

厚生労働科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

薬物代謝系の制御機構の解明と薬剤に対する
生体側の感受性決定因子の探索

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山本雅之

平成16（2004）年3月

目次

I 総括研究報告	-----1
薬物代謝系の制御機構の解明と薬剤に 対する生体側の感受性決定因子の探索	
II 研究報告	
1. Nrf2-Keap1 制御系の活性化機構の 分子レベルでの解析	-----3
2. 薬剤の急性毒性・晩発性毒性の発 症における AhR/Nrf2-Keap1 制御系の 関与の検討	-----19
3. Nrf2 活性化をもたらす物質の探索 と検討	-----25
III 研究成果の刊行に関する一覧表	-----29
IV 研究成果の刊行物・別刷	-----32

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

総括研究報告書

薬物代謝系の制御機構の解明と薬剤に対する

生体側の感受性決定因子の探索

主任研究者 山本雅之（筑波大学・基礎医学系・教授）

近年、様々な医薬品開発が進み、生活習慣病に対する薬剤治療が成功裏に行われるようになりつつあり、また、生活習慣病以外の疾患に対しても、投薬治療が有効に行われている。しかしながら、薬剤には期待される効果と同時に、毒性・副作用が付随するのが常であり、個人によってはその発生が重大問題となる。したがって、これからの高齢化社会においては、薬剤急性毒性を未然に防止し、個人の体質に応じて適切な薬剤を適正な投薬量で処方する体制づくりが急務である。

本研究の目的は、薬物代謝に関わる酵素群の遺伝子発現制御機構を転写因子レベルで包括的に解明することである。この目的で、動物個体を用いた発生工学実験と分子生物学実験を行う。また、その制御に関与する因子群のヒトにおける機能と遺伝子多型を解析することを通して、個人ごとの薬剤に対する感受性を予測し、投薬量の最小化や薬剤急性毒性の発症を最小限に食い止める方策を開発することである。本研究は、厚生労働省の掲げる「個人の特徴に応じた革新的な医療の実現」の課題に、生命科学の最先端から挑むものであり、本領域の世界標準の形成を目指すものである。

本研究により、薬物代謝酵素群遺伝子の発現制御機構の包括的理解が進むとともに、薬剤の急性毒性発症を規定する因子を解明することができるものと期待される。また、ヒトにおいて、低レベル薬物代謝能と連関する制御因子の遺伝子多型を予め調べることにより、薬剤感受性の高い個人を予測する

ことが可能となる。さらに、急性毒性発症機構を分子レベルで解明することにより、それを回避するための補助薬などを開発することが可能になる。すなわち、本研究により、個人の特徴に応じた医療の実現が可能になるものと考ええる。一方、薬物代謝制御機構の分子レベルでの正確な理解と制御因子遺伝子の改変マウスは、薬剤や食品添加物、農薬の評価基準を算出する際に、確固とした生物学的な根拠を提供するモデル系作出に繋がる。

本研究報告書では、1. Nrf2-Keap1 制御系の分子メカニズムの解析、2. 薬剤の急性毒性・晩発性毒性の発症における AhR/Nrf2-Keap1 制御系の関与の検討、3. Nrf2 活性化をもたらす物質の探索、について成果を報告する。

1. Nrf2-Keap1 制御系の活性化機構の分子レベルでの解析

研究要旨

本研究は、薬物代謝に関わる酵素群の遺伝子発現制御機構を転写因子レベルで包括的に解明することを目的とする。その達成のために、以下のような分子生物学実験と動物個体を用いた発生工学実験、そして、ヒトの遺伝子多型の解析を行った。Nrf2-Keap1 制御系の活性化機構の分子レベルでの解析においては、Nrf2、Keap1 それぞれに、親電子性試薬に対する Nrf2 の活性化に関与する複数の機能ドメインが存在することを、*in vitro*、*in transfecto* での実験系から明らかにした。とりわけ、Keap1 分子に存在する 25 個のシステイン残基のうち、親電子性試薬に対する反応性を担っている重要な 2 つの残基を同定し、また、同分子の機能において、細胞骨格であるアクチンとの結合の重要性を示した。このように試験管内実験や培養細胞での実験で得られた結果を、さらに個体レベルで検証するための実験系として、トランスジェニックコンプリメンテーションレスキュー法を確立した。

A. 研究目的

薬物の 1 次代謝産物は、生体内で異物代謝系第 2 相酵素群の発現を誘導する。我々は転写因子 Nrf2 がこれら生体防御酵素群の発現を統一的に制御することを発見し、本知見を同因子の遺伝子破壊マウスを作製・解析して実証した。また、同欠損マウスではアセトアミノフェン等の薬物に対する感受性が亢進していること、すなわち、Nrf2 が薬剤毒性に対する生体防御に重要なことを発見した。さらに、Nrf2 の抑制性制御因子として Keap1 を単離し、同分子が Nrf2 機能を制御していることを生化学的・遺伝学的に証明した。Keap1 による Nrf2 の機能抑制の解除が、生体防御酵素群の誘導の上で鍵となるステップであり、その分子メカニズムを解明する目的で、以下の実験を行った。

