

— 教授就任記念講演 —

## 酸素に対する細胞の適応応答の分子機構

## Molecular Mechanisms of the Adaptative Response against Oxygen

山 本 雅 之

東北大学大学院医学系研究科 医化学分野

東北医学雑誌への「新任教授記念講演」の要旨執筆の機会を頂きましたので、同窓の皆様へ、着任のご挨拶と最近取り組んでいる研究に関する若干の知見を紹介させていただきます。私は、1979年に本学を卒業後、医化学教室の大学院生となり、菊地吾郎教授の薫陶を頂きました。その後、国内外の研究施設で研修を積んだ後に、1995年に筑波大学教授として赴任し、昨年まで12年間在職して、分子生物学研究と同大学の医学系研究科の運営に努めてきました。本年1月より本学の医化学分野を担当することになり、懐かしい星陵キャンパスに戻って参りました。本学の発展に微力を尽くす所存ですので、今後ともご指導・ご鞭撻をよろしくお願いいたします。

さて、私が大学院で研究を始めたのは、米国のManiatis先生が遺伝子クローン化に革命的な手法で成功するなど、分子生物学の大きな革命が起きていた頃でした。私も、遺伝子発現がどのように制御されているかを解明する研究に強く心を引かれ、1983年に大学院を修了した後、すぐにEngel先生(Northwestern大学;現在はMichigan大学)の研究室に留学しました。大学院時代からヘム合成系の初発酵素である5-アミノレブリン酸合成酵素の発現制御メカニズムの研究に取り組んでいましたが、留学に出る少し前に、林典夫教授と渡邊則道博士が、同酵素には赤血球特異的に発現するイソ酵素が存在することを示唆する実験結果を得ました。この事象を実証するために5-アミノレブリン酸合成酵素のcDNAクローン化が必須でしたが、しかし、1983年当時には、微量しか精製できない酵素のクローン化は簡単ではなく、方法論的なブレイクスルーが必要でした。

ちょうどその頃に、米国のYoung博士らがラムダファージライブラリーと特異抗体を組み合わせてcDNAクローン化を簡便かつ効率良く行う方法を考案したことが報告されました。そこで、Engel先生と相談して、この手法に取り組むことにしたのですが、原

理的に可能といっても、実技的にはたいへん難しく、ほとんどの試薬を手作りしながら、ようやく世界で最初の「赤血球系発現ライブラリー」を完成した時は感動しました。もちろん、このライブラリーからは多くの有力なcDNAクローンが単離できたのですが、私たちが取り組んでいた赤血球型5-アミノレブリン酸合成酵素のcDNAも首尾良く単離できて、その存在を実証することができました<sup>1)</sup>。そこで、この酵素にALAS-Eという名前を付けたのですが、気を許している間に遺伝子にALAS2という名を付けられてしまい、これが世界的に定着してしまったのは不覚の至りでした。研究の世界での先陣争いは厳しいものであることを肝に銘じた出来事でした。

ところで、この研究は、赤血球におけるヘム生合成が赤血球特異的に発現するイソ酵素によって担われており、他の組織で利用されている非特異型イソ酵素とは明らかに制御様式が異なることを、概念として最初に明らかにしたものです。その後、ヘム合成系の他の酵素の遺伝子解析が進み、それらは赤血球特異的なプロモーター(と第1エキソン)を使うことが多いことが明らかにされました。ヘム産生・利用に関する興味深い分子進化の様子が窺われると思います。また、赤血球型5-アミノレブリン酸合成酵素の機能失調が遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子であることも明らかになり、私たちの実施した一連の研究が、転写制御様式の研究からも、また、臨床医学の観点からも、大きな発見に繋がったものと考えています(図1)。なお、本研究には、血液免疫内科の張替秀郎教授、分子生物学分野の古山和道准教授を始め、永井正(自治医大准教授)、中島修(山形大准教授)、石原元(富山大)、Robert Riddle(Pennsylvania大)博士らの大きな貢献がありました。また、本研究はRockefeller大学の佐々茂先生との密接な共同研究の賜でもあります。

