

2-3-4. 図

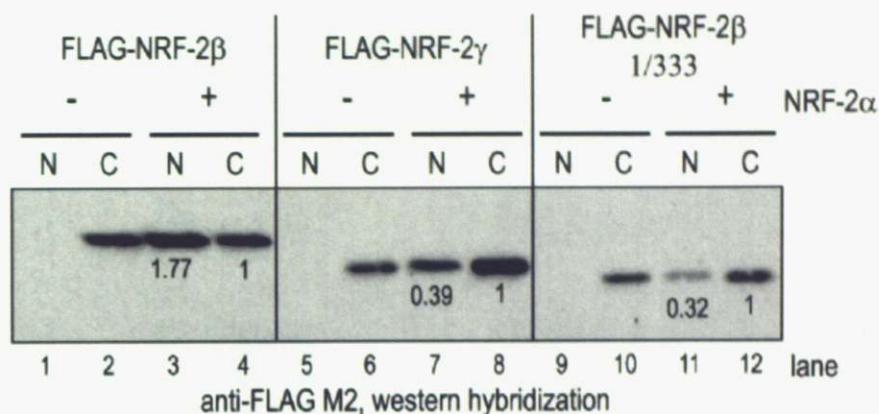


図 2-3-1. NRF-2βと NRF-2γを NRF-2αと共に細胞内で過剰発現させた場合、NRF-2βの方が NRF-2γよりも多く、核抽出液中に含まれる。

HEK293T 細胞に pcDNA-FLAG-NRF-2β または pcDNA-FLAG-NRF-2γ、または pcDNA-FLAG-NRF-2β-1/333 を単独で、もしくは pcDNA-NRF-2αと co-transfectionし、36 h 培養した後、細胞を回収し、細胞質画分と核抽出液を採った。核抽出液 (N) と細胞質画分 (C) 15 μg ずつを SDS-PAGE で分離し、anti-FLAG M2 抗体を用いて western hybridization を行った。FLAG-NRF-2β/γのいずれの construct も、NRF-2αを共発現しない場合、殆ど核抽出液中には含まれなかった。一方、NRF-2αを共発現した場合、FLAG-NRF-2β/γのいずれの construct も顕著に核抽出液中に含まれる量が増加した。NRF-2αを共発現させた時の、細胞質画分に含まれる量に対する核抽出液中に含まれる量を定量し、図中に数字で表した。FLAG-NRF-2βに比べて、FLAG-NRF-2γと FLAG-NRF-2β-1/333 では核抽出液中に含まれる割合が少ないことが分かった。

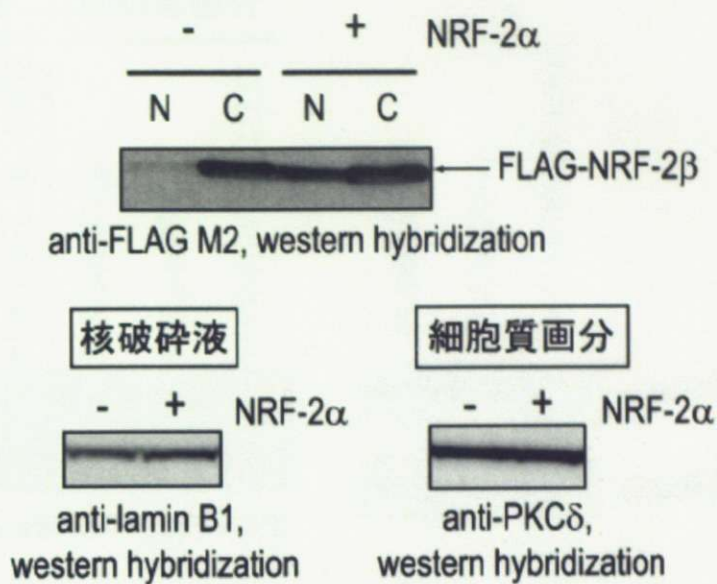


図 2-3-2. 核破碎液を調製した場合でも、NRF-2βを単独で過剰発現すると核画分には殆ど含まれない。

HEK293T 細胞に pcDNA-FLAG-NRF-2β を単独で、もしくは pcDNA-NRF-2α と co-transfection し、36 h 培養した後、細胞を回収し、細胞質画分と核画分を分けた。核画分を低張液で懸濁した後、ソニケーションで破碎した(核破碎液、N)。核破碎液(N)と細胞質画分(C) 20 μg ずつを SDS-PAGE で分離し、anti-FLAG M2 抗体、anti-lamin B1 抗体、anti-PKCδ 抗体を用いて western hybridization を行った。核破碎液を調製しても、核抽出液を調製した場合と同様に、FLAG-NRF-2β を単独で過剰発現させると殆どが細胞質画分に含まれた。Lamin B1、PKCδ はそれぞれ核画分、細胞質画分に含まれる蛋白質のコントロールである。

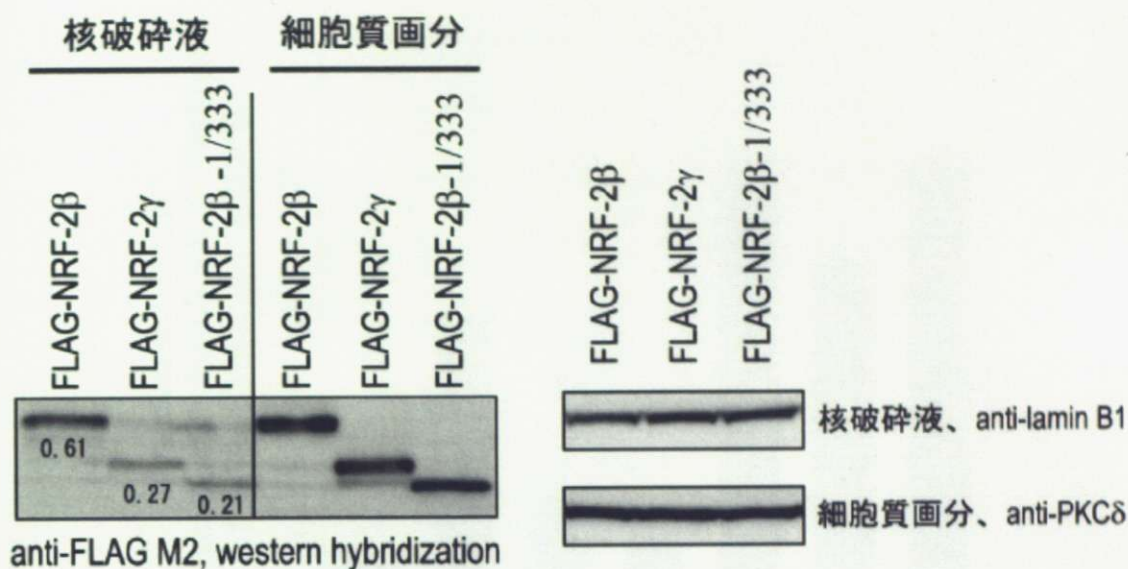


図 2-3-3. 核破碎液を調製しても、NRF-2 α を共発現させた場合、NRF-2 β の方が NRF-2 γ よりも多く核破碎液中に含まれる。

HEK293T 細胞に pcDNA-FLAG-NRF-2 β または pcDNA-FLAG-NRF-2 γ 、または pcDNA-FLAG-NRF-2 β -1/333 を pcDNA-NRF-2 α と co-transfection し、36 h 培養した後、細胞を回収し、細胞質画分と核破碎液を採った。核破碎液(N)と細胞質画分(C)20 μ g ずつを SDS-PAGE で分離し、anti-FLAG M2 抗体、anti-lamin B1 抗体、anti-PKC δ 抗体を用いて western hybridization を行った。核破碎液を調製しても、核抽出液を調製した場合と同様に、FLAG-NRF-2 β に比べて、FLAG-NRF-2 γ と FLAG-NRF-2 β -1/333 では核破碎液中に含まれる割合が少なかった。細胞質画分に含まれる量に対する核破碎液中に含まれる量を定量し、図中に数字で表した。Lamin B1、PKC δ はそれぞれ核画分、細胞質画分に含まれる蛋白質のコントロールである。

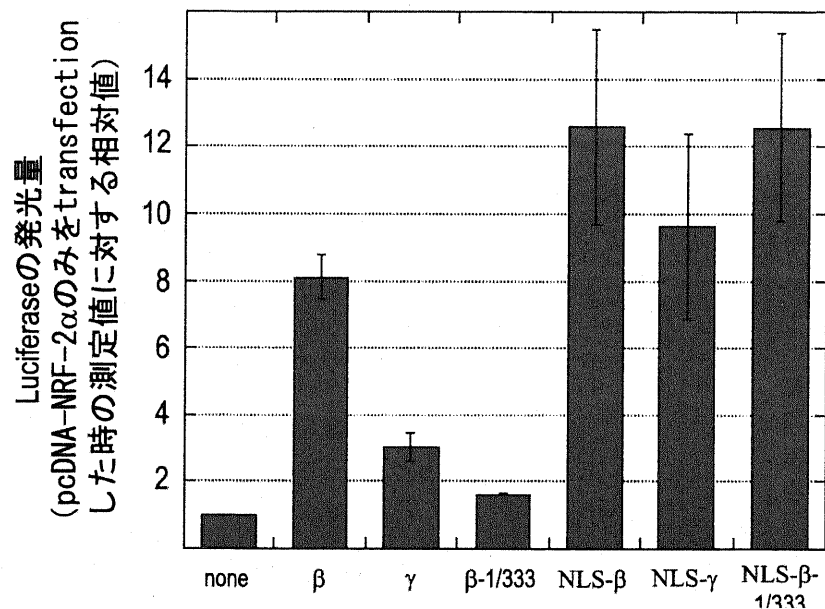


図 2-3-4. NLS-NRF-2 γ 、NLS-NRF-2 β -1/333 は、NLS-NRF-2 β と同程度の転写促進活性を持つ。

HEK293T 細胞に hIF2mt プロモーター中の NRF-2 の認識配列を組み込んだ reporter plasmid、pLuc-91/-42 と pcDNA-NRF-2 α に、pcDNA 空ベクター、pcDNA-NRF-2 β (β)、pcDNA-NRF-2 γ (γ)、pcDNA-NRF-2 β -1/333 (β -1/333)、pcDNA-FLAG-NLS-NRF-2 β (NLS- β)、pcDNA-FLAG-NLS-NRF-2 γ (NLS- γ)、pcDNA-FLAG-NLS-NRF-2 β -1/333 (NLS- β -1/333) のいずれか一つを co-transfection し、36 h 培養した後、細胞破碎液を用いて Luciferase の発光量を測定した。独立の実験を 3 回行ない、pcDNA 空ベクターを transfection した時の測定値に対する相対値 \pm 標準偏差で表した。pcDNA-NRF-2 γ 、NRF-2 β -1/333 を transfection した場合、pcDNA-NRF-2 β と比べて、Luciferase の発光量が、それぞれ約 3 分の 1、約 5 分の 1 に低下した。一方で、pcDNA-FLAG-NLS-NRF-2 γ 、pcDNA-FLAG-NLS-NRF-2 β -1/333 を transfection した場合、pcDNA-FLAG-NLS-NRF-2 β と、Luciferase の発光量はほぼ同程度であった。

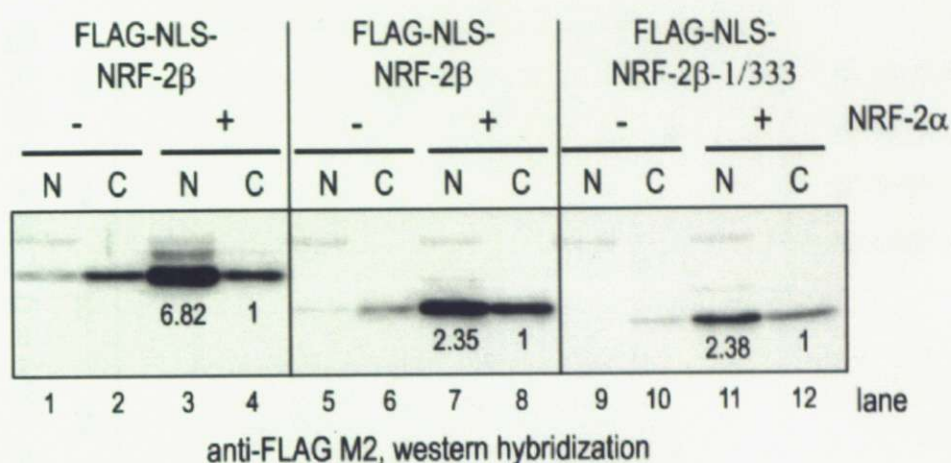


図 2-3-5. NLS を N 末に付加することで、NRF-2βと NRF-2γの核抽出液中に含まれる量が増加した。

HEK293T 細胞に pcDNA-FLAG-NLS-NRF-2βまたは pcDNA-FLAG-NLS-NRF-2γ、または pcDNA-FLAG-NLS-NRF-2β-1/333 を単独で、もしくは pcDNA-NRF-2αと co-transfection し、36 h 培養した後、細胞を回収し、細胞質画分と核抽出液を採った。核抽出液(N)と細胞質画分(C) 15 μg ずつを SDS-PAGE で分離し、anti-FLAG M2 抗体を用いて western hybridization を行った。NRF-2αを共発現させた時の、細胞質画分に含まれる量に対する核抽出液中に含まれる量を定量し、図中に数字で表した。NLS を N 末に付加すると、いずれの construct も核抽出液中に含まれる割合が増加した(図 5-1 との比較。NRF-2β、lane 3; NRF-2γ、lane 7; NRF-2β-1/333、lane 11)。