B. 研究方法

Nrf2 は、非刺激時においては、細胞質において Keap1 に捉えられてプロテアソームにより分解されている。しかし、異物代謝系第 1 相反応の生成物である親電子性物質の刺激が加わると、Nrf2 は Keap1 から解離して安定化し、核内に移行して転写を活性化する。以下の実験により、Nrf2 が Keap1 から解離する分子機構を解析した。

(1) Nrf2 の分子解剖 これまでに作製してきた Nrf2 分子の様々な欠失変異体に加えて、Nrf2 分子の単位機能ドメインと予想される領域と Gal4-DBD あるいは GFP (緑色蛍光蛋白質) との融合蛋白質を作製した。それらを、一過性遺伝子導入法により培養細胞に強制発現させて、その転写活性化能、細胞内局在、代謝回転速度を指標に、各ドメインの機能を評価した。

(2) Keap1 の分子解剖 Nrf2 と同様に、Keap1 分子の様々な欠失変異体を作製し、培養細胞に対する一過性遺伝子導入実験により、その機能を Nrf2 活性抑制能と親電子性試薬に対する反応性という観点から調べた。また、Keap1 の一つの特徴として、アクチン細胞骨格への結合が認められることから、Nrf2 の抑制能に対するその意義を調べるために、アクチンの脱重合剤存在下での Nrf2 抑制能を検討した。さらに、Keap1 はシステイン残基が非常に多く存在する蛋白質であることから、親電子性物質が直接 SH 基と反応する可能性が考えられたので、化学修飾法と質量分析により、その標的となるシステイン残基の直接の同定を試みた。

(3) 個体レベルでの Keap1 分子機能の検証系の確立 *keap1* 遺伝子欠損マウスは、生後 2—3 週目に上部消化管の異常角化により摂食障害を起こし死亡する。Keap1 分子の生体機能の検討を行うことを目的として、本マウスを利用したトランスジェニックコンプリメンテーションレスキュー法を開発し、野生型 Keap1 分子による *keap1* 遺伝子欠損マウスのレスキュー実験を試みた。そのために、野生型 Keap1 を発現するトランスジェニックマウスを作製した。最初に、Keap1 を発現させる制御領域として、さまざまな組織・細胞系列で機能するニワトリ β -アクチンプロモーターを利用して、トランスジェニックマウスを作製した。一方、*keap1* 遺伝子自身の制御領域を利用す

るために、*keap1* 遺伝子制御機構の解析にも取り組んだ。*keap1* 遺伝子上流域を LacZ レポーター遺伝子に連結し、同構築をマウス受精卵へ導入してトランスジェニックマウスを作製して、LacZ 遺伝子発現を β -galactosidase 活性をモニターすることにより、同領域の転写活性化能を検討した。その結果、角化扁平上皮や肝臓など、*keap1* 遺伝子が発現する主要な組織での発現を再現できる領域を同定し、その領域を利用した野生型 Keap1 過剰発現トランスジェニックマウスを作製した。これら Keap1 過剰発現トランスジェニックマウスが *keap1* 欠損マウスをレスキューできるかどうかを、複合変異マウス作成により調べた。

(4) Nrf2 による転写活性化に必要な因子の個体レベルでの検証系の確立

Nrf2 は親電子性物質や酸化ストレスの刺激時には、細胞質における Keap1 分子による捕捉を逃れることが可能となり、核内へ移行し、標的遺伝子群の転写を活性化する。この際には、種々の制御因子が協調的に機能することが必要であるが、生体内における実際の反応はまだ十分には明らかでない。そこで、Nrf2 による恒常的転写活性化が認められる *keap1* 遺伝子欠損マウスを利用して、ある制御因子が Nrf2 による転写活性化にどれほど重要であるかを評価する手法、すなわち、ノックアウトレスキュー法の確立を試みた。最初の試みとして小 Maf 群因子を選択し、*keap1* 遺伝子欠損マウスにおける Nrf2 の恒常的活性化が、小 Maf 群因子のさらなる欠損によりどのように変化するかを、*keap1::small maf* 複合変異マウスの作成とその解析により検討した。

倫理面への配慮

本研究では遺伝子組換えマウスを実験に使用したが、その飼育、薬剤投与、屠殺にあたっては、動物愛護の精神にのっとり、与える苦痛が最小限になるように配慮した。また、無駄な屠殺を行うことがないように、計画を十分に吟味してから実験を行うようにつとめた。本実験計画は、すでに筑波大学動物実験委員会及び遺伝子組換え安全委員会に申請をおこない、それぞれから承認されている。

