

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16511

研究課題名（和文）sMaf転写因子を中心とした遺伝子発現制御ネットワークの解明

研究課題名（英文）Transcriptional network regulated by sMaf transcription factors

研究代表者

大槻 晃史（Otsuki, Akihito）

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・助教

研究者番号：30778022

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：sMafおよびCNC両転写因子は、細胞内の存在比に応じて様々な組み合わせの二量体を形成する。CNC-sMaf二量体が酸化ストレス応答をはじめ様々な生命現象に関わることは、これまでに多くの研究で実証されている一方で、sMaf因子ホモ二量体に関しては、これまで生体内での機能はほとんど明らかではなかった。本研究では、sMafホモ二量体が制御する標的遺伝子を純粋に評価するため、sMafホモ二量体のみを特異的に発現させることのできる培養細胞系を樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

標的遺伝子制御において、しばしば転写因子は他の転写因子との複合体を形成しゲノム上のDNAモチーフ認識する。しかしながら、細胞内の存在比に応じて様々な組み合わせの二量体を形成しうる転写因子において、特定の組み合わせの転写因子二量体の機能を純粋に評価することは難しい。本研究では、sMaf群転写因子同士を強制的に二量体化（テザリング）することでsMaf因子ホモ二量体の機能を純粋に評価する解析系を構築した。タンパク質のテザリング解析には他にも事例があるが、転写制御での報告は少ない。本手法は、二量体として機能する他の転写因子に対しても応用可能であり有効な解析手法として提案できると考えている。

研究成果の概要（英文）：While many studies have demonstrated that the CNC-sMaf heterodimer is involved in various biological functions, including oxidative stress responses, functions of the sMaf homodimer in vivo has been largely unknown. In this study, we established a cell culture system that can specifically express sMaf homodimers to precisely evaluate the target genes of the sMaf homodimers.

研究分野：遺伝子発現制御

キーワード：転写因子 Maf CNC Nrf2

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体が環境の変化に適切に応答し恒常性を維持するためには、転写因子による空間的に調和のとれた遺伝子発現制御が必須である。転写因子は、単量体あるいは他の転写因子との複合体を形成することで、ゲノム上の DNA モチーフ認識し、標的遺伝子の発現を制御する。

sMaf 群転写因子 (MafF, MafG, MafK) は塩基性領域ロイシンジッパーファミリーに属する転写因子である。sMaf 因子自身は転写活性化ドメインを持たないが、様々な CNC 因子 (Nrf1, Nrf2, Nrf3, NFE2) とヘテロ二量体を形成し、標的遺伝子の発現を誘導する。また、sMaf 群因子は CNC 因子のパートナー分子として機能するだけでなく、それ自身でホモ二量体 (sMaf ホモ二量体) を形成し、標的遺伝子の発現誘導を負に制御すると考えられている。

sMaf および CNC 両因子は、細胞内の存在比に応じて様々な組み合わせの二量体を形成しうる。CNC-sMaf 二量体が酸化ストレス応答をはじめ様々な生命現象に関わることは、これまでに多くの研究で実証されている一方で、sMaf 因子ホモ二量体に関しては、*in vitro* の実験系を用いて標的 DNA 配列に対して親和性を持つことが示されてきたものの、これまで生体内での機能はほとんど明らかではなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、sMaf ホモ二量体を特異的に発現させることのできる培養細胞を樹立し、sMaf ホモ二量体が制御する標的遺伝子を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) MafG ホモ二量体を特異的に発現する培養細胞系の確立

sMaf および CNC 両因子は、細胞内の存在比に応じて様々な組み合わせの二量体を形成しうる。この状況は様々な二量体が存在しうる生体環境において、sMaf ホモ二量体の機能を純粋に評価することを難しくしてきた。そこで本研究では、全ての sMaf 因子を欠失したマウス線維芽細胞株 (G0K0F0 細胞)<sup>[1]</sup>において MafG 同士を強制的にリンカーペプチドで結合させることで、MafG ホモ二量体のみが発現する培養細胞を樹立した。

#### (2) MafG ホモ二量体による標的遺伝子制御

Nrf2-sMaf ヘテロ二量体は様々な親電子性ストレス応答遺伝子の発現を活性化することが知られている。そこで、マウス細胞内で発現した MafG ホモ二量体がこれらの遺伝子の発現に影響を及ぼすか検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) MafG ホモ二量体発現細胞の樹立

G0K0F0 細胞株では、sMaf ホモ二量体のみならず、sMaf を必須のパートナーとする CNC 因子の機能も欠失していることを確認した<sup>[1]</sup>。次に、MafG ホモ二量体を発現させ

