

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：11101  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790319  
 研究課題名（和文） Nrf2 依存的遺伝子発現活性化における Z-DNA 構造の機能解明  
 研究課題名（英文） Function of Z-DNA structure in Nrf2-dependent gene activation  
 研究代表者  
 丸山 敦史（MARUYAMA ATSUSHI）  
 弘前大学・医学（系）研究科（研究院）・助教  
 研究者番号：10431438

研究成果の概要（和文）：本研究では、Nrf2 依存的遺伝子発現調節における左巻き DNA 構造が果たす役割の解析を行った。まず、生細胞内で一過性に生じる Z-DNA 構造の検出法を確立した。その方法を用いて、ヒトヘムオキシゲナーゼ - 1 (HO-1) 遺伝子のプロモーター領域が Nrf2 依存的に Z-DNA 構造を形成することを明らかにした。さらに、HO-1 遺伝子発現増強に先んじて、クロマチンリモデリング因子 BRG1 がエンハンサー領域にリクルートされることおよびプロモーター領域が Z-DNA 構造を形成することがわかった。また、Z-DNA 構造形成によりプロモーター領域のヌクレオソーム崩壊が速やかに起こるとともに、RNA polymerase II のプロモーター導入が促進されることがわかった。以上から、Z-DNA 構造が HO-1 遺伝子発現を増強することがわかった。本研究により、DNA の形がクロマチン構造に影響を与え、遺伝子発現を制御することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：  
 Left-handed double helix of DNA, called Z-DNA, is an alternative structure of DNA and appears to have many diverse roles in nuclear processes such as transcriptional regulation and nucleosome positioning. In this study, I have developed a method for *in vivo* detection of Z-DNA formation and show Nrf2 activation is associated with Z-DNA formation in the *HO-1* gene promoter. The results implicate Nrf2-dependent Z-DNA formation in *HO-1* gene transcriptional activation and suggest the involvement of BRG1 in Z-DNA formation. Human *HO-1* gene promoter might be a good model system to understand Z-DNA formation and how Z-DNA forming sequences regulate gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：酸化ストレス、転写制御、Nrf2、Z-DNA、ヘムオキシゲナーゼ - 1

## 1. 研究開始当初の背景

生物は環境変化を感知し、速やかに適応するが、その適応反応は遺伝性因子やエピジェネティクスによって遺伝子発現の段階で調節されている。そのため遺伝子発現調節機構は生物の生存に必須であり、この環境変化依存的な遺伝子発現は分業特化した転写因子によって調節されている。

Nrf2 は活性酸素種や重金属、親電子性物質などの環境ストレスに応答・活性化する転写因子である。Nrf2 遺伝子破壊マウスの解析から、Nrf2 が酸化ストレスや外来異物に対する生体防御機構の活性化を担うことが明らかになった。しかし、核内での Nrf2 依存的な転写活性化の分子機構の詳細は、ほとんど解明されていない。これまで研究者らは Nrf2 の核内挙動に着目し、核内で Nrf2 に相互作用する分子について解析を進めてきた。その結果、Nrf2 と相互作用する分子として CBP、BRG1、TRRAP を同定し、Nrf2 依存的な転写活性化における機能を解析してきた。なかでもクロマチン構造変換複合体のコアサブユニット BRG1 は Nrf2 の標的遺伝子のうちヒトヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) 遺伝子の発現を選択的に増強した。さらに、ヒト HO-1 遺伝子プロモーター領域には Z-DNA 構造をとりうるチミンとグアニン(TG)の反復配列が存在し、その配列が Nrf2-BRG1 複合体を介した遺伝子発現を増強することが示唆された。

通常、生体の DNA は右巻き二重らせん構造をとっている。一方、プリン塩基とピリミジン塩基が交互に並ぶ反復配列は、左巻きらせん DNA 構造 (Z-DNA) をとりやすいことが知られており、Z-DNA 形成配列と呼ばれている。しかし、細胞内のゲノム上で実際に Z-DNA 構造が形成されるか否かは、不明であった。そこで研究者らは、Z-DNA 結合タンパ