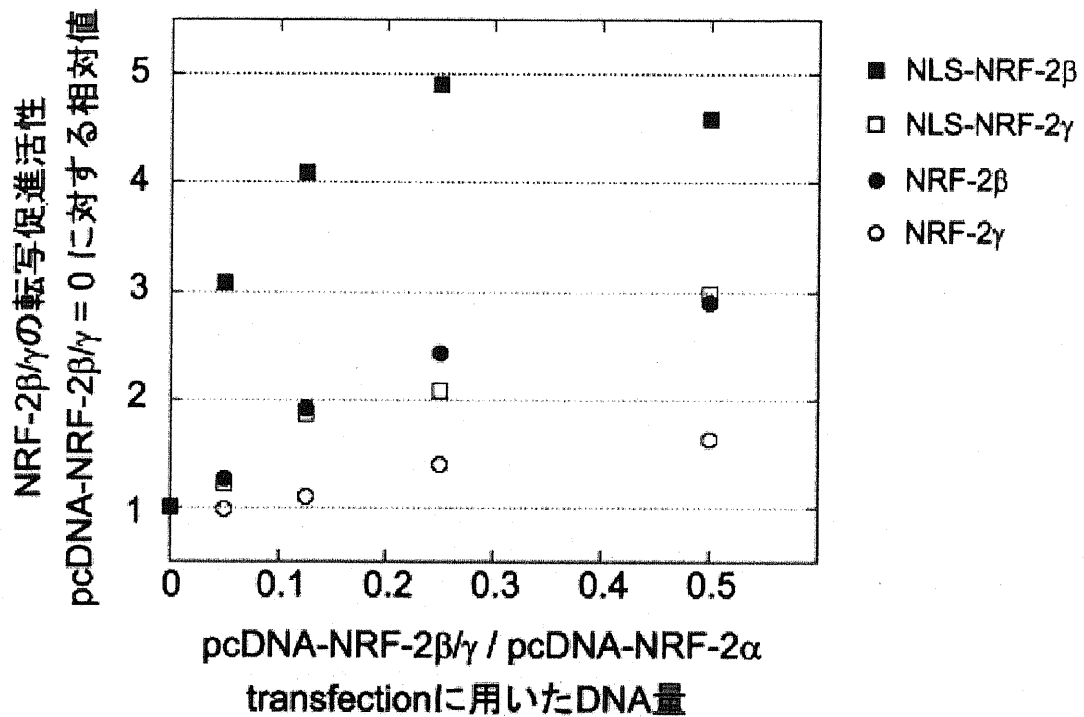


図 2-3-6. NRF-2β/γは、核に局在する効率に比例した転写促進活性を持つ。
 HEK293T 細胞に pLuc-91/-42 と、pcDNA-NRF-2αを 200 ng、pcDNA-FLAG-NRF-2β (黒丸)、
 pcDNA-FLAG-NRF-2γ (白丸)、pcDNA-FLAG-NLS-NRF-2β (黒四角)、
 pcDNA-FLAG-NLS-NRF-2γ (白四角)をそれぞれ 10、25、50、100 ng co-transfection し、36 h 培養
 した後、細胞破碎液を用いて Luciferase の発光量を測定した。pcDNA-NRF-2β/γを全く加えなかつ
 た時の測定値に対する相対値で表した。NLS-NRF-2γと NRF-2βは、transfection した DNA の量に
 よらず転写促進活性がほぼ等しかった。NRF-2γ は NLS-NRF-2γと NRF-2βと比べて転写促進活
 性が低く、NLS-NRF-2βは NLS-NRF-2γと NRF-2βと比べて転写促進活性が高かった。

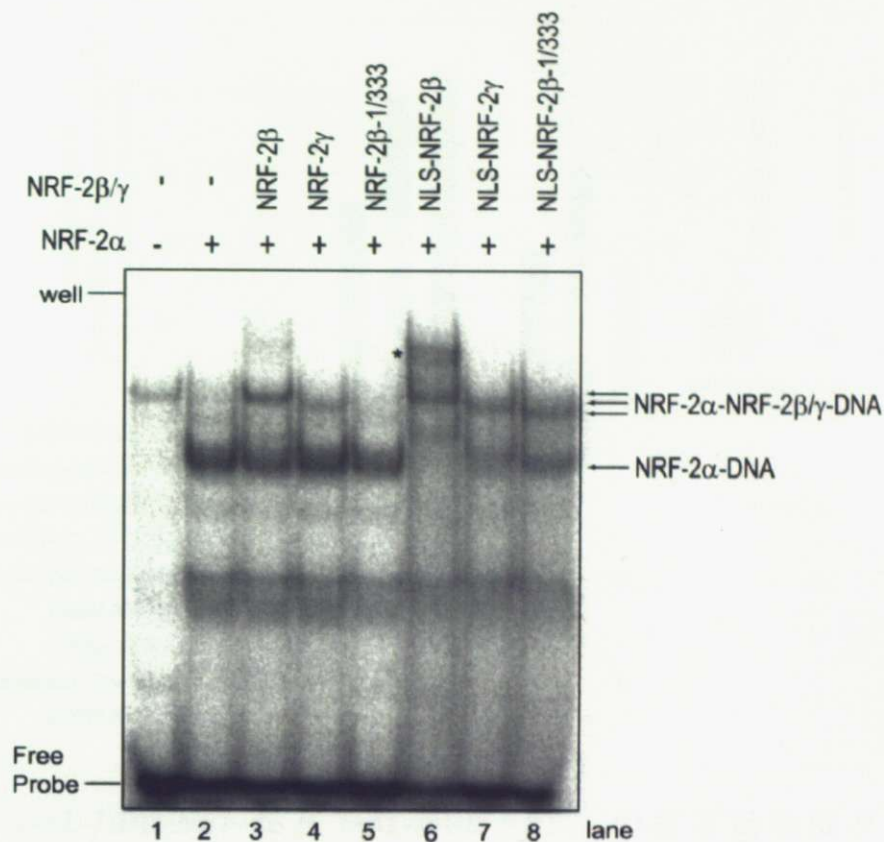


図 2-3-7. NLS を付加することで、核抽出液中に含まれる NRF-2β/γ の量が増加した。
³²P ラベルした hIF2mt, -56/-32 の二本鎖 DNA プローブと、HEK293T 細胞の核抽出液を用いて EMSA を行なった。反応液 15 μl 中に、5 fmol 32P-probe と 5 μg の核抽出液を加えた。NRF-2α を単独で過剰発現すると、NRF-2α と DNA を含むバンドのみが強く現れた (lane 2)。NRF-2β を共発現させると、NRF-2α と NRF-2β を含むバンドが現れた (lane 3)。NRF-2γ もしくは NRF-2β-1/333 を共発現させると、NRF-2β の場合と比較して、NRF-2α と NRF-2β/γ を含むバンドは、弱くなるか、または殆ど検出されなかった (lane 4、5)。一方で、FLAG-NLS-NRF-2γ もしくは FLAG-NLS-NRF-2β-1/333 を NRF-2α と共発現させた場合、NRF-2α と NRF-2β を含むバンドが強く見られるようになった (lane 7、8)。NRF-2β は、DNA と NRF-2α と高濃度で共存した場合、C 末のドメインを介して homodimer を形成することが知られている⁸¹。'*' は NRF-2β の homodimer 化によるバンドであると考えられる。

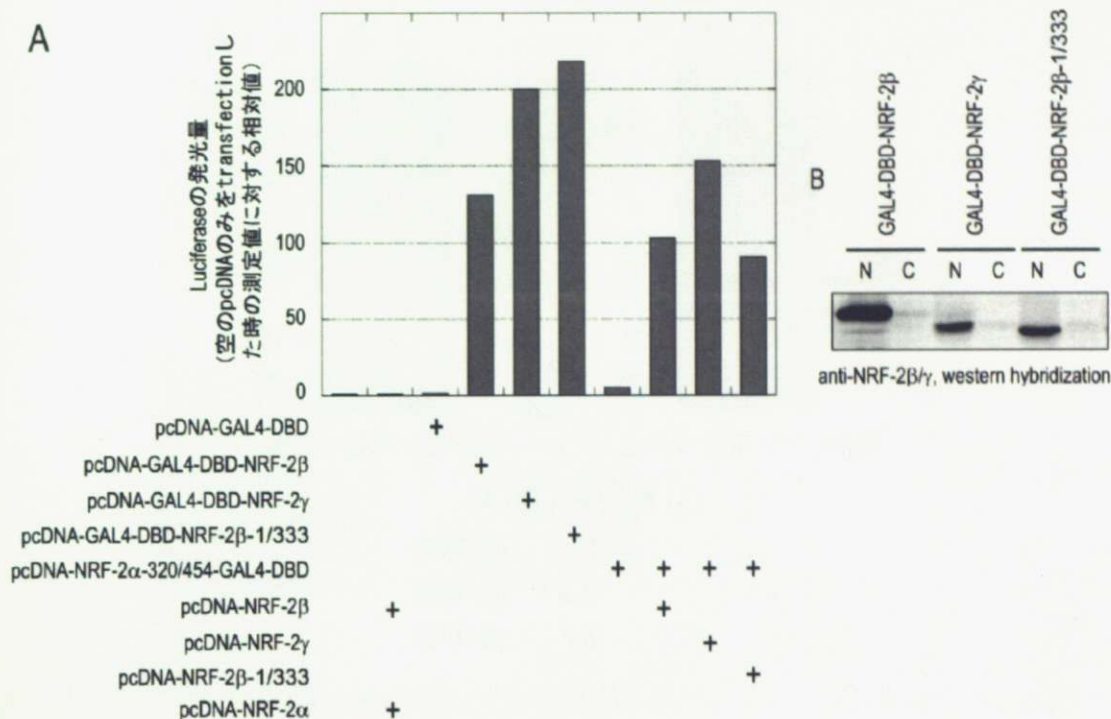


図 2-3-8. GAL-DBD-NRF-2β と GAL-DBD-NRF-2γ の転写活性はほぼ等しい (Gugneja S et al., 1995 の追実験)。

A. HEK293T 細胞に GAL4 DNA-binding site を組み込んだ plasmid、pFR-Luc (Stratagene) に、GAL4-DBD、GAL4-DBD と NRF-2α-320/454 (NRF-2β/γとの結合部位)、NRF-2β、NRF-2γの融合蛋白質、何も付加していない NRF-2α、NRF-2β、NRF-2γを発現させる plasmid を co-transfection し、36 h 培養した後、細胞破碎液を用いて Luciferase の発光量を測定した。pFR-Luc と pcDNA の空ベクターのみを transfection した時の測定値に対する相対値で表した。Gugneja S et al., 1995 の結果と同様⁹⁶、GAL4-DBD-NRF-2β、GAL4-DBD-NRF-2γ、GAL4-DBD-NRF-2β-1/333 で転写促進活性はほぼ変わらなかった。さらに、NRF-2α-320/454-GAL4-DBD に NRF-2β、NRF-2γ、NRF-2β-1/333 を co-transfection する実験でも、NRF-2β、NRF-2γ、NRF-2β-1/333 による転写促進の効果はほぼ同じであった。B. HEK293T 細胞に pcDNA-GAL4-DBD-NRF-2βまたは pcDNA-GAL4-DBD-NRF-2γ、または pcDNA-GAL4-DBD-NRF-2β-1/333 を transfection し、36 h 培養した後、細胞を回収し、細胞質画分と核抽出液を採った。核抽出液(N)と細胞質画分(C) 15 μg ずつを SDS-PAGE で分離し、anti-NRF-2β/γ 抗体を用いて western hybridization を行った。GAL4-DBD-NRF-2β/NRF-2γ/NRF-2β-1/333 のいずれも顕著に核画分に現れることが分かった。

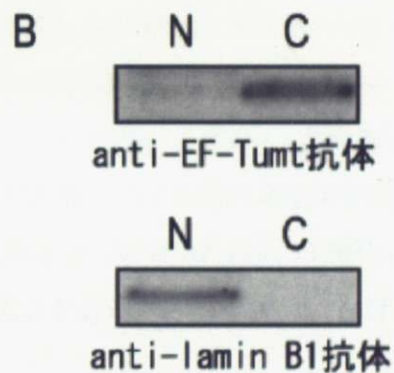
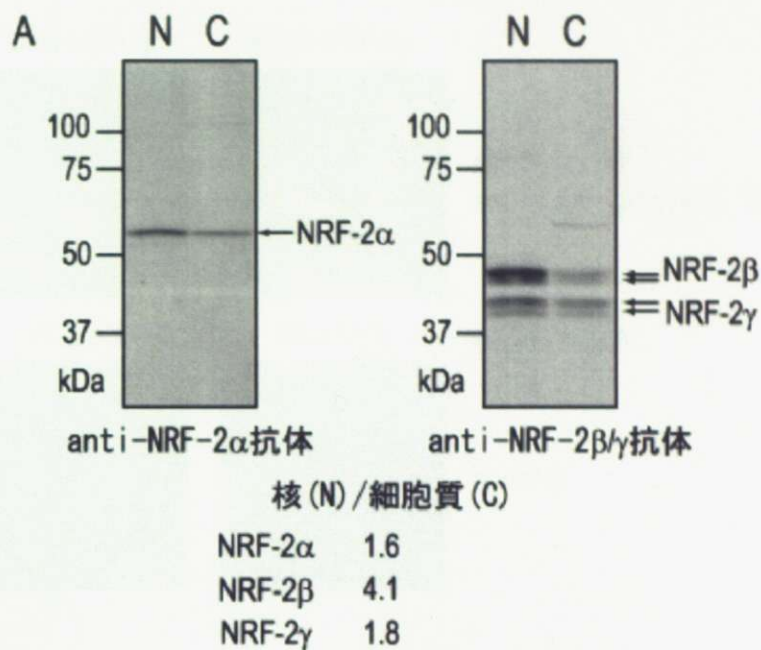


