

令和 3 年 4 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08617

研究課題名(和文) 環境ストレス応答転写因子群の標的遺伝子選択特異性の分子機構解明

研究課題名(英文) Target gene specificity of transcription factors involved in environmental stress response

研究代表者

勝岡 史城 (KATSUOKA, FUMIKI)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・教授

研究者番号：30447255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：活性酸素や毒物、細胞の機能不全といったストレスに対して、細胞は生体防御遺伝子群の発現をオンにし適応する。このようなストレス応答遺伝子の発現制御の一部は、bZIP型転写因子であるCNC因子と小Maf群因子の二量体によって制御されている。本研究では、特定のCNC-小Maf二量体の機能を純粋に評価できる新規の解析系を確立し、この解析系によって、CNC因子に属するNrf1とNrf2が同じDNA結合配列を利用しながら、異なる標的遺伝子選択特異性を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

次世代シーケンス技術の発展により、包括的なヒト全ゲノム情報が蓄積しつつある。そして蓄積したゲノム情報の、機能アノテーション(意味付け)が重要となっている。しかしながら、機能的に重複したファミリーを形成する転写因子の正確な機能や、その因子が機能する遺伝子発現制御領域のアノテーションは不足している。本研究では、新規に確立した解析系を用いることで、Nrf1-MafG、Nrf2-MafG二量体の分子としての機能解明に取り組み、両者の結合配列に違いはないものの、機能的な点で明確な差異があることを実証した。これら情報は、遺伝子発現制御の分子機構の理解に役立つものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In response to oxidative, xenobiotic stresses and cellular dysfunction, cells turn on a battery of cytoprotective genes to cope with them. These stress responses are regulated in part by various combinations of heterodimers composing bZIP transcription factors, CNC (Nrf1, Nrf2, Nrf3, p45 NFE2) and small Maf proteins (MafF, MafG, MafK). In this study, we established a new assay system, which allows us to analyze the function of each CNC-sMaf dimer specifically without interference from other endogenous CNC-sMaf dimers or sMaf homodimers. Using this system, together with next generation sequencing analyses, we have clearly shown that Nrf1-MafG and Nrf2-MafG heterodimers show different target gene specificity, while they bind to the same DNA sequences.

研究分野：遺伝子発現制御

キーワード：Nrf1 Nrf2 小Maf ストレス応答

### 1. 研究開始当初の背景

生物は、外来異物、活性酸素種などの様々なストレスに対して、生体防御遺伝子群を統一的に発現誘導する。このシステムは主に複数の CNC 群因子 (Nrf1, Nrf2, Nrf3, p45 NFE2) と sMaf 群因子 (MafF, MafG, MafK) のヘテロ二量体によって制御されている。CNC 群因子の中で、Nrf2 と Nrf1 の機能は特に良く研究されている。Nrf2 は、通常細胞質において Keap1 E3 リガーゼ複合体を介して分解されている。しかし、Keap1 がストレスを感知すると Nrf2 の分解が止まり、Nrf2 は核に移行して sMaf と二量体を形成し、抗酸化剤応答配列 (ARE) に結合して抗酸化・解毒代謝酵素遺伝子群の発現を上昇させる。一方、Nrf1 は小胞体に局在しており、品質不良タンパク質蓄積ストレスにより活性化する。Nrf1 は、核に移行し sMaf と二量体を形成して、プロテアソームサブユニット遺伝子や脂質代謝関連の遺伝子の発現を上昇させる。

Nrf1 と Nrf2 が構造上極めて類似しているにも関わらず、異なる標的遺伝子を選択的に活性化している点である。しかし、Nrf1 と Nrf2 の結合する DNA 配列には差異は見出されていない。即ち、両因子がどのように特定の標的遺伝子群を選択し、それらの発現を活性化しているのかは不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、CNC 群因子の機能が sMaf に依存する点に着目し、sMaf 群因子の完全欠失細胞株を用いて、個々の CNC-sMaf 二量体の特異的機能を評価する独自の解析系を樹立する事を目的とした。また、本系を活用して、各 Nrf1 と Nrf2 の機能を個別に評価し、シス配列の差異を解析する事を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) CNC-sMaf テザード分子による sMaf 三重欠失細胞相補レスキュー系の確立

sMaf 三重欠失マウス由来の線維芽細胞では、sMaf 群因子の機能が完全に欠損しているだけでなく、sMaf に依存した Nrf1 と Nrf2 を含む全ての CNC 因子の機能も欠損している。この細胞系に対して、特定の CNC と sMaf 因子をリンカー配列で結合した二テザード量体分子を発現させ、その機能を相補レスキューすることで、CNC-sMaf 二量体機能を個別に解析できる系を確立する。まずは Nrf2 と MafG のテザード分子を作成することで、この系の確立を試みる。

