

200400059A

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16年度 総括研究報告書

主任研究者 山本 雅之

平成17(2005)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 山本雅之	
II. 研究報告	
1. 薬剤の毒性発症におけるNrf2-Keap1制御系の重要性 の検討	3
2. <i>nrf2</i> 遺伝子と <i>keap1</i> 遺伝子における遺伝子多型の 同定とヒト疾患と遺伝子多型との相関の検討	14
3. 培養細胞を用いたNrf2/Keap1制御系の分子機構 の検討	18
4. マウス個体におけるNrf2活性化分子機構の解析	23
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・人間総合科学研究科・教授）

I. 総括研究報告

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。

本研究における Nrf2 と Keap1 による生体防御系の制御システムの分子機能解析は、

薬物代謝機構・酸化ストレス応答機構の解明において、世界的な最先端を形成しており、医薬品開発や食生活改善による健康増進という点に、大きく貢献するものと考えられる。すなわち、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。また、食品中に生体防御系の活性化に働く因子に富んだものを含めることができれば、食生活の改変により代謝能の向上や酸化ストレス応答能の向上を図ることが可能になる。また、ヒト疾患と *nrf2* や *keap1* 遺伝子の関連性が確認できれば、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、Nrf2-Keap1 制御系の分子機構の一層の解明により、外界や細胞内の刺激に対する新規の応答機構の同定、薬剤の新たな標的の同定が可能になるものと期待される。

本研究報告書では、1. 薬剤の毒性発症における Nrf2-Keap1 制御系の重要性の検討、2. *nrf2* 遺伝子と *keap1* 遺伝子における遺伝子多型の同定とヒト疾患と遺伝子多型との相関の検討、3. 培養細胞を用いた Nrf2/Keap1 制御系の分子機構の検討、4. マウス個体における Nrf2 活性化分子機構の解析、について成果を報告する。

II. 研究報告

1. 薬剤の毒性発症における Nrf2-Keap1 制御系の重要性の検討

研究要旨

nrf2 遺伝子欠損マウスに対して、ベンツピレンやニトロサミンなどの化学物質を投与して、同マウスが、これらの化学物質に対して易発癌性を示すか否かを検討した。その結果、*nrf2* 欠損マウスは、ベンツピレンやニトロサミンなどの化学物質に対して、易発癌性が著明に亢進していることが観察された。一方、肝臓特異的に *keap1* 遺伝子を欠損したマウスを作成したところ、同マウスは薬剤に対する抵抗性が著明に増大していた。これらの結果から、薬剤の毒性発現抑制と化学発癌抑制における Nrf2 の重要性が実証された。

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、さらに、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 が薬剤急性毒性に対する生体防御に重要な貢献をしていることを発見した。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。そこで、本研究では、究極の薬剤慢性毒性として捉えることができる化学発癌について、その防御に対して Nrf2 により制御される遺伝子群が果たす役割を明らかにすることを目的に、Nrf2 欠損マウスに対する発癌実験を行った。さらに、恒常的に Nrf2 機能を亢進させることが、薬剤毒性に対する防御能の向上につながるかどうかを明らかにするために、肝細胞特異的 *keap1* 遺伝

子破壊マウスの作成を行った。

B. 研究方法

(1) *nrf2* 遺伝子欠損マウスに対する膀胱発癌実験

nrf2 遺伝子欠損マウスと対照の野生型マウスに対して、ニトロサミンを経口投与し、その代謝産物の定量と膀胱発癌の発生頻度とを調べた。その際、Nrf2 の活性化作用を有する薬剤であるオルティプラッツを同時に投与した。

(2) 肝臓特異的 *keap1* 遺伝子欠損マウスに対するアセトアミノフェン投与実験

Nrf2 の恒常的な活性化を実現するために、その抑制性因子である Keap1 の遺伝子破壊マウスを作成した。同マウスでは確かに Nrf2 が恒常的に活性化され、その標的遺伝子群の発現が野生型に比べて顕著に上昇していた。しかし、同時に上部消化管上皮の異常な角化亢進に伴う摂食障害のために、生後 3 週以内に致死となるので、Nrf2 制御下にある生体防御酵素群の発現上昇と生体のストレス抵抗性との関連を十分に検討することはできなかった。そこで、異物代謝に重要な役割を果たす肝臓において、特異的に *keap1* 遺伝子を欠失する条件付き遺伝子破壊マウスを樹立し、その薬剤耐性について検討した。

(3) 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努めた。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* 遺伝子欠損マウスに対する膀胱発癌実験

対照である野生型マウスでは、オルティプラッツの投与により、発癌作用を有するニトロサミンの代謝中間産物が減少し、膀胱発癌の頻度も顕著に減少したが、*nrf2* 遺伝子欠損マウスでは、そのようなオルティプラッツの効果は認められ無かった。ニトロサミン代謝中間体のレベルは高く、また、膀胱発癌発生頻度も高いままであった。

(2) 肝臓特異的 *keap1* 遺伝子欠損マウスに対するアセトアミノフェン投与実験

肝臓特異的 *keap1* 遺伝子欠損マウスは *keap1* 遺伝子全破壊マウスと異なり、生存・生殖がともに可能であった。肝特異的に Nrf2 の核への蓄積が認められ、非ストレス下においても第2相異物代謝酵素群の発現が上昇していた。この肝特異的 *keap1* 欠損マウスに対するアセトアミノフェン肝毒性試験を行ったところ、本変異マウスと野生型マウスでは致死量に明らかな差が見られ、病理組織学的にも、また、生化学的にも、著明に前者の肝障害が軽症であった。

D. 考察

(1) *nrf2* 遺伝子欠損マウスに対する膀胱発癌実験

オルティプラッツの代謝促進機能・発癌抑制機能が、ともに Nrf2 に依存していることが確認された。これは、Nrf2 により制御される因子群が発癌に対して、極めて重要な防御機能を果たしていることを示す結果である。発癌作用を有する親電子性代謝中間体をいかに速やかに代謝して無毒化するかが、発癌に対する生体防御の上で重要であることがわかる。

