林麻己人 (グループ 2)

「順方向遺伝学を用いた新規ストレス応答関連因子の探索」

順方向遺伝学は、特定の生命現象に関わる未知遺伝子の同定に最も有効な手法である。我々は、順方向遺伝学が駆使できる脊椎動物ゼブラフィッシュを活用して、親電子性物質・酸化ストレス応答に関わる未知因子群を同定することを試みた。着目したのは Nrf2-Keap1 システムである。ヒトの体は、親電子性物質や酸化ストレスに曝された時に、各種異物代謝酵素や抗酸化剤蛋白質を誘導して、これらの消去につとめる。この誘導で中心的な役割を担うのは、転写因子 Nrf2 とその制御因子 Keap1 であるが、どのようにストレス感知はなされているのかなど疑問点も数多く残っている。

我々は、まず魚類にも Nrf-Keap1 システムが存在することを見だし、ゼブラフィッシュを用いた解析結果が、ヒトでの誘導機構の研究につながることを実証した。次に、異物代謝酵素の一つである *gstp1* の発現誘導を指標に、親電子性物質や酸化ストレスに対する応答が異常になる突然変異ゼブラフィッシュの探索を開始した。誘導剤には、マイケル反応アクセプターであるジエチルマレイン酸 (DEM) と抗リュウマチ金製剤であるオーラノフィン (AUR) を用いた。約 700 ファミリーの突然変異系統を探索した結果、19 の突然変異系統が単離された。注目すべき点は、AUR による誘導だけが減弱する突然変異系統が単離されたのに対し、DEM による誘導だけが減弱する系統は単離できなかったことである。このことは、DEM と AUR の誘導は共通経路で行われるが、AUR に関しては、それ以外の上流因子が必要であることを示唆している。一方、誘導剤を処理しない状態で既に *gstp1* が強く発現する系統も見つかり、通常状態では、転写誘導を抑制制御する機構が複数存在することが示された。現在は、得られた突然変異系統の後代を育成しつつ、詳細な機能解析と原因遺伝子の遺伝子座マッピングを開始したところである。

ERATO

独立行政法人 科学技術振興機構
ERATO 山本環境応答プロジェクト 中間研究報告会
(兼 中間評価会)

平成 18 年 2 月 28 日 筑波大学総合研究棟 D 116 公開講義室

15 : 00~15 : 50

伊東健 (グループ 3)

「酸化ストレスに対する適応型遺伝子発現制御機構－疾病防御における役割」

親電子性毒物および活性酸素種に対する、抗酸化剤応答配列 (ARE) を介した解毒化酵素および抗酸化蛋白質群の発現誘導機構は、動物にとって必須の生体防御機構であり、転写因子 Nrf2 により制御される。近年、この応答反応が、発癌、急性毒性および神経変性疾患の防御に有効であることが明らかになった。我々はまず、Nrf2 を介した転写活性化機構を解析するために、Nrf2 の活性化ドメインである N 末端領域に特異的に相互作用するタンパク質を HeLa 細胞の核抽出液からアフィニティー精製した。同定されたタンパク質の 1 つである TRRAP は、複数の HAT 複合体に共通して含まれるサブユニットであるが、TRRAP ノックダウン解析などから、Nrf2 依存的な転写活性化を抑制することが明らかになった。さらに、クロマチンリモデリング因子が Nrf2 の転写活性化に果たす役割を解析するために、BAF 複合体の ATPase サブユニットである BRG1 が Nrf2 の転写活性化に果たす役割を解析した。ヒト癌細胞 SW480 において BRG1 を siRNA によりノックダウンすると、キノノオキシドレダクターゼ 1 遺伝子を含むその他の Nrf2 標的遺伝子の発現には変化が見られなかったが、ヘムオキシゲナーゼ 1 遺伝子 (*HO-1*) の親電子性物質による発現誘導が著明に低下した。BRG1 は、*HO-1* 遺伝子の制御領域にリクルートした後、Z 型 DNA 形成を促進し、クロマチンを活性化して *HO-1* の発現を誘導すると考えられた。

一方、Nrf2 は、急性炎症の過程および血管の laminar flow によって活性化されて、抗炎症作用を発揮することが明らかになった。私たちは、親電子性を持つシクロペンテン型のプロスタグランジンが、このような場合の Nrf2 の活性化に関与していることを明らかにした。カラゲニンやエラスターゼ処理で誘導した急性肺炎で解析すると、Nrf2 防御系はマクロファージにおいて強く活性化され、炎症防御に中心的な役割を果たしていることが明らかになった。

ERATO