

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：特定領域研究  
 研究期間：2005～2009  
 課題番号：17054028  
 研究課題名（和文） 血液細胞分化と酸化ストレス応答における DECODE システムの比較解析  
 研究課題名（英文） Comparative Analysis of the DECODE Systems in Hematopoiesis and Oxidative Stress Response  
 研究代表者  
 五十嵐 和彦（IGARASHI KAZUHIKO）  
 東北大学・大学院医学系研究科・教授  
 研究者番号：00250738

## 研究成果の概要（和文）：

転写因子 Bach1、Bach2、MafK が形成する DECODE 複合体をそれぞれ精製し、質量分析を行い、構成因子を特定した。Bach1 は癌抑制因子 p53 と結合し、p53 による酸化ストレス応答性細胞老化を抑制することを示した。この抑制機構として、Bach1 はヒストン脱アセチル化酵素 HDAC1 を p53 標的遺伝子に動員し、ヒストン脱アセチル化を促進し、遺伝子発現を抑えることを証明した。細胞老化実行遺伝子の最小セットを特定した。この他に、B リンパ球分化を制御する DECODE 回路を同定し、その機能を解明した。

## 研究成果の概要（英文）：

DECODE complexes of Bach1, Bach2, and MafK were purified and characterized by using mass spectrometry analysis. Bach1 was found to interact with the tumor suppressor p53 and to inhibit cellular senescence induced by oxidative stress. Bach1 recruits histone deacetylase 1 to some of the p53 target genes and promotes histone deacetylation. In addition, a DECODE gene circuit for the class switch recombination of antibody genes has been identified.

## 交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費        | 間接経費 | 合計          |
|---------|-------------|------|-------------|
| 2005 年度 | 27,600,000  | 0    | 27,600,000  |
| 2006 年度 | 28,400,000  | 0    | 28,400,000  |
| 2007 年度 | 37,300,000  | 0    | 37,300,000  |
| 2008 年度 | 28,400,000  | 0    | 28,400,000  |
| 2009 年度 | 28,400,000  | 0    | 28,400,000  |
| 総計      | 150,100,000 | 0    | 150,100,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：Bach1, Bach2, 転写因子, クロマチン, 発現制御

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現の制御プログラムには、多きく二つの様式があると考えられる。一つは、恒常性維持のプログラムであり、例えば酵素遺伝子が必要な時に on になり、必要なくなる

と off になるメカニズムを支えている。もう一つは、非可逆的変化を生み出すプログラムであり、例えば細胞分化に使われる。後者のプログラムでは、ある遺伝子が発現することにより細胞が次の段階へと非可逆的に進む。

この二つのプログラムの基本原理の違いは未だに不明だが、遺伝子発現のスイッチとして作用する転写因子がクロマチンレベルでどのように作用するか（すなわち、エピジェネティック効果を有するか否か）、下流標的遺伝子にエピジェネティック効果を有するものがあるか否か、などにより規定されると予想される。

## 2. 研究の目的

上に述べた仮説を実証するために、グロビン遺伝子や抗体遺伝子など細胞分化関連遺伝子制御に加え、ヘムオキシゲナーゼ1などストレス応答性遺伝子制御においても機能している転写因子 Bach1 および Bach2 に注目し、以下の点を明らかにする。

(1) Bach1 および Bach2 を含む転写制御複合体を精製し、その構成因子を同定し、個々の機能および複合体としての機能を解明する。

(2) Bach1 および Bach2 複合体の活性制御機構を解明する。特に Bach1 に関しては、ヘムと酸素分圧による制御機構、そして Bach2 に関しては phosphatidyl inositol 経路による制御機構を解明する。

(3) BTB ドメインを介して形成される核内転写因子構造体の構成要素を同定し、その機能を解明する。

(4) Bach1 および Bach2 の生理的標的遺伝子を同定し、エンハンサー解析等を行う。さらに、機能不明の標的遺伝子に関してはノックアウトマウス作成等によりその作用を解明する。