(2) 肝臓特異的 *keap1* 遺伝子欠損マウスに対するアセトアミノフェン投与実験

この結果は、肝細胞における Nrf2 活性の亢進が標的遺伝子の発現誘導を介して実際に薬物代謝の促進に働いていることを明解に示すものであり、異物代謝・解毒における Nrf2-Keap1 系の重要性を個体レベルで実証するものである。したがって、肝臓において Nrf2 を恒常的に活性化できる薬剤は、個体の薬剤耐性増強に有効であることが強

く示唆される。

E. 結論

Nrf2-Keap1 制御系は、薬剤の毒性発現抑制と化学発癌抑制において極めて重要な役割をはたしていることが実証された。また、肝細胞において、Nrf2 を恒常的に活性化することが、個体の薬剤耐性を増強する上で有効であることが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(原著論文)

1. Gene expression profiling of NRF2-mediated protection against oxidative injury. Cho, H-Y., Reddy, S.P., DeBiase, A., Yamamoto, M. and Kleeberger, S.R. *Free Rad. Biol. Med.* **38**, 325–343 (2005)
2. An activator protein-1-Notch-4 angiogenic vascular remodeling pathway. Wu, J., Iwata, F., Grass, J.A., Elnitski, L., Ohneda, O., Yamamoto, M., and Bresnick, E.H. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 1458-1474 (2005)
3. Transgenic overexpression of GATA-1 mutant lacking N-finger domain causes hemolytic syndrome in mouse erythroid cells. Nakano, M., Ohneda, K., Mukai, H.Y. Shimizu, R., Ohneda, O., Ohmura, S., Suzuki, M., Tsukamoto, S., Yanagawa, T., Yoshida, H., Takakuwa, Y. and Yamamoto, M. *Genes Cells* **10**, 47-62 (2005)
4. Transgenic expression of Bach1 transcription factor results in megakaryocytic impairment. Toki, T., Katsuoka, F., Kanezaki, R., Xu, G., Kurotaki, H., Sun, J., Kamio, T., Watanabe, S., Tandai, S., Terui, K., Yagihashi, S., Komatsu, N., Igarashi, K., Yamamoto, M. and Ito, E. *Blood* in press
5. Nrf2 transcriptionally activates the *mafG* gene through an antioxidant response element. Katsuoka, F., Motohashi, M., Engel, J.D. and Yamamoto, M. *J. Biol. Chem.* **280**, 4483-4490 (2005)
6. Evolutionary conserved N-terminal domain of Nrf2 is essential for the Keap1-mediated degradation of the protein by proteasome. Katoh, Y., Iida, K., Kang, M-I., Kobayashi, A., Mizukami, M., Tong, K.I., McMahon, M., Hayes, J.D., Itoh, K. and Yamamoto, M. *Arch. Biochem. Biophys.* **433**, 342-350 (2005)
7. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the Kelch-like motif region of mouse Keap1. Padmanabhan, B., Scharlock, M., Tong, K.I., Nakamura, Y., Kang, M-I., Kobayashi, A., Matsumoto, T., Tanaka, A., Yamamoto, M. and Yokoyama, S. *Acta Crystallographica* (Section F, Structural Biology and Crystallization Communications) **61**, 153-155 (2005)
8. Essential role of synoviolin in embryogenesis. Yagishita, N., Ohneda, K., Amano, T., Yamasaki, S., Sugiura, A., Tsuchimochi, K., Shin, H., Kawahara, K., Ohneda, O., Ohta, T., Tanaka, S., Yamamoto, M., Maruyama, I., Nishioka, K., Fukamizu, A. and Nakajima, T. *J. Biol. Chem.* In press
9. Restricted expression of constitutively active-aryl hydrocarbon receptor in T lineage cells causes thymus

- involution and suppresses immunization-induced splenocyte increase. Nohara, K., Pan, X., Tsukumo, S., Hida, A., Ito, T., Nagai, H., Inouye, K., Motohashi, H., **Yamamoto, M.**, Fujii-Kuriyama, Y. and Tohyama, C. *J. Immunol.* In press
10. Pi-class glutathione S-transferase genes are regulated by Nrf2 through an evolutionarily conserved regulatory element in zebrafish. Suzuki, T., Takagi, Y., Osanai, H., Li, L., Takeuchi, M., Katoh, Y., Kobayashi, M. and **Yamamoto, M.** *Biochem. J.* In press
 11. UVA irradiation induces Nrf2 activation in dermal fibroblasts: Protective role in UVA-induced apoptosis. Hirota, A., Kawachi, Y., Itoh, K., Nakamura, Y., Xu, X., Banno, T., Takahashi, T., **Yamamoto, M.** and Ohtsuka, F. *Invest. Dermatol.* In press
 12. The distal sequence element of the selenocysteine tRNA gene is a tissue dependant enhancer essential for mouse embryogenesis. Kelly, V.P., Suzuki, T., Nakajima, O., Arai, T., Tamai, Y., Takahashi, S., Nishimura, S. and **Yamamoto, M.** *Mol. Cell. Biol.* in press
 13. GATA transcription factors inhibit cytokine-dependent growth and survival of a hematopoietic cell line through the inhibition of STAT3 activity. Ezoe, S., Matsumura, I., Gale, K., Satoh, Y., Ishikawa, J., Mizuki, M., Takahashi, S., Minegishi, N., Nakajima, K., **Yamamoto, M.**, Enver, T. and Kanakura, Y. *J. Biol. Chem.* In press
 14. Role of 15-deoxy- Δ^{12-14} Prostaglandin J₂ and Nrf2 Pathways in Protection against Acute Lung Injury. Mochizuki, M., Ishii, Y., Itoh, K., Iizuka, T., Morishima, Y., Kimura, T., Kiwamoto, T., Matsuno, Y., Hegab, A. E., Nomura, A., Sakamoto, T., Uchida, K., **Yamamoto, M.** and Sekizawa, K. *Am. J. Res. Cri. Care Med.* In press
 15. Increased dose of Runx1/AML1 acts as a positive modulator of myeloid leukemogenesis in BXH2 mice. Yanagida, M., Osato, M., Yamashita, N., Liqun, H., Jacob, B., Wu, F., Cao, X., Nakamura, T., Yokomizo, T., Takahashi, S., **Yamamoto, M.**, Shigesada, K. and Ito, Y. *Oncogene*, in press
 16. Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -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)
 17. Characterization of the pufferfish Otx2 cis-regulators reveals evolutionarily conserved genetic mechanisms for the vertebrate head specification. Kimura-Yoshida, C., Kitajima, K., Oda-Ishii, I., Tian, E, Suzuki, M., **Yamamoto, M.**, Suzuki, T., Kobayashi, M., Aizawa, S. and Matsuo, I. *Development* **131**, 57-71 (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. Transgenic rescue of GATA-1-deficient mice with GATA-1 lacking a FOG-1 association site phenocopies patients with X-linked thrombocytopenia. Shimizu, R., Ohneda, K., Engel, J.D., Trainor, C.D. and **Yamamoto, M.** *Blood* **103**, 2560-2567 (2004)
 20. 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)
 21. 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)
 22. 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)
 23. Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis. Yoshida, S., Takakura, A., Ohbo, K., Abe, K., Wakabayashi, J., **Yamamoto, M.**, Suda, T., and Nabeshima, Y-i. *Dev. Biol.* **269**, 447-458 (2004)

24. Interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. Imagawa, S., Yamaguchi, Y., Ogawa, K., Obara, N., Suzuki, N., **Yamamoto, M.** and Nagasawa, T. *Respiration* **71**, 24-29 (2004)
25. Small Maf proteins are obligate 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* **101**, 6379-6384 (2004)
26. Nrf2 deficiency improves autoimmune nephritis caused by the *fas* mutation *lpr*. Morito, N., Yoh, K., Hirayama, A., Itoh, K., Nose, M., Koyama, A., **Yamamoto, M.** and Takahashi, S. *Kidney Int.* **65**, 1703-1713 (2004)
27. A constitutively active arylhydrocarbon receptor induces growth inhibition of Jurkat T cells through changes in the expression of genes related to apoptosis and cell cycle arrest. Ito, T., Tsukumo, S., Suzuki, N., Motohashi, H., **Yamamoto, M.**, Fujii-Kuriyama, Y., Mimura, J., Lin, T-M., Peterson, R. E. Tohyama, C. and Nohara, K. *J. Biol. Chem.* **279**, 25204-25210 (2004)
28. Activation of hepatic Nrf2 *in vivo* by acetaminophen in CD-1 Mice. Goldring, C. E. P., Kitteringham, N. R., Elsby, R., Randle, L. E., Clement, Y. N., Williams, D. P., McMahon, M., Hayes, J. D., Itoh, K., **Yamamoto, M.** and Park, B. K. *Hepatology* **39**, 1267-1276 (2004)
29. In vivo and in vitro constant expression of GATA-4 in mouse postnatal Sertoli cells. Imai, T., Kawai, Y., Tadokoro, Y., **Yamamoto, M.**, Nishimune, Y., Yomogida, K. *Mol. Cell. Endocrinol.* **214**, 107-115 (2004)
30. Nrf2 deficiency causes tooth decolorization due to iron transport disorder in enamel organ. Yanagawa, T., Itoh, K., Uwayama, J., Shibata, Y., Yamaguchi, A., Sano, T., Ishii, T., Yoshida, H. and **Yamamoto, M.** *Genes Cells* **9**, 641-651 (cover photo)
31. Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., **Yamamoto, M.** and Hayes, J.D. *J. Biol. Chem.* **279**, 31556-31567 (2004)
32. The transcriptional program of antibody class switching involves the repressor Bach2. Muto, A., Tashiro, S., Nakajima, O., Hoshino, H., Takahashi, S., Sakoda, E., Ikebe, D., **Yamamoto, M.** and Igarashi, K. *Nature* **429**, 566-571 (2004) (Paper Selected for Advanced Online Publication; E-pub May 21, 2004)
33. The transcription factor Nrf2 protects against pulmonary fibrosis. Cho, H-Y., Reddy, S.P.M., **Yamamoto, M.** and Kleeberger, S.R. *FASEB J.* **18**, 1258-1260 (2004)
34. MafT, a new member of the small Maf protein family in zebrafish. Takagi, Y., Kobayashi, M., Li, L., Suzuki, T., Nishikawa, K., and **Yamamoto, M.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 62-69 (2004)
35. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. Kobayashi, A., Kang, M.I., Ohkawa, H., Ohtuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K. and **Yamamoto, M.** *Mol. Cell. Biol.* **24**, 7310-7319 (2004)
36. Identification of polymorphisms in the promoter region of human *NRF2* gene. Yamamoto, T., Yoh, K., Kobayashi, K., Ishii, Y., Kure, S., Koyama, A., Sekizawa, K., Motohashi, H., and **Yamamoto, M.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321**, 72-79 (2004)
37. Do β -globin, *GATA-1* or *EpoR* regulatory domains specifically mark erythroid progenitors in transgenic reporter mice? Suzuki, N., Imagawa, S., Noguchi C. T. and **Yamamoto, M.** *Blood* **104**, 2968-2969 (2004)
38. Multiple, distant *Gata2* enhancers specify temporal and tissue-specific patterning in the developing urogenital system. Khandekar, M. J., Suzuki, N., Lewton, J., **Yamamoto, M.** and Engel, J. D. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 10263-10276 (2004)
39. Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis. Iida, K., Itoh, K., Kumagai, Y., Oyasu, R., Hattori, K., Kawai, K., Shimazui, T., Akaza, H., and **Yamamoto, M.** *Cancer Res.* **64**, 6124-6431 (2004)
40. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. Rangasamy, T., Cho, C.Y., Thimmulappa, R.K., Zhen, L., Srisuma, S.S., Kensler, T.W., **Yamamoto, M.**, Petrache, I., Tuder, R.M., and Biswal, S. *J. Clin. Invest.* **114**, 1248-1259 (2004)