図 2-3-9. NRF-2 β の方が NRF-2 γ よりも細胞質画分に対して核画分に含まれる割合が多い。

HeLa 細胞の細胞質画分(C)または核破砕液(N) 20 μ g を 12% SDS-PAGE で分離し、affinity purified anti-NRF-2 α 抗体、affinity purified anti-NRF-2 β 抗体、anti-EF-Tumt 抗体、anti-lamin B1 抗体を用いて western hybridization を行なった。A. NRF-2 α 、NRF-2 β 、NRF-2 γ について細胞質画分に対して核破砕液のバンドの濃さを定量した。NRF-2 β 、NRF-2 γ については二本のバンドを合計した。B.細胞質画分と核画分の分画ができているかどうかを、それぞれ細胞質と核に局在する蛋白質のマーカである EF-Tumt と lamin B1 に対する抗体を用いて調べた。

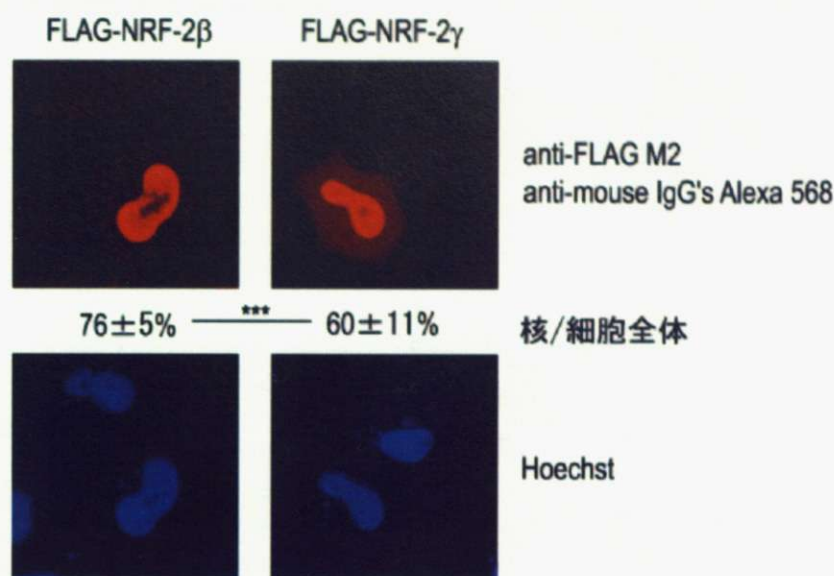
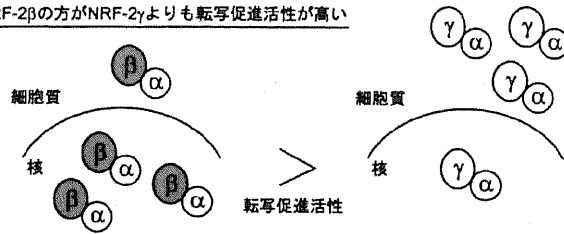


図 2-3-10. FLAG-NRF-2 β / γ の細胞内局在観察。FLAG-NRF-2 β の方が FLAG-NRF-2 γ よりも核に局在する割合が高い。

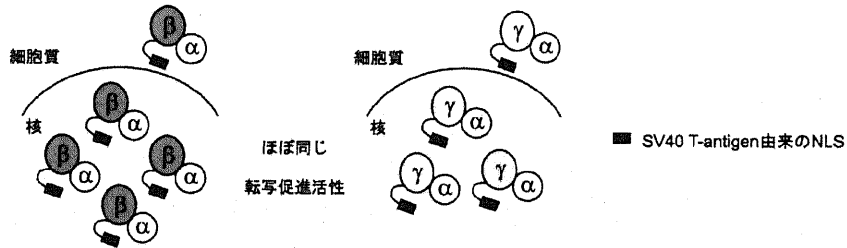
HeLa 細胞に pcDNA-FLAG-NRF-2 β 、pcDNA-FLAG-NRF-2 γ を transfection し、36 h 培養した後、ホルマリンで細胞を固定化し、anti-FLAG M2 抗体と anti-mouse IgG's Alexa 568 を用いて免疫染色を行った(上段、赤)。Hoechst 33342 を用いて核 DNA を染色した(下段、青)。Leica TCS SP2 を用いて共焦点画像を撮った。細胞全体に対する核の領域の蛍光強度の割合を image J を用いて測定し、図中に示した。値は 11 細胞(FLAG-NRF-2 β)、13 細胞(FLAG-NRF-2 γ)の平均値 \pm 標準偏差。非等分散の 2 標本を対象とする t 検定(両側検定)を行ない、統計的有意差 p 値を算出した。****: $p < 0.001$ 。

A. 転写促進活性 NRF-2 β vs NRF-2 γ

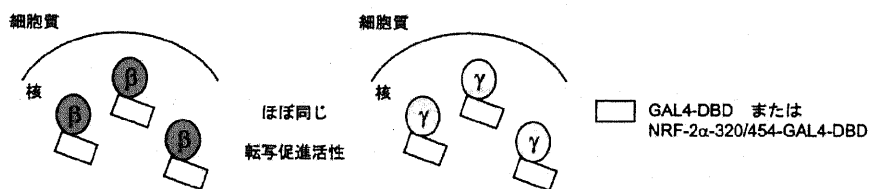
NRF-2 β の方がNRF-2 γ よりも転写促進活性が高い



SV40-NLSを付加して核内局在を促すと、NRF-2 β とNRF-2 γ で転写活性はほぼ同じになる



GAL4-DBDで核内局在を促すと、NRF-2 β とNRF-2 γ で転写活性はほぼ同じになる



B. 組織間でのNRF-2 β / γ サブユニットの使い分けによる転写制御

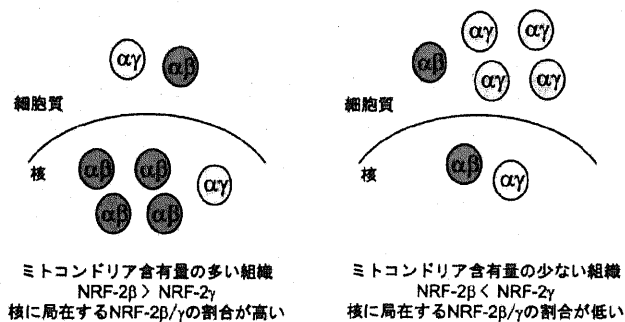
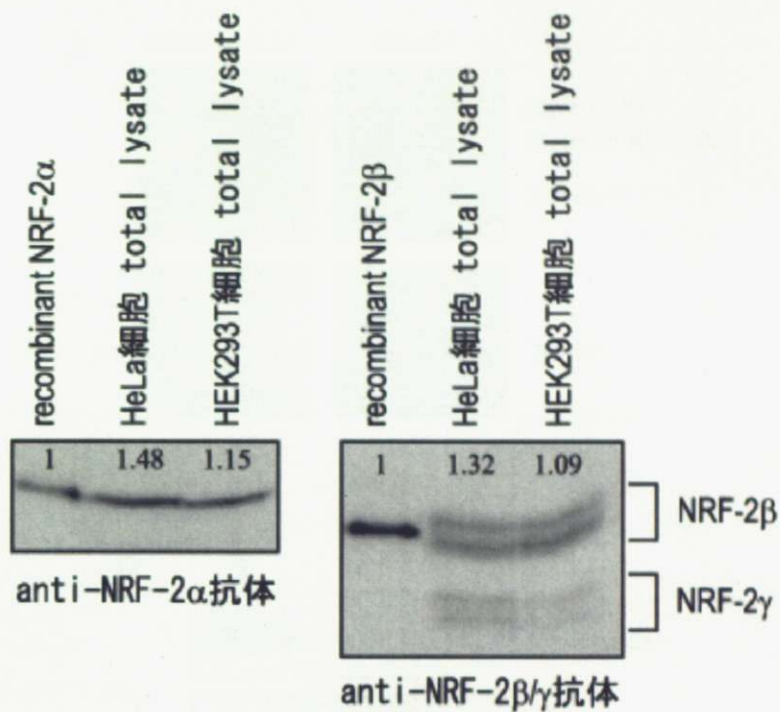


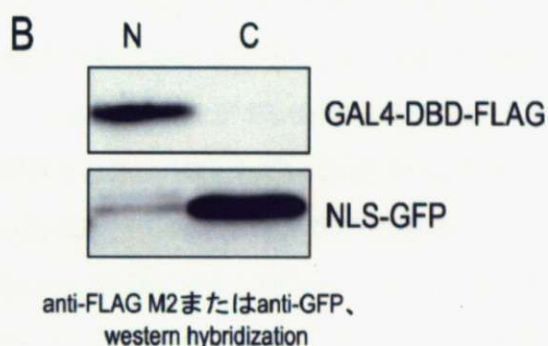
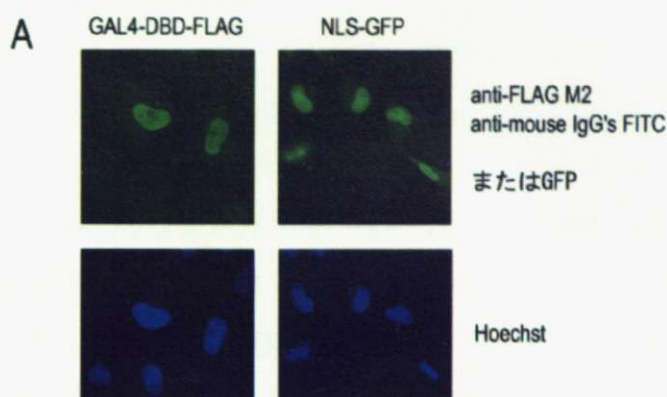
図 2-3-11. NRF-2 β / γ の転写促進活性と NRF-2 β / γ の使い分けによる転写制御機構。

A. NRF-2 β (図中 β)は NRF-2 γ (図中 γ)よりも転写を促進する活性が高い。SV40 T-antigen 由来 NLS(図中黒四角)を NRF-2 β / γ に付加して核内局在を促すと、NRF-2 β / γ で転写促進活性に差が見られなくなる。また、GAL4-DBD(図中白四角)融合蛋白質の転写活性を比較すると NRF-2 β と NRF-2 γ で転写活性に差が見られない。GAL4-DBD 融合蛋白質は殆どが核に運ばれる。B.ミトコンドリア含有量の多い組織では NRF-2 β の方が NRF-2 γ よりも多く発現しており、核に局在する NRF-2 $\alpha\beta$ / $\alpha\gamma$ (図中 $\alpha\beta$ 、 $\alpha\gamma$)の割合が高く、一方ミトコンドリア含有量の少ない組織では NRF-2 γ の方が NRF-2 β よりも多く発現しており、核に局在する NRF-2 $\alpha\beta$ / $\alpha\gamma$ の割合が少なくなる。



補足図 2-3-1. NRF-2 α と NRF-2 β/γ は、細胞内でほぼ等量存在する。

HeLa 細胞と HEK293T 細胞の細胞破碎液 (total lysate) 20 μ g と、recombinant NRF-2 α 、NRF-2 β 20 fmol を SDS-PAGE で分離し、affinity purified anti-NRF-2 α 抗体もしくは affinity purified anti-NRF-2 β 抗体を用いて western hybridization を行なった。Recombinant protein のバンドの濃さを 1 として total lysate 中に含まれる NRF-2 α 、NRF-2 β/γ のバンドの濃さを定量した。NRF-2 β/γ については 4 本のバンドを合計した。HeLa 細胞、HEK293T 細胞共に、NRF-2 α と NRF-2 β/γ はほぼ等量存在することが分かった。



補足図 2-3-2. GAL4-DNA binding domain と NLS-GFP の核/細胞質局在。

HeLa 細胞に GAL4 DNA binding domain (GAL4-DBD) と SV40 T-antigen 由来の NLS を付加した GFP (NLS-GFP) を過剰発現させ、顕微鏡観察と Dignam らの方法による細胞分画で核と細胞質の局在を調べた。A. HeLa 細胞に pcDNA-GAL4-DBD-FLAG、もしくは pcDNA-SV40-NLS-GFP を transfection し、36 h 培養した後、GFP を観察、もしくは anti-FLAG M2 抗体と anti-mouse IgG's FITC を用いて免疫染色を行った(上段、緑)。Hoechst 33342 を用いて核 DNA を染色した(下段、青)。Leica TCS SP2 を用いて共焦点画像を撮った。GAL4-DBD-FLAG と NLS-GFP は顕著に核に局在することが分かった。B. HeLa 細胞に pcDNA-GAL4-DBD-FLAG、もしくは pcDNA-SV40-NLS-GFP を transfection し、36 h 培養した後細胞を回収し、細胞質画分と核抽出液を採った。核抽出液(N)と細胞質画分(C) 15 μ g ずつを SDS-PAGE で分離し、anti-FLAG M2 抗体もしくは anti-GFP 抗体を用いて western hybridization を行った。GAL4-DBD-FLAG のバンドは主に核抽出液に検出されたが、NLS-GFP のバンドは主に細胞質画分に検出された。

2-4. NRF-2 $\alpha\beta/\alpha\gamma$ の核内輸送機構の解明

2-4-1. 序論

NRF-2 は β サブユニットと γ サブユニットの使い分けによって組織間でのミトコンドリアの酸化的リン酸化に関わる遺伝子の発現を調節していると考えられるが、3-3 章で、NRF-2 β と NRF-2 γ で核に局在する効率が異なるために転写を促進する活性が異なることを見出した。では、NRF-2 β/γ で核内局在の効率が異なる原因は何であるか？この問題に答えるために、NRF-2 $\alpha\beta/\alpha\gamma$ の核内輸送機構について調べることにした。