(5) 以上で解明される Bach システムと、Maf や AP-1 など、他の塩基性ロイシンジッパー因子群との協調作用と拮抗作用を検討する。

(6) Bach2 の生理的標的遺伝子候補にコードされる転写因子 Blimp-1 はエピジェネティックな制御により抗体産生を制御する。そこで、Blimp-1 複合体の精製を行い、機能を検討する。

## 3. 研究の方法

当初予定した研究計画は以下の通りであったが、成果に述べるように予想外な知見も多く得られ、随時計画を修正して進めてきた。

(1) Bach1 および Bach2 複合体精製および機能解析

FLAG および HA エピトープで標識された Bach1 あるいは Bach2 を発現する HeLa 細胞株を樹立し、大量培養の後に FLAG 抗体と HA 抗体を用いてアフィニティー精製を行う。得られた沈降物をグリセロール密度勾配遠心やゲル濾過カラムで分離し、Bach1 や Bach2 を含む複合体を回収し、質量分析計を用いて複合体の構成蛋白質群を同定する。さらに、

クロマチン再構成試験管内転写系を用いて複合体の活性を検討する。複合体解析までは五十嵐が担当し、クロマチン再構成系を用いた実験は太田が担当する。

(2) Bach1 および Bach2 複合体の活性制御機構の検討

Bach1 に関しては、ヘムと酸素分圧による制御機構を追求する。ヘム結合により Bach1 の分解が促進されることが判明しているので、ヘム応答性ユビキチン化システムを生化学的および分子生物学的手法を用いて同定する。さらに、このシステムが酸素分圧に応答する可能性を、培養細胞へのトランスフェクション実験などを用いて検討する。一方、Bach2 の細胞内分布は B リンパ球の活性化に際して phosphatidyl inositol 経路により制御されていることがわかっているため、Bach2 リン酸化部位の同定、リン酸化酵素精製、B 細胞リセプターによる制御などを生化学的に行う。

(3) BTB ドメインを介して形成される核内転写因子構造体の解析

Bach2 は PML ボディーに集積し、この場所で転写抑制を行う。これは核内の部位特異的な転写制御機構の存在を示唆する。そこで、研究 a) で発見される Bach2 複合体の構成要素も PML ボディーに集積する可能性を抗体染色等を用いて検討し、さらに PML ボディーにおける転写反応に対する作用を RNA FISH 法などを用いて定量化する。

(4) Bach1 および Bach2 の生理的標的遺伝子の同定解析

ジーンチップや蛋白質 2 次元泳動・質量分析などを用いて、Bach1 や Bach2 ノックアウト細胞で発現の変化している遺伝子を同定する。機能上興味深い候補遺伝子に関してはゲノム情報科学とトランスフェクションアッセイなどを用いてエンハンサー解析を行う。機能不明の標的遺伝子に関してはノックアウトマウス作成、レトロウイルスを用いた過剰発現等を行い、その生理機能を解明する。

(5) Bach DECODE システムと、Maf/AP-1 塩基性ロイシンジッパー因子群との協調作用と拮抗作用

Bach DECODE システムの標的遺伝子が、Maf, Jun, Fos などの AP-1 系転写因子でも制御されている可能性を、それぞれのノックアウト線維芽細胞などを用いて検討する。また、免疫沈降実験などを行い、Bach DECODE 複合体の構成要素が、AP-1 系複合体にも含まれる可能性を検証し、DECODE システムのクロストークの実態を探る。

(6) Blimp-1 複合体の精製機能解析  
Bach2 の生理的標的遺伝子候補にコードされる転写因子 Blimp-1 はエピジェネティックな反応により抗体産生を制御すると考えられる。そこで、a) と同じ手法を用いて Blimp-1