41. A GATA-specific inhibitor (K-7174) rescues anemia induced by IL-1 β , TNF- α or L-NMMA. Imagawa, S., Nakano, Y., Obara, N., Suzuki, N., Doi, T., Kodama, T., Nagasawa, T., and Yamamoto, M. *Blood* **104**, 4300-4307 (2004)
42. Transcription factor Nrf2 is essential for induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, glutathione S-transferases, and glutamate cysteine ligase by broccoli seeds and isothiocyanates. McWalter, G.K., Higgins, L.G., McLellan, L.I., Henderson, C.J., Song, L., Thornalley, P.J. Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J.D. *J. Nutr.* **134**, 3499S-3506S (2004)
43. Leukemogenesis caused by incapacitated GATA-1 function. Shimizu, R., Kuroha, T., Ohneda, O., Pan, X., Ohneda, K., Takahashi, S., Philipsen, S., and Yamamoto, M. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 10814-10825 (2004)

(総説論文)

1. Molecular mechanisms activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of antioxidant genes. Kobayashi, M. and Yamamoto, M. *Antioxidants Redox Signaling* **7**, 3840395 (2005, invited review)
2. Gene expression regulation and domain function of hematopoietic GATA factors. Shimizu, R. and Yamamoto, M. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **16**, 129-136, (2005)
3. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. Ferreira, R., Ohneda, K., Yamamoto, M. and Philipsen, S. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 1215-1217 (2005)
4. Unique function of the Nrf2-Keap1 pathway in the inducible expression of antioxidant and detoxifying enzymes. Kobayashi, A., Ohta, T. and Yamamoto, M. *Methods Enzymol.* **378**, 273-286 (2004, invited review)
5. Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. Itoh, K., Tong, K.I. and Yamamoto, M. *Free Radical Biol. Med.* **36**, 1208-1213 (2004, invited review)
6. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. Motohashi, H. and Yamamoto, M. *Trends Mol. Med.* **10**, 549-557 (2004, invited review)
7. 「酸化ストレスマーカー」(二木鋭雄, 野口範子, 内田浩二編): 第3章 酸化ストレス応答「転写制御」, 山本多恵・山本雅之(2004)
8. 「キーワードで理解する転写イラストマップ」(田村隆明編): 組織特異的遺伝子発現, 小原直・鈴木教郎・山本雅之, pp. 139-149 (2004)
9. 「ヒトゲノム-生命システムの理解と医学への展開」: 遺伝子発現とクロマチン, 西川恵三・山本雅之, *Molecular Medicine* **41** 巻 増刊号, pp. 110-117 (2004)

2. 学会発表

1. *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. ASBMB Annual Meeting and 8th IUBMB Conference. Boston, Massachusetts, June 12-16, 2004.
2. *Role and mechanism of Nrf2/Keap1 system in macrophages in the downstream of cyclopentenone prostaglandins.* Ken Itoh, Mie Mochizuki, Yukio Ishii, Tetsuro Ishii, Kiyohisa Sekizawa, Koji Uchida and Masayuki Yamamoto. 13th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophage 2004. Senri Life Science Center, Osaka, July 1-2, 2004
3. *Nrf2-Keap1: Regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species.* Masayuki Yamamoto. 15th international Symposium on Microsomes and Drug Oxidations: Chemical Biology in the Postgenomic Era. July 4-9, 2004 (Abstract p. 131)
4. *Self-association of GATA1 enhances transcriptional activity.* Keizo Nishikawa, Makoto Kobayashi, Masayuki Yamamoto. 6th International Conference on Zebrafish Development & Genetics, Madison, July 29 - August 2, 2004.
5. *Fine regulation of GATA-1 and GATA-2 gene expression in vivo.* Masayuki Yamamoto. The 14th

