

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07335

研究課題名(和文) ストレス応答転写制御に果たす小Maf群因子の機能とがん悪性化との関連性

研究課題名(英文) The function of small Maf group factors in stress response transcriptional regulation and their association with cancer malignancy

研究代表者

勝岡 史城 (Katsuoka, Fumiki)

東北大学・未来型医療創成センター・教授

研究者番号：30447255

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)：転写因子NRF2と小MAF群因子の二量体は、酸化ストレスに応答した生体防御遺伝子の発現を制御する。脊椎動物では、3種類の小MAF群因子が同定されているが、各因子の機能の違いは充分解析されていなかった。本研究では独自の系を用いて、NRF2-MAFG二量体の性状と同二量体とNRF2-MAFF二量体との機能的差異を解析した。結果、sMAF間で最も多様性に富むC末端領域は、NRF2との二量体による転写活性化には必須でないことが示された。また、NRF2-MAFF二量体は、NRF2-MAFG二量体と同様に各種生体防御遺伝子の転写活性化に寄与できるが、活性化能には違いがある可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特定の小MAF群因子が特定のがんで高発現していることが報告されているが、各小MAF因子の機能の違いは十分に解析されていなかった。今回、独自の解析系を用いて、MAFGとMAFFが基本的に共通した標的遺伝子転写活性化能を有していることが示された。この結果は、がん細胞を対象とした研究においても学術的に重要である。また、近年ヒトゲノムの解析が進み、同定されたパリアントの機能解釈の重要性が増す中で、小MAF群因子のC末端に関して得られた知見は、疾患ゲノム研究においても重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：The NRF2 and small MAF heterodimers regulate the expression of genes involved in the defense response to oxidative stress. In vertebrates, three small MAF proteins have been identified, but the functional differences between these factors have not been fully analyzed. In this study, using an own unique system, we analyzed the characteristics of the NRF2-MAFG dimer and the functional differences between the NRF2-MAFF dimer. As a result, the sMAF C-terminal region, which is the most diverse among sMAFs, is not essential for NRF2-mediated transcriptional activation. Furthermore, while the NRF2-MAFF dimer can contribute to the transcriptional activation of cytoprotective genes similarly to the NRF2-MAFG dimer, the results showed the possible differences in their activation capabilities.

研究分野：遺伝子発現制御

キーワード：酸化ストレス NRF2 小MAF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

塩基性領域-ロイシンジッパー (bZIP) 型転写因子である NRF1 や NRF2 を含む CNC 因子は、小 MAF (sMAF) 群因子とヘテロ二量体を形成し、様々な生体防御遺伝子の発現を制御する。NRF1 と sMAF の二量体は、タンパク質蓄積ストレスに応答して、プロテアソーム関連遺伝子を活性化する。NRF2 と sMAF の二量体は、ストレスに応答して、抗酸化・解毒代謝酵素遺伝子を活性化する。一方で、一部のがん細胞では、NRF1 や NRF2 が恒常的に活性化し、がんの悪性化に寄与することが明らかになっている。ヒトでは3種類の sMAF 群因子 (MAFF, MAFG, MAFK) が同定され、それぞれ、がん細胞の悪性化との関連も報告されている。しかし、sMAF 群因子間の機能の違いは十分に解析されていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、十分解明されていない sMAF 群因子の機能的な差異を、申請者が独自に構築した特定の CNC-sMAF 二量体の機能を評価する解析系を用いて明らかにし、それぞれの sMAF 群因子が正常細胞の恒常性およびがん細胞の機能獲得に果たす役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

CNC 因子と sMAF をリンカーペプチドで融合させたテザード CNC-sMAF 二量体を、sMAF 因子を全て欠失した細胞に導入し、内在性の sMAF ホモ二量体や CNC-sMAF ヘテロ二量体の干渉を受けることなく、特定の CNC-sMAF 二量体の機能を評価できる独自の解析系 (Tethered Dimer Rescue: TDR 系) を用いて、sMAF 因子の機能的な差異を評価する (引用文献)。この目的で、(1) sMAF 因子の C 末端領域の機能解析と、(2) NRF2-MAFF 二量体の機能解析の2つの課題に主に取り組んだ。

4. 研究成果

(1) sMAF 因子の C 末端領域の機能解析

sMAF 群因子の機能的な差異を検討するにあたり、同因子のアミノ酸一次構造上、多様性のある領域に着目した。sMAF 群因子は、DNA 結合に関わる塩基性領域から二量体形成に関わるロイシンジッパー領域までは比較的保存性が高い。しかし、C 末端側は多様性に富んでおり、この領域の重要性を示すことが重要であると考えた。過去の報告で、MAFG の C 末領域は、CNC 因子の一つ p45NE-E2 との二量体の機能において、転写活性化に必須であることが示されている。本研究では、MAFG の C 末領域が NRF2 との二量体の機能に必須であるかを、TDR 系を用いて検討した。