ク質を用いて核内に移行して Z-DNA 構造に結合する分子プローブを作製し、クロマチン免疫沈降法によって細胞内における Z-DNA 形成の有無を検討した。その結果、細胞内ゲノム上の HO-1 遺伝子プロモーター領域において、酸化ストレス誘導的な Z-DNA 構造形成が検出できた。しかし、未だ Z-DNA 形成の転写調節における機能的意義は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、Nrf2 依存的な遺伝子発現調節において Z-DNA 構造が担う役割を解明することが目的である。

## 3. 研究の方法

(1) Z-DNA 形成検出法の構築：生細胞内で一過性に起きる Z-DNA 構造形成を検出するために、Z-DNA 結合タンパク質アデノシンデアミナーゼ 1 (ADAR1) の Z $\alpha$ ドメインと SV40 の核移行シグナルそして EGFP を融合した分子プローブを作製した。さらに Z $\alpha$ ドメインと SV40 の間に可動性リンカー配列を挿入し、Z-probe タンパク質を作製した。陰性対照として、Z $\alpha$ ドメインの Z-DNA 結合に必須のアミノ酸に変異を導入し、Zmut-probe を作製した。作製したタンパク質は、ゲルシフト解析で Z-DNA 結合活性を確認した。

(2) Z-DNA 形成挙動の解析：生細胞内での一過性 Z-DNA 構造形成検出するために、Z-probe 発現プラスミドを生細胞へ導入し、EGFP 特異的抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行った。さらに、Nrf2 活性化剤であるジエチルマレイン酸(DEM)で HeLa 細胞を処理した後、Nrf2 の標的遺伝子 HO-1 のプロモーター領域の Z-DNA 構造形成を経時的に解析した。

(3) Z-DNA 形成における Nrf2 の役割の解

析：Z-DNA 構造形成における Nrf2 の役割を検討するために、HeLa 細胞に Nrf2 特異的 siRNA を導入し、HO-1 のプロモーター領域の Z-DNA 構造形成を検討した。また、DEM 処理時の HO-1 領域における Nrf2 結合挙動を経時的に解析した。

(4) Z-DNA 形成における BRG1 の役割の解析：Z-DNA 構造形成における Nrf2 の役割を検討するために、HeLa 細胞に BRG1 特異的 siRNA を導入し、HO-1 のプロモーター領域の Z-DNA 構造形成を検討した。また、DEM 処理時の HO-1 領域における BRG1 結合挙動を経時的に解析した。

(5) Z-DNA 形成の転写制御への貢献：Z-DNA 形成の転写制御への貢献を検討するために、Z-DNA 形成時の HO-1 領域における RNA polymerase II (Pol II) の結合挙動を経時的に解析した。さらに、この時の HO-1 遺伝子プロモーターのヌクレオソーム挙動を解析した。

(6) Nrf2 と相互作用するタンパク質 (群) の同定と解析：Nrf2 の転写活性化の分子機構を解明するために、大腸菌で合成したリコンビナント Nrf2 と相互作用するタンパク質を HeLa 細胞の核抽出液から単離し、同定を行った。また、同定タンパク質の Nrf2 依存的転写活性化における機能を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) Z-probe の Z-DNA への結合活性を調べるために、ゲルシフト解析を行った。その結果、Z-probe は Z-DNA 形成配列である TG<sub>18</sub> 反復配列に結合したが、Zmut-probe は結合しなかった。さらに、競合阻害実験を行ったところ、Z-DNA 形成配列である TG<sub>18</sub> および GC<sub>18</sub> では、Z-probe の Z-DNA への結合が阻害されたが、TA<sub>18</sub> 配列では阻害されなかった。以上から、Z-probe は、Z-DNA 形成配列に結

合することが明らかとなった。

(2) HeLa 細胞に Z-probe を発現させたところ、核に局在することを確認した。生細胞内での一過性 Z-DNA 構造形成検出するために、Z-probe を発現するプラスミドと BRG1 発現プラスミドを SW13 細胞へ一過性形質導入した。SW13 細胞では、BRG1 依存的に CSF1 遺伝子プロモーターの TG 反復配列の Z-DNA 形成を介して、遺伝子発現が増強する。抗 GFP 抗体によるクロマチン免疫沈降(ChIP)を行ったところ、BRG1 依存的な CSF1 遺伝子プロモーターの濃縮が見られた。すなわち、Z-probe が BRG1 依存的に CSF1 遺伝子プロモーターに結合増強したことを示している。このことから、Z-probe を用いて生細胞内で Z-DNA 形成を検出できることがわかった。