複合体の精製を行い、機能を検討する。さらに、構成要素に関してはBリンパ球での過剰発現実験やRNAi阻害実験を行い、抗体産生への関与を証明する。

#### 4. 研究成果

(1) FLAG-HA 二つのエピトープをBach1に付加し、赤白血病細胞で発現させ、これらエピトープに対する抗体を用いて二段階精製を行い、Bach1複合体を得た。質量分析を行い、癌抑制因子p53を構成因子として特定した。この発見から、Bach1とp53のクロストークを予想し、Bach1ノックアウトマウス由来胎仔線維芽(MEF)細胞を用いて詳細な解析を行った。そして、Bach1ノックアウトMEF細胞は通常培養条件である20%酸素下では早期に細胞老化へ突入すること、3%酸素下ではこの応答は観察されないことを見いだした。20%酸素下という条件は、生体内酸素濃度からするとむしろ高酸素であり、酸化ストレスを誘発することから、Bach1は酸化ストレス応答性の細胞老化を抑制することが考えられた。さらに、この細胞老化はp53をノックアウトあるいはノックダウンすることにより解消されることからp53依存性も示された。

分子機構については、Bach1-ヒストン脱アセチル化酵素HDAC1-p53が三者複合体を形成すること、p53標的遺伝子にこの複合体が動員されること、Bach1ノックアウト細胞ではHDAC1の動員が失われることなどを示し、Bach1はHDAC1をp53標的遺伝子に動員し、ヒストン脱アセチル化を促進し、遺伝子発現を抑えることを証明した。

(2) 上記の結果からBach1はp53標的遺伝子の中でも細胞老化に関わるものを特異的に阻害することが予想された。そこで遺伝子発現プロファイリングとノックダウン実験を組み合わせ、p53で活性化され、Bach1で抑制される遺伝子群を抽出した。これら遺伝子のノックダウンを老化Bach1ノックアウトMEF細胞で行い、再増殖を評価した。単独ノックダウンではいずれの遺伝子も再増殖は認められなかったが、Perp, Pai-1, p21, Noxaを同時にノックダウンすることにより、軽度ながらも再現性良く再増殖が観察された。Rbも細胞老化に関わることから、老化Bach1ノックアウトMEF細胞でノックダウンを行ったところ、p53ノックダウンと比較してごく弱い再増殖が観察された。しかし、Perp, Pai-1, p21, Noxaに加えてRbをノックダウンすることにより、p53ノックダウンと同等の再増殖が観察された。この結果から、p53下流で複数の遺伝子が癌抑制因子pRbとともに細胞老化維持に関わること、そしてそれら標的遺伝子の発現をBach1が抑制することが考えられた。細胞老化のDECODE回

路の実体が明らかになったと言える。

(3) Bach1-p53結合は、p53活性制御に重要と考えられたが、この結合自体がどのように制御されるのか、不明であった。Bach1複合体中に癌抑制因子p19ARFを見だし、これがBach1-p53結合を制御する可能性を考えた。まず、二重精製法により、Bach1-p53複合体とBach1-p19ARF複合体が排他的に形成されていることを示した。培養細胞での過剰発現免疫沈降により、Bach1とp53の結合がp19ARFにより阻害されることを示した。酸化ストレス化においてp19ARFがBach1によるp53阻害を解除し、p53を活性化するという新規制御系を提唱した。

(4) 転写因子Bach2は抗体遺伝子のクラススイッチや体細胞突然変異の実行に必須であるが、これら応答に関わる下流標的遺伝子は不明であった。Bach2ノックアウトB細胞の遺伝子プロファイリング等により、転写因子Blimp-1の発現がBach2欠失により過剰となることを見いだした。Blimp-1遺伝子のエンハンサー解析を行い、Bach2/MafK二量体が直接そのイントロンエンハンサーおよびプロモーター上流エンハンサーに結合し、転写を抑制することを示した。Bach2複合体の解析から、Bach2はヒストン脱アセチル化酵素HDAC3を動員しヒストンの脱アセチル化を促進することを示した。一方、Blimp-1ノックアウトマウスを用いたレスキュー実験から、Bach2ノックアウトマウスB細胞ではBlimp-1が過剰に発現し、これによりAIDの発現が抑制され、抗体クラススイッチが抑えられることを示した。これにより、抗体クラススイッチのDECODE回路の実体を証明することができた。