テザード NRF2-MAFG 二量体 (T-N2G) およびテザード NRF2-C 末端欠損 MAFG 二量体 (T-N2GdC) の安定発現細胞を樹立した (図1)。定量的な解析を行うため、過剰発現ではない T-N2G 発現細胞株 (T-N2G-Low) を樹立し、同程度の発現量を示す T-N2GdC 安定発現細胞株を2クローン樹立した (図1)。T-N2G および T-N2GdC とともに、NRF2 活性化剤であるジエチルマレイン酸 (DEM) の処理によって誘導されることが確認された。T-N2GdC は、C 末端領域が欠失していることが、分子量が小さいことでも確認できる (図1)。

樹立した T-N2G 発現細胞と T-N2GdC 発現細胞を DEM で処理し、網羅的な遺伝子発現解析を行うため、RNA シークエンス解析を実施した。発現ベクターのみを導入した細胞をコントロール (Mock) とした。結果、T-N2G 発現細胞で DEM によって誘導される多くの NRF2 の標的遺伝子は、T-N2GdC 発現細胞においても同程度に誘導される

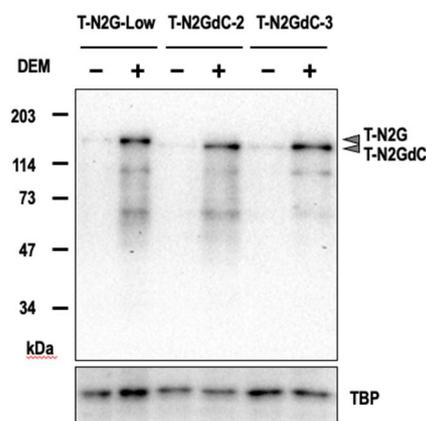


図1. T-N2G発現細胞と同程度のT-N2GdCを発現する安定細胞株を2クローン樹立した

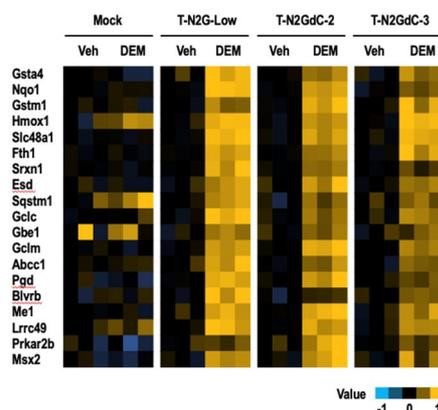


図2. T-N2GdCは、T-N2Gと同様に NRF2標的遺伝子の転写活性化能を有する

ことが示された (図2)。この結果は、MAFG が NRF2 の二量体として転写活性化に寄与する場合において、そのC末端領域、すなわち sMAF 群因子で最も多様性に富む領域は必須ではないことを示している。同領域は、p45NF-E2-sMAF 二量体の巨核球関連遺伝子の転写活性化に対しては、必須であることが示されている。したがって、sMAF 群因子の C 末端領域の必要性は、二量体のパートナーとなる CNC 因子によって異なることが示された。

過去の報告で、MAFG の C 末端領域が核マトリックス分画への同因子の局在に重要であることが示されている (引用文献)。NRF2 および NRF2-MAFG 二量体 (T-N2G) の核内局在を分画法にて確認した結果、核マトリックスが濃縮される核の不溶性分画 (Insoluble) ではなく、可溶性分画 (Soluble) に主に局在することが明らかとなった (図3)。一方で、内在性の MAFG は核の不溶性分画に局在した。また、MAFG の C 末端領域を欠失した NRF2-MAFG 二量体 (T-N2GdC) も、同様に可溶性分画に主に局在し、C 末端領域の核局在に対する寄与は確認されなかった。

以上の結果から、sMAF 群因子で最も多様性に富む C 末端領域の NRF2-MAFG 二量体における機能に対する貢献は、限定されている可能性が示された。他の CNC 因子との二量体における機能に対する貢献については、さらに検証していく必要がある。

(2) NRF2-MAFF 二量体の機能解析

sMAF 群因子間の機能の差異を検討するため、TDR 系を用いて NRF2-MAFG 二量体と NRF2-MAFF 二量体の機能解析を実施した。sMAF 群因子の中で、MAFG と MAFF は相同性が高く、MAFF は MAFG および MAFF と進化的に距離があり、アミノ酸一次構造において独自の構造を持っている。このため、MAFG と MAFF の機能比較を実施した。テザード NRF2-MAFF 二量体 (T-N2F) 安定発現細胞株を樹立し、すでに樹立済みの T-N2G 発現細胞株との比較解析を実施した (図4)。T-N2F 分子は、T-N2G 分子同様に、DEM の処理によって誘導されることを確認した。