さて、1986年に帰国して、新しい研究に取り組み始めましたが、この頃に米国で、遺伝子発現を制御する蛋白質である「転写因子」のハンティング競争が始ま

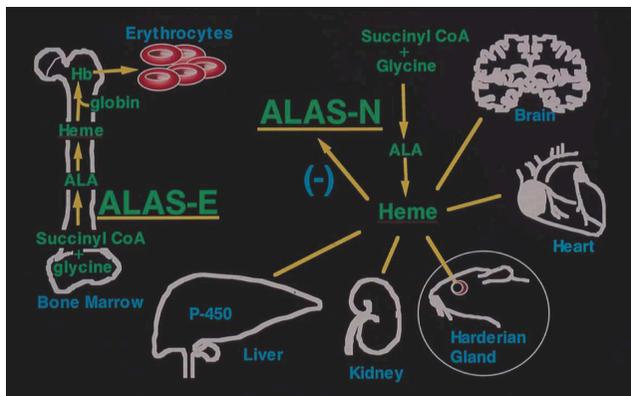


図1. 動物における2つのヘム合成経路  
赤血球特異的な5-アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS-E) の発見

りました。私も、赤血球型5-アミノレブリン酸合成酵素の赤血球特異的発現を規定する分子メカニズムを明らかにしたいと考えて研究の方向性を探っていたのですが、Weintraubらのグループが1987年に未分化細胞を骨格筋に分化させる能力を持った転写因子MyoDを発見したことは衝撃的でした。この研究は、1つの転写因子が「細胞の運命」を決定できることを実証したものです。私も赤血球分化を決定する転写因子を見つけたいと考えました。そこで、Engel先生に手紙を出して、「赤血球特異的な転写因子を同定しよう」と提案したところ、即座に「大賛成」という返事が来ましたので、早速米国に出かけて、遺伝子発現の赤血球特異性を規定する転写因子の探索を始めました。幸運なことに、私たちは新しい赤血球系転写因子を発見することができましたが<sup>2)</sup>、この新しい転写因子を巡る競争がいかに厳しかったかは、私たちがNF-E1と命名した因子を、同時期に競っていたHarvardチームはGF-1、NIHチームはEryf1と別名で同定したこと、すなわち、発見者たちが自由に命名をしたことから窺い知ることができると思います。これらは後に当事者の話し合いにより、GATA因子と呼ばれるようになりました。私たちはGATA因子がファミリーを形成していることを発見しましたが、なかでも赤血球の特異性を決める因子としてはGATA-1が決定打でした(図2)。一方、GATA-2とGATA-3は他の細胞系列でそれぞれ有力な機能を果たしていました。この研究には、後にCELL誌の副編集長としてLewin編集長を支えたLinda Ko博士が大学院生として献身的に協力してくれました。

さて、林典夫先生のご好意で、1990年に帰国して東北大学で新しい研究への取り組みを始めました。当

時の転写因子研究は、転写活性化能の解析が中心で、転写因子そのものの発現や制御に取り組んでいる有力な研究室はありませんでしたので、私たちは「制御因子の制御機構」解明を標榜して、GATA因子群の解析に取り組むことにしました。弘前大学の伊藤悦朗教授と協力して、Gata1遺伝子の構造を丹念に明らかにしていく中で、その構造がたいへんユニークなものであることを発見しました<sup>3)</sup>。

ところで、この当時は転写因子機能を、培養細胞系への一過性の遺伝子発現で推量するのが主流でした。しかし、個体レベルで真に機能する遺伝子発現の制御機構を解明するには、この方法は明らかに不十分であり、どうしてもマウス個体での遺伝子組換えに取り組むこと、すなわち、トランスジェニックマウス法や遺伝子ターゲティング法をマスターする必要がありました。この頃に、高橋智博士(現筑波大教授)が研究グループに参加してきて、小野寺浩(腫瘍外科分野)、西村滋子(筑波大血液内科)両博士らと一緒にこのプロジェクトを進めてくれました。これが、私たちのチームの世界的な先進性の確立に大きく貢献しました。