次に、HeLa 細胞に Z-probe を導入し、Nrf2 活性化剤であるジエチルマレイン酸 (DEM) で細胞を刺激した後、抗 GFP 抗体による ChIP を行った。その結果、DEM 刺激により、ヘムオキシゲナーゼ - 1 (HO-1) 遺伝子プロモーターの TG 反復配列の Z-probe による濃縮が増強した。一方、チオレドキシソレダクターゼ - 1 (TXNRD1) 遺伝子プロモーターの Z-probe による濃縮は見られなかった。以上から、DEM により HO-1 遺伝子プロモーターの Z-DNA 形成が増強することがわかった。

(3) DEM による HO-1 遺伝子プロモーターの Z-DNA 形成増強における Nrf2 の役割を検討するために、HeLa 細胞へ Nrf2 特異的 siRNA を導入した後、HO-1 遺伝子プロモーターの Z-DNA 形成を検出した。その結果、Nrf2 ノックダウン細胞では、DEM による HO-1 遺伝子プロモーターの Z-DNA 形成増強が見られなかった。このため、DEM による HO-1 遺伝子プロモーターの Z-DNA 形成増強には Nrf2 が必要なことがわかった。さらに、Z-DNA 形

成における Nrf2 の必要性を検討するため、HeLa 細胞に DEM を投与した後、経時的に Nrf2 の HO-1 遺伝子領域への結合挙動を検討した。その結果、DEM による HO-1 遺伝子発現に先んじて、Nrf2 が HO-1 遺伝子の転写開始点上流 9kb の E2 エンハンサーへ結合増強するとともに、Z-DNA が形成されることがわかった。

(4) Z-DNA 形成における BRG1 の役割を検討するために、HeLa 細胞に BRG1 特異的 siRNA を導入し、HO-1 遺伝子プロモーター領域の Z-DNA 形成を検討した。その結果、Nrf2 の発現量自体が低下してしまった。そこで、DEM 処理時の HO-1 遺伝子領域における BRG1 結合挙動を経時的に解析した。その結果、DEM 刺激により、BRG1 は HO-1 遺伝子エンハンサーおよびプロモーターへの結合が増強していた。この結合挙動は、Z-DNA 形成挙動に一致するものであった。以上から、BRG1 は Z-DNA 形成に関与していると考えられた。

(5) Z-DNA 形成の転写制御への貢献を検討するために、Z-DNA 形成時の HO-1 領域における RNA polymerase II (Pol II) の結合挙動およびプロモーター領域のヌクレオソーム占有度を経時的に解析した。その結果、HO-1 遺伝子プロモーターにおけるヌクレオソーム占有度は、Z-DNA 形成とともに速やかに減少した。さらに、HO-1 遺伝子プロモーターへの Pol II 結合は、Z-DNA 形成とともに増加したが、TXNRD1 遺伝子プロモーターでは、増強が見られなかった。以上の結果から、Z-DNA 構造は、転写活性化に関与していると考えられた。

(6) Nrf2 と相互作用するタンパク質として KAP1 を同定した。KAP1 は転写の活性化および抑制化のどちらにも関与するタンパク質である。KAP1 の Nrf2 依存的転写活性化に

おける機能を解析するために、マウス線維芽細胞 NIH3T3 において、KAP1 をノックダウンした。その結果、Nrf2 の標的遺伝子である Ho-1 および Nqo1 遺伝子発現が低下した。さらに、KAP1 ノックダウン細胞では、Nqo1 遺伝子の Nrf2 結合部位 ARE への結合が低下していた。また、酸化ストレス感受性検査を実施したところ、KAP1 ノックダウン細胞はコントロール細胞に比べ、酸化ストレスに対して脆弱になっていることがわかった。以上の結果から、KAP1 は Nrf2 依存的転写活性化に関与する分子であることが明らかとなった。

## 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 7 件)

① Maruyama A, Mimura J, Harada N, Itoh K..