NRF-2 は、細胞のエネルギー需要に応答して細胞内局在を変化させることで、cytochrome *c* oxidase サブユニット遺伝子の転写を促進することが知られている。哺乳動物の中樞視覚系線状皮質には、cytochrome *c* oxidase の活性が高い領域と低い領域が縞状に分布しており、発火の頻度や結合するシナプスが異なることが知られているが、Wong-Riley らは NRF-2 α の抗体を用いた免疫染色を行ない、cytochrome *c* oxidase 活性が高い領域ほど、NRF-2 α の発現量が多いことを見出した¹⁰⁰。また tetrodotoxin 処理によって視神経へ送られる刺激を阻害すると、cytochrome *c* oxidase 活性の低下に伴って NRF-2 α の蛋白質量が低下することから¹⁰⁰、視神経細胞において、NRF-2 の量の調節によって cytochrome *c* oxidase subunit の発現量が調節され、それによって cytochrome *c* oxidase 活性が調節されていると考えられた。細胞外のカルシウムイオン濃度、 $[K^+]_o$ の上昇によって神経細胞が脱分極し、活性化されることが知られている¹⁰¹。Wong-Riley らは、rat primary neuronal culture を塩化カリウムで処理して脱分極させると、cytochrome *c* oxidase subunit の発現量の増加と cytochrome *c* oxidase 活性の上昇に先立って、NRF-2 α 、NRF-2 β/γ の蛋白質量の増加と、NRF-2 β/γ の細胞質から核内への蓄積が見られることを見出した¹⁰²。さらに Wong-Riley らは、塩化カリウム処理による脱分極誘導開始直後の NRF-2 α 、NRF-2 β/γ の細胞内局在の変化を、免疫電顕を用いて詳細に調べた実験から、脱分極誘導後の NRF-2 α 、NRF-2 β/γ の蛋白質量は変わらないが、細胞質に対して核に局在する割合が6倍から8倍に増加することを明らかにした⁹⁵。これらの知見から、NRF-2 は発現量を変化させることでも視神経細胞の cytochrome *c* oxidase 活性の調節を行なうが、短時間での応答には、神経細胞の活性化に伴って細胞質から核に蓄積することで cytochrome *c* oxidase subunit の発現量を増加させると考えられる。したがって、NRF-2 の核内輸送機構を解明することは、細胞のエネルギー需要の変化に応答した転写制御機構を理解するためにも重要である。

NRF-2 $\alpha\beta/\alpha\gamma$ の核内輸送メカニズムについて調べた Sawa らの報告では、NRF-2 α に対する抗体を用いた免疫染色で、COS1 細胞に NRF-2 α を単独で過剰発現した場合は一部しか核に移行せず、

NRF-2 β もしくは NRF-2 γ を共発現させると NRF-2 α は効率よく核に運ばれることを示した⁴⁹。一方、NRF-2 β に対する抗体を用いた免疫染色で、NRF-2 β は単独で過剰発現させても顕著に核に局在すること、NRF-2 α との相互作用に必要な領域(N 末の 1/133)を削った NRF-2 β の変異体でも核に局在することが示された。また、NRF-2 β と NRF-2 γ に共通する領域、242/330 を削った変異体は核に局在しなくなった。これらの結果から、NRF-2 α は単独では核に移行できないが、NRF-2 β/γ 存在下では効率良く核に運ばれること、NRF-2 β/γ の中に核移行シグナルが存在することが示唆された。

ところが、Sawa らの報告から示唆された NRF-2 の核内輸送メカニズムにはいくつかの問題点が存在する。第一に、NRF-2 α の DNA 結合ドメイン(Ets domain)を持つ他の転写因子では、Ets domain を介して単独で核に運ばれることが知られている¹⁰³⁻¹⁰⁵。したがって、NRF-2 α が単独で核に運ばれる経路が存在するのではないか、NRF-2 α が核に運ばれる効率が低い原因は何であるか。第二に、NRF-2 α にも核移行シグナルが存在するとしたら、NRF-2 $\alpha\beta$ /NRF-2 $\alpha\gamma$ はどのようにして核に運ばれるのか。第三に、NRF-2 β/γ のアミノ酸一次配列からは既知の核移行シグナルが見つからない。このため、NRF-2 β/γ が核に運ばれる機構は不明である。第四に、NRF-2 $\alpha\beta$ と NRF-2 $\alpha\gamma$ の核内輸送メカニズムに違いはあるのか。本研究では、これらの問題点を解決することを目指した。

2-4-2. 実験結果

2-4-2-1. NRF-2 α は単独でも核に運ばれるが、NRF-2 β によって核局在が促進される。

NRF-2 α の核内輸送経路を調べるために、NRF-2 α -FLAG を HeLa 細胞内で発現させ、細胞内局在を調べる実験を行なった。HeLa 細胞に pcDNA-NRF-2 α -FLAG を transfection し、anti-FLAG 抗体を用いて免疫染色を行なって細胞内局在を観察したところ、Sawa らの報告と同様、NRF-2 α -FLAG は単独で過剰発現させても一部が核に局在するが、NRF-2 β を共発現させると核局在が促進された(図 2-4-1、A と C)。NRF-2 α -FLAG を単独で過剰発現させた場合、NRF-2 α が NRF-2 β の助けを借りずに核に運ばれるのか、内在性の NRF-2 β によって一部の NRF-2 α が核に運ばれるのかを区別するために、NRF-2 β と相互作用できない NRF-2 α の変異体を細胞内で発現させて細胞内局在を調べる実験を行なった。NRF-2 α の Tyr409 を Glu に置換した変異体(Y409E)を作製した。NRF-2 α と NRF-2 β の複合体の結晶構造では、NRF-2 α の Tyr409 の側鎖が NRF-2 β の Glu113 の側鎖と水素結合を形成している⁶⁶。Tyr409 を Glu に置換することで、静電反発が生じて NRF-2 β との結合が損なわれると期待した。Recombinant GST-NRF-2 β を glutathione beads に吸着させ、野生型の recombinant NRF-2 α (NRF-2 α -WT)もしくは NRF-2 α -Y409E と混ぜ、4°C で 1 h incubate した後 beads を回収し、溶出画分 (bound) と input を SDS-PAGE で分離して CBB で染色した。その結果、NRF-2 α -WT は GST-NRF-2 β と結合するが、NRF-2 α -Y409E は GST-NRF-2 β と結合しないことが分かった(図 2-4-1E)。NRF-2 α -Y409E-FLAG の細胞内局在を調べたところ、NRF-2 α -Y409E でも NRF-2 α -WT と同程度に核に局在することが分かった(図 2-4-1、A と B)。また、NRF-2 β を共発現させても NRF-2 α -Y409E-FLAG の細胞内局在に変化は見られないことから(図 2-4-1E)、NRF-2 α -Y409E は細胞内でも NRF-2 β と相互作用しないことが示唆された。これらの結果から、NRF-2 α には単独で核に運ばれる経路と、NRF-2 β によって促進される核内輸送経路があることが分かった。

2-4-2-2. NRF-2 α は Ets domain を介して核に運ばれる。

次に、NRF-2 α 単独での核内輸送に必要な領域を決定するために、NRF-2 α の欠損変異体と部位特異的変異体の細胞内局在を調べた。図 2-4-1 から、NRF-2 α を単独で過剰発現させた場合、NRF-2 β / γ に依存しない細胞内局在が観察できると考えられる。HeLa 細胞に pcDNA-NRF-2 α -FLAG の欠損変異体もしくは部位特異的変異体を transfection し、36 h 培養した後、anti-FLAG 抗体を用いて免疫染色を行なった。その結果、NRF-2 α を N 末から Ets domain まで削っても核局在に変化は見られなかったが(図 2-4-2A、NRF-2 α -FLAG-168/454、255/454、320/454)、Ets domain を含まない領域(1/319)だけでは核には殆ど局在しなかった。細胞破碎液を用いた

western hybridization によって、いずれの変異体も HeLa 細胞内で単一の長さの蛋白質が発現していることを確かめている(補足図 2-4-1)。このことから、NRF-2 α 単独での核内輸送には C 末端の Ets domain が必要かつ十分であることが分かった。また、Ets domain 以外の領域を欠損させても NRF-2 α の核局在は促進されなかったことから、NRF-2 α の N 末ドメインは NRF-2 α の核局在に阻害的に働いてはいないと考えられる。したがって Ets domain 単独での核内輸送の効率は、NRF-2 β によって促進される核内輸送の効率よりも低いと考えられる。このことに関しては後に考察する。Ets domainを持つ他の転写因子では、Ets domain の DNA 結合部位周辺に保存されている塩基性アミノ酸が核内輸送に必要であることが知られている¹⁰⁵⁻¹⁰⁷。そこで、NRF-2 α の Ets domain 中の Arg376 と Arg379 を Ala に置換した変異体(R376A/R379A)を作製して細胞内局在を調べたところ、R376A/R379A 変異によって NRF-2 α の核局在が阻害されることが分かった(図 2-4-2A)。このことから、NRF-2 α は他の Ets domain を持つ蛋白質と同様の機構で核に運ばれることが示唆された。

2-4-2-3. NRF-2 β の核内輸送には、311/321 の領域が必要かつ十分である。

NRF-2 β/γ の核内輸送メカニズムを明らかにするために、まず NRF-2 β の核移行シグナルを同定したいと考えた。HeLa 細胞に pcDNA-FLAG-NRF-2 β の欠損変異体もしくは部位特異的な変異体を transfection し、36 h 培養した後、anti-FLAG 抗体を用いて免疫染色を行なった。その結果、NRF-2 β の C 末端から 321 番目のアミノ酸まで削っても顕著な核局在が見られたのに対して、310 番目のアミノ酸まで削ると殆ど核に局在しなくなった(図 2-4-3A)。この結果は、NRF-2 β の 242/330 の部分を削ると核局在が阻害されるという Sawa らの報告と一致する⁴⁹。NRF-2 β の 311 番目から 321 番目のアミノ酸(311/321)で核内局在に十分かどうかを調べるために、GFP の C 末端に NRF-2 β -311/321 を融合させた construct (GFP-NRF-2 β -311/321)を作製し、細胞内局在を調べた。その結果、GFP のみでは細胞全体に分布したのに対して、GFP-NRF-2 β -311/321 は顕著に核に局在した(図 2-4-3B)。細胞破碎液を用いた western hybridization によって、いずれの変異体も HeLa 細胞内で単一の長さの蛋白質が発現していることを確かめている(補足図 2-4-1)。これらの結果から、NRF-2 β の核内局在には NRF-2 β/γ に共通する領域、311/321 が必要かつ十分であることが分かった。これまで知られている核移行シグナルの多くは塩基性のアミノ酸を含んでおり、塩基性アミノ酸が核内局在に必要であることが知られている^{108,109}。そこで、NRF-2 β の 311/321 中の Lys316 と Arg317 を Ala に置換した変異体(NRF-2 β -K316A/R317A)を作製し、細胞内局在を調べた。その結果、NRF-2 β -K316A/R317A は殆ど核に局在しないことが分かった。このことから、NRF-2 β の核内局在には Lys316 と Arg317 が必要であることが分かった。

2-4-2-4. NRF-2 α 単独での核内輸送は細胞質因子とエネルギーを必要とせず、NRF-2 $\alpha\beta$ の核内輸送は細胞質因子とエネルギーの両方が必要である(*in vitro* nuclear import assay)。

NRF-2 α 単独での核内輸送経路と、NRF-2 β によって促進される核内輸送経路に必要な因子を調べるために、NRF-2 α 、NRF-2 β の GFP 融合蛋白質を用いて *in vitro* nuclear import assay を行なった。*In vitro* nuclear import assay では、HeLa 細胞を digitonin で処理して細胞膜の透過性を高め(このとき核膜は保持される)、細胞質を洗い流した後に、外から加えた GFP 融合蛋白質の核内輸送を観察する¹¹⁰。この時、GFP 融合蛋白質に、GTP と ATP 再生系(energy)もしくは細胞質画分(cytosol)を加えて核内輸送への依存性を調べる。SV40 T-antigen の核移行シグナル(NLS)と BSA の融合蛋白質を用いて *in vitro* nuclear import assay を行なった Adam らの実験では、NLS-BSA の核内輸送には、細胞質画分とエネルギーの両方が必要であることが示されている¹¹⁰。GFP に SV40 T-antigen 由来の NLS を融合させた蛋白質(NLS-GFP)を調製して digitonin 処理した HeLa 細胞に加えたところ、Adam らの実験結果と同様、NLS-GFP は細胞質画分とエネルギーの両方に依存して核に運ばれた(図 2-4-4 五段目)。GFP のみでは細胞質画分とエネルギーを加えても核に運ばれなかったことから(図 2-4-4 四段目)、NLS-GFP の核への蓄積は SV40 T-antigen 由来の NLS に依存していると考えられる。次に、NRF-2 α -GFP のみを digitonin 処理した HeLa 細胞に加えた場合、反応 buffer のみで核内輸送が観察され、細胞質画分とエネルギーの依存性は見られなかった(図 2-4-4 一段目)。一方、NRF-2 α -GFP に NRF-2 β を等量加えると(NRF-2 α -GFP & NRF-2 β)、buffer のみでの核内輸送は阻害され、NRF-2 α -GFP の核内輸送は細胞質画分とエネルギーに依存するようになった(図 2-4-4 二段目)。これらの結果から、NRF-2 α 単独での核内輸送は細胞質因子とエネルギーを必要とせず、NRF-2 $\alpha\beta$ の核内輸送は細胞質因子とエネルギーの両方が必要であることが分かった。また、GFP-NRF-2 β を加えた場合も細胞質画分とエネルギーに依存して核に運ばれたことから(図 2-4-4 三段目)、NRF-2 $\alpha\beta$ の核内輸送は NRF-2 β に依存していることが示唆された。