- Conference on Hemoglobin Switching. Rosario Resort, Orcas Island, Washington, USA. September 10-14, 2004
6. *Identification of a novel functional domain conferring positive and negative bidirectional regulator property on MafG in megakaryocytes.* Motohashi, H., Katsuoka, F., Francastel, C., Engel, J.D., and Yamamoto, M. The 14th Conference on Hemoglobin Switching, Rosario Report, Orcas Island, Washington, September 10-14, 2004.
 7. *Noninvasive imaging of erythropoiesis in living mice expressing luciferase reporter gene under the control of gata-1 hematopoietic regulatory domain.* Kinuko Ohneda, Mikiko Suzuki, and Masayuki Yamamoto. 14th Conference on Hemoglobin Switching, Orcas Island, Washington, U.S.A, September 10-14, 2004
 8. *Small Maf proteins are dispensable for the expression of globin genes in primitive hematopoiesis.* Katsuoka, E., Motohashi, H., Engel, J.D., and Yamamoto, M. The 14th Conference on Hemoglobin Switching, Rosario Report, Orcas Island, Washington, September 10-14, 2004
 9. *Self-association of GATA-1 is required for erythropoiesis in vivo.* Shimizu, R., Ohneda, K., Nishikawa, K., Trainor, C.D., Yamamoto, M. The 14th Conference on Hemoglobin Switching. Rosario Resort, Orcas Island, Washington, USA. September 10-14, 2004
 10. *Perturbation of hematopoiesis as a consequence of transgene insertion into the proximity of c-myc gene.* Mukai, H.Y., Motohashi, H., Suzuki, N., Ohneda, O., Nagasawa, T., Yamamoto, M. The 14th Conference on Hemoglobin Switching. Rosario Resort, Orcas Island, Washington, USA. September 10-14, 2004
 11. *Rescue of GATA1 null mice by GATA transgenes requires the correct spatio-temporal expression pattern.* Ferreira, R., Wai, A., Shimizu, R., Gillmans, N., Rottier, R., von Lindern, M., Ohneda, K., Yamamoto, M., Grosveld F., Philipsen, S. The 14th Conference on Hemoglobin Switching. Rosario Resort, Orcas Island, Washington, USA. September 10-14, 2004
 12. *Two novel erythroid progenitor fractions expressing GATA-1.* Norio Suzuki, Osamu Ohneda, Naoshi Obara, Shigehiko Imagawa, Masayuki Yamamoto. The 14th Conference on Hemoglobin Switching. Orcas Island. September 10-14, 2004
 13. *Regulatory mechanisms of the Keap1-Nrf2 oxidative stress sensor system.* Masayuki Yamamoto. The 41st Nobel Symposium on Oxygen Biology. Nobel Forum, Karolinska Institute, Stockholm, November 11-13, 2004
 14. *Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of GATA-2 and its contribution to the UV-C-induced downregulation.* Naoko Minegishi, Norio Suzuki, Yukie Kawatani, Masayuki Yamamoto. THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY 46th ANNUAL MEETING, San Diego, California, December 7, 2003 (Publication Only)
 15. *Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species.* Masayuki Yamamoto. The 2nd International Symposium on DNA Metabolism and Chromatin Dynamics in Cellular Responses, Hiroshima University, Hiroshima. December 16-17, 2004
 16. *Conserved gene regulation of detoxifying and antioxidant proteins by the Nrf2-Keap1 pathway in zebrafish.* Makoto Kobayashi, Yaeko Takagi, Li Li, Miki Takeuchi, Takafumi Suzuki, Masayuki Yamamoto :広島大学 21世紀プログラム第2回国際シンポジウム, 広島. 2004年12月16-17日
 17. *フグ Otx2 遺伝子の頭部形態形成過程における発現調節機構.* 木村一吉田千春, 小田一石井いずみ, 鈴木徹, 山本雅之, 小林麻己人, 相澤慎一, 松尾勲. 日本発生生物学会第37回大会, 名古屋. 6月4日-6日
 18. *腫瘍血管新生における HIF-2α の役割.* 山下年晴, 大根田修, 長野真澄, 岩田典子, 山本雅之, 藤井義明. 第5回文部科学省特定領域研究「がん」若手研究者ワークショップ, アートランドホテル蓼科, 8月25-28日
 19. *造血幹細胞の発生と分化を制御する転写因子 GATA-2 のドメイン特異的機能.* 峯岸直子, 川谷幸恵, 山本雅之. 第66回日本血液学会総会, 国立京都国際会館, 京都. 9月17-19日 (講演要旨集 p.285)
 20. *GATA 結合活性阻害・HIF-1 結合活性亢進薬 (K-11706) の経口投与による慢性貧血改善の試み.* 全川重彦, 松本 健, 小原 直, 鈴木教郎, 高橋 智, 長澤俊郎, 山本雅之. 第66回日本血液学会総会,

- 国立京都国際会館, 京都. 9月17-19日 (講演要旨集 p.286)
21. 赤血球型5-アミノレブリン酸合成酵素遺伝子の鉄応答性配列欠失による赤血球でのポルフィリン異常蓄積. 原田祐子, 日下智聖, 田嶋克史, 加藤丈夫, 山本雅之, 中島 修. 第66回日本血液学会総会, 国立京都国際会館, 京都. 9月17-19日 (講演要旨集 p.349)
 22. *GATA-1* 遺伝子変異血液細胞株 (*GAK14*) の樹立と赤血球分化能の解析. 長野真澄, 大根田修, 岩田典子, 清水律子, 山本雅之. 第63回日本癌学会学術総会 福岡国際会議場, 9月29日-10月1日 9月29日~10月1日 (Proceedings p.189)
 23. *An increased dose of RUNX1/AML1 promotes the development of myeloid leukemia: implications for DS-AMKL.* 大里元美, 柳田匡俊, 山下南海子, 岩崎正幸, 中村卓郎, 横溝智雅, 高橋 智, 山本雅之, 重定勝哉, 伊藤嘉明. 第63回日本癌学会学術総会 福岡国際会議場, 9月29日-10月1日 9月29日~10月1日 (Proceedings p.409)
 24. *Oltipraz* による *BBN* 誘発性膀胱発癌抑制における転写因子 *Nrf2* の役割. 飯田勝之, 伊東健, 赤座英之, 山本雅之. 第63回日本癌学会学術総会 福岡国際会議場, 9月29日-10月1日 9月29日~10月1日 (Proceedings p.523)
 25. *The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2.* Akihiko Muto, Satoshi Tashiro, Osamu Nakajima, Hideoto Hoshino, Satoru Takahashi, Eiichiro Sakoda, Dai Ikeba, Masayuki Yammaoto, Kazuhiko Igarashi. 第77回日本生化学会大会. パシフィコ横浜. 10月13-16日 (発表抄録集 p.957)
 26. *A laminar shear stress activates Keap1-Nrf2 system in endothelial cells.* Tomonori Hosoya, Mong-Il Kang, Ken Itoh, Koji Uchida, Masayuki Yamamoto. 第77回日本生化学会大会. パシフィコ横浜. 10月13-16日 (発表抄録集 p.957)
 27. *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. 第77回日本生化学会大会 パシフィコ横浜 10月13-16日 (発表抄録集 p.957)
 28. *Oxidative stress sensor Keap1 regulates rapid turnover of Nrf2 as an adaptor for Cul3-based E3 ligase.* 小林 聡, 姜 文一, 大川裕美, 大辻真希子, 千葉智樹, 山本雅之. 第77回日本生化学会大会. パシフィコ横浜. 10月13-16日 (発表抄録集 p.1031)
 29. *Transgenic overexpression of erythroid-type 5-aminolevulinic synthase causes variegate porphyria in mice: a novel mouse model for acute porphyria.* Xu Gao, Tadashi Yoshida, Masayuki Yamamoto, Osamu Nakajima. 第77回日本生化学会大会. パシフィコ横浜. 10月13-16日 (発表抄録集 p.1125)
 30. 活性化AhRによるT細胞への影響の分子メカニズム. 伊藤智彦, 九十九伸一, 山本雅之, 本橋ほづみ, 鈴木教郎, 藤井義明, 三村純正, 遠山千春, 野原恵子. フォーラム2004-衛生薬学・環境トキシコロジー, 幕張メッセ. 10月25-26日
 31. *B[a]P* を気管内投与した *Nrf2* ノックアウト *gpt delta* マウスの肺中に生じた突然変異スペクトルの解析. 橋本頼子, 天沼喜美子, 松本 理, 日吉孝子, 高野裕久, 増村健一, 伊東 健, 能美健彦, 山本雅之, 青木康展. フォーラム2004-衛生薬学・環境トキシコロジー, 幕張メッセ. 10月25-26日
 32. *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. 第28回日本過酸化脂質・フリーラジカル学会大会 名古屋大学シンポジオン 10月27-28日 (招待講演) .
 33. *Study of cellular defense mechanism using zebrafish system.* Makoto Kobayashi. 第10回小型魚類研究会, 神戸, 11月14日
 34. *Nrf2-dependent induction of pi-class glutathione S-transferase genes.* Yaeko Takagi, Takafumi Suzuki, Hitoshi Osanai, Miki Takeuchi, Li Li, Makoto Kobayashi, Masayuki Yamamoto. 第10回小型魚類研究会, 神戸, 11月14日
 35. 肝臓におけるエリスロポエチンの役割とその遺伝子発現制御機構. 鈴木教郎, 小原 直, 寺社下浩一, 渡部美穂, 鎌田宣夫, 今川重彦, 山本雅之. 第13回腎とエリスロポエチン研究会 新高輪プリンスホテル, 12月4日