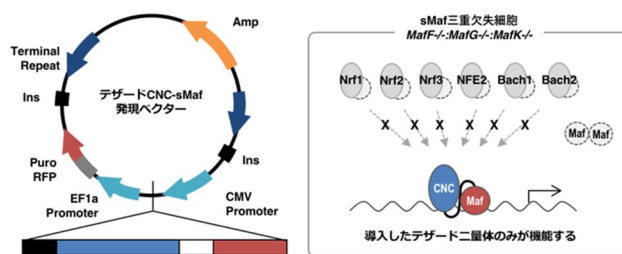


図1 CNC-sMafテザード分子によるsMaf三重欠失細胞相補レスキュー系

#### (2) Nrf1, Nrf2 の分子機能の差異を明らかにする

上記で樹立した系を用いて、Nrf1 と MafG のテザード分子の機能を評価し、Nrf1 と Nrf2 の標的遺伝子選択特異性の差異を、RNA シークエンスによる包括的な遺伝子発現解析、クロマチン免疫沈降 (ChIP) シークエンスによるゲノムワイドな結合部位の解析により明らかにする。また、CNC 因子のドメイン機能相関解析を実施し、標的遺伝子選択の特異性が、DNA 結合特異性で規定されるのか、転写共役因子リクルート等で規定されるのか、その分子メカニズムを解明する。

### 4. 研究成果

#### (1) CNC-sMaf テザード分子による sMaf 三重欠失細胞相補レスキュー系の確立

Nrf2-MafG のテザード分子 (T-N2G) を作成し、sMaf 三重欠失細胞に導入し、安定発現細胞株を樹立した。T-N2G 分子が、Nrf2 の活性化剤であるジエチルマレイン酸 (DEM) の処理により、予想される分子量として核に蓄積する事を確認した。定量 PCR による遺伝子発現解析では、DEM 処理により、T-N2G 発現細胞でのみ、NAD (P) H キノンオキシドレダクターゼ 1 (NQO1), グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) A4 といった Nrf2 の代表的な標的遺伝子が活性化する事を確認し、導入したテザード分子が機能的である事を確認した。

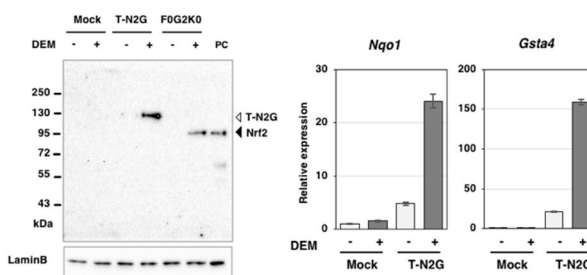


図2 DEM依存的なNrf2-MafGテザード分子の蓄積と標的遺伝子の活性化

次に、T-N2G 分子によって活性化される遺伝子を包括的に解析するため、RNA シークエンスを実施した。その結果、T-N2G 分子は、Nrf2 の標的遺伝子である抗酸化酵素遺伝子、解毒代謝酵素遺伝子、ABC トランスポーター、代謝関連遺伝子等の一群を活性化することが示された。空ベクターを導入した細胞 (Mock) では、活性化しないため、T-N2G 依存的な活性化であることが示された。一方、T-N2G 分子は、Nrf1 の標的遺伝子であるプロテアソームサブユニット遺伝子の一類を活性化しない事が明らかとなった。Nrf2-MafG 二量体の標的遺伝子選択特異性が、Nrf1 と厳密に区別されている事が示された。

次に、T-N2G のゲノム結合プロファイルを明らかにするため、ChIP シークエンス解析を実施した。その結果、CNC-binding element (CsMBE) が濃縮されることが確認された。この配列は、TRE シークエンス Core の TGASTCA の片側が CNC 因子の好む A または G であり、もう片側が sMaf 因子の好む GC である。このモチーフの他に、T-N2G 結合部位を中心に、50 塩基程度離れた場所に別のモチーフが濃縮された。このモチーフは、げっ歯類特異的な SINE B2 ファミリーに属するレトロトランスポゾンである事が明らかとなった。この結果は、トランスポゾンが進化の過程で Nrf2 の転写制御領域の拡張に寄与した可能性を示唆している。同様の結果は、我々のヒト不死化リンパ球を用いた Nrf2 のゲノムワイドな結合解析でも明らかになり、ヒトの場合は LINE1 が貢献している事が示唆されている (引用文献 )

これらの結果は、T-N2G 分子を用いた sMaf 三重欠失細胞相補レスキュー系が、Nrf2-MafG 二量体の機能を評価する事ができることを示し、また、同時に sMaf が Nrf2 の二量体のパートナー因子であるとするこれまでの主張を更に強く指示する結果でもあった。これらの結果は、引用文献 で誌上発表を行った。