(5) 転写因子Bach2が形成するDECODE複合体を精製し、Bach2のユビキチン化を促進する新規E3リガーゼ複合体を発見した。このE3複合体はCullin3を足場として二種類のBTB-Kelchタンパク質のヘテロ二量体が基質アダプターとなる、新規のものであった。ノックダウン実験等により、このアダプターがBach2のユビキチン化を促進するとともに、状況によってはむしろ阻害するといった、二面性を有することを見いだした。さらに、新規アダプターの一つはそれ自体がヘムにより安定化することを見いだした。すなわち、ヘムはBTB-Kelchの安定性を増すことによりBach2のユビキチン化を促進するという、新規のヘムDECODE回路を見いだした。

(6) Bach1が補欠分子ヘムを直接結合し、ヘム受容体として機能することを示してきたが、Bach2も同様にヘム受容体として機能することを発見した。ヘムはBach2のDNA結合活性を阻害し、ユビキチン化依存性分解

を促進した。したがって、ヘムは Bach2 を阻害することにより抗体産生や形質細胞分化を制御する可能性がある。近年、細胞障害時に放出されるミトコンドリア構成分子が免疫や炎症を制御することが示されている。ヘムはほぼ全ての細胞に含まれ、特にミトコンドリアに多く存在することから、新規のシグナル分子として液性免疫を制御することが考えられた。

(7) Bach1 や Bach2 とヘテロ二量体を形成するパートナー分子 MafK について、その DECODE 複合体を精製し、質量分析を行った。Parp1、Ku など、20 種以上の結合分子を特定した。その中で S-adenosylmethionine 合成酵素 MATII はこれまで核内での機能が全く報告されていないことから、これに焦点をあて解析を進めた。予想外なことに、MATII の多くは核内に分布すること、MafK により標的遺伝子に動員されること、MATII をノックダウンすることにより MafK 標的遺伝子が脱抑制されることを見いだした。したがって、MATII は MafK の転写コリプレッサーとして作用すると考えられた。極めて重要な発見として、このコリプレッサー作用には MATII の酵素活性が必須であることを強調したい。S-adenosylmethionine (SAM) はヒストンや DNA など、様々なメチル化反応においてメチル基供与体となることから、MATII が標的遺伝子近傍で SAM を供給し、周辺因子のメチル化を促進する可能性が考えられた。

(8) MATII 複合体を精製し、質量分析により 50 以上の MATII 結合分子を特定した。MATII は予想以上に広汎なクロマチン因子、核輸送因子、損傷修復因子等と結合することが判明した。いくつかの因子に関してノックダウン実験を行い、MATII のコリプレッサー機能への関与を調べた。これまでに、Parp-1、CHD4、Baf53a は MafK の転写抑制に必須であることを見いだしている。今後は、これら因子が一つのタンパク質複合体として転写を抑制するのか、検証していく必要がある。

(9) Bach1 と Bach2 が有する BTB ドメインは、タンパク質相互作用モチーフと考えられる。他のタンパク質 BTB ドメインについては構造解析の報告があるが、Bach1 や Bach2 の BTB ドメインについてはこれまで解析されていなかった。そこで、組み換えタンパク質を大量発現精製し、結晶化を試みた。Bach1 BTB ドメインに関しては X 線結晶構造解析まで進むことができ、ホモ二量体を形成すること、この相互作用には複数のヘリックスやループ構造が関与すること、などを見いだした。さらにシステイン残基も相互作用面に存在することから、二量体形成が酸化還元で制御される可能性が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 35 件 (英文論文、全て査読あり))