一連の解析の結果、個体レベルでのGata1遺伝子の発現制御の様子が明らかになり、エンハンサーやプロモーター上流域制御領域の同定を通して、Gata1遺伝子の自己制御とネットワーク制御の実態を実証することに成功しました(図3)<sup>4)</sup>。また、平行して作製した遺伝子破壊マウスを併用して「遺伝子相補レスキュー法」を確立しました<sup>5)</sup>。この手法は、本橋ほづみ准教授と勝岡史城助教によるMaf転写因子機能の個体レベルでの解析<sup>6)</sup>、鈴木教郎博士によるエリスロポエチン受容体の解析<sup>7)</sup>へと発展しました。また、GATA-1の発現量低下と部分欠失変異が、それぞれマウスとヒトダウ

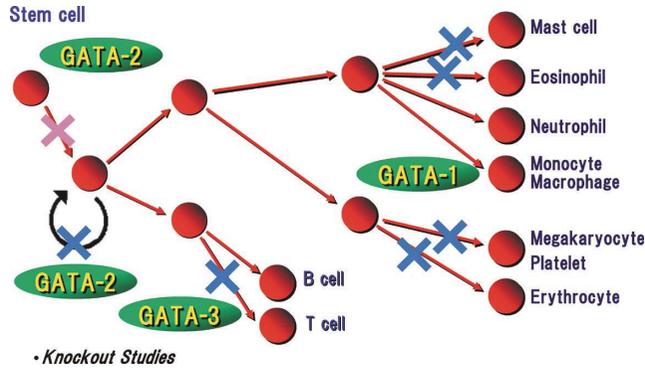
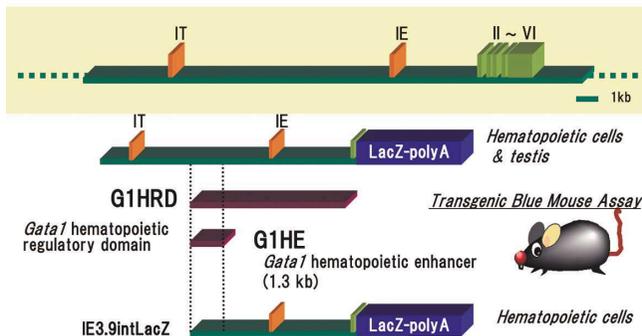


図2. GATA 転写因子群の機能貢献

マウス *Gata1* 遺伝子図3. マウス *Gata1* 遺伝子の構造と機能  
トランスジェニックブルーマウス法による解析

ン症候群に伴伴する白血病を惹起することが明らかになり、清水律子講師らによって「GATA-1 関連白血病」という新しい病態像が確立されつつあります<sup>9)</sup>。さらに、森口尚助教と鈴木未来子さんによって、大腸菌人工染色体 (BAC) を用いた *Gata1* 遺伝子の新しい発現制御様式が明らかにされつつあります。これらに加えて、峯岸直子准教授 (TUBERO)、蓬田健太郎教授 (武庫川女子大)、大根田絹子教授 (高崎健康福祉大)、大根田 修教授 (筑波大)、今川重彦教授 (筑波大) を始め、本学の赤坂純逸、太田 潤、諏訪部徳芳、Michigan 大学の Jordan Shavit、田邊 修、Kim-Chew Lim、筑波大の小林-大崎 牧、西川恵三、細谷-大村咲恵博士らによる、ここには紹介しきれない多くの GATA 因子群の研究業績があります。

さて、このような GATA 因子の解析過程で、赤血球の特異性を決めるのには GATA-1 だけではなく、幾つかの転写因子の組み合わせが重要ではないかと考えるようになりました。そこで、GATA-1 の隣接部位に結合がよく見られる NF-E2 転写因子に着目したので

すが、なかなかその実態がわかりませんでした。そんな折、癌研究所の西澤 誠博士に NF-E2 結合配列について話をしたところ、彼が見つけた癌遺伝子 *cMaf* の結合配列とよく似ていることが判明しました。ほどなくして、「NF-E2 配列には p45 因子が結合するが、p45 の DNA 結合には 18 kDa の別の蛋白質が必要らしい」という報告が Nature にでました。Maf ファミリーにも 18 kDa 程の大きさの小 Maf 群因子が存在しますので、ここで「転写因子 NF-E2 の本態は p45 と小 Maf 群因子が作るヘテロ 2 量体である」という大きな仮説になりました。そこで、小 Maf 群因子と p45 を混ぜ合わせてみると見事に NF-E2 配列に結合することがわかり、そのことを 1994 年の Nature に報告しました<sup>9)</sup>。この研究は、五十嵐和彦教授 (生物化学分野) を中心に遂行されたのですが、細胞の正常な分化と癌化が同じ転写因子によって行われるという事実にとっても興奮したことを覚えています (図 4)。