次に、確立した CNC-sMaf テザード分子による sMaf 三重欠失細胞相補レスキュー系を用い、Nrf1-MafG テザード分子 (T-N1G) の機能を評価した。その結果、T-N1G 分子は、プロテアソーム阻害剤 MG132 の処理によって、自身の標的遺伝子であるプロテアソーム関連遺伝子を活性化するだけでなく、Nrf2 の標的である抗酸化・解毒代謝関連の遺伝子群を広範に活性化する事が明らかとなった。従って、Nrf1 は、Nrf2 と比較してより広い標的遺伝子選択特異性を示す事が示された。その他 T-N1G の ChIP シークエンス解析データを含めた結果は、誌上発表の予定である。

次に転写活性化ドメインと DNA 結合ドメインのどちらが、これら Nrf1 と Nrf2 の標的遺伝子選択特異性に重要か明らかにするため、ドメイン置換分子を作成し、その機能を確立したテザード分子評価系で解析した。しかし、この過程で Nrf1 と Nrf2 の標的遺伝子選択特異性に関しては、その発現量が重要である事が明らかとなり、発現量を厳密にコントロールした系での評価が必要と判断し、新たな解析の構築を検討している

<引用文献>

Landscape of electrophilic and inflammatory stress-mediated gene regulation in human lymphoblastoid cell lines. Ishida N, Aoki Y, Katsuoka F, et al. Free Radic Biol Med. 2020 Dec;161:71-83.

Direct and Specific Functional Evaluation of the Nrf2 and MafG Heterodimer by Introducing a Tethered Dimer into Small Maf-Deficient Cells. Katsuoka F, Otsuki A, Takahashi M, Ito S, Yamamoto M. Mol Cell Biol. 2019 Sep 27;39(20):e00273-19

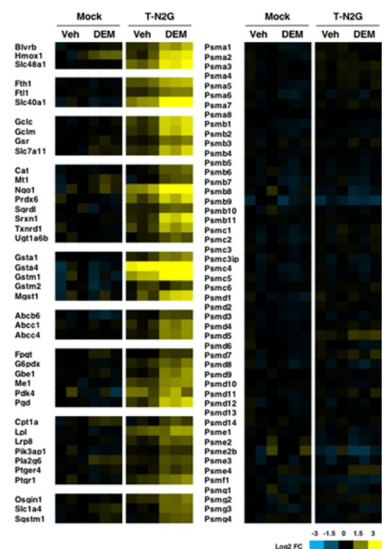


図3 T-N2G分子はNrf2の標的遺伝子の一類を活性化するが Nrf1の標的遺伝子であるプロテアソーム関連遺伝子群は活性化しない

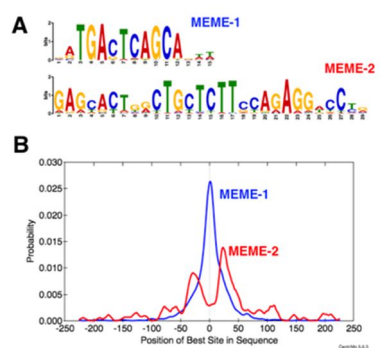


図4 T-N2G分子の結合部位に濃縮される配列

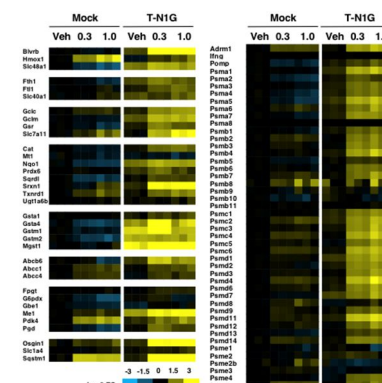


図5 T-N1G分子はNrf1の標的遺伝子であるプロテアソーム関連遺伝子を活性化するだけでなく、Nrf2標的遺伝子群の一部も活性化する

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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, 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 -
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 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 -
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0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 テザード二量体を用いた機能解析が示すNrf1-MafGとNrf2-MafGヘテロ二量体の標的遺伝子選択特異性の差異.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 勝岡史城, 大槻晃史, 高橋瑞枝, 山本雅之
2. 発表標題 Nrf2-MafGテザードヘテロ二量体分子は小Maf群因子欠失細胞においてNrf2標的遺伝子の一群を特異的に活性化する.
3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大槻晃史, 勝岡史城, 山本雅之
2. 発表標題 転写因子NRF2-sMaf二量体結合配列における多様性の評価
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大槻晃史, 勝岡史城, 山本雅之.
2. 発表標題 Maf認識配列 (MARE) を介した転写制御の破綻によって生じる致死的表現型の解析.
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017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
研究協力者	畑中 望  (HATANAKA NOZOMI)	東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・技術補佐員  (11301)	

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
---------	---------