〈抄録〉第23回 日本臨床薬理学会年会 2002年12月10~11日 大阪

Aldose Reductase による Aldehyde 化合物の代謝と 転写因子 *Nrf2* による転写調節

西 中 徹* 矢 部 千 尋*

【背景・目的】

Aldo-keto reductases (AKRs)は単量体の(α/β)₈-barrel 構造を持った約 320 のアミノ酸からなる NAD(P)(H)依存性の酸化還元酵素の総称である。AKR は哺乳類をはじめ植物、細菌などにおいても見出され、現在までに 100 種類以上の AKR が発見されている。AKRs は幅広い基質特異性を有しており、直鎖状アルデヒド、単糖、ステロイド、プロスタグランジン、芳香族炭化水素等を酸化還元する。このように AKRs は生体内におけるホルモン等の代謝調節ならびに、外来異物や薬物の代謝に深く関与していると考えられている。このような多数の分子種と多様な基質特異性より、AKRs は cytochrome P450 と同様なシステムにより分類分けがなされている。

Aldose reductase (AR)は AKRs の一種であり、AKR1B の酵素に分類される。AR は glucose 代謝の副路である polyol pathway の律速酵素であり、糖尿病合併症の発症に深く関与している¹⁾。一方、AR は他の AKRs と同様に幅広い基質特異性を有しており、ステロイド等の内因性物質をはじめ、cyclophosphamide の代謝産物 acrolein の代謝や、benzo(a)pyrene のジヒドロジオール体の解毒、また脂質過酸化によって生じる 4-hydroxynonenal の代謝に関与することが示唆さ

れている。また AR は転写調節を受けその発現量が増加する。すなわち高浸透圧や活性酸素、NO, methylglyoxal 等によって発現が増加する²⁾。このように AR は cytochrome P450 をはじめとする種々の薬物代謝酵素同様、外来異物等の刺激により発現が増加し、様々な物質の代謝に変化をもたらすことが考えられる。

転写因子 Nrf2 は塩基性領域ロイシンジッパー構造を有する cap'n collar 転写因子群に属し、小 Maf タンパク質群とヘテロダイマーを形成し遺伝子プロモーター上の antioxidant response element (ARE) に結合しその転写を活性化する。Nrf2 は β -naphthoflavone や *t*-butylhydroquinone 等の親電子物質や酸化的ストレスによって活性化され、glutathione S-transferase や NADPH:quinone oxidoreductase などの第2相系薬物代謝酵素の発現を増加させる³⁾。

AR 遺伝子のプロモーター上には2つの ARE コンセンサス配列がパリンドローム状に配置しており、そのすぐ上流には AP-1 site ならびに高浸透圧に応答する tonicity response element (TonE) が存在し、言うなれば multiple stress response region (MSRR) を形成している。これらの配列はマウス、ラット、ヒトの間で高度に保存されており、AR の発現調節において重要な働きを担っていることが示唆される。しかしながら AR の発現調節における Nrf2 の関与については不明であることから、今回著者らはその可能性について検討をおこなった。

* 京都府立医科大学薬理学

〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路の梶井町 465

【方法】

ARE 配列を含むマウス AR 遺伝子 5'-プロモーター領域を luciferase 遺伝子上流に組み込んだレポータープラスミドを Nrf2 発現プラスミドとともに HepG2 細胞に導入後レポーターアッセイをおこない、Nrf2 による AR 遺伝子の活性化について調べた。

【結果】

TonE, AP-1, ARE すべてを含む -1.06kb AR プロモーター領域を有するルシフェラーゼレポーターを用いた解析において、Nrf2 の共発現により AR プロモーターの活性化が認められた。

また、上記プロモーター領域を 5'-上流より順次欠失させたレポーターを用いた解析の結果、TonE と AP-1 の配列を欠失した場合に Nrf2 による転写活性化は消滅した。そこで TonE と AP-1 を含む領域のみを SV40 プロモーター配列を有するルシフェラーゼレポータープラスミドの上流に繋いだコンストラクトを作成し解析した結果、この領域のみでは転写活性化に不十分であった。そこでさらに下流の ARE 配列を含むコンストラクトについて解析した結果、十分な転写活性化が認められた。また TonE 配列は Nrf2 に対する応答には直接関係なく、AP-1 配列と ARE の両方が必要であることがわかった。また、変異体を用いた解析の結果、2つある ARE のうち、下流側の ARE1 が必須であることがわかった。

ARE を含む MSRR 内には他に AP-1 配列と TonE が存在することから、これらの配列に結合する転写因子と Nrf2 との相互作用について検討をおこなった。AP-1 に結合する転写因子 c-Jun の共発現は Nrf2 による転写活性化を抑制した。一方、TonE に結合する転写因子 TonEBP/NFAT5 の共発現は Nrf2 による転写活性化を相乗的に増強した。

【考察】

Nrf2 は AR の転写調節に関与していることが示された。Nrf2 による転写活性化には AR プロモーター上の AP-1 配列と ARE1 が必須であった。

Fig. 1. Aldose reductase gene transcripton is activated by transcripton factor Nrf2.

また Nrf2 による転写活性化において c-Jun は抑制的に、TonEBP/NFAT5 は相乗的に作用することが示された。したがって、AR の転写調節においては様々なストレスによってそれぞれ異なる転写因子を活性化し、それらが複合的に作用しあっていると考えられた。外来から摂取する薬物や化学物質は直接 Nrf2 を活性化したり、酸化的ストレスや増殖刺激を引き起こすことから AR の発現はこれら外来異物によって変化を受けることが大いに考えられる。したがってこのような AR の発現上昇は発癌物質の解毒代謝を促進したり、あるいは逆に医薬品の代謝系に変化をもたらすことによる薬効変化を引き起こすものと考えられる。

【文献】

- 1) Yabe-Nishimura, C. : Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications. *Pharmacol. Rev.*, **50**: 21-33 (1998).
- 2) Nishinaka, T. and Yabe-Nishimura, C. : EGF receptor-ERK pathway is the major signaling pathway that mediates upregulation of aldose reductase expression under oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, **31**: 205-216 (2001).
- 3) Itoh, K., et. al. : An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **236**: 313-322 (1997).