2-4-2-5. NRF-2 $\alpha\beta$ は importin- α と importin- β によって核に運ばれる。

図 2-4-4 で、NRF-2 $\alpha\beta$ の核内輸送が細胞質因子に依存することが分かった。細胞質に含まれる蛋白質の核内輸送因子の殆どは importin- β family に属している。Importin- β family は、細胞質で基質蛋白質と結合し、核膜孔を通して基質を核内に運んだ後、核内で RanGTP と結合して基質を解離する。Importin- β family は直接基質と結合する場合と、アダプターとして働く importin- α を介して基質と結合する場合がある¹¹¹。細胞質に含まれるどの因子が NRF-2 $\alpha\beta$ の核内輸送を担っているかを調べるために、*in vitro* nuclear import assay に種々の inhibitor を加える実験を行なった。Importin- β の欠損変異体(importin- β -45/462)は不可逆的に核膜孔に結合して核膜孔を通過する

輸送全般を阻害する¹¹²。Importin- β -45/462 を加えると、細胞質因子に依存した NRF-2 α -GFP & NRF-2 β の核内輸送も、細胞質因子に依存しない NRF-2 α -GFP 単独での核内輸送も阻害された(図 2-4-5 上段)。このことから、いずれの核内輸送も核膜孔を経由していることが分かった。RanQ69L は RanGTPase の変異体で、importin- β family に結合して基質との結合を阻害する^{113,114}。importin- α family のひとつ Rch1 の importin- β binding domain (IBB domain、1/69)は、importin- β に特異的に結合して importin- β をマスクする¹¹⁵。RanQ69L と Rch1-IBB の両方とも NRF-2 α -GFP & NRF-2 β の核内輸送を阻害したことから、NRF-2 α -GFP & NRF-2 β の核内輸送は importin- β に依存することが示唆された。SV40 T-antigen 由来 NLS は importin- α と importin- β に依存して核に運ばれることが知られている¹¹⁶⁻¹¹⁹。NLS-GFP も NRF-2 α -GFP & NRF-2 β と同様に、importin- β -45/462、RanQ69L、Rch1-IBB を加えると核内輸送が阻害された。

NRF-2 $\alpha\beta$ の核内輸送は Importin- β に依存することが示唆された。Importin- β は基質と直接結合して核に運ぶ場合と、importin- α を介して基質と結合する場合がある。そこで、importin- α の依存性を調べるために、精製した recombinant importin- α 、importin- β を用いて核内輸送を再構成する実験を行なった。Importin- α には3つの subfamily が存在し、一部の基質に対しては特異性が異なることが知られているため^{120,121}、それぞれの subfamily の代表的な蛋白質、Rch1、NPI-1、Qip1 を実験に用いた。Importin- α を加えない場合、importin- β だけでは NRF-2 α -GFP & NRF-2 β は殆ど核に運ばれなかったのに対して、Rch1、NPI-1、Qip1 を加えると NRF-2 α -GFP & NRF-2 β は顕著に核に運ばれるようになった(図 2-4-6)。これらの結果から、NRF-2 $\alpha\beta$ は importin- α と importin- β によって核に運ばれることが分かった。また、importin- α の subfamily によって NRF-2 $\alpha\beta$ の核内輸送の効率はほぼ変わらないことが示唆された。

2-4-2-6. NRF-2 β と importin- α の結合には importin- β が必要である。また、NRF-2 β の Lys316 と Arg317 が importin- α :importin- β 複合体との結合に必要である。

In vitro nuclear import assay の結果から、NRF-2 $\alpha\beta$ は importin- α と importin- β によって核に運ばれることが分かった。NRF-2 $\alpha\beta$ が importin- α :importin- β 複合体によってどのように認識されるかを明らかにするために、精製した recombinant NRF-2 α 、NRF-2 β 、importin- α 、importin- β を用いて gel shift assay を行なった。Importin- α の subfamily によって NRF-2 $\alpha\beta$ の核内輸送の効率はほぼ変わらなかったことから、以降の実験では、importin- α の一つ Rch1 のみを用いた。Recombinant protein 1 μ M ずつを混ぜて 4°C で 1 h incubate した後、反応液を非変性 PAGE にかけて蛋白質複合体を分離し、anti-NRF-2 β /抗体、anti-HA 抗体、anti-FLAG 抗体を用いた western hybridization で、それぞれ NRF-2 β 、HA-importin- β 、FLAG-Rch1 を含む蛋白質複合体のバンドを検出した(図 2-4-7)。まず、NRF-2 β 単体で Rch1:importin- β 複合体と相互作用するかどうかを調べた。NRF-2 β

にFLAG-Rch1もしくはHA-importin- β を単独に加えた場合、NRF-2 β のバンドの移動度は変わらなかったのに対して、FLAG-Rch1とHA-importin- β を両方加えた場合、NRF-2 β を含むバンドが上にシフトした(図 2-4-7A、lane 1-4)。このことから、NRF-2 β と Rch1:importin- β との結合には、Rch1とimportin- β の両方が必要であることが分かった。SV40 T-antigen 由来の NLS の場合、importin- α のimportin- β binding domain (IBB domain、1/69)は、importin- β 非存在下ではimportin- α の残りの領域と結合してNLSとimportin- α の結合を阻害することが知られる。そのため、IBB domainを削ったimportin- α の変異体は野生型のimportin- α よりもSV40 T-antigen 由来のNLSとの結合力が強くなる¹²²。NRF-2 β にRch1のIBB domainを削った変異体(Rch1 Δ IBB)を加えると、NRF-2 β のバンドが上にシフトした(図 2-4-7A、lane 1と5)。このことから、NRF-2 β はSV40 T-antigen 由来のNLSと同様の様式でimportin- α と相互作用していることが示唆された。Anti-HA 抗体を用いてHA-importin- β を含むバンドを検出した場合も同様に、HA-importin- β のみではNRF-2 β を加えてもバンドの移動度は変わらないが、FLAG-Rch1 存在下ではNRF-2 β を加えることによってバンドが上にシフトした(図 2-4-7B、lane 1と3、2と4)。Anti-FLAG 抗体を用いてFLAG-Rch1またはFLAG-Rch1 Δ IBBを含むバンドの位置を検出した場合も同様に、FLAG-Rch1のみではNRF-2 β を加えてもバンドの移動度は変わらないが、HA-importin- β 存在下ではNRF-2 β を加えることによってバンドが上にシフトした(図 2-4-7B、lane 1と4、2と5)。また、FLAG-Rch1 Δ IBB にNRF-2 β を加えるとバンドが上にシフトし、Rch1 Δ IBB:NRF-2 β の二者複合体が検出された(図 2-4-7C、lane 3と6)。これらの結果から、NRF-2 β はimportin- α を介してimportin- α :importin- β 複合体と結合すること、NRF-2 β とimportin- α の結合にはimportin- β が必要であることが分かった。NRF-2 β のLys316とArg317をAlaに置換した変異体(NRF-2 β -K316A/R317A)では、核内局在が阻害された(図 2-4-3A)。NRF-2 β -K316A/R317AにRch1:importin- β を加えてもバンドの移動度が変わらなかったことから、K316A/R317A変異によってNRF-2 β とRch1:importin- β との結合が阻害されることが分かった(図 2-4-7D、lane 3と4)。このことから、NRF-2 β の核内局在にはimportin- α :importin- β と結合することが必要であることが示唆された。GFP 融合蛋白質の核内局在を調べる実験から、NRF-2 β の311/321の領域で核内局在に十分であることが分かった(図 2-4-3B)。Rch1:HA-importin- β にGST-GFP-NRF-2 β -311/321を加えるとGFP-NRF-2 β 、GST-GFP-SV40-NLSの場合と同様、上にシフトするバンドが現れた。一方でGST-GFPをRch1:HA-importin- β に加えてもバンドの移動度は変わらなかった(図 2-4-7E)。これらの結果から、NRF-2 β の311/321の領域でimportin- α :importin- β との結合に十分であることが分かった。

2-4-2-7. NRF-2 β はimportin- α のN末領域、SV40 T-antigen 由来NLSとの結合領域とほぼ同じ範囲に結合する。NRF-2 β のNLS(311/321)中でLys316とArg317に加えてPro313、Pro314も

importin- α との結合に必要である。

これまでの実験から、NRF-2 β の核内輸送に必要な領域、311/321: EEPPAKRQCIE (NRF-2 β のNLSと呼ぶ)は単独でimportin- α と結合すること、Lys316とArg317がimportin- α との結合に必要であることが分かった。一方、これまで知られているimportin- α に結合するNLSの多くは、塩基性アミノ酸、lysine、arginine 残基を少なくとも3残基以上含んでおり^{108,109}、SV40 T-antigen 由来のNLS、PKKKRKVとimportin- α の複合体の結晶構造から、PKKKRKVの下線で示した3つの塩基性アミノ酸がimportin- α との相互作用に寄与していることが示唆されている¹²³。このため、NRF-2 β のNLSがimportin- α とどのように相互作用しているのかは不明であった。

そこでまず、NRF-2 β のNLS中でimportin- α との結合に必要なアミノ酸残基を決定するために、各アミノ酸残基をAlaに置換した変異体を作製してimportin- α との結合の有無をgel shift assayを用いて調べた。Rch1:importin- β に野生型のNRF-2 β を加えると上にシフトするバンドが現れた。同様に、E311A/E312A、P313A、P314A、Q318A、C319A/I320A 変異体をRch1:importin- β に加えても上にシフトするバンドが現れた(図2-4-8A)。一方で、K316A、R317A、P313A/P314A 変異体をRch1:importin- β に加えてもRch1:importin- β のバンドは殆ど影響を受けなかった。これらの結果から、NRF-2 β のNLS中のLys316、Arg317以外に、Pro313とPro314もimportin- α との相互作用に寄与していること、Pro313とPro314の両方をAlaに置換するとimportin- α と結合できなくなることが分かった。次に、P313A、P314A 変異体によるNRF-2 β の細胞内局在の変化を調べた。HeLa細胞にpcDNA-FLAG-NRF-2 β のP313A、P314A、P313A/P314A 変異体をtransfectionし、36 h培養した後細胞を固定化し、anti-FLAG M2を用いて免疫染色を行なった。P313A 変異体ではNRF-2の核内局在が一部阻害されたが、P314A 変異体ではNRF-2 β の核内局在に変化は見られなかった(図2-4-8C)。P313A/P314A 変異体では、P313A 変異体よりも更に核内局在が阻害された。これらの結果から、Pro313とPro314がNRF-2 β の核内局在に必要であること、Pro313の方がPro314よりも寄与が大きいことが分かった。また、mouse、xenopus、zebrafishのNRF-2 β ホモログ中にもhuman NRF-2 β のNLSと類似の配列が存在し、塩基性アミノ酸に加えて、二つのproline残基も保存されていることが分かった(図2-4-8B)。このことから、NRF-2 β のNLSは脊椎動物に保存されており、proline残基と塩基性アミノ酸の両方がNRF-2 β のNLSの機能に必要であることが示唆された。

次に、importin- α のどの領域がNRF-2 β と相互作用しているかを調べるために、Rch1の欠損変異体を用いてgel shift assayを行なった。importin- α は、importin- β と結合するN末のIBB domainと、10個のarmadillo repeat(三つの α -helixが束になった構造)が並ぶC末ドメインで構成されている。野生型のRch1(1/529)と、Rch1のN末から数えて1つ目から6つ目のarmadillo repeatを含む変異体(1/335)、1つ目から6つ目のarmadillo repeatを含む変異体(1/285)にNRF-2 β を加

えたところ、野生型の Rch1 と Rch1-1/335 では上にシフトするバンドが現れたのに対して、Rch1-1/285 では上にシフトするバンドは現れなかった(図 2-4-8D、lane 2、5、8)。このことから、Rch1 の 1 つ目から 6 つ目までの armadillo repeat を含む領域で NRF-2 β との相互作用に十分であること、6 つ目の armadillo repeat が NRF-2 β との相互作用に必要であることが分かった。SV40 T-antigen 由来の NLS と importin- α との複合体の結晶構造からは、主に importin- α の 1 つ目から 4 つ目までの armadillo repeat が NLS と相互作用することが示唆されている^{123,124}。SV40 T-antigen 由来 NLS と GST-GFP との融合蛋白質を(GST-GFP-SV40-NLS)用いて Rch1 変異体との結合の有無を調べたところ、野生型の Rch1、Rch1-1/335、Rch1-1/285 のいずれも GST-GFP-SV40-NLS を加えると上にシフトするバンドが現れた(図 2-4-8D、lane 3、6、9)。このことから、Rch1 の 1 つ目から 5 つ目までの armadillo repeat を含む領域で SV40 T-antigen 由来 NLS との相互作用に十分であることが確かめられた。これらの結果から、NRF-2 β は importin- α に対して SV40 T-antigen 由来 NLS とほぼ同じ領域に結合するが、6 つ目の armadillo repeat の依存性が異なることが分かった。

2-4-2-8. NRF-2 α 単独でも importin- α :importin- β と結合して核内に運ばれる。

Ets domain を持つ転写因子の一つ、Fli-1 は Ets domain を介して、importin- α と importin- β に結合することが示唆されている¹⁰⁵。NRF-2 α 単独での核内輸送は細胞質因子を必要としないことが分かったが(図 2-4-4)、NRF-2 α 単独での核内輸送は Ets domain を介することが示唆されたため(図 2-4-2)、NRF-2 α が importin- α :importin- β と結合し、核に運ばれるかどうかを調べることにした。Recombinant NRF-2 α と Rch1、HA-importin- β を用いて gel shift assay を行なった。NRF-2 α に Rch1 と HA-importin- β の両方を加えた時のみ NRF-2 α のバンドが上にシフトしたことから(図 2-4-9A)、NRF-2 α も NRF-2 β と同様に Rch1:importin- β と結合すること、Rch1 と importin- β の両方が NRF-2 α との結合に必要であることが分かった。次に、NRF-2 α が Rch1 と importin- β によって核に運ばれるかどうかを、*in vitro* nuclear import assay を用いて調べた。Digitonin 処理した HeLa 細胞に NRF-2 α -GFP を加えて核への蓄積を観察した。NRF-2 α -GFP は buffer のみでも核への蓄積が見られるが、recombinant Rch1 と importin- β を加えると更に効率よく核に蓄積した(図 2-4-9B)。これらの結果から、importin- α :importin- β は NRF-2 α にも結合して、核に運ぶことができることが分かった。NRF-2 α の核内局在が阻害された変異体、R376A/R379A (図 2-4-2)についても Rch1:importin- β との結合を調べたところ、NRF-2 α -R376A/R379A は野生型の NRF-2 α と比べて Rch1:importin- β によって上にシフトするバンドの割合が少なくなった(図 2-4-9A、lane 4 と 6)。一方、NRF-2 α の R376A/R379A 変異体は importin- α :importin- β に依存しない核内輸送も野生型に比べて効率が低かった(図 2-4-9C)。したがって、*in vitro* nuclear import assay で、NRF-2 α には細胞質

