

研究課題名 転写因子による環境応答制御の定量的解析
所属研究機関 筑波大学先端学際領域研究センター
研究者氏名 本橋ほづみ

1. 研究計画の概要

研究の趣旨・目的

最近、生体内における転写因子の機能は、従来の試験管内実験、あるいは、培養細胞に対する一過性遺伝子導入実験で明らかにされてきた機能とは大きく異なる側面を持っていることが明らかになりつつある。個体レベルでは、個々の転写因子機能はその分子構造、発現様式、そして、発現量により総合的に規定されており、さらに、その機能は他の複数の転写因子との協調的相互関係の中で発揮されるものである。本研究は、このような基本認識に基づき、転写因子の機能を規定する要素として、その分子構造のみならず、細胞核内における有効存在量を重視して、個体レベルで観察される種々の複雑な事象を転写制御の側面から理解することを目指している。現代社会が直面しつつある環境問題や、高齢化社会における健康問題の解決に大きく貢献できるものとして、環境中の異物・酸化ストレスに対する応答反応に注目し、その制御機構を解明することを目指す。

研究計画の概要

(1) 異物代謝系第2相酵素群の誘導における bZip 型転写因子群の機能解析。異物代謝系第2相酵素群は、抗酸化剤応答配列 (antioxidant responsive element; ARE) を介して、塩基性領域ロイシンジッパー型 (bZip 型) 転写因子である Nrf2 により、統一的に制御されている。また、Nrf2 は酸化ストレスに対する生体防御機構にも重要である。これまで、研究員らは、Nrf2 は bZip 構造を介して小 Maf 群因子とヘテロ 2 量体を形成して機能することを明らかにしてきたが、最近、Nrf2 は同時に c-Jun や ATF4 などの転写因子とも 2 量体形成が可能であることが報告された。しかし、生体内において、これらの因子がどのように Nrf2 と相互作用し、転写因子ネットワークを形成しながら機能しているかは、未だ不明である。そこで、本研究では、親電子性試薬や酸化ストレス応答の際に生体内で真に機能する Nrf2 のパートナー分子の同定を試みた。Nrf2 の抑制性因子 Keap1 の遺伝子破壊マウスでは、Nrf2 が恒常的に活性化され、その結果、同マウスは、食道と前胃の角化異常をきたし、摂食障害により生後 2?3 週目で死亡する。研究員は、このマウスを利用して、Nrf2 による転写活性化における小 Maf 群因子の重要性を検討することにした。keap1 欠損下で小 Maf 群因子の量を減らした場合に、Nrf2 機能亢進状態が顕れるかどうか、つまり、keap1::小 Maf 群因子複合変異マウスを作製し、keap1 遺伝子欠損による致死性が回避されるかどうかを検討した。次に、単純な小 Maf 群因子の減少により、Nrf2 を介した異物代謝・ストレス応答反応が障害されるかどうかを検討した。さらに、Nrf2/小 Maf 群因子ヘテロ 2 量体の結合配列を、表面プラズモン共鳴 (SPR) を利用した DNA-タンパク質チップアッセイにより、網羅的に検索し、それぞれの結合配列とヘテロ 2 量体の親和性を測定することを試みている。

(2) ダイオキシン受容体 (AhR) の機能効率を変化させる生体機能分子 (AhR モディファイヤー) の探索と同定。AhR は、核内受容体型の転写因子であり、シトクロム p450 1A1 などの異物代謝系第1相酵素群の発現誘導に必須である。AhR はヒト・マウス・ラットなどの種間で、あるいは、純系化された実験マウスでは、その系統間で、機能効率が大きく異なる。その原因の1つは、AhR のリガンド分子 (例えば TCDD や PCB) に対する親和性の違いであると推測されているが、研究員らはこれまでに、生体内には AhR の機能効率を規定する別の要因が存在することを示唆する予備的な実験結果を得ていた。そこで、本研究では、個体において AhR モディファイヤーの探索と同定を行い、転写因子の機能効率が生体でどのようにして決定されているかを明らかにすることを試みている。AhR 遺伝子破壊マウスを5つの異なる系統に戻し交配することにより、純系化を図り、表現型を比較した。本研究項目では、マウス系統ごとの遺伝子情報の利用が重要な鍵であり、ゲノムプロジェクトの成果を最大限に利用し、ポストシーケンス時代の利点を最大限に活用するものである。