C. 研究結果

(1) Nrf2 の分子解剖 Nrf2 の転写活性化に関与するドメインとして、bZip 構造のアミノ末端側に存在する CBP との結合領域と、RNA ポリメラーゼ II の CTD に類似したアミノ酸配列を有する C 末端領域の重要性が示された。CBP との結合領域は、NF-E2 p45 や Nrf1 といった、他の CNC 群因子においても保存されており、クロマチンリモデリング因子である BRG1 依存的な転写活性化に必要であることが明らかになった。また、非刺激時における Nrf2 の分解に関与するドメインとして、Nrf2 分子の最もアミノ末端領域が必要であることが示された。そのカルボキシル末端側に隣接して、Keap1 との相互作用に必要な部分が存在することも明らかになった。

(2) Keap1 の分子解剖 Keap1 は、アミノ末端側から、NTR ドメイン、BTB ドメイン、IVR ドメイン、DGR ドメイン、CTR ドメインに分けられる。Nrf2 との結合には DGR ドメインが必須であるが、Keap1 の機能を発揮するためには、BTB、IVR、DGR のいずれの領域も必要であるという結果が得られた。すなわち、Nrf2 機能の抑制のためには、Keap1 分子全体のコンフォメーションが保たれていることが重要なものと考えられる。また、BTB ドメインおよび IVR ドメインの欠失変異体は、Nrf2 と結合できるにも関わらず Nrf2 分子の分解を促進することができない。このことから、BTB ドメインと IVR ドメインは、Nrf2 分子の分解に重要な機能を果たしている可能性が考えられる。

ところで、アクチン重合阻害剤の添加により、細胞外にトラップされていた Nrf2 が核内へ移行したことから、Keap1 はアクチンフィラメントを足場にして Nrf2 の捕捉と分解を行っているものと推測される。また、化学修飾と質量分析をもちいた解析により、IVR ドメインのシステイン残基に、親電子性試薬が直接結合・作用することが示された。これらのうち、C273 と C288 のシステイン残基は、Keap1 による Nrf2 活性化の制御に重要であることが、培養細胞を用いた遺伝子導入実験から明らかになった。すなわち、Keap1 が

親電子性試薬のセンサー分子として機能し得ることが明らかになった。

(3) 個体レベルでの Keap1 分子機能の検証系の確立 *keap1* 遺伝子の発現制御メカニズムを明らかにするために、その転写開始点を 5'RACE 法により決定したところ、3つの異なるプロモーターと第1エクソンが存在することが明らかになった。これらの使い分けを、いくつかの異なる組織・細胞系列において調べたが、これまでのところ顕著な特異性は認められていない。3つのプロモーターを含む、*keap1* 遺伝子の翻訳開始点上流約 5.7 kbp の領域を LacZ レポーター遺伝子に連結し、トランスジェニックマウスを作製したところ、同マウスでは、食道・前胃の扁平上皮、肝臓、肺胞上皮、神経節細胞などにβ-ガラクトシダーゼ活性が認められ、*keap1* 遺伝子の発現プロファイルをほぼ忠実に再現できることが明らかになった。

そこで、本領域に野生型 Keap1 cDNA を連結し、トランスジェニックマウスを作製した。また、ニワトリβ-アクチンプロモーターにより Keap1 cDNA を発現するトランスジェニックマウスも作製した。これらの Keap1 過剰発現マウスでは、トランスジーンが発現量が高くても低くても、特に表現形に異常は認められなかった。

これらのトランスジェニックマウスを *keap1* 遺伝子欠損マウスと交配して複合変異マウスを作製したところ、いずれの構築でも *keap1* 遺伝子欠損マウスの表現形をレスキューすることができた。しかしながら、アクチンプロモーターを利用したものでは、高発現ラインのみが *keap1* 欠損マウスの致死性の回避を達成することができたのに対して、*keap1* 遺伝子自身の制御領域を利用したものでは、内在性 *keap1* 遺伝子の発現量とほぼ同程度の発現量で、*keap1* 遺伝子欠損マウスの致死性の回避、体重の増加、食道と前胃の異常角化の消失、肝臓における第2相酵素群の異常な誘導の消失が確認された。すなわち、野生型 Keap1 分子を *keap1* 遺伝子の制御領域により発現させることにより、安定した *keap1* 遺伝子欠損マウスのレスキューが可能であることが明らかになった。ここに、Keap1 の変異分子の機能を個体レベルで検証する実験系、トランスジェニックコンプリメンテーションレスキュー法が確立さ