1. Okada, S., Muto, A., Ogawa, E., Nakanome, A., Katoh, Y., Ikawa, S., Aiba, S., Igarashi, K. and Okuyama, R. Bach1-dependent and -independent regulation of heme oxygenase-1 in keratinocytes. **J. Biol. Chem.** (2010) in press.
2. MacLeod, A.K, McMahon, M., Plummer, S.M., Higgins, L.G, Penning, T.M., Igarashi, K., and Hayes JD. Characterization of the cancer chemopreventive NRF2-dependent gene battery in human keratinocytes: demonstration that the KEAP1-NRF2 pathway, and not the BACH1-NRF2 pathway, controls cytoprotection against electrophiles as well as redox-cycling compounds. **Carcinogenesis**. 30, 1571-1580 (2009)
3. Ito, N., Watanabe-Matsui, M., Igarashi, K., and Murayama, K. Crystal structure of the Bach1 BTB domain and its regulation of homodimerization. **Genes Cells** 14, 1365-2443 (2009)
4. Dohi, Y., Ikura, T., Hoshikawa, Y., Katoh, Y., Ota, K., Nakanome, A., Muto, A., Omura, S., Ohta, T., Ito, A., Yoshida, M., Noda, T., and Igarashi, K. Bach1 inhibits oxidative stress-induced cellular senescence by impeding p53 function on chromatin. **Nature Struct. Mol. Biol.** 15, 1246-1254 (2008)
5. Ochiai, K., Muto, A., Tanaka, H., Takahashi, S. and Igarashi, K. Regulation of the plasma cell transcription factor Blimp-1 gene by Bach2 and Bcl6. **Int. Immunol.** 20, 453-460 (2008)
6. Zenke-Kawasaki, Y., Dohi, Y., Katoh, Y., Ikura, T., Ikura, M., Asahara, T., Tokunaga, F., Iwai, K., and Igarashi, K. Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor Bach1. **Mol. Cell Biol.** 27, 6962-6971 (2007)
7. Ochiai, K., Katoh, Y., Ikura, T., Hoshikawa, Y., Noda, T., Karasuyama, H., Tashiro, S., Muto, A., and Igarashi, K. Plasmacytic transcription factor Blimp-1 is repressed by Bach2 in B cells. **J. Biol. Chem.** 281, 38226-38234 (2006)
8. Omura, S., Suzuki, H., Toyofuku, M., Ozono, R., Kohno, N., and Igarashi, K. Effects of genetic ablation of bach1 upon smooth muscle cell proliferation and atherosclerosis after cuff injury. **Genes Cells** 10, 277-285 (2005)

[学会発表] (計 45 件)

1. Cross-talk between Bach1, NF- $\kappa$ B, and IL-6 in epithelial-mesenchymal transition. Brydun, A., Nakanome A., Matsumoto, M., Ota, K., Dohi, Y.

and Igarashi, K., American Association for Cancer Reserch International Conference on Frontiers in Basic Cancer Research (2009.10.8-11, Boston, USA)

2. 核内メチル化反応を支えるタンパク質ネットワーク. 五十嵐和彦 日本薬学会シンポジウム (2010.3.29.岡山コンベンションセンター)

3. Regulation of cell proliferation by the heme-Bach1 pathway. Kazuhiko Igarashi Gordon Research Conference on Tetrapyrroles, Chemistry and Biology of. (2006.7.23-28, Newport, RI, USA)

4. Heme-mediated gene regulation in mammalian cells. K. Igarashi, Y. Zenke, and Y. Dohi Cold Spring Harbor Laboratory Meeting “Mechanisms of eukaryotic transcription” (August 31-September 4, 2005.マイアミ. USA)

[図書] (計 4 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

五十嵐 和彦 (IGARASHI KAZUHIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00250738

### (2) 研究分担者

武藤 哲彦 (MUTO AKIHIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：80343292