ところで、動物は植物由来の炭水化物と大気中の酸素を体内に取り込んで、主なエネルギーを得ています。

これに対して、植物は「親電子性物質」と総称される化学物質を産生して、動物による捕食から逃れています。逆に動物にとっては、これらは効率的に排出しなければならない毒物です。同様に、酸素も生体機能を傷害する重大な環境ストレスです。動物は様々な環境変化に対して適切なタイミングで相応の酵素群を発現させる「しくみ」を持っていて、体内のセンサー分子がストレスとなる環境情報を感知すると、これに適した生体防御酵素群の発現を誘導します。すなわち、動物は酸素や植物の良いところだけを使い、それらに由来するストレスに対しては抑え込むメカニズムを進化させてきました。これらの解毒酵素系は、近年の産業化社会発展に伴い環境中に排出されるようになった化学物質に対する生体防御にも重要な貢献をしています。生体がどのようなメカニズムで酸素の毒性や親電子性物質に反応しているのかを正確に理解することは、効果的な生体防御機構の構築のために重要ですが、同時に、そのような生体防御機構の破綻に由来する種々の生活習慣病の病態解明のためにも必須です。

私は1995年に、東北大学から筑波大学に異動しましたが、その頃から私たちのチームはこの研究領域に足

を踏み入れました。以前から、このような生体防御酵素群の遺伝子の誘導的発現制御が抗酸化剤応答性配列 (ARE) を介するということが報告されていたのですが、肝心のその配列に結合する転写因子は同定できていませんでした。私たちは、NF-E2 結合配列と ARE 配列の類似性に気付いて、NF-E2 配列結合因子が ARE にも結合する可能性を検討していました。そこで、p45 関連転写因子の検討を行い、生体が親電子性物質や活性酸素に暴露された際にその一つである Nrf2 が解毒酵素や抗酸化酵素遺伝子の発現誘導に貢献することを発見しました (図5)<sup>10</sup>。伊東 健博士 (現弘前大学教授) が、Nrf2 遺伝子欠失マウスでは種々の生体防御遺伝子の発現が著明に減少していること、すなわち、Nrf2 が生体防御遺伝子群の転写活性化に必須であることを実証しました。また、Nrf2 遺伝子欠失マウスは外来異物や酸化ストレスに対する感受性が亢進しており、アセトアミノフェンや高酸素・ディーゼル微粒子暴露などへの高感受性を示しました。

親電子性物質や酸化ストレスが Nrf2 を活性化するメカニズムに関する重要な手がかりは、Nrf2 の N 末端領域の解析から得られました。私たちは、本領域に



図4. 転写因子 GATA-1 と NF-E2 による赤血球特異的な遺伝子発現を制御

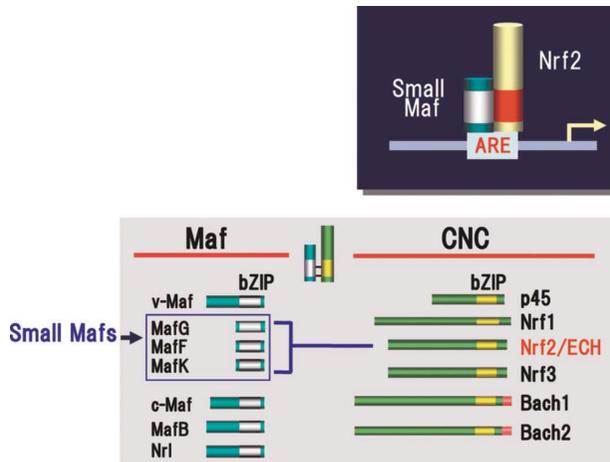


図5. 第2相解毒酵素群遺伝子の誘導発現は ARE 配列と Nrf2-Maf ヘテロ2量体により制御される

結合する新規蛋白質として Keap1 を同定しましたが、Keap1 は細胞質に存在し、Nrf2 を捕獲してその転写活性を抑制します。また、この Keap1 による抑制は親電子性物質投与により解除されます。すなわち、Keap1 による抑制メカニズムの本質は Nrf2 核局在の阻止であり、一方、ストレスによる Nrf2 活性誘導の本質は Keap1 抑制からの「脱抑制」であることが理解されます (図 6)。