れた。

(4) Nrf2 による転写活性化に必要な因子の個体レベルでの検証系の確立

小 Maf 群因子には、MafG、MafK、MafF の3つが存在するので、*keap1* 遺伝子欠損マウスとそれぞれの小 Maf 群因子遺伝子の欠損マウスとを交配し、2重欠損マウスを作製した。しかし、これらの初期の重複変異マウスはいずれも *keap1* 遺伝子欠損マウスの致死性を回避させることはできなかった。これまでの小 Maf 群因子の解析から、3種類の小 Maf 因子は互いに機能を代償できることが示されているので、次いで、2つの小 Maf 群因子遺伝子と *keap1* の3重欠損マウスの作成を試みた。*mafG::mafK* 2重欠損マウスは、血小板減少による出血傾向が顕著で、出生後まもなく死亡するため、今回の交配実験では除外した。したがって、*mafG::mafF::keap1*、*mafF::mafK::keap1* という2種類の3重欠損マウスを作製し、その表現形を検討した。その結果、前者では *keap1* 欠損マウスの致死性を回避することができ、食道と前胃の異常角化の改善とケラチノサイトにおける Nrf2 標的遺伝子である keratin 6 の発現も正常レベルにまで低下していた。一方、後者は *keap1* 単独欠損マウスと全くかわるところがなかった。このことから、MafG と MafF は Nrf2 による転写活性化に必要であると結論された。これまでの生化学的解析より、これら小 Maf 群因子が Nrf2 のヘテロ2量体形成相手分子として、その転写活性化に貢献していることが推測されていたが、本実験により、そのことが個体レベルで実証された。この手法を発展させ、ある因子の遺伝子破壊マウスを *keap1* 遺伝子欠損マウスと交配し、それが *keap1* 遺伝子変異マウスの表現形をいかにレスキューするかの解析を通して、その因子が生体において Nrf2 の転写活性化にどの程度貢献しているかを検討できる実験系（ノックアウトレスキュー法）が確立可能であることを示している。

D. 考察

Nrf2 は非常に強い転写活性化能を有する転写因子である。生体は、Nrf2 分子の機能を、その蛋白質量と細胞内局在というポイントで制御することにより、

刺激に応じた速やかな反応を可能にしていると考えられる。興味深い点は、Nrf2の強力な転写活性化能が発揮されるトリガーを与えるメカニズムと、その強い転写活性化のメカニズムである。これらの課題は、Nrf2とKeap1の相互作用、Nrf2の分解、Nrf2の核移行、Nrf2の転写活性化能の獲得、Keap1とアクチンフィラメントとの相互作用、といった要素に分けることができ、本研究では、これらのステップにおいて機能する因子のいくつかを同定した。とりわけ、Keap1分子が親電子性試薬のセンサーとしての機能を果たしているという可能性を示唆する結果として、IVRドメインの2つのシステイン残基の重要性を明らかにしたことは、今後のKeap1-Nrf2システムの反応性を変化させる薬剤の開発に大きく役立つものと期待される。

また、Keap1-Nrf2システムの分子機構を、実際の生理的条件下で、統合された環境の個体において検証することは非常に重要であると考えている。なぜならば、培養細胞を用いた実験系では、Keap1とNrf2両者の過剰発現の状態であり、また、それらの量比も恣意的に決められていることから、真に生理的状态での結果を反映しているかどうかは分からないからである。この点を解決するための実験系として、トランスジェニックコンプリメンテーションレスキュー法とノックアウトレスキュー法という2つの*in vivo*システムを確立したことは特筆される。これらを応用することにより、組織・細胞系列特異的、あるいは、時期特異的なKeap1分子の機能・協調的に作用する因子群を明らかにすることが可能となり、Nrf2の転写活性化に必要な因子群のそれぞれの貢献度を評価することが可能になるものと期待される。

E. 結論

Nrf2とKeap1のそれぞれに、親電子性試薬に対するNrf2活性化に関与する複数の機能ドメインが存在することを、*in vitro*、*in transfecto*解析から明らかにした。また、親電子性試薬がKeap1に直接作用することを証明し、Keap1がセンサー分子として機能することを実証した。さらに、これらの結果を個体レベルで検証するための2つの*in vivo*実験系を確立した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Small Maf compound mutants display CNS neuronal degeneration, aberrant transcription and Bach protein mislocalization coincident with myoclonus and abnormal startle response. Katsuoka, F., Motohashi, H., Tamagawa, Y., Kure, S., Igarashi, K., Engel, J.D. and Yamamoto, M. **Mol. Cell. Biol.** **23**, 1163-1174 (2003)
- (2) Influence of *nrf2* genotype on modulation by oltipraz of benzo[a]pyrene-DNA adducts and tumor yield in mice. Ramos-Gomez, M., Dolan, P.M., Itoh, K., Yamamoto, M. and Kensler, T.W. **Carcinogenesis** **24**, 461-467 (2003)
- (3) Modulation of *keap1* and *nrf2* – dependent gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones: IDENTIFICATION OF NOVEL GENE CLUSTERS. Kwak, M.K., Wakabayashi, N., Itoh, K., Motohashi, H., Yamamoto, M. and Kensler, T.W. **J. Biol. Chem.** **278**, 8135-8145 (2003)
- (4) Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. Itoh, K., Wakabayashi, W., Katoh, Y., Ishii, T., O'Connor, T. and Yamamoto, M. **Genes Cells** **8**, 379-391 (2003; cover)
- (5) EPR imaging and analysis of reducing activity in oxidative stress-related Nrf2 transcription factor deficient mice. Hirayama, A., Yoh, K., Nagase, S., Ueda, A., Itoh, K., Morito, N., Hirayama, K., Takahashi, S., Yamamoto, M. and Koyama, A. **Free Rad. Biol. Med.** **34**, 1236-1242 (2003)
- (6) Gene expression of detoxifying enzymes in AhR and Nrf2 compound null mutant mouse. Noda, S., Harada, N., Hida, A., Fujii-Kuriyama, Y., Motohashi, H. and Yamamoto, M. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **303**, 105-111 (2003)
- (7) Distinct specificity of xenobiotic response in AhR-humanized model mouse. Moriguchi, T., Motohashi, H., Hosoya, T., Nakajima, O., Takahashi, S., Ohsako, S., Aoki, Y., Nishimura, T., Tohyama, C., Fujii-Kuriyama, Y., and Yamamoto, M. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **100**, 5652-5657 (2003)