36. SUMO化による転写因子 *MafG* の機能変換. 本橋ほづみ, 勝岡史城, 山本雅之. 第27回日本分子生物学会年会. ワークショップ. 神戸ポートアイランド. 12月8-11日 (発表抄録集 p.329)
37. 表面プラズモン共鳴イメージングを用いた *MafG* のホモ2量体とヘテロ2量体の認識配列の網羅的評価. 山本多恵, 京基樹, 紙谷光恵, 田中俊之, 勝岡史城, James Douglas Engel, 本橋ほづみ, 山本雅之. 第27回日本分子生物学会年会. 神戸ポートアイランド. 12月8-11日 (発表抄録集 p.429)
38. 酸化ストレスセンサー *Keap1* の遺伝子 *cSNP* の肺癌細胞を用いた同定とその機能解析. 大辻真希子, 粥川容子, 小林聡, 姜文一, 太田力, 山本雅之. 第27回日本分子生物学会年会. 神戸ポートアイランド. 12月8-11日 (発表抄録集 p.441)
39. トランスジェニックレスキュー法を用いた *Keap1* の個体レベルでの機能解析. 山本多恵, 若林順子, 小林聡, 本橋ほづみ, 山本雅之. 第27回日本分子生物学会年会. 神戸ポートアイランド. 12月8-11日 (発表抄録集 p.441)
40. 肝臓特異的 *Keap1* 欠損マウスはアセトアミノフェン肝毒性に抵抗性を示す. 大川裕美, 本橋ほづみ, 小林聡, 山本雅之. 第27回日本分子生物学会年会. 神戸ポートアイランド. 12月8-11日 (発表抄録集 p.441)
- ゼブラフィッシュ *gstp1* と *gstp2* 遺伝子の転写制御. 高木やえ子, 鈴木隆史, 長内仁, 竹内未紀, 李麗, 中山裕子, 小林麻己人, 山本雅之. 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 2004年12月8-11日 (発表抄録集 p.441)
41. 抗体クラススイッチの転写プログラムには抑制因子 *Bach2* が関与する. 武藤哲彦, 田代聡, 中島修, 高橋智, 迫田英一郎, 山本雅之, 五十嵐和彦. 第27回日本分子生物学会年会. 神戸ポートアイランド. 12月8-11日 (発表抄録集 p.442)
42. 酸化ストレス応答・異物代謝系遺伝子の発現制御に対する小 *Maf* 群因子の多様な貢献. 勝岡史城, 本橋ほづみ, 石井哲郎, 山本雅之. 第27回日本分子生物学会年会. 神戸ポートアイランド. 12月8-11日 (発表抄録集 p.442)
43. *SeCys tRNA* 遺伝子条件付きノックアウトマウスのマクロファージの解析. 鈴木隆史, Vincent Kelly, 中島修, 本橋ほづみ, 西村暹, 山本雅之. 第27回日本分子生物学会年会. 神戸ポートアイランド. 12月8-11日 (発表抄録集 p.442)
44. *HIF-2a* 遺伝子ノックダウンマウスにみられる貧血に対する解析. 岩田典子, 大根田修, 山下年晴, 藤井義明, 山本雅之. 第27回日本分子生物学会年会 神戸ポートアイランド, 12月8-11日 (講演要旨集 p.443)
45. *IPAS/HIF-3a* は低酸素刺激によるエリスロポイエチン産生に関与している. 山下年晴, 大根田修, 長野真澄, 岩田典子, 山本雅之, 藤井義明. 第27回日本分子生物学会年会 神戸ポートアイランド, 12月8-11日 (講演要旨集 p.443)
46. *GATA* 結合活性阻害・*HIF-1* 結合活性亢進薬 (*K-11706*) の経口投与による慢性貧血改善の試み. 今川重彦, 松本健, 小原直, 鈴木教郎, 高橋智, 長澤俊郎, 山本雅之. 第27回日本分子生物学会 神戸ポートアイランド, 12月10-13日 (講演要旨集 p.445)
47. エリスロポエチンの遺伝子発現における *GATA* 配列を介した転写制御. 小原直, 鈴木教郎, 今川重彦, 大根田修, 山本雅之. 第27回日本分子生物学会 神戸ポートアイランド, 12月10-13日 (講演要旨集 p.445)
48. エリスロポエチン遺伝子の肝臓特異的エンハンサーとその機能. 鈴木教郎, 小原直, 金起範, 潘小青, 寺社下浩一, 渡部美穂, 鎌田宣夫, 今川重彦, 大根田修, 山本雅之. 第27回日本分子生物学会 神戸ポートアイランド, 12月10-13日 (講演要旨集 p.445)
49. *c-myb* 遺伝子近傍へのトランスジーン挿入がもたらした造血異常. 向井陽美, 本橋ほづみ, 鈴木教郎, 大根田修, 山本雅之. 第27回日本分子生物学会 神戸ポートアイランド, 12月10-13日 (講演要旨集 p.445)
50. 成体における *GATA-1 N-finger* の機能貢献の個体レベルでの解析. 大根田絹子, 中野真佑, 向井陽美, 清水律子, 大根田修, 大村咲恵, 鈴木未来子, 塚本佐保, 高桑雄一, 山本雅之. 第27回日本分子生物学会年会 神戸ポートアイランド, 12月8-11日 (講演要旨集 p.445)
51. 造血組織発生における *GATA-1* 分子のダイマー化の役割. 清水律子, 大根田絹子, 西川恵三, 山本

- 雅之. 第 27 回日本分子生物学会年会 神戸ポートアイランド, 12 月 8-11 日 (講演要旨集 p. 690)
52. 条件付き遺伝子ノックアウトマウスを用いた *GATA-1* の成体造血における機能解析. 鈴木未来子, 向井陽美, Philipsen, S, 大根田絹子, 山本雅之. 第 27 回日本分子生物学会年会 神戸ポートアイランド, 12 月 8-11 日 (講演要旨集 p. 690)
53. *MafA* 欠損マウスの表現形解析. 江崎律子, 張川, 森口 尚, 梶原美和子, 原田旬子, 下畑 誉, 大石久史, 濱田理人, 森戸直記, 長谷川和輝, 工藤 崇, James Douglas Engel, 山本雅之, 高橋 智. 第 27 回日本分子生物学会年会 神戸ポートアイランド, 12 月 8-11 日 (講演要旨集 p. 697)
54. 酸化ストレスセンサー *Keap1* の *Cul3* 型 *E3 ligase* アダプターとしての機能. 小林 聡, 姜 文一, 大辻真希子, Kit Tong, 千葉智樹, 山本雅之. 第 27 回日本分子生物学会年会. 神戸ポートアイランド. 12 月 8-11 日 (発表抄録集 p. 738)
55. 2-oxoglutarate による *vascular endothelial growth factor*, *erythropoietin* 産生抑制. 松本 健, 今川重彦, 小原 直, 鈴木教郎, 長澤俊郎, 山本雅之. 第 27 回日本分子生物学会 神戸ポートアイランド, 12 月 10-13 日 (講演要旨集 p. 857)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

特になし。

2. *nrf2* 遺伝子と *keap1* 遺伝子における遺伝子多型の同定とヒト疾患と遺伝子多型との相関の検討

研究要旨

薬剤の急性毒性・晩発性毒性の発症における第1相酵素群・第2相酵素群の関与を、個体レベルにおいて明らかにするために、それらの統一的な制御因子である AhR と Nrf2 について、それぞれの機能を変化させた遺伝子改変マウスを作製し、それらの薬剤に対する反応性を調べた。その結果、Nrf2 により制御される遺伝子群の機能は、薬剤の毒性発現の抑制に重要であることが示された。また、ヒトにおける薬剤応答性の個人差の発生に、これら遺伝子の機能的な差異がどれほど影響しているかを明らかにするために、*keap1* 遺伝子と *nrf2* 遺伝子の多型解析を行い、それぞれの遺伝子に複数の多型が存在することを明らかにした。これらの多型が、薬剤投与の副作用による肝障害や急性呼吸不全の発症、あるいは、外来化学物質との関連が深いとされている肺癌の発症と相関があるかどうかを検討したが、今回の解析で用いたサンプルでは、肺癌以外では有意な相関は得られなかった。

A. 研究目的

異物代謝系第1相酵素群と第2相酵素群の協調的な作用により、体内に摂取された薬物は代謝され、体外に排泄される。第1相酵素群は、主として、チトクローム P450 群により触媒されており、薬物を酸化、あるいは、水酸化することにより、反応性の高い代謝中間産物を形成する。摂取された薬剤が、第1相酵素群の誘導的な発現をもたらすが、その作用は、ステロイドホルモン受容体に類似した受容体型転写因子により実現されている。芳香族炭化水素類は、ダイオキシン受容体 (AhR) を活性化することにより、CYP1 族の酵素群を誘導し、フェノバルビタール類は CAR を介して CYP2 族酵素群を誘導する。また、PXR は、合成ステロイド剤を含む様々な化合物により活

活性化されて、CYP3 族の発現をもたらし、PPAR はペルオキシソーム増殖剤や非遺伝毒性発癌剤などにより活性化されて CYP4 族の酵素群を誘導することが、報告されている。第 1 相反応により生成した活性化代謝中間産物は、第 2 相酵素群の発現を誘導し、第 2 相反応により水溶性の高い硫酸基、グルタチオン基、あるいは、グルクロン酸基などと抱合され、排泄される。これまでの我々の研究から、第 2 相酵素群の統一的な制御因子が Nrf2 であることが明らかになった。