研究計画の詳細報告

(単位：百万円)

研究項目	所要経費				
	13年度	14年度	15年度	16年度	合計 (予定)
1. 小 Maf 群因子機能の定量的解析					
(1) 小 Maf 群因子欠損マウスの表現型の検討	6.067				6.067
(2) 小 Maf 群因子の発現量と機能の関連の個体レベルでの検討		7.000			7.000
(3) 小 Maf 群因子を含む 2 量体と DNA の結合定数の網羅的測定			6,893		6,893
(4) 小 Maf 群因子を含む 2 量体と DNA の親和性と個体における機能の関連の検討					
2. AhR モディファイヤーの探索					
(1) AhR 遺伝子欠損マウスの純系化	4.000				4.000
(2) 系統ごとの AhR 欠損による表現型の差異の検討		5.000			5.000
(3) 系統により差異が確された卵巣機能の詳細な検討と QTL 解析の準備			4.000		4,000
(4) 卵巣機能障害をパラメーターとした QTL 解析により AhR モディファイヤーを探索					
3. 間接経費	3.020	3.600	3.268		9,888
所要経費(合計) (間接経費を含む)	13.087	15.600	14.161		42,848

.研究成果の概要

研究成果の概要

(1) 異物代謝系第2相酵素群の誘導におけるbZip型転写因子群の機能解析。

小Maf群因子には、MafG, MafK, MafFの3因子が存在しており、これまでの遺伝子破壊マウスの結果から、これらは相互に代償しあいながら機能していることが想定されている。

そこで、まず、mafG::mafK2重欠損マウスの表現型の解析を通して、小Maf群因子が減少した際に生じる異常の解明を試みた。これまで、研究者らは、同マウスに認められる造血細胞の異常について、詳細に解析してきたが、今回は、それに加えて認められる、非常に特徴的な神経症状について解析を行った。脊髄は脳幹部の大型神経細胞がクロマトリシスを起こしており、抑制性神経伝達物質であるグリシンの受容体の発現が顕著に減少していることが明らかになった。グリシン受容体の完全欠失マウスは胎生致死であるが、発現量の減少という結果であったことから、神経症状をしめしつつ、生存可能なマウスが得られたと考えられる。このマウスは、ヒトのグリシン受容体遺伝子の変異による驚愕症候群を模したものである。

次いで、小Maf群因子がNrf2のパートナー分子であるかどうかの検討をするために、Nrf2の恒常的活性化がもたらされている、keap1の欠損状態において、小Maf群因子の発現量を減少させることを試みた。そのために、mafG+/-::mafK+/-::mafF/-::keap1+/-4重ヘロマウスを作製し、この遺伝子型同士の交配を行い、得られたkeap1-/-マウスについて小Maf群因子の遺伝子型を調べた。その結果、野生型小Maf群因子の遺伝子の数が多いほど(完全な野生型は6つ)keap1遺伝子欠損の表現型が顕著で、体重増加が障害されていた。一方、野生型小Maf群因子の遺伝子数1つ、もしくは、2つと、少ないほど、体重増加障害は緩和されていた。これは、小Maf群因子の減少により、Nrf2の恒常的な転写活性化が阻害されたことを示している。つまり、Nrf2による転写活性化には、小Maf群因子が必要であることが個体レベルで明らかになった。

また、単純な、小Maf群因子の減少が、Nrf2の標的遺伝子であることが確認されている遺伝子群の発現誘導に影響するかどうかを調べたところ、一部の遺伝子でのみ、誘導の減弱が認められた。これは、遺伝子により、小Maf群因子の要求性が異なるということを示唆する結果である。AREの配列の違い、あるいは、その周辺配列により、Nrf2が組むパートナー分子が異なっている可能性が示唆された。