因子を必要としない核内輸送経路と、importin- α :importin- β によって運ばれる経路があることが示唆されたが、R376A/R379A 変異によっていずれの経路も阻害されたことから、細胞内で NRF-2 α 単独での核内輸送がどちらの経路によって行なわれているかは不明である。

2-4-2-9. NRF-2 $\alpha\beta$ は NRF-2 β と importin- α :importin- β の結合に依存して核内に運ばれる。

NRF-2 α 、NRF-2 β ともに単独でも importin- α :importin- β に結合することが分かった。NRF-2 $\alpha\beta$ が importin- α :importin- β とどのように相互作用しているかを調べるために、importin- α :importin- β との結合が阻害された NRF-2 α 、NRF-2 β の変異体を用いて gel shift assay を行なった。NRF-2 α -R376A/R379A、NRF-2 β -K316A/R317A 変異体を用いても、野生型の NRF-2 α 、NRF-2 β を用いた場合と同様に NRF-2 α :NRF-2 β 複合体のバンドが検出された(図 2-4-10A、lane 3、7、9)。NRF-2 α :NRF-2 β に Rch1:importin- β を加えるとバンドが上にシフトした(lane 7 と 8)。NRF-2 α :NRF-2 β : importin- α :importin- β 複合体のバンドは、野生型の NRF-2 α の代わりに NRF-2 α -R376A/R379A を用いた場合は検出されたのに対して、野生型の NRF-2 β の代わりに NRF-2 β -K316A/R317A を用いると検出されなくなった(lane 4、8、10)。このことから、NRF-2 $\alpha\beta$ と importin- α :importin- β の結合は NRF-2 β の核移行シグナルに依存することが分かった。また、HeLa 細胞に NRF-2 β -K316A/R317A と FLAG-NRF-2 α を共発現させた場合、FLAG-NRF-2 α は殆ど核に局在しなくなった(図 2-4-10B)。これらの結果から、NRF-2 $\alpha\beta$ は、NRF-2 β と importin- α :importin- β の結合に依存して核内に運ばれることが分かった。

2-4-2-10. NRF-2 $\alpha\gamma$ は NRF-2 $\alpha\beta$ は importin- α :importin- β によって、同程度の効率で核に運ばれる。

これまでの実験から、NRF-2 $\alpha\beta$ の核内輸送は NRF-2 β と Rch1:importin- β の結合に依存することが分かった。また、NRF-2 β と Rch1:importin- β の相互作用には NRF-2 β と NRF-2 γ に共通する領域の 311/321 で必要十分であることから、NRF-2 $\alpha\beta$ と NRF-2 $\alpha\gamma$ は Rch1:importin- β によって同様の機構で核内に運ばれると推察された。このことを検証するために、免疫染色による NRF-2 β の変異体と NRF-2 α の細胞内局在観察、recombinant NRF-2 γ を用いた gel shift assay、GFP-NRF-2 γ を用いた *in vitro* nuclear import assay を行なった。

NRF-2 β -1/310 変異体は、NRF-2 β と NRF-2 γ に共通する部分で、核局在に必要な領域 311/321 が欠損しているため殆ど核に局在しない(図 2-4-3A)。HeLa 細胞に NRF-2 β -1/310 と FLAG-NRF-2 α を共発現させると、NRF-2 β -K316A/R317A の場合と同様(図 2-4-9B)、FLAG-NRF-2 α は殆ど核に局在しなくなった(図 2-4-11A)。このことから、NRF-2 β が NRF-2 α と結合することで NRF-2 α に依存した核内輸送経路を遮断する機構は NRF-2 γ にも共通することが示

唆された。次に、NRF-2 γ と Rch1:importin- β の相互作用を gel shift assay を用いて調べた。Recombinant NRF-2 γ に Rch1:importin- β を加えると NRF-2 β と同様に上にシフトするバンドが現れた(図 2-4-11B、lane 1 と 2、5 と 6)。また、Rch1:importin- β に NRF-2 γ を加えると NRF-2 β を加えた場合と同様に上にシフトするバンドが現れた(図 2-4-11C、lane 1、2、4)。これらの結果から、NRF-2 β と同様に NRF-2 γ も Rch1:importin- β と強固に結合することが分かった。次に、digitonin 処理した HeLa 細胞に、Rch1 と importin- β を、濃度を変えて投入した場合に GFP-NRF-2 β と GFP-NRF-2 γ が核に運ばれる効率がどのように変化するかを調べた。0.5 μ M の GFP-NRF-2 β もしくは GFP-NRF-2 γ に対して Rch1:importin- β を加えない場合と GFP-NRF-2 β も GFP-NRF-2 γ も殆ど核に運ばれなかった(図 2-4-11E)。GFP-NRF-2 β 、GFP-NRF-2 γ ともに、0.02 μ M の Rch1:importin- β を加えると一部が核に運ばれて、0.1 μ M、0.5 μ M の Rch1:importin- β を加えるとさらに効率よく核に運ばれた。また、Rch1:importin- β をどの濃度で加えた場合も、GFP-NRF-2 β と GFP-NRF-2 γ で核に運ばれる効率に違いは見られなかった。このことから、NRF-2 β と NRF-2 γ は Rch1:importin- β によってほぼ同程度の効率で核に運ばれることが示唆された。また、gel shift assay で recombinant NRF-2 α と NRF-2 γ に Rch1:importin- β を加えると、NRF-2 α :NRF-2 β と同様に、上にシフトするバンドが現れたことから(図 2-4-11D、lane 3 と 5)、NRF-2 $\alpha\gamma$ も NRF-2 $\alpha\beta$ と同じく、Rch1:importin- β と安定な複合体を形成することが分かった。これらの結果から、NRF-2 $\alpha\beta$ と NRF-2 $\alpha\gamma$ は importin- α :importin- β によって同程度の効率で核に運ばれることが分かった。

2-4-3. 考察

NRF-2 α には単独で核に運ばれる経路が存在する(図 2-4-12)。

NRF-2 α は Ets family の中では例外的に、単独では核に運ばれないと考えられていたが、以下の実験結果に基づき、NRF-2 α は NRF-2 β/γ の助けを借りずに、単独でも核に運ばれることが明らかになった。第一に、intact な HeLa 細胞において、NRF-2 β/γ と相互作用できない変異体 NRF-2 α -Y409E でも野生型の NRF-2 α と同程度核に局在した。第二に、digitonin 処理した HeLa 細胞に、NRF-2 α -GFP を外から加えると、NRF-2 β/γ 非存在下でも核に運ばれた。

NRF-2 α の単独での核内輸送には、細胞質因子に依存しない経路と、importin- α :importin- β によって核に運ばれる経路があることが示唆された。細胞質因子に依存しない蛋白質の核内輸送は、これまでに ERK2、beta catenin、SMAD 転写因子などで知られている¹²⁵⁻¹²⁷。これらの場合、核に運ばれる蛋白質と核膜孔の構成因子である nucleoporin の直接の相互作用が輸送に関与していることが示唆されている^{125,128}。NRF-2 α の細胞質因子に依存しない核内輸送は、nucleoporin のいくつかと不可逆的に結合して核膜孔を塞ぐ importin- β -45/462 を加えると阻害されたことから(図

2-4-5)、NRF-2 α の場合も nucleoporin との相互作用が核内輸送に必要であると考えられる。*In vitro* nuclear import assay の系に importin- β -45/462 を加えることで、阻害されない核内輸送経路も知られており¹²⁹、importin- β -45/462 は一部の核内輸送経路のみを阻害すると考えられる。Ets family の一つ、PU.1 についても *in vitro* nuclear import assay で細胞質因子に依存しないで核に運ばれることが示されている¹⁰⁴。NRF-2 α の場合と異なり、PU.1 の核内輸送にはエネルギーが必要であることが示唆されている。Solution binding assay で、核膜孔の核側に位置する nucleoporin、Nup153 と PU.1 の結合が RanGTP によって強められることが示されており、PU.1 の実験では核内の RanGTP が枯渇したことによって、核内輸送におけるエネルギー依存性が見られたと考えられる。PU.1 も Ets domain に依存して核に運ばれることから、NRF-2 α も類似の輸送経路であると考えられるが、NRF-2 α の核内輸送がエネルギー非依存的に観察されたのは、本研究の実験系では GTP が枯渇されずに、核内の RanGTP が十分量残されていたことに起因する可能性がある。一方で、importin- α :importin- β も NRF-2 α に結合して核に運ぶ活性があることが分かった(図 2-4-9)。Ets family の一つ Fli-1 も、Ets domain を介して importin- α と結合することが示されている¹⁰⁵。これらの実験結果と知見から、細胞質因子に依存しない経路と importin- α :importin- β によって運ばれる経路は、Ets family に共通する核内輸送経路であると考えられる。

NRF-2 α は単独でも核に運ばれるが、NRF-2 $\alpha\beta$ と比べて核内輸送の効率は低いと考えられる(図 2-4-1)。NRF-2 α の N 末部分、Ets domain 以外の領域(1/319)を削っても核内局在の効率は変わらないことから(図 2-4-2)、NRF-2 α の N 末部分が核内輸送に阻害的に働いているわけではない。したがって、NRF-2 β の NLS 依存の経路と比較して、NRF-2 α の Ets domain 自身の核内輸送の効率は低いと考えられる。Ets family の他の蛋白質、例えば Elf-3 や Fli-1 は Ets domain 以外の領域にも核移行シグナルが存在することが知られる^{105,106}。このことから、Ets family は、Ets domain によって核に運ばれる経路が存在するが、効率的な核内輸送には Ets domain 以外に核移行シグナルも持つことが必要なのではないかと考えられる。

NRF-2 β/γ が NRF-2 α と等量存在する場合、NRF-2 β/γ は NRF-2 α 単独での核内輸送経路を遮断するため NRF-2 $\alpha\beta/\alpha\gamma$ の核内輸送は NRF-2 β/γ の NLS に依存するが、いくつかの生理的条件下では NRF-2 α 単独での核内輸送が起こっているのではないかと考えられる。NRF-2 β/γ の量は変化せずに NRF-2 α の発現量が増加することで、NRF-2 の標的遺伝子の転写が促進される例がいくつか知られている。例えば、筋繊維細胞のシナプス結合部位特異的な遺伝子発現を誘導させると、NRF-2 β の蛋白質量は変わらず NRF-2 α の蛋白質量のみが増加する⁶⁹。同様に、甲状腺ホルモンをラットに投与すると、ミトコンドリアの ATPase subunit の mRNA 量の増加に先立って NRF-2 α のみの mRNA 量の増加が見られる³⁵。MEF 細胞の細胞周期特異的な遺伝子発現では、G0 期から S 期に入る時点で NRF-2 α の蛋白質量が増加することによって、DNA 合成に関わる遺伝子の発

現が誘導される⁸⁹。これらの場合、NRF-2 は β/γ サブユニットの量は変えずに α サブユニットの量を変化させることで転写調節を行なっている。これらの生理的条件下では、細胞質で新たに合成された α サブユニットに対して、細胞質で α サブユニットと会合して核へと運ぶ β/γ サブユニットの量が足りなくなることが予想される。このとき、 α サブユニットは β/γ サブユニットに依存せずに核に運ばれ、核内で初めて β/γ サブユニットと結合すると考えられる。

NRF-2 β/γ は importin- α :importin- β に依存した核移行シグナルを持つ。

NRF-2 β/γ は単独で過剰発現した場合でも核に局在することから、NRF-2 β/γ の内部に核移行シグナルが存在すると考えられてきたが⁴⁹、既知の核移行シグナルの特徴を持つ部位が存在しないため、NRF-2 β/γ が核に運ばれる機構は分かっていなかった。本研究で、NRF-2 β/γ の核移行シグナル(NLS)を同定し、NRF-2 β/γ は importin- α :importin- β によって核に運ばれることを明らかにした。NRF-2 β/γ の NLS はこれまで知られている importin- α と結合する NLS とは異なり、塩基性アミノ酸を二つしか持たない。NRF-2 β/γ の NLS が importin- α によってどのように認識されるかについて考察する。

NRF-2 β/γ の欠損変異体の細胞内局在を調べた実験から、311/321 の領域が NRF-2 β/γ の核内局在に必要であることが分かった。また、311/321を GFP に融合させると GFP が顕著に核に局在したことから、311/321 の領域で核内局在に十分であることが分かった(図 2-4-3)。NRF-2 β/γ は importin- α :importin- β と結合すること、importin- α :importin- β と結合しない NRF-2 β の変異体は核に局在しなくなる(図 2-4-7)、*in vitro* nuclear import assay で GFP-NRF-2 β/γ は Rch1 と importin- β の濃度依存的に核に運ばれることから(図 2-4-11)、NRF-2 β/γ は importin- α :importin- β と結合して核に運ばれることが分かった。