るためのプラスミドベクター構築を作製し、得られた構築を GOK0F0 細胞に導入した。ウエスタンブロットにて想定した分子量の MafG ホモ二量体が安定的に発現していることを確認した。なお本研究期間中には、同様の手法を用いた Nrf2-MafG ヘテロ二量体<sup>[1]</sup>および Nrf1-MafG ヘテロ二量体<sup>[2]</sup>の安定発現細胞株樹立に関して、遺伝子発現制御に関する知見とともに共著論文として誌上発表した。

## (2) 親電子性ストレス応答における MafG ホモ二量体による遺伝子発現制御

樹立した細胞株にジエチルマレイン酸 (DEM) を添加することで親電子性ストレス刺激を加え、ストレス刺激応答時の遺伝子発現変化を評価した。DEM は Nrf2-sMaf ヘテロ二量体の機能を活性化することで、抗酸化遺伝子発現を誘導することが知られている。親電子性ストレス誘導の結果、MafG ホモ二量体を過剰発現させた細胞では一部の Nrf2 標的抗酸化遺伝子の発現が減弱していた。リンカーペプチドで結合した二量体を強制的に発現させる実験系の構築を通して、細胞内で実際に sMaf ホモ二量体による抑制性制御が存在することが示唆されていると考えられる。

### <参考文献>

- [1] Katsuoka F, Otsuki A, Takahashi M, Ito S, Yamamoto M. Direct and Specific Functional Evaluation of the Nrf2 and MafG Heterodimer by Introducing a Tethered Dimer into Small Maf-Deficient Cells. *Mol Cell Biol.* 2019 Sep 27;39(20):e00273-19.
- [2] Katsuoka F, Otsuki A, Hatanaka N, Okuyama H, Yamamoto M. Target Gene Diversity of the Nrf1-MafG Transcription Factor Revealed by a Tethered Heterodimer. *Mol Cell Biol.* 2022 Mar 17;42(3):e0052021.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Katsuoka Fumiki, Otsuki Akihito, Hatanaka Nozomi, Okuyama Haruna, Yamamoto Masayuki	4. 巻 42
2. 論文標題 Target Gene Diversity of the Nrf1-MafG Transcription Factor Revealed by a Tethered Heterodimer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e00520-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mcb.00520-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Otsuki Akihito, Okamura Yasunobu, Aoki Yuichi, Ishida Noriko, Kumada Kazuki, Minegishi Naoko, Katsuoka Fumiki, Kinoshita Kengo, Yamamoto Masayuki	4. 巻 41
2. 論文標題 Identification of Dominant Transcripts in Oxidative Stress Response by a Full-Length Transcriptome Analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e00472-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MCB.00472-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishida Noriko, Aoki Yuichi, Katsuoka Fumiki, Nishijima Ichiko, Nobukuni Takahiro, Anzawa Hayato, Bin Li, Tsuda Miyuki, Kumada Kazuki, Kudo Hisaaki, Terakawa Takahiro, Otsuki Akihito, Kinoshita Kengo, Yamashita Riu, Minegishi Naoko, Yamamoto Masayuki	4. 巻 161
2. 論文標題 Landscape of electrophilic and inflammatory stress-mediated gene regulation in human lymphoblastoid cell lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 71-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.freeradbiomed.2020.09.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Katsuoka Fumiki, Otsuki Akihito, Takahashi Mizue, Ito Shin, Yamamoto Masayuki	4. 巻 39
2. 論文標題 Direct and Specific Functional Evaluation of the Nrf2 and MafG Heterodimer by Introducing a Tethered Dimer into Small Maf-Deficient Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e00273-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MCB.00273-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Otsuki A, Yamamoto M.	4. 巻 43
2. 論文標題 Cis-element architecture of Nrf2-sMaf heterodimer binding sites and its relation to diseases.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Pharmacal Research	6. 最初と最後の頁 275-285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12272-019-01193-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Keleku-Lukwete Nadine, Suzuki Mikiko, Panda Harit, Otsuki Akihito, Katsuoka Fumiki, Saito Ritsumi, Saigusa Daisuke, Uruno Akira, Yamamoto Masayuki	4. 巻 3
2. 論文標題 Nrf2 activation in myeloid cells and endothelial cells differentially mitigates sickle cell disease pathology in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 1285-1297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2018017574	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 勝岡史城、大槻晃史、畑中望、山本雅之.
2. 発表標題 テザード二量体が明らかにするNrf2-MafGヘテロ二量体のタンパク質恒常性ストレス応答遺伝子の発現制御に対する貢献.
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akihito Otsuki, Fumiki Katsuoka and Masayuki Yamamoto
2. 発表標題 Detecting alternatively spliced transcript isoforms in oxidative stress response using single-molecule long read sequencing
3. 学会等名 The Environmental Response V (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------