- (8) Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of ARE-driven gene expression. McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J.D. **J. Biol. Chem.** **278**, 21592-21600 (2003)
- (9) Activation of Nrf2 and accumulation of ubiquitinated A170 by arsenic in osteoblasts. Aono, J., Yanagawa, T., Itoh, K., Li, B., Yoshida, H., Kumagai, Y., Yamamoto, M. and Ishii, T. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **305**, 271-277 (2003)
- (10) Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. Nioi, P., McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J. **Biochem. J.** **374**, 337-348 (2003)
- (11) A potential mechanism for the impairment of nitric oxide formation caused by prolonged oral exposure to arsenate in rabbits. Pi, J., Horikuchi, S., Sun, Y., Nikaido, M., Hayashi, T., Yamauchi, H., Itoh, K., Yamamoto, M., Sun, G., Waalkes, M.P., Shimojo, N. and Kumagai, Y. **Free Rad. Biol. Med.** **35**, 102-113 (2003)
- (12) Nrf2 regulates the sensitivity of death receptor signals through intra-cellular glutathione levels. Morito, N., Yoh, K., Itoh, K., Hirayama, A., Koyama, A., Yamamoto, M. and Takahashi, S. **Oncogene** **18**, 9275-9281 (2003)
- (13) *Keap1*-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., Motohashi, H., Noda, S., Takahashi, S., Imakado, S., Kotsuji, T., Otsuka, F., Roop, D.R., Harada, T., Engel, J.D. and Yamamoto, M. **Nature Genetics** **35**, 238-245 (2003)
- (14) Transcription factor Nrf2 is required for the constitutive and inducible expression of multidrug resistance-associated protein1 (Mrp1/Abcc1) in mouse embryo fibroblasts. Hayashi, A., Suzuki, H., Itoh, K., Yamamoto, M. and Sugiyama, Y. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **310**, 824-829 (2003)
- (15) Expression of the aflatoxin B1-8,9-epoxide-metabolizing murine glutathione S-transferase A3 subunit is regulated by the Nrf2 transcription factor through an antioxidant response element. Jowsey, I.R., Jiang, Q., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J.D. **Mol. Pharmacol.** **64**, 1018-1028 (2003)
- (16) Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. Kwak, M.K., Wakabayashi, N., Greenlaw, J.L., Yamamoto, M.

- and Kensler, T.W. **Mol. Cell. Biol.** **23**, 8786-8794 (2003)
- (17) Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy-D^{12,14}-prostaglandin J₂. Itoh, K., Mochizuki, M., Ishii, Y., Ishii, T., Shibata, T., Kawamoto, Y., Kelly, V., Sekizawa, K., Uchida, K. and Yamamoto, M. **Mol. Cell. Biol.** **24**, 36-45 (2004)
- (18) Evaluation of MafG interaction with Maf recognition element arrays by surface plasmon resonance imaging technique. Kyo, M., Yamamoto, T., Motohashi, H., Kamiya, T., Kuroita, T., Tanaka, T., Kawakami, B. and Yamamoto, M. **Genes Cells** **9**, 153-164 (2004)
- (19) Role of Nrf2 in the regulation of CD36 and stress protein expression in murine macrophages: activation by oxidatively modified LDL and 4-hydroxynonenal. Ishii, T., Itoh, K., Ruiz, E., Leake, D.S., Unoki, H., Yamamoto, M. and Mann, G.E. **Circulation Res.** **94**, 609-616 (2004)
- (20) Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: Fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Kang, M-I., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Kensler, T.W. and Talalay, P. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **101**, 2040-2045 (2004)
- (21) Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. Kang, M.I., Kobayashi, A., Wakabayashi, N., Kim, S.G. and Yamamoto, M. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **101**, 2046-2051 (2004)
- (22) Small Maf proteins are transcriptional cofactors for normal keratinocyte differentiation in the Keap1-Nrf2 regulatory pathway. Motohashi, H., Katsuoka, F., Engel, J.D. and Yamamoto, M. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** *in press*

2. 学会発表

Nrf2 and its protein-protein interactions regulate drug-dependent gene induction.