Nrf2 activation is associated with Z-DNA formation in the human HO-1 promoter. *Nucleic Acids Res.* In press. 2013. (査読あり) DOI: 10.1093/nar/gkt243.

② Tanji K, Maruyama A, Odagiri S, Mori F, Itoh K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K.

Keap1 is localized in neuronal and glial cytoplasmic inclusions in various neurodegenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol.* 72, 18-28, 2013. (査読あり) DOI: 10.1097/NEN.0b013e31827b5713.

③ Tanji K, Odagiri S, Maruyama A, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K.

Alteration of autophagosomal proteins in the brain of multiple system atrophy. *Neurobiol Dis.* 49C, 190-198, 2012. (査読あり) DOI: 10.1016/j.nbd.2012.08.017.

④ Harada N, Ito K, Hosoya T, Mimura J, Maruyama A, Noguchi N, Yagami KI, Morito N, Takahashi S, Maher JM, Yamamoto M, Itoh K.

Nrf2 in bone marrow-derived cells positively

contributes to the advanced stage of atherosclerotic plaque formation. *Free Radic Biol Med.* 53, 2256-2262, 2012. (査読あり) DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.001.

⑤Mimura J, Kosaka K, Maruyama A, Satoh T, Harada N, Yoshida H, Satoh K, Yamamoto M, Itoh K. Nrf2 regulates NGF mRNA induction by carnosic acid in T98G glioblastoma cells and normal human astrocytes. *J. Biochem. (Tokyo)* 150, 209-217, 2011. (査読あり) DOI: 10.1093/jb/mvr065.

⑥Maruyama A, Nishikawa K, Kawatani Y, Mimura J, Hosoya T, Harada N, Yamamoto M, Itoh K. The novel NRF2-interacting factor KAP1 regulates susceptibility to oxidative stress by promoting the NRF2-mediated cytoprotective response. *Biochem. J.* 436, 387-397, 2011. (査読あり) DOI: 10.1042/BJ20101748.

⑦Harada N\*, Kanayama M\*, Maruyama A\*, Yoshida A, Tazumi K, Hosoya T, Mimura J, Toki T, Maher JM, Yamamoto M, Itoh K. Nrf2 regulates ferroportin 1-mediated iron efflux and counteracts lipopolysaccharide-induced ferroportin 1 mRNA suppression in macrophages. *Arch. Biochem. Biophys.* 508, 101-109, 2011. \*: equal contribution. (査読あり) DOI: 10.1016/j.abb.2011.02.001.

[学会発表] (計4件)

①丸山敦史、伊東健、酸化ストレス誘導性遺伝子HO-1発現を制御するnon-coding RNAsの解析、第85回日本生化学会大会 (ポスター発表)、福岡、2012年12月13日～2012年12月16日

②Maruyama A, Itoh K. Nrf2 induces the Z-DNA formation in the human HO-1 promoter. 7th International Meeting on Heme Oxygenases & Related Enzymes (Poster presentation)、

University of Edinburgh、Edinburgh (英国)、2012年05月28日～2012年06月01日

③Maruyama A, Itoh K. Nrf2 enhances PolIII and BRG1 binding to the human HO-1 promoter. 第34回日本分子生物学会年会 (ポスター発表)、横浜、2011年12月15日

④丸山敦史、伊東健、Nrf2 なヒト HO-1 遺伝子発現活性化機構の解析、第77回日本生化学会 東北支部例会 (口頭発表)、仙台、2011年07月23日

[図書] (計1件)

①丸山敦史、伊東健。活性酸素種で活性化する転写経路のクロストーク—Nrf2/Keap1 経路を中心に—。2718-2725、実験医学増刊、活性酸素・ガス状分子による恒常性制御と疾患、羊土社、2012

[その他]

ホームページ等

弘前大学大学院医学研究科附属高度先進医学研究センター分子生体防御学講座

<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/admed/department/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

丸山 敦史 (MARUYAMA ATSUSHI)

弘前大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・助教

研究者番号：10431438

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし