

# 生体システムにおける分子レベルからの環境適応機構

筑波大学 先端学際領域研究センター・科技機構 ERATO 環境応答プロジェクト

山本 雅之

私たちの住んでいる「環境」に関する話題に科学者の目が向くようになり、生物がいかに環境からの刺激に応答しているのか、そのメカニズムを理解することの重要性が認識されるようになってきている。個々の生物の環境適応の特色は、その生物がどのようにして生存のためのエネルギーを得ているのかという点に現れる。環境条件が生物の生存のための土台を形成していることは言うまでもないが、生物はまた環境に応じた形のエネルギー獲得法を取得してきたことも同時に理解しなければならない。動物の生存戦略はシンプルで、他の生物が作り出したエネルギー源を摂取し、酸素を利用してそれを燃焼してエネルギーを獲得する。したがって、動物にとって大切な環境要素はエネルギー源である食物と酸素である。進化の視点から動物の生存戦略を考察すると、その本質は食物と酸素、両者が内在性に持っている毒作用に対して、いかに強力な防御系を形成するかということであったように思われる。

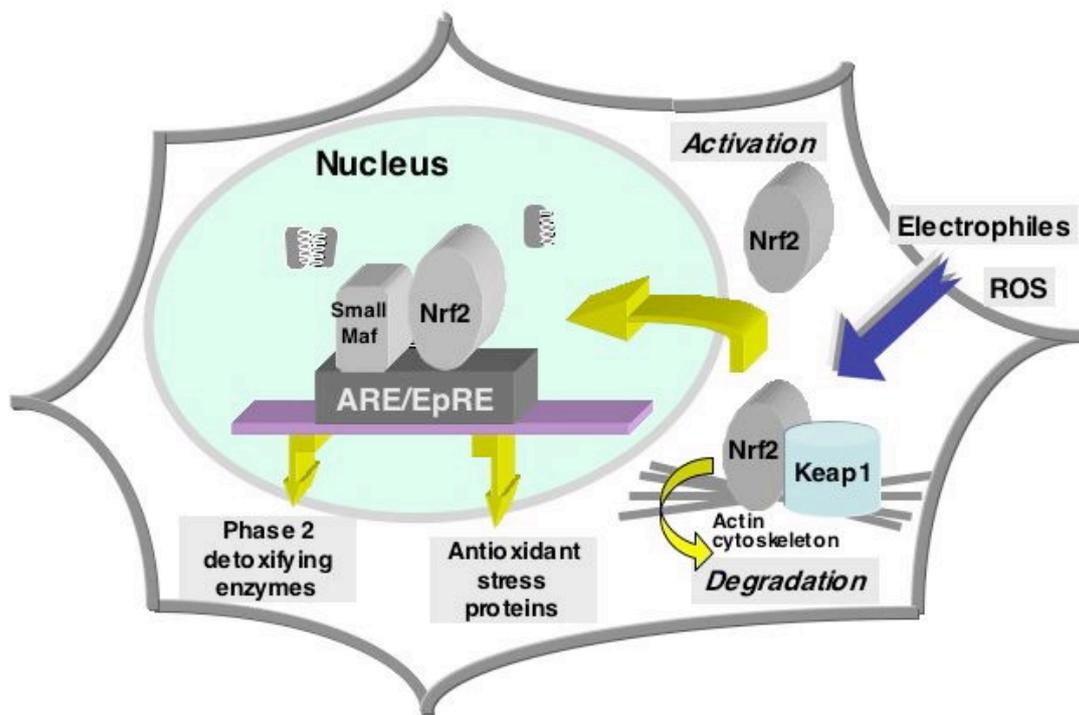
動物は低酸素刺激に対して、エリスロポエチンや血管新生因子などを産生して応答するが、この際には HIF-1 や HIF-2 と呼ばれる転写因子が中心的な機能貢献を行う。これらの転写因子は通常、細胞内で非常に早く壊れているが、低酸素状態になると安定化する。すなわち、低酸素はこれらの転写因子によって感知され、その機能を変換する。一方、ダイオキシン等による第1相解毒化酵素群の遺伝子の発現誘導が核内レセプター型転写因子である Ah 受容体により、また、親電子性毒物による第2相解毒酵素群の遺伝子の発現誘導が Nrf2 転写因子によって仲介されていること（後述）が発見され、動物が毒物・親電子性物質に対する応答系を獲得してきた過程を知る手がかりが得られている。また、Nrf2 は第2相解毒酵素群のみならず、酸素ストレス（高酸素）に対する防御系の主要な酵素群の誘導機構にも貢献していることが明らかにされている。このことは、動物の生存戦略のうえで、酸素と毒物に応答する酵素群が共通の制御機構の下にある場合も存在することを示しており、環境適応の起源や分子進化を考えるうえで非常に興味深い。

さて、Nrf2-小 Maf 因子複合体は、酸化ストレス応答酵素群と第2相解毒酵素群の発現を同時に制御することが明らかになり、化学発癌予防や薬物急性毒性の研究面からも注目されている。細胞内には酸化ストレスに応答するために、還元型グルタチオンが多量に存在している。グルタチオン合成における律速反応をつかさどる $\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素 ( $\gamma$ GCS) は、 $\beta$ -ナフトフラボンやブチルヒドロキシアニソール (BHA) などの様々な外来異物で誘導されることが知られていたが、これらの外来異物は、同様に第2相異物代謝酵素群遺伝子の発現も誘導する。

第2相異物代謝酵素群の遺伝子発現制御領域の解析の結果、抗酸化剤応答領域 (ARE) または親電子性物質応答領域 (EpRE) が同定されたが、これらの配列は異物代謝系酵素遺伝子だけではなく、酸化ストレス応答遺伝子の制御領域にも存在する。一方、興味深いことに、ARE/EpRE と赤血球系転写因子 NF-E2 が認識する配列とはたいへん良く類似していた。さらに、癌原遺伝子 Maf の産物の結合配列 MARE も NF-E2 配列と高い相同性を有していた。このように ARE 配列は NF-E2 配列/MARE 配列と同様の配列特異性を保持していることから、私たちは NF-E2 関連転写因子が ARE を介した遺伝子発現制御過程に関与しているものとする仮説を立てた。NF-E2 配列には、DNA 結合ドメインである塩基性領域ロイシンジッパー構造

を有する CNC 転写因子群と小 Maf 因子から構成される複合体が結合して遺伝子発現制御を行うが、CNC 転写因子群は、複合体形成ならびに DNA 結合活性のために必ずパートナーとして小 Maf 因子を要求する。CNC 転写因子群には、p45, Nrf1, Nrf2, Nrf3, Bach1, Bach2 の 6 分子が同定されているが、これらの中でも、Nrf2 は、その発現が代謝臓器である小腸、腎臓、肺などで著明であることから、私たちは Nrf2 が ARE/EpRE 配列に結合して機能する本態であると考えて、遺伝子破壊マウスを作製し、解析を行った。

Nrf2 遺伝子破壊マウスの腹腔内マクロファージを用いて解析を行ったところ、BHA によるグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) やキノンレダクターゼなどの第 2 相解毒酵素群の誘導発現が顕著に低下していた。また、酸化ストレス応答酵素であるヘムオキシゲナーゼ-1 や  $\gamma$ GCS の誘導発現も著減していた。すなわち、Nrf2 が酸化ストレス応答ならびに異物代謝応答における「鍵」因子であることが明らかとなった。



さて、Nrf2 の蛋白質構造を詳細に検討すると、種間で保存された 6 個のドメインが存在することが明らかになり、私たちはそれらを Neh1-Neh6 ドメインと名付けた。欠失変異体を構築して転写活性化能を検討したところ、Neh2 ドメインは Nrf2 転写活性化に対し抑制的に作用していることが明らかになった。そこで、Neh2 ドメインに結合して Nrf2 の転写活性化能を抑制する分子を同定するために、酵母 two-hybrid 系を用いた検討を行い、新たな蛋白質 Keap1 を同定・単離した。Keap1 の構造は、ショウジョウバエ Kelch タンパク質と類似しており、カルボキシ末端に DGR ドメインを、アミノ末端に BTB ドメインを有している。

ところで、Keap1 の細胞内局在を解析したところ、Keap1 は細胞質に分布した。DGR ドメインはアクチン結合蛋白質によく見いだされるモチーフであることから、Keap1 は細胞質のアクチン細胞骨格に結合していることが示唆された。そこで、培養細胞発現系で Nrf2 と Keap1 の細胞内局在を解析すると、Nrf2 単独では核に集積するのに対して、Keap1 と Nrf2 を共発現

させると Keap1 は Nrf2 の核移行を阻害し細胞質に留めおくように働いた。重要な点は、この系に酸化ストレス物質であるジエチルマレイン酸を添加すると、Keap1 による Nrf2 の細胞質トラップが解除され、Nrf2 が核に移行したことである。このことは、Nrf2-Keap1 システムが酸化ストレスの細胞質センサーとして働き、酸化ストレスに応じて Nrf2 が細胞質から核へ移行して、酸化ストレス応答遺伝子の発現を活性化していることを示す（図参照）。

環境刺激に対する応答機構の分子基盤の研究は、遺伝子発現制御機構の研究、特に誘導性エンハンサーの研究と大きくオーバーラップする。環境刺激に応じて、一群の遺伝子の発現が誘導されたり、抑制されたりすることのメカニズムを知ることは、まさに遺伝子の発現制御機構研究の中心的な課題の一つである。多様で複雑な適応応答機構が、実際には少数の共通したメカニズムによって制御されているとしたら、そのメカニズムを明らかにすることは実験科学者にとってたいへん魅力的なことである。近年の遺伝子発現制御機構の解析の進歩は著しく、ゲノムサイエンスの発展と呼応して、本格的なファンクショナルゲノミクスの時代が到来している。そのような基礎科学の成果を十分に取り入れながら、動物の環境への適応応答の分子機構の解明を進めることはその中の重要課題である。

ところで、この研究分野では、遺伝子破壊（ターゲティング）マウスや遺伝子導入（トランスジェニック）マウスを用いての、個々の応答系遺伝子の個体レベルでの機能解析が活発に行われている。例えば、胎盤型 GST 遺伝子破壊マウスの解析から、そのマウスが化学物質による発癌に高感受性であることが示されている。このようなマウス発生工学の発展は、上述のような適応応答系制御機構の分子レベルでの解析の進展と呼応して、毒物やストレスの鋭敏なモニターマウス系の作製を可能とする。このように、個々の環境応答系の個体レベルでの機能解析、さらに、刺激の感知と応答機構の分子レベルでの解明は、来たるべき未来「環境」における私たちの生存戦略の展望につながるものである。