本研究の目的は、これら異物代謝系酵素群が、薬物による急性毒性や慢性毒性、晩発性障害などの副作用の発現の防止にどのように貢献しているのかを、それらの統一的な制御因子の機能を操作することを通して明らかにすることである。さらに、ヒトにおけるこれら制御因子の遺伝子多型が存在するかどうかの検討を行い、薬剤に対する反応の個人差の発生に、こうした遺伝子多型がどれほど貢献しているのかを明らかにすること、ひいては、個人の特徴的な反応性に応じた薬剤を適切な投薬量で処方するオーダーメイド薬物治療を可能にすることである。

B. 研究方法

(1) ヒト *nrf2* 遺伝子と *keap1* 遺伝子の多型解析

ヒトの様々な疾患感受性に Nrf2-Keap1 制御系の機能の個体差が関与している可能性を考えて、ヒトの癌組織や皮膚疾患、自己免疫疾患、慢性呼吸器疾患の患者血液など、様々なサンプルを用いて、ヒト *nrf2* 遺伝子と *keap1* 遺伝子の多型解析を行った。それぞれの遺伝子上にプライマーを設計し、ヒトサンプルから得られた DNA を鋳型に PCR を行い、ダイレクトシーケンス反応によりゲノム DNA の配列を決定した。これらから同定された遺伝子多型の出現頻度が、さらに、薬剤投与の副作用による肝障害や急性呼吸不全の発症、あるいは、外来化学物質との関連が深いとされている肺癌の発症と相関があるかどうかを検討した。

(2) 倫理面への配慮

本研究では、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、患者に末梢血の提供を依頼した。この際、事前に本研究の趣旨を、患者本人（患者が未成年者の場合はその保護者）に直接説明し、理解と承諾が得られた場合にのみ、提供をうけた。なお、採血は熟練した医師が行った。血液の提供に同意しない患者が、治療の上で不利益を被ることがないように、十分に配慮し、また、得られた検体は、番号を付して、提供者の氏名は一切同定不可能とすることにより、プライバシーを保護した。なお、この研究の一部は、研究協力者 楊 景堯 講師・小山哲夫 教授により、筑波大学倫理委員会に申請され、承諾を得ている。

C. 研究結果

(1) ヒト *nrf2* 遺伝子と *keap1* 遺伝子の多型を解析

ヒトの癌組織、皮膚疾患、自己免疫疾患、慢性呼吸器疾患の患者血液細胞を用いた DNA 塩基配列の解析から、ヒト *nrf2* 遺伝子のプロモーター領域と *keap1* 遺伝子のアミノ酸翻訳領域とに遺伝子多型が存在することが明らかになった。しかしながら、これらの疾患群と同定された遺伝子多型の頻度との間には、有意な相関を認めることが出来なかった。例外は、*keap1* 遺伝子のアミノ酸翻訳領域におけるアミノ酸置換を伴う多型であり、肺癌組織において特徴的に検出された。さらに、薬剤投与の副作用による肝障害の発症とこれらの遺伝子多型との相関を検討したが、残念ながら、今回調べたサンプルでは有意な相関を認めることはできなかった。

D. 考察

(1) ヒト *nrf2* 遺伝子と *keap1* 遺伝子の多型解析

今回解析した疾患群サンプル数は20検体ほどであり、数として十分であったとは

いいにくい。一方、Kleeberger らは薬剤投与に起因する急性呼吸不全を来した症例群を調べることにより、*nrf2* 遺伝子のプロモーター領域の遺伝子多型との相関を検出することに成功している。したがって、今後例数を増やす、あるいは、より適切な疾患群を選択することにより、有意な相関が得られる可能性があるものと期待される。ヒトにおいて、Nrf2-Keap1 制御系の機能レベルと、薬剤易感受性、あるいは、疾患感受性との相関を明らかにし、今後の本研究の社会に対する貢献度をより大きなものにする必要があると考えている。

E. 結論

現段階では、*nrf2* 遺伝子と *keap1* 遺伝子における遺伝子多型とヒト疾患との相関を十分に明らかにすることは出来なかったが、今後、さらなる解析を行う必要がある課題である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 薬剤の毒性発症における Nrf2-Keap1 制御系の重要性の検討 の項に同じ。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

特になし。

3. 培養細胞を用いた Nrf2-Keap1 制御系の分子機構の検討

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の鍵因子である Nrf2-Keap1 制御系の機能メカニズムを詳細に検討し、薬物代謝機構、ひいては、酸化ストレス応答機構を転写因子レベルで解明することを目的とする。その達成のために、生化学的アプローチ、構造生物学的アプローチ、細胞生物学的アプローチを組み合わせ、Nrf2 による転写活性化機構の詳細な解析と、Keap1 による刺激の感知機構の解析を行った。その結果、転写活性化機構の解析を通して、クロマチンリモデリング因子である BAF 複合体が Nrf2 による転写活性化に重要であることを明らかにした。また、Nrf2 に相互作用する蛋白質複合体の精製を行い、TIF1 β などのメディエーターが含まれていることを明らかにした。さらに、Keap1 による刺激の感知機構の解析を通して、Keap1 分子のうち Nrf2 との結合に関与する DGR ドメインの結晶構造を明らかにした。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、あるいは、定常状態にける Nrf2 の抑制を担っていると考えられる 2 つのシステイン残基の同定にも成功し、さらに、Keap1 が Nrf2 のユビキチン化を促進する E3 結合酵素のアダプター分子として Cullin3 とともに機能することを発見した。

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 の制御因子として Keap1 を単離し、同分子が Nrf2 機能を抑制制御していることを生化学的・遺伝学的