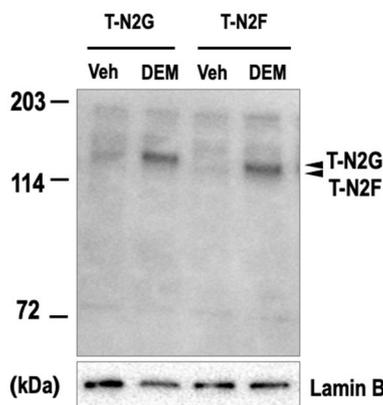


図4. テザードNRF2-MAFF分子の発現

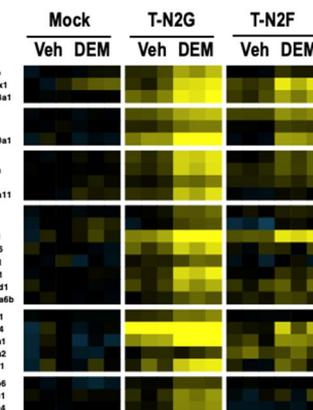


図5. T-N2Fは、T-N2Gと比較して、NRF2標的遺伝子の転写活性化能が弱い

T-N2G 発現細胞と T-N2F 発現細胞を DEM で処理し、網羅的な遺伝子発現解析を行うため、RNA シークエンス解析を実施した。発現ベクターのみを導入した細胞をコントロール (Mock) とした。T-N2F は、T-N2G と比較して、NRF2 標的遺伝子の転写活性化能が弱いことが示された。但し、本解析系ではバルクの安定細胞を用いた解析であるため、T-N2F の NRF2 標的遺伝子転写活性化能を、より定量的に評価するためには、安定細胞のクローニングが必要であると考えている。

<引用文献>

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.

Motohashi H, Fujita R, Takayama M, Inoue A, Katsuoka F, Bresnick EH, Yamamoto M. Molecular determinants for small Maf protein control of platelet production. *Mol Cell Biol*. 2011 Jan;31 (1) :151-62. doi: 10.1128/MCB.00798-10. Epub 2010 Oct 25. Erratum in: *Mol Cell Biol*. 2012 May;32 (10) :2041.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Hirose Wataru, Horiuchi Makoto, Li Donghan, Motoike Ikuko N., Zhang Lin, Nishi Hafumi, Taniyama Yusuke, Kamei Takashi, Suzuki Mikiko, Kinoshita Kengo, Katsuoka Fumiki, Taguchi Keiko, Yamamoto Masayuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Selective Elimination of NRF2-Activated Cells by Competition With Neighboring Cells in the Esophageal Epithelium	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 153 ~ 178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2022.09.004	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 Patel Shaili D., Anand Deepti, Motohashi Hozumi, Katsuoka Fumiki, Yamamoto Masayuki, Lachke Salil A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Deficiency of the bZIP transcription factors Mafg and Mafk causes misexpression of genes in distinct pathways and results in lens embryonic developmental defects	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.981893	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 Kuga Ayumi, Tsuchida Kouhei, Panda Harit, Horiuchi Makoto, Otsuki Akihito, Taguchi Keiko, Katsuoka Fumiki, Suzuki Mikiko, Yamamoto Masayuki	4. 巻 42
2. 論文標題 The -TrCP-Mediated Pathway Cooperates with the Keap1-Mediated Pathway in Nrf2 Degradation <i>In Vivo</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e0056321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mcb.00563-21	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 Okazaki Keito, Anzawa Hayato, Katsuoka Fumiki, Kinoshita Kengo, Sekine Hiroki, Motohashi Hozumi	4. 巻 171
2. 論文標題 CEBPB is required for NRF2-mediated drug resistance in NRF2-activated non-small cell lung cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 567 ~ 578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvac013	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, 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 e0052021
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 Shimizu Ritsuko, Hirano Ikuo, Hasegawa Atsushi, Suzuki Mikiko, Otsuki Akihito, Taguchi Keiko, Katsuoka Fumiki, Uruno Akira, Suzuki Norio, Yumoto Akane, Okada Risa, Shirakawa Masaki, Shiba Dai, Takahashi Satoru, Suzuki Takafumi, Yamamoto Masayuki	4. 巻 6
2. 論文標題 Nrf2 alleviates spaceflight-induced immunosuppression and thrombotic microangiopathy in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-05251-w	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 Aoki Yu-ichi, Taguchi Keiko, Anzawa Hayato, Kawashima Junko, Ishida Noriko, Otsuki Akihito, Hasegawa Atsushi, Baird Liam, Suzuki Takafumi, Motoike Ikuko N, Ohneda Kinuko, Kumada Kazuki, Katsuoka Fumiki, Kinoshita Kengo, Yamamoto Masayuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Whole blood transcriptome analysis for age- and gender-specific gene expression profiling in Japanese individuals	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvae008	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奥山遥奈、畑中望、山本雅之、勝岡史城
2. 発表標題 Nrf2-MafGヘテロ二量体の転写制御におけるMafG C末端の機能
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

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Nrf1-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 勝岡史城
2. 発表標題 シークエンス技術の進歩が支える東北メディカル・メガバンク機構のゲノムコホート
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023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
---------	---------