(2) 異物代謝系第1相酵素群の誘導に必須であるダイオキシン受容体(AhR)の機能効率を変化させる生体機能分子(AhRモディファイヤー)の探索と同定。

AhR遺伝子破壊マウスを、C57BL6, 129SVj, DBA/2, Balb/c, Iq1の5系統に8世代まで戻し交配を行い、純系化を図った。得られたコンジェニックマウスは、組織学的な異常は認められず、生存率も系統間での差は認められなかった。しかし、卵巣機能を調べるため、過剰排卵を誘発して、排卵数を調べたところ、C57BL6では、野生型に比べてAhR遺伝子欠損マウスでは、排卵数の減少が認められたのに対して、129SVjでは、野生型もAhR遺伝子欠損マウスも、同等数の排卵が認められた。この違いが機能的に意味があるかどうかを調べるために、現在、産児数に差があるかどうかを、AhR遺伝子欠損マウスの雌の交配実験により調べつつある。

波及効果、発展方向、改善点等

本提案研究は、広範な生命科学・基礎生物学の領域における様々な蛋白質の生体内機能の解析に、個体レベルでの解析の重要性と定量的解析の視点を導入することになるものと思われる。また、それを通して、医学領域におけるヒト疾患の理解にも大きく貢献するものと考えられる。

近年、ヒトの疾患が、制御因子群の量的変動によりもたらされている例の報告が散見されるようになっている。すなわち、これまで主流であったような因子の完全な欠損状態と正常との比較(すなわち「全か無か」という解析)では理解し得ないヒトの病態が、数多く存在するものと考えられる。特に、高齢化社会で大きな問題となる成人病は、正常な個体発生を遂げ、普通の生活が可能である個体に生じる疾病であり、その理解のためには、鍵となる因子の減少や機能効率の低下といった定量的解析の視点が必須である

．今回報告する小 Maf 群因子の減少状態による神経症状の発現は，まさに，このねらいにかなったものである．さらに，疾患感受性の違いも，制御因子の機能効率の差異として理解されるべきものであり，本研究で行う AhR モディファイヤーの探索と同定は，その手がかりを提供するものと期待される．

さらに，本研究の成果として，外来性異物に対する適応・応答機構の包括的理解と内在性の酸化ストレスの処理機構の解明が得られると期待されるが，これまでの結果から，Nrf2 の標的遺伝子として認識されている一連の遺伝子群は，それらの有する ARE の多様性により，異なった制御機構のもとに転写されている可能性が示唆される．今後は，さまざまな ARE に対する，様々な 2 量体の結合を，網羅的に検討し，これまでひとまとめにしてきた ARE の類型化をはかり，環境ストレスに対する応答機構の詳細を明らかにしていきたいと考えている．

.研究成果発表等の状況

(1) 研究発表件数

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合 計
国 内	0 件	3 件	9 件	12 件
国 際	9 件	1 件	3 件	13 件
合 計	9 件	4 件	12 件	25 件

(2) 特許等出願件数

合計 1 件 (うち国内 1 件、国外 0 件)

(3) 受賞等

0 件 (うち国内 0 件、国外 0 件)

(4) 主な原著論文による発表の内訳

1. Terunuma, T., Hara, A., Senarita, M., **Motohashi, H.**, Kusakari, J: Effect of acoustic overstimulation on regulation of glucocorticoid receptor mRNA in the cochlea of the guinea pig. **Hear. Res.** 151, 121-124, 2001.
2. Yoh, K., Sugawara, T., **Motohashi, H.**, Takahama, Y., Koyama, A., Yamamoto, M. and Takahashi, S: Transgenic over-expression of MafK suppresses T cell proliferation and function *in vivo*. **Genes Cells** 6, 1055-1066, 2001.
3. Kusunoki, H., **Motohashi, H.**, Katsuoka, F., Morohashi, A., Yamamoto, M. and Tanaka, T: Solution structure of the DNA-binding domain of MafG. **Nature Struct.Biol.** 4, 252-256, 2002.
4. Kwak, M.K., Wakabayashi, N., Itoh, K., **Motohashi, H.**, Yamamoto, M., and Kensler, T.W: Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway: Identification of novel gene clusters for cell survival. **J. Biol. Chem.** 278, 8135-8145, 2003.
5. Katsuoka, F., **Motohashi, H.**, Tamagawa, Y., Kure, S., Igarashi, K., Engel, J.D., and Yamamoto, M: Small Maf compound mutants display CNS neuronal degeneration, aberrant transcription and Bach protein mislocalization coincident with myoclonus and abnormal startle response. **Mol. Cell. Biol.** 23, 1163-1174, 2003.
6. Noda, S., Harada, N., Hida, A., Fujii-Kuriyama, Y., **Motohashi, H.***, and Yamamoto M: Gene expression of detoxifying enzymes in AhR and Nrf2 compound null mutant mouse. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 303, 105-111, 2003. (*Corresponding author)
7. Moriguchi, T., **Motohashi, H.**, Hosoya, T., Nakajima, O., Takahashi, S., Ohsako, S., Aoki, Y., Nishimura, N., Tohyama, C., Fujii-Kuriyama, Y., and Yamamoto, M: Distinct response to dioxin in an arylhydrocarbon receptor (AhR)-humanized mouse. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 100, 5652-5657, 2003.
8. Suzuki, N., Suwabe, N., Ohneda, O., Obara, N., Imagawa, S., Pan, X., **Motohashi, H.** and Yamamoto, M. Identification and characterization of two types of erythroid progenitors that express GATA-1 at distinct levels. **Blood** 102, 3575-3583, 2003.

9. Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., **Motohashi, H.**, Noda, S., Takahashi, S., Imakado, S., Kotsuji, T., Otsukua, F., Roop, D. R., Harada, T., Engel, J. D. and Yamamoto, M. Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. **Nat. Genet.** 35, 238-245, 2003.

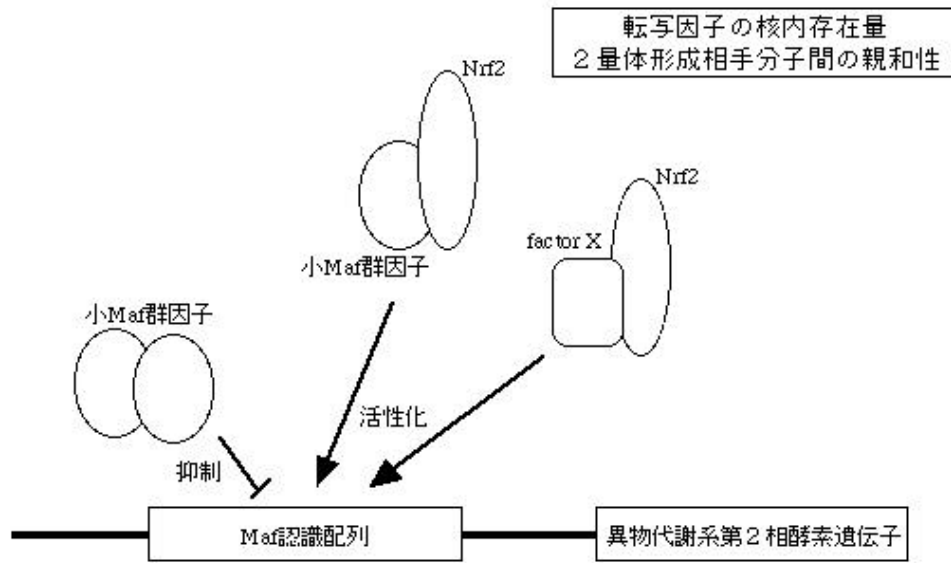
原著論文以外による発表(レビュー等)

10. 玉川優奈, **本橋ほづみ**, 山本雅之: 血小板減少と転写因子. 血液フロンティア 11, 567-574, 2001.
11. **本橋ほづみ**, 山本雅之: モデル動物を用いた定量発現調節の解析. 組織培養工学 27, 259-262, 2001.
12. **Motohashi, H.**, O'Connor, T., Katsuoka, F., Engel, J.D., and Yamamoto, M: Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. **Gene** 294, 1-12, 2002.
13. **本橋ほづみ** Small Maf Biology-----小 Maf 群因子が支える転写制御システムと生命現象. 生化学 75, 1193-1201, 2003.

(5) 主要雑誌への研究成果発表

Journal	Impact Factor	合計
Hearing Res.	1.97	82.07
Genes Cells	4.34	
Nature Struc. Biol.	10.24	
J. Biol. Cahem.	6.70	
Mol. Cell. Biol.	8.84	
Biochem. Biophys. Res. Commun.	2.94	
Proc. Natl. Acad. Sci. USA	10.7	
Blood.	9.63	
Nature Genet.	26.71	

転写因子による環境応答制御の定量的解析



AhRモディファイヤーの探索