Rch1 の欠損変異体を用いた gel shift assay から、NRF-2 β/γ の NLS と SV40 T-antigen 由来 NLS は importin- α のほぼ同じ領域に結合した(図 2-4-8)。Importin- α が認識する NLS は塩基性アミノ酸の cluster が一つのもの(monopartite NLS)と二つのもの(bipartite NLS)に大別され^{108,109,130}、SV40 T-antigen 由来 NLS は monopartite NLS の代表的なものである。Monopartite NLS は少なくとも三つの塩基性アミノ酸を含むと考えられてきた¹³¹。また、monopartite NLS のうち、SV40 T-antigen 由来 NLS と c-myc 由来 NLS について、importin- α との複合体の結晶構造が解かれており、塩基性アミノ酸を三つ含む'consensus'配列、K-K/R-x-K/R が importin- α との相互作用に寄与していることが明らかにされている^{123,132}。このため塩基性アミノ酸を二つしか含んでいない NRF-2 β/γ の NLS (311/321: EEPPAKRQCIE)が importin- α によってどのように認識されるかは不明である。

結晶構造から示唆された monopartite NLS の塩基性アミノ酸部分と importin- α の相互作用は三

つに大別される。ひとつは塩基性アミノ酸のアミノ基と importin- α 側の酸性アミノ酸残基との間の静電相互作用。ひとつは塩基性アミノ酸の炭素鎖が importin- α 側の複数の tryptophan 残基にスタックされることによる疎水性相互作用。ひとつは NLS の主鎖が β 構造を取ることで、主鎖のアミド基が importin- α 側の複数の asparagine 残基と水素結合を形成する。NRF-2 β/γ の NLS は、monopartite NLS の 'consensus'、K-K/R-x-K/R と重ねると4番目の K/R が cysteine に変わっている。K-K/R-x-K/R の4番目の K/R は importin- α の酸性アミノ酸残基との静電相互作用と tryptophan 残基との疎水性相互作用に寄与しており、NRF-2 β/γ の NLS ではこれらの相互作用が失われると考えられる。

一方で monopartite NLS は塩基性アミノ酸の cluster の N 末側に proline 残基が存在する場合が多く¹³¹、塩基性アミノ酸の cluster から N 末側に2アミノ酸隔てて proline が存在することで核内局在が促進されることが示唆されている¹³³。NRF-2 β/γ の NLS の場合も塩基性アミノ酸の2残基 N 末側に proline 残基が二つ存在しており、importin- α との結合に寄与している(図 2-4-8)。このことから、NRF-2 β/γ の NLS では、塩基性アミノ酸の N 末側の proline 残基が塩基性アミノ酸の不足を補うことで importin- α と結合するのではないかと考えられる。

Rch1 の欠損変異体と、NRF-2 β/γ の NLS、SV40 T-antigen 由来の NLS との相互作用を調べた実験結果から、Rch1 の N 末から5番目の armadillo repeat までで SV40 T-antigen 由来の NLS との結合に十分であるが、NRF-2 β/γ の NLS との結合には6番目の armadillo repeat が必要であることが分かった(図 2-4-8)。Importin- α と c-myc の NLS、PAAKRVKLD と importin- α との複合体の結晶構造では、proline 残基の主鎖が importin- α の5番目の armadillo repeat 中の側鎖と水素結合を形成している¹³²。一方で塩基性アミノ酸の cluster 部分は2番目から4番目の armadillo repeat と相互作用している。NRF-2 β/γ の NLS も c-myc の NLS と類似の構造を取って importin- α と結合していると考えられるが、6番目の armadillo repeat が NRF-2 β/γ の NLS の認識に必要なのは、NLS 中の塩基性アミノ酸の cluster から N 末に伸びた領域が5番目以降の armadillo repeat と相互作用しているためであると考えられる。一方で SV40 T-antigen 由来 NLS は、三つの塩基性アミノ酸が保存されているために、importin- α の5番目までの armadillo repeat で相互作用に十分であったと考えられる。

NRF-2 β/γ 存在下では NRF-2 α 単独での核内輸送経路は遮断され、NRF-2 $\alpha\beta/\alpha\gamma$ の核内輸送は NRF-2 β/γ の NLS に依存する(図 2-4-12)。

以下の実験結果に基づき、NRF-2 α には単独で核に運ばれる経路が存在するが、NRF-2 β/γ 存在下ではそれらの経路は遮断され、NRF-2 $\alpha\beta/\alpha\gamma$ の核内輸送は NRF-2 β/γ の NLS に依存することが明らかにされた(図 2-4-12)。第一に、*in vitro* nuclear import assay で、NRF-2 α -GFP は細胞質因

子を必要とせずに核に運ばれたが、等量の NRF-2 β を加えると核に運ばれなくなった(図 2-4-4)。第二に、gel shift assay で、NRF-2 α は単独で importin- α :importin- β と結合するが、NRF-2 β -K316A/R317A を加えると結合できなくなった(図 2-4-10)。第三に、HeLa 細胞に野生型の NRF-2 α を過剰発現させると一部は核に運ばれるが、NRF-2 β -K316A/R317A を共発現させると殆どが細胞質に局在した(図 2-4-10)。このメカニズムは、NRF-2 α と NRF-2 β/γ が細胞質に共存する場合、NRF-2 α のみでは核に運ばれずに、NRF-2 $\alpha\beta/\alpha\gamma$ 複合体が形成されてから核に運ばれることを保証している。NRF-2 の転写促進には α サブユニットと β/γ サブユニットの両方が必要である。転写活性を持たない α サブユニットが単独で核に運ばれることを阻害し、転写促進活性を持つ NRF-2 $\alpha\beta/\alpha\gamma$ のみが核内に入ることを保証することで、NRF-2 による転写促進を効率的に行なっていると考えられる。これまで、Ets family の中では例外的に、NRF-2 α は単独では核に運ばれず、NRF-2 β/γ 存在下でのみ核に運ばれると考えられていた^{49,134}。このことにより、転写促進活性を持つ NRF-2 $\alpha\beta/\alpha\gamma$ のみが核に運ばれると説明されてきた。本研究で NRF-2 α 単独でも核に運ばれることが分かったが、一方で、NRF-2 β/γ 存在下では NRF-2 α 単独での核内輸送は遮断され、NRF-2 $\alpha\beta/\alpha\gamma$ のみが核に運ばれる分子機構が明らかにされた。

NRF-2 β と NRF-2 γ で核局在効率に差を生じる原因は明らかにされていない。その原因についてどのようなことが考えられるか。

2-3 章で、NRF-2 β は NRF-2 γ よりも核に局在する効率が高いために、転写を促進活性が高いことが分かった。NRF-2 $\alpha\beta/\alpha\gamma$ の核内輸送の分子機構を比較した結果、NRF-2 $\alpha\beta$ と NRF-2 $\alpha\gamma$ では核に運ばれる経路は同一であることが示唆された(図 2-4-11)。第一に、NRF-2 β と NRF-2 γ に共通する領域 1/310 を NRF-2 α と共発現させると、NRF-2 α の核内輸送が阻害された。このことから NRF-2 α に依存した核内輸送経路を遮断する仕組みは NRF-2 β と NRF-2 γ に共通すると考えられる。第二に、NRF-2 γ と NRF-2 α の複合体も NRF-2 β と NRF-2 α の複合体と同様に importin- α :importin- β と安定な複合体を形成した。第三に、*in vitro* nuclear import assay の結果から、importin- α :importin- β によって GFP-NRF-2 β と GFP-NRF-2 γ はほぼ同じ効率で核に運ばれた。このことから、少なくとも *in vitro* では、NRF-2 $\alpha\beta$ と NRF-2 $\alpha\gamma$ で核に運ばれる効率は変わらないと考えられる。したがって、細胞内で NRF-2 $\alpha\beta/\alpha\gamma$ の核内局在に違いが生じる原因は現在のところ分かっていない。以下の実験結果から、HeLa 細胞または HEK293T 細胞内で、NRF-2 $\alpha\beta/\alpha\gamma$ の核局在効率は、何らかの要因で低く抑えられていると考えられる。HeLa 細胞を核画分と細胞質画分に分け、NRF-2 α 、NRF-2 β/γ に対する抗体を用いて western hybridization を行なうと NRF-2 α 、NRF-2 β/γ ともに、核画分にも細胞質画分にも含まれていた(図 2-3-8)。同じ分画方法で、核膜に結合している lamin B1 に加えて GAL4-DBD も細胞質には含まれずに顕著に核画分のみに含ま

れることから(図 2-3-8、補足図 2-3-2)、NRF-2 $\alpha\beta/\alpha\gamma$ が細胞質画分に検出されたのは、NRF-2 $\alpha\beta/\alpha\gamma$ が細胞質に局在していることを反映していると考えられる。また、SV40 T-antigen 由来 NLS もしくは GAL4-DBD を N 末に付加すると、NRF-2 β/γ ともに核画分に含まれる割合が増加した(図 2-3-5、図 2-3-7)。これらの結果は、NRF-2 β/γ のみでは細胞内で核に局在する効率は低いことを示唆している。この要因として、細胞内で importin- α :importin- β に依存した核内輸送を阻害する機構が存在する可能性と、NRF-2 β/γ を核外に運ぶ経路が存在して核内輸送と拮抗している可能性が考えられる。またそれらの要因によって NRF-2 $\alpha\beta$ と NRF-2 $\alpha\gamma$ で核に局在する効率が異なる可能性がある。NRF-2 β/γ の NLS は、C 末の β/γ に特異的なドメインの近傍に存在する。このため、NRF-2 β/γ の C 末ドメインと相互作用する因子によって NLS と importin- α :importin- β との相互作用が影響を受け、NRF-2 β/γ の核内輸送効率に差が生じる可能性がある。

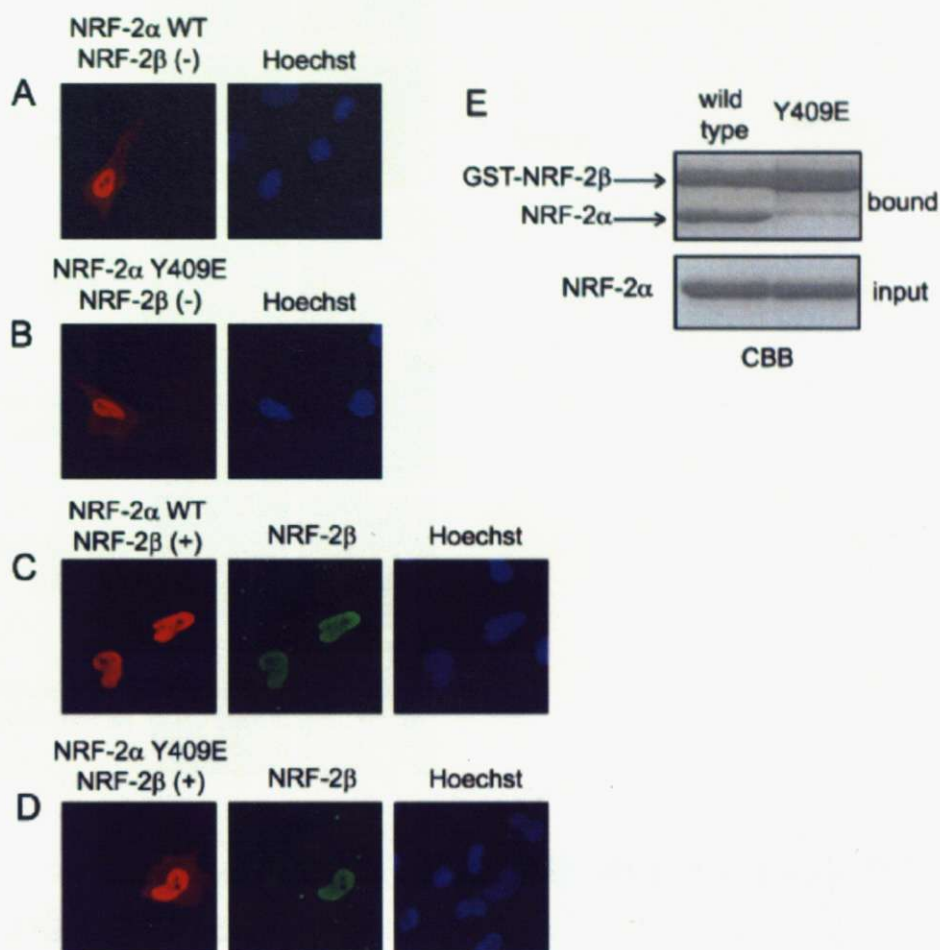


図 2-4-1. NRF-2αは単独でも核に運ばれるが、NRF-2βによって核局在が促進される。

A-D. HeLa 細胞に、pcDNA-NRF-2α-FLAG (WT、A、C)、pcDNA-NRF-2α-Y409E-FLAG (Y409E、B、D)、pcDNA-NRF-2β (C、D)を transfection し、36 h 培養した後細胞を固定化し、anti-FLAG M2 抗体と anti-mouse IgG Alexa fluor 568 (赤)、anti-NRF-2β/γ抗体と anti-rabbit IgG FITC (緑)を用いて免疫染色を行なった。Hoechst 33342 を用いて核 DNA を染色した(青)。Leica TCS SP2 を用いて共焦点画像を撮った。NRF-2βと結合できない(E 参照) NRF-2α-Y409E でも NRF-2α-WT と同程度に核に局在することが分かった(A と B)。また、Sawa らの報告と同様、NRF-2βを共発現させると NRF-2αの核局在が促進された(A と C)。E. Recombinant GST-NRF-2βを glutathione beads に吸着させ、recombinant NRF-2α-WT もしくは NRF-2α-Y409E と混ぜ、4°Cで 1 h incubate した後 beads を回収し、溶出画分 (bound) と input を SDS-PAGE で分離して CBB で染色した。NRF-2α-WTは GST-NRF-2βと結合するが、NRF-2α-Y409Eは GST-NRF-2βと結合しないことが分かった。