Masayuki Yamamoto. Experimental Biology-ASPET 2003, Division for Drug Metabolism Symposium. "Structural Domains and Motifs: Functional Implications for Drug-sensing Transcription Factors". San Diego Convention

Center, San Diego, April 14, 2003

Transcription factor regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. Masayuki Yamamoto. The Charles E. Dohme Memorial Symposium for "Protection against Cancer: Genes and Chemistry". Vernon B. Mountcastle Auditorium, John's Hopkins University, Baltimore, April 22, 2003

Nrf2-Keap1 Regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. Masayuki Yamamoto. JBS Bio-Frontier Symposium 2003, Tsukuba Convention Center, June 5-7, 2003 (Abstract in Proceedings p. 12)

Principles of chemoprevention. John D. Hayes, Mike McMahon, C. Bonnesen, L. I. McLellan, C. Roland Wolf, Ken Itoh and Masayuki Yamamoto. JBS Bio-Frontier Symposium 2003, Tsukuba Convention Center, June 5-7, 2003 (Abstract in Proceedings p. 14)

The role of Nrf2 in susceptibility to pulmonary oxidant injury. Steven R. Kleeberger, Sekher Reddy, Thomas W. Kensler, Masayuki Yamamoto and Hye-Youn Cho. JBS Bio-Frontier Symposium 2003, Tsukuba Convention Center, June 5-7, 2003 (Abstract in Proceedings p. 15)

The Role and Mechanism of Nrf2/Keap1 System in the Downstream of Cyclopentenone Prostaglandins. Ken Itoh, Mie Mochizuki, Yukio Ishii, Tania O'Connor, Tetsuro Ishii, Kiyohisa Sekizawa, Koji Uchida and Masayuki Yamamoto. JBS Bio-Frontier Symposium 2003, Tsukuba Convention Center, June 5-7, 2003 (Abstract in Proceedings p. 16)

Small Maf proteins are functional partner molecules of Nrf2 in keratinocytes. Hozumi Motohashi, Fumiki Katsuoka, James Douglas Engel and Masayuki Yamamoto. JBS Bio-frontier symposium 2003, Tsukuba Convention Center, June 5-7, 2003 (Abstract in Proceedings p. 18)

Revealing new interactions between the small Maf proteins and the developmental pathway in which they act. James Douglas Engel, Carolyn Jahn, Fumiki Katsuoka, Hozumi Motohashi and Masayuki Yamamoto. JBS Bio-Frontier Symposium 2003, Tsukuba Convention Center, June 5-7, 2003 (Abstract in Proceedings p. 23)

Functional analysis of large Maf transcription factor MafB in vivo. Satoru

Takahashi, Takashi Moriguchi, Michito Hamada, Chuan Zhang, Naoki Morito and Masayuki Yamamoto. JBS Bio-Frontier Symposium 2003, Tsukuba Convention Center, June 5-7, 2003 (Abstract in Proceedings p. 25)

Small Maf compound mutants display central nervous system neuronal degeneration, aberrant transcription, and Bach protein mislocalization coincident with myoclonus and abnormal startle response. Fumiki Katsuoka, Hozumi Motohashi, Yuna Tamagawa, Shigeo Kure, Kazuhiko Igarashi, James Douglas Engel and Masayuki Yamamoto. JBS Bio-Frontier Symposium 2003, Tsukuba Convention Center, June 5-7, 2003 (Abstract in Proceedings p. 33)

Two cysteines of the redox sensor Keap1 are crucial for the repression of Nrf2 transcriptional activity through a complex with actin filaments. Moon-Il Kang, Nobunao Wakabayashi, Akira Kobayashi, Ken Itoh and Masayuki Yamamoto. JBS Bio-Frontier Symposium 2003, Tsukuba Convention Center, June 5-7, 2003 (Abstract in Proceedings p. 36)

Keap1 mediates Nrf2 accumulation in response to electrophiles. Yasutake Kato, Ken Itoh, Katsuyuki Iida and Masayuki Yamamoto. JBS Bio-Frontier Symposium 2003, Tsukuba Convention Center, June 5-7, 2003 (Abstract in Proceedings p. 37)

Characterisation of the mouse glutathione S-transferase Alpha 3 gene: Identification of an antioxidant response element in the gene promoter which mediates Nrf2-dependent gene expression. Jowsey, I.R., Jiang, Q., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J.D. JBS Bio-Frontier Symposium 2003, Tsukuba Convention Center, June 5-7, 2003 (Abstract in Proceedings p. 38)

Electrophile response element-mediated induction of the cysteine/glutamate exchange transporter gene expression. Hiromi Sasaki, Hideyo Sato, Kazumi Kuriyama-Matsumura, Kanako Sato, Kanako Maebara, Hongyu Wang, Michiko Tanba, Ken Itoh, Masayuki Yamamoto and Shiro Bannai. JBS Bio-Frontier Symposium 2003, Tsukuba Convention Center, June 5-7, 2003 (Abstract in Proceedings p. 42)

Transcriptional regulation of zebrafish GSTP gene. Takafumi Suzuki, Yaeko Takagi, Hiroshi Osanai, Makoto Kobayashi and Masayuki Yamamoto. JBS Bio-Frontier Symposium 2003, Tsukuba Convention Center, June 5-7, 2003 (Abstract in Proceedings p. 43)

- Nrf2 regulates the sensitivity of death receptor signals through intra-cellular glutathione levels.* Naoki Morito, Keigyou Yoh, Ken Itoh, Masayuki Yamamoto and Satoru Takahashi. JBS Bio-Frontier Symposium 2003, Tsukuba Convention Center, June 5-7, 2003 (Abstract in Proceedings p. 45)
- Susceptibility to N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine induced urinary bladder carcinogenesis is increased and chemoprotective efficiency of oltipraz is lost in nrf2-deficient mice.* Katsuyuki Iida, Ken Itoh, Hideyuki Akaza and Masayuki Yamamoto. JBS Bio-Frontier Symposium 2003, Tsukuba Convention Center, June 5-7, 2003 (Abstract in Proceedings p. 46)
- Nrf2 controls expression of CD36 by oxidatively modified LDL and 4-hydroxynonenal in murine peritoneal macrophages.* Tetsuro Ishii, Ken Itoh, Emilio Ruiz, David S. Leake, Masayuki Yamamoto and Giovanni E. Mann. JBS Bio-Frontier Symposium 2003, Tsukuba Convention Center, June 5-7, 2003 (Abstract in Proceedings p. 47)
- Activation of Nrf2 and accumulation of ubiquitin-conjugated A170 stress protein in cultured murine osteoblasts by arsenic.* Junko Aono, Toru Yanagawa, Ken Itoh, Hiroshi Yoshida, Yoshito Kumagai, Masayuki Yamamoto and Tetsuro Ishii. JBS Bio-Frontier Symposium 2003, Tsukuba Convention Center, June 5-7, 2003 (Abstract in Proceedings p. 48)
- Disruption of nrf2 gene causes tooth decolorization: iron transport disorder in nrf2 knockout enamel organ.* Toru Yanagawa, Ken Itoh, Akira Yamaguchi, Yasuaki Shibata, Satoru Takahashi, Tetsuro Ishii, Hiroshi Yoshida and Masayuki Yamamoto. JBS Bio-Frontier Symposium 2003, Tsukuba Convention Center, June 5-7, 2003 (Abstract in Proceedings p. 49)
- Transgenic overexpression of MafK suppresses T cell proliferation and function in vivo.* Yoh K. Sugawara T, Motohashi H, Takahama Y, Koyama A, Yamamoto M, Takahashi S. JBS Bio-Frontier Symposium 2003, Tsukuba Convention Center, June 5-7, 2003 (Abstract in Proceedings p. 50)
- Increased susceptibility of Nrf2 knockout mice to diesel exhaust -- accelerated DNA adduct formation in the lung and mutagenicity.* Yasunobu Aoki, Hiromi Sato, Noriko Nishimura, Akiko Hashimoto, Satoru Takahashi, Ken Itoh, Takehiko Nohmi, and Masayuki Yamamoto. JBS Bio-Frontier Symposium 2003, Tsukuba

Convention Center, June 5-7, 2003 (Abstract in Proceedings p. 51)

EPR imaging of reducing activity in Nrf2 transcriptional factor deficient mice. Aki Hirayama, Keigyou Yoh, Sohji Nagase, Atsushi Ueda, Ken Itoh, Naoki Morito, Kouichi Hirayama, Satoru Takahashi, Masayuki Yamamoto and Akio Koyama. JBS Bio-Frontier Symposium 2003, Tsukuba Convention Center, June 5-7, 2003 (Abstract in Proceedings p. 52)

Transcription factor regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. Masayuki Yamamoto. The Second International Symposium on Redox Life Science. Niseko Higashiyama Prince Hotel, Hokkaido August 20-22, 2003

Two domains of Nrf2 cooperatively bind CREB binding protein and synergistically activate transcription. Mechanism of eukaryotic transcription. Ken Itoh, Yasutake Katoh, Eisaku Yoshida, Makoto Miyagishi, Akiyoshi Fukamizu and Masayuki Yamamoto. Cold Spring Harbor Laboratory, August 27-31, 2003

The role and mechanism of Nrf2-Keap1 system in the downstream of cyclopentenone prostaglandins. Ken Itoh, Mie Mochizuki, Yukio Ishii, Kiyohisa Sekizawa, Koji Uchida and Masayuki Yamamoto. The International Meeting of the Society for Free Radical Research-Asia. Cultural Center of Seoul National University, November 6-8, 2003

Role of Nrf2-Keap1 pathway in detoxification of reactive electrophiles. Ken Itoh, Nobunao Wakabayashi, Tetsuro Ishii, Masayuki Yamamoto. International Joint Meeting on Food Factors and Free Radicals in Health & Disease. Kyoto Park Hotel, December 4-7, 2003

Transcription factor regulation of drug metabolizing and antioxidant enzymes and cancer chemoprevention. Masayuki Yamamoto. The 8th Korea-Japan Cancer Research Workshop "Molecular Mechanisms of Tumor Suppression", Okinawa Miyako Hotel, December 19-20, 2003 (Abstract pp. 24-25)

勝岡史城, 本橋ほづみ, 山本雅之. The contribution of small Maf proteins to the expression of detoxification enzyme and oxidative stress-inducible genes. 第4回文部科学省特定領域研究「がん」6領域 ワークショップ 蓼科, 2003年8月27-30日 (講演要旨集 p.)

- Makoto Kobayashi, Takafumi Suzuki, Yaeko Takagi, Yoshiko Wada, Hitoshi Osanai, Masayuki Yamamoto. Nrf2-Keap1 regulation in zebrafish: a key system for cellular defense against electrophiles and reactive oxygen species. 第76回日本生化学会大会, 横浜, 10月15-18日. (発表抄録集 p. 764)
- 京基樹, 山本多恵, 本橋ほづみ, 紙谷光恵, 黒板敏弘, 田中俊之, 川上文清, 山本雅之. 表面プラズモン共鳴イメージング法によるアレイ状に固定化した Maf 認識配列 (MARE) と MafG の相互作用評価. 第26回日本分子生物学会年会. 神戸国際会議場. 12月10-13日 (発表抄録集 p. 572)
- 磯貝真史, 梶原美和子, 川内紫真子, 濱田理人, 森口尚, 山本雅之, 高橋智. c-Maf knockout マウスの骨軟骨組織における表現形解析. 第26回日本分子生物学会年会. 神戸国際会議場. 12月10-13日 (発表抄録集 p. 759)
- 山本多恵, 本橋ほづみ, 京基樹, 紙谷光恵, 黒板敏弘, 川上文清, 田中俊之, 山本雅之. Maf 認識配列 MARE の多様性が小 Maf 群因子 2 量体との親和性に及ぼす影響の網羅的解析. 第26回日本分子生物学会年会. 神戸国際会議場. 12月10-13日 (発表抄録集 p. 957)
- 勝岡史城, 本橋ほづみ, 石井哲郎, 山本雅之. 小 Maf 群因子複合欠失マウスにおける酸化ストレス応答・異物代謝系遺伝子の発現制御. 第26回日本分子生物学会年会. 神戸国際会議場. 12月10-13日 (発表抄録集 p. 957)
- 張川, 森口尚, 梶原美和子, 大石久志, 濱田理人, 森戸直記, 江崎律子, 大根田絹子, James Douglas Engel, 山本雅之, 高橋智. mafA ノックアウトマウスの解析. 第26回日本分子生物学会年会. 神戸国際会議場. 12月10-13日 (発表抄録集 p. 958)

招待講演

Transcription factor regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. Seminars in Cell and

Developmental Biology, Karolinska Institute, Stockholm. July 1, 2003

転写因子 Nrf2 による異物代謝系と酸化ストレス応答系の制御機構. 第16

回バイオメディカル分析化学シンポジウム「ラジカルから生理機能・病態を捉える」, エバーグリーン富士, 富士吉田, 8月3-5日, 2003年
(講演要旨: 薬学雑誌 123 卷 Suppl. 1, pp. 54-55)

細胞癌化とその抑制における転写因子の役割. がん特定6領域合同研究発表会「先端がん」, 学術総合センター 一橋記念講堂, 8月7日, 2003年 (講演要旨集; pp. 174-175)

転写因子と発癌. 第3回神経芽腫研究会特別講演. 慶応大学病院, 信濃町. 9月20日, 2003年

Nrf2-Keap1による酸化ストレス応答. 第27回日本過酸化脂質・フリーラジカル学会大会シンポジウム「酸素ストレス・低酸素ストレスに関わるシグナル伝達」, 日本薬学会長井記念館, 長井記念ホール, 渋谷, 10月30-31日, 2003年 (講演要旨; 過酸化脂質研究 27 卷 22 頁)

転写因子による異物代謝系と酸化ストレス応答系の発現制御機構. 第32回日本環境変異原学会大会シンポジウム「環境応答に対する生体応答の分子機構」, 三重県総合文化センター, 津, 11月26-28日, 2003年 (プログラム要旨集, 52頁)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。