ところで、Keap1 による Nrf2 抑制制御の生理的意義は、若林伸直博士の作製した *Keap1* 遺伝子欠失マウスの解析により確固たるものになりました<sup>11)</sup>。*Keap1* 遺伝子欠失マウスの胎児繊維芽細胞では、誘導剤が存在しなくとも Nrf2 が恒常的に核に蓄積しており、様々な Nrf2 の標的遺伝子が発現しています。また、Keap1 と Nrf2 二重欠失マウス由来の細胞では、この表現型はレスキューされますので、上述の Keap1 欠失表現型は恒常的な Nrf2 活性化によってもたらされていると結論されます。一方、Nrf2 はプロテアソーム経路を介して非常に速やかな代謝回転をしています。細胞を親電子性物質で処理するとこの Nrf2 分解は抑制されます。実際に、Keap1 は Nrf2 のユビキチン化を促進しています。小林 聡准教授が、Keap1 は BTB ドメインを持つが、BTB ドメインを持つ蛋白質は Cul3-Roc1 ユビキチンリガーゼ複合体の基質認識のアダプターとなることを発見し、Keap1 と Cul3-Roc1 との相互作用の検討を行ったところ、その結果はまさに Keap1 が Cul3 と結合する分子であることを示していました (図 8)。このように、細胞はストレスに速やかに応答するために、通常から常に Nrf2 を合成しては

分解するという不経済なメカニズムを採用していますが、その利点は、ストレス状況下では Nrf2 分解を止めることにより素早く Nrf2 量を増加させ、迅速に標的遺伝子を活性化することができることであると思います。

さて、Keap1-Nrf2 制御系が酸化ストレスを感知するメカニズムの解明は難問でしたが、この点に関する一つの手掛かりは、多くの Nrf2 誘導剤がシステインのスルフヒドリル基に反応性の高い物質である点にありました。Keap1 はシステインに富んだ分子であり、種々の Nrf2 誘導剤が直接 Keap1 のシステイン残基を修飾することで Keap1 による Nrf2 抑制の解除に貢献していることが示唆されます。そこで、いくつもの試行錯誤を経て、実際に Keap1 分子中にあるいくつかのシステイン残基が重要であることを突き止めました。実際に、山本多恵博士と鈴木隆史博士が<sup>3)</sup>、マウス個体レベルでこれらのシステイン残基に変異を導入したところ、変異分子はもはや Nrf2 を分解できませんでしたので、これらのシステイン残基の修飾が Keap1-Cul3 複合体による Nrf2 のユビキチン化反応を抑制し、その結果、Nrf2 蛋白質が安定化するものと理解されます (図 7)。また、小林麻己人講師のチームによるゼブラフィッシュのフォワードスクリーニングが、この解析に威力を発揮しつつあります。

Kit Tong 博士による一連の構造機能解析の結果から、親電子性物質による Keap1 のシステイン残基修飾を介した Nrf2 のユビキチン化反応抑制メカニズムに関して、私は「蝶番と門モデル」と命名した Keap1 の立体構造変換モデルが有力であると考えています<sup>12)</sup>。

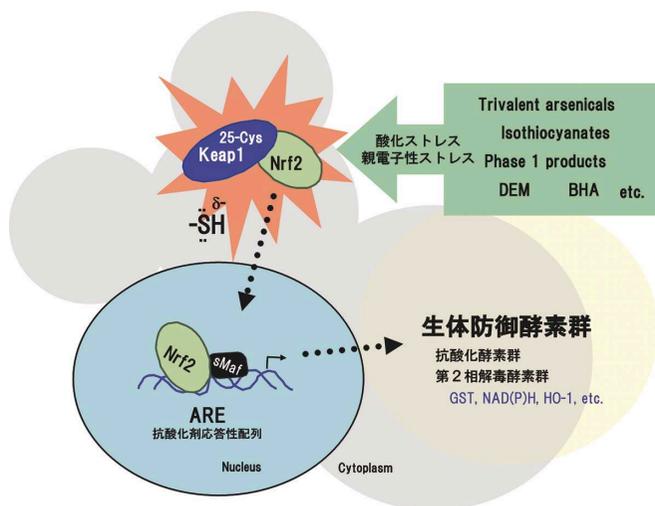


図 6. Keap1-Nrf2 系は酸化ストレスや親電子性物質に対する生理的な応答系である

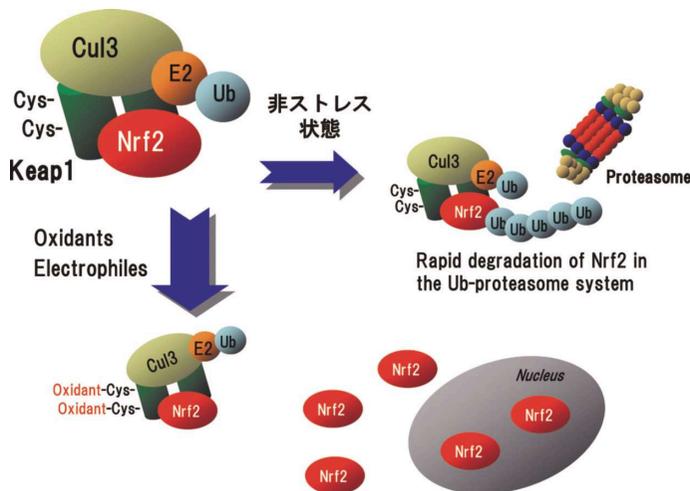


図7. Nrf2 蛋白質は非ストレス時には速やかに分解と親電子性物質や酸化ストレスによる Nrf2 分解の阻害

## 門と蝶番メカニズム

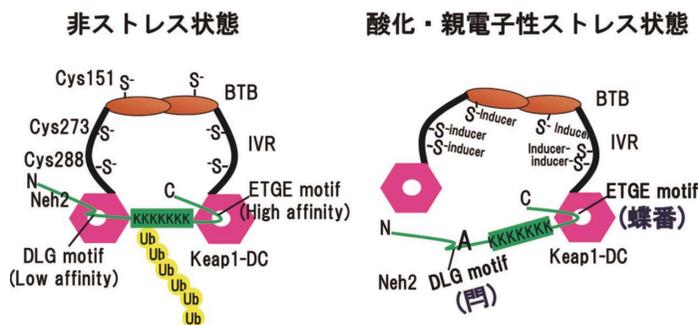


図8. 門と蝶番メカニズム

2つの部位での基質認識が Nrf2-Keap1 制御系に重要な貢献をしているが、弱い DLG 結合サイトは親電子性物質のストレスによりはずれ、この構造が崩れる

Neh2 ドメインにある2つの結合モチーフ (DLG と ETGE) を介して Keap1 は Nrf2 と結合しますが、その2つのモチーフ間にはユビキチン化されるリジン残基が存在しています。Nrf2 が両方の結合モチーフを用いて Keap1 と結合することにより Neh2 ドメインが両端を固定すると、中央にあるリジン残基がユビキチン化反応に対して適切な距離や位置関係を保持することができます。一方、システイン残基が修飾されると、複合体全体の立体構造変換が起こり、結合親和性が弱い DLG モチーフが Keap1 から離れ、その結果、Keap1-Cul3 複合体はユビキチン化反応に十分な距離や位置関係を維持できなくなり、Nrf2 分解が止まるものと考えています (図8)。

さて、プロッコリー新芽やローズマリーなどに多く

含まれる Nrf2 の強力な誘導剤は、昨今の健康食品ブームに影響されて注目を集めています。また、創薬の観点から見ると、Keap1 を標的とする薬剤は、Nrf2 を活性化させることにより発癌予防や抗炎症作用などの効果を発揮することが期待されます。実際に、大川裕美、田口恵子、Jon Maher 博士らが、肝臓や肺に特異的な Keap1 欠損マウスを作製し、解析したところ、本マウスでは、肝で Nrf2 が恒常的に活性化しており、アセトアミノフェンに対して高度に耐性を示しました。すなわち、組織特異的に Keap1 活性を阻害すれば、生理的に Nrf2 を活性化させて本組織における異物代謝や酸化ストレス防御能を亢進させることができることが示されました。今後、Keap1-Nrf2 システムを標的にした創薬の可能性があると思います。

一方, 国立癌センターの太田 力博士と協力して, ヒト肺癌細胞における *KEAP1* 遺伝子の体細胞変異を同定しました<sup>13)</sup>. この結果は, Keap1 分子に変異が入り, Nrf2 を活性化することが, 癌細胞の発展に有利に働くことを示しています. すなわち, Nrf2 の活性化は正常細胞にとってはストレスから身を守り発癌予防の方向に働きますが, すでに癌化した細胞では, 抗癌剤への耐性獲得など悪性度を増すためにも働きます. 換言すると, 癌細胞に対しては, *Keap1* 遺伝子導入による Nrf2 抑制が癌の進行を抑えるのに有効かもしれません.

すでに紙幅も尽きましたので, もう一つの重要テーマである低酸素応答<sup>14)</sup> については, 別の機会にご紹介したいと思います. 私は, 本文中で紹介できなかった方々を含めて, 多くの共同研究者に恵まれて, 酸素を運ぶ細胞, 酸化ストレス応答, そして, 低酸素応答をテーマに研究を進めています. 今回, 機会を頂きましたので, 本学で今後も独創性のある研究を続けて行きたいと思っています. どうぞよろしく願いいたします.

## 文 献

- 1) Yamamoto, M., Yew, N., Federspiel, M., et al. (1985) Isolation of recombinant cDNAs encoding chicken erythroid  $\sigma$ -aminolevulinic synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82**, 3702-3706.
- 2) Yamamoto, M., Ko, L.J., Leonard, M.W., et al. (1990) Activity and expression of the NF-E1 (GATA) multigene family. *Genes Dev.*, **4**, 1650-1662.
- 3) Ito, E., Toki, T., Ishihara, H., et al. (1993) Erythroid transcription factor GATA-1 is abundantly transcribed in mouse testis. *Nature*, **362**, 466-468.
- 4) Onodera, K., Takahashi, S., Nishimura, S., et al. (1997) GATA-1 transcription is controlled by distinct regulatory mechanisms during primitive and definitive erythropoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94**, 4487-4492.
- 5) Takahashi, S., Onodera, K., Motohashi, H., et al. (1997) Arrest in erythroid cell development by promoter-specific disruption of GATA-1 gene. *J. Biol. Chem.*, **272**, 12611-12615.
- 6) Motohashi, H., Katsuoka, F., Shavit, J., et al. (2000) Positive or negative MARE-dependent transcriptional regulation is determined by the abundance of small Maf proteins. *Cell*, **103**, 865-875.
- 7) Suzuki, N., Ohneda, O., Takahashi, S., et al. (2002) Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant mice from lethality. *Blood*, **100**, 2279-2288 (Plenary paper).
- 8) Shimizu, R., Kuroha, T., Ohneda, O., et al. (2004) Leukemogenesis caused by incapacitated GATA-1 function. *Mol. Cell Biol.*, **24**, 10814-10825.
- 9) Igarashi, K., Kataoka, K., Itoh, K., et al. (1994) Regulation of transcription by dimerization of erythroid transcription factor NF-E2 p45 with small Maf proteins. *Nature*, **367**, 568-572.
- 10) Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., et al. (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the N-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.*, **13**, 76-86.
- 11) Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., et al. (2003) Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nature Genetics.*, **35**, 238-245.
- 12) Tong, K.I., Katoh, Y., Kusunoki, H., et al. (2006) Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol. Cell Biol.*, **26**, 2887-2900.
- 13) Padmanabhan, B., Tong, K.I., Ohta, T., et al. (2006) Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Mol. Cell*, **21**, 689-700.
- 14) Suzuki, N., Obara, N. and Yamamoto, M. (2007) Use of gene manipulated mice in the study of erythropoietin gene expression. *Method Enzymol*, Oxygen Biology and Hypoxia, in press.