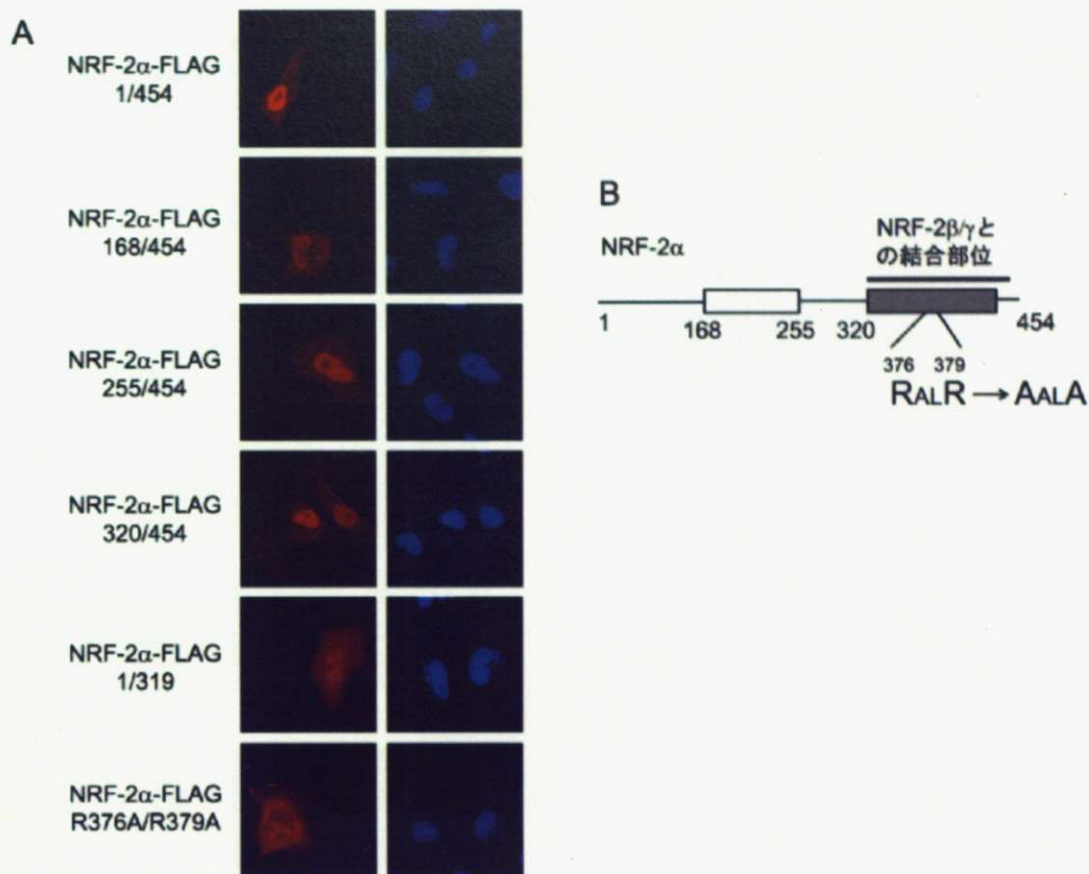


図 2-4-2. NRF-2 α は Ets domain を介して核に運ばれる。Ets domain 中の Arg376、Arg379 が核内輸送に必要である。

A. HeLa 細胞に、pcDNA-NRF-2 α -FLAG の野生型と欠損変異体又は部位特異的変異体を transfection し、36 h 培養した後細胞を固定化し、anti-FLAG M2 抗体と anti-mouse IgG Alexa fluor 568 (赤)を用いて免疫染色を行なった。Hoechst 33342 を用いて核 DNA を染色した(青)。Leica TCS SP2 を用いて共焦点画像を撮った。NRF-2 α -FLAG-1/454 は図 2-4-1 の NRF-2 α -WT、NRF-2 β (-)と同じ写真である。NRF-2 α を N 末から Ets domain まで削っても核局在に変化は見られなかった(168/454、255/454、320/454)。一方で Ets domain を含まない領域(1/319)だけでは核には殆ど局在しなかった。Ets domain 中の Arg376 と Arg379 を Ala に置換すると NRF-2 α の核局在が阻害された(R376A/R379A)。B. NRF-2 α の一次構造を模式図で表した。図 1-4 参照。

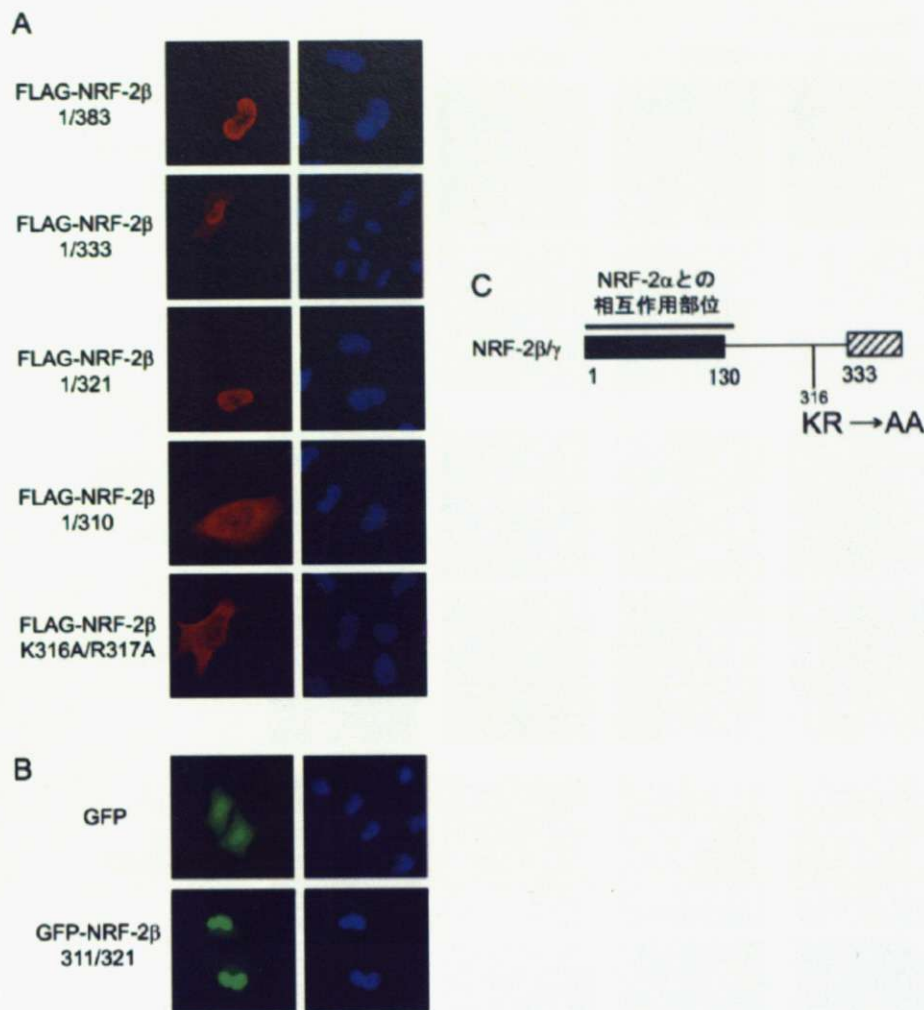


図 2-4-3. NRF-2βの核内輸送には、311/321 の領域が必要かつ十分である。また 311/321 中の Lys316、Arg317 が核内輸送に必要である。

A, B. HeLa 細胞に、pcDNA-FLAG-NRF-2βの野生型と欠損変異体又は部位特異的変異体(A)、pcDNA-GFPとpcDNA-GFP-NRF-2β-311/321(B)を transfection し、36 h 培養した後細胞を固定化し、anti-FLAG M2 抗体と anti-mouse IgG Alexa fluor 568 (赤)を用いて免疫染色を行なうか(A)、または GFP の蛍光を観察した(B)。Hoechst 33342 を用いて核 DNA を染色した(青)。Leica TCS SP2 を用いて共焦点画像を撮った。FLAG-NRF-2β-1/383 は図 2-3-8 の FLAG-NRF-2βと同じ写真である。NRF-2βの C 末端から 321 番目のアミノ酸まで削っても顕著な核局在が見られたのに対して、310 番目のアミノ酸まで削ると殆ど核に局在しなくなった(A)。また、NRF-2βの Lys316 と Arg317 を Ala に置換すると、核に局在しなくなった(A)。GFP は細胞全体に局在したのに対して、GFP-NRF-2β-311/321 は顕著に核に局在した(B)。C. NRF-2β/γの一次構造の模式図。図 1-4 参照。NRF-2β/γに特異的な領域を斜線四角で表した。

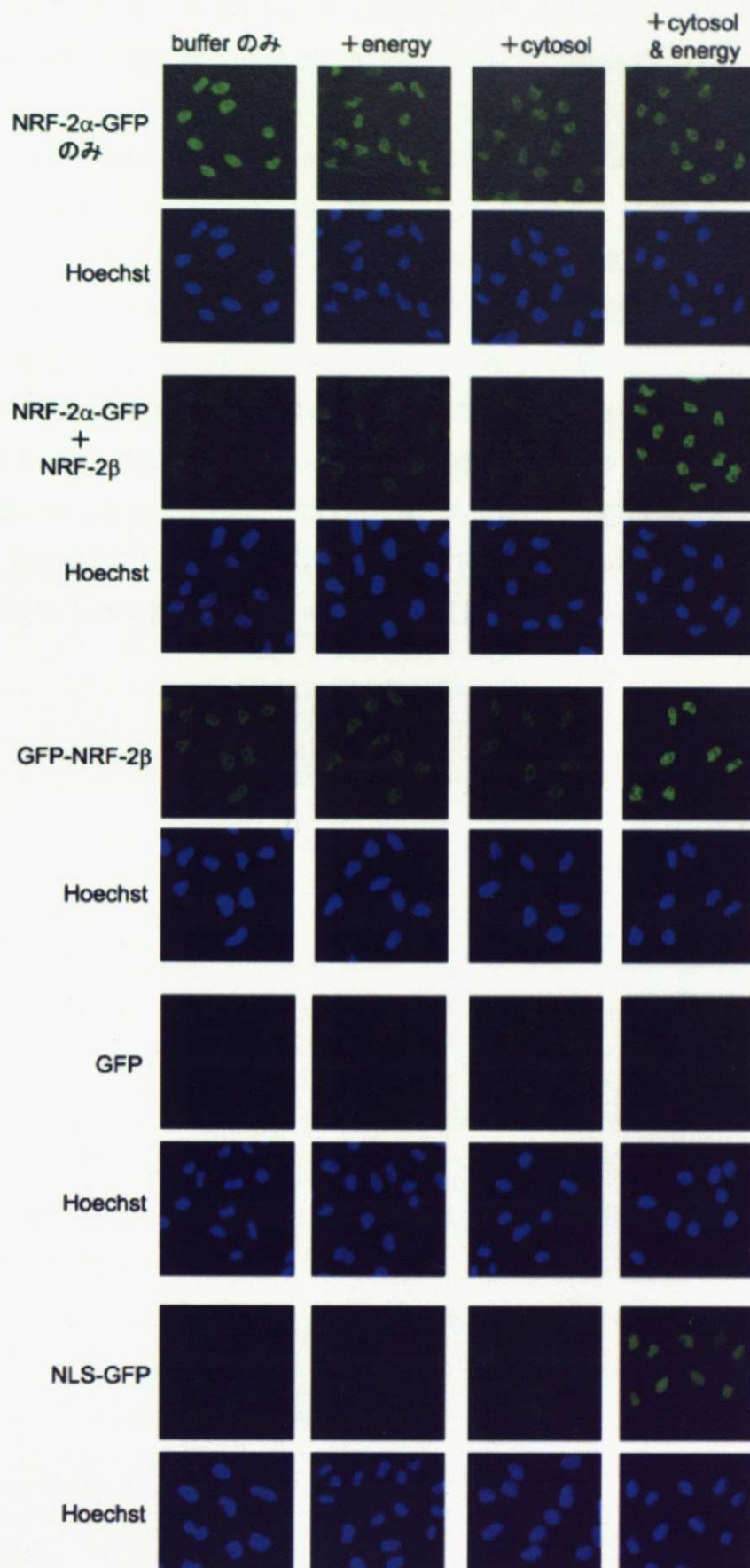


図 2-4-4. NRF-2 α 単独での核内輸送は細胞質因子とエネルギーを必要とせず、NRF-2 $\alpha\beta$ の核内輸送は細胞質因子とエネルギーの両方が必要である(*in vitro* nuclear import assay)。

Digitonin で処理した HeLa 細胞に 0.5 μ M NRF-2 α -GFP(一段目、二段目)、NRF-2 β (二段目)、GFP-NRF-2 β (三段目)、GFP(四段目)、NLS-GFP(五段目)を加えて 1 h 30°C で incubate した後、ホルマリンを加えて反応を停止させ、核に蓄積した GFP 融合蛋白質を観察した(緑)。Hoechst 33342 を用いて核 DNA を染色した(青)。Leica TCS SP2 を用いて共焦点画像を撮った。また、反応液中に 0.5 mM GTP と ATP 再生系(energy、左から二列目、四列目)、7 mg/ml HeLa cytosol (cytosol、三列目、四列目)を加えた。Buffer のみもしくは cytosol のみを加えた場合、Hexokinase を用いて残存の ATP を除去した。NRF-2 α -GFP は細胞質因子とエネルギーを必要とせずに buffer のみで核に運ばれたが、NRF-2 β 存在下では細胞質とエネルギーの両方を加えたときのみ核に運ばれた。また GFP のみでは核に運ばれないが、SV40 T-antigen 由来の核移行シグナルを付加した GFP(NLS-GFP)は細胞質とエネルギーの両方を加えたときのみ核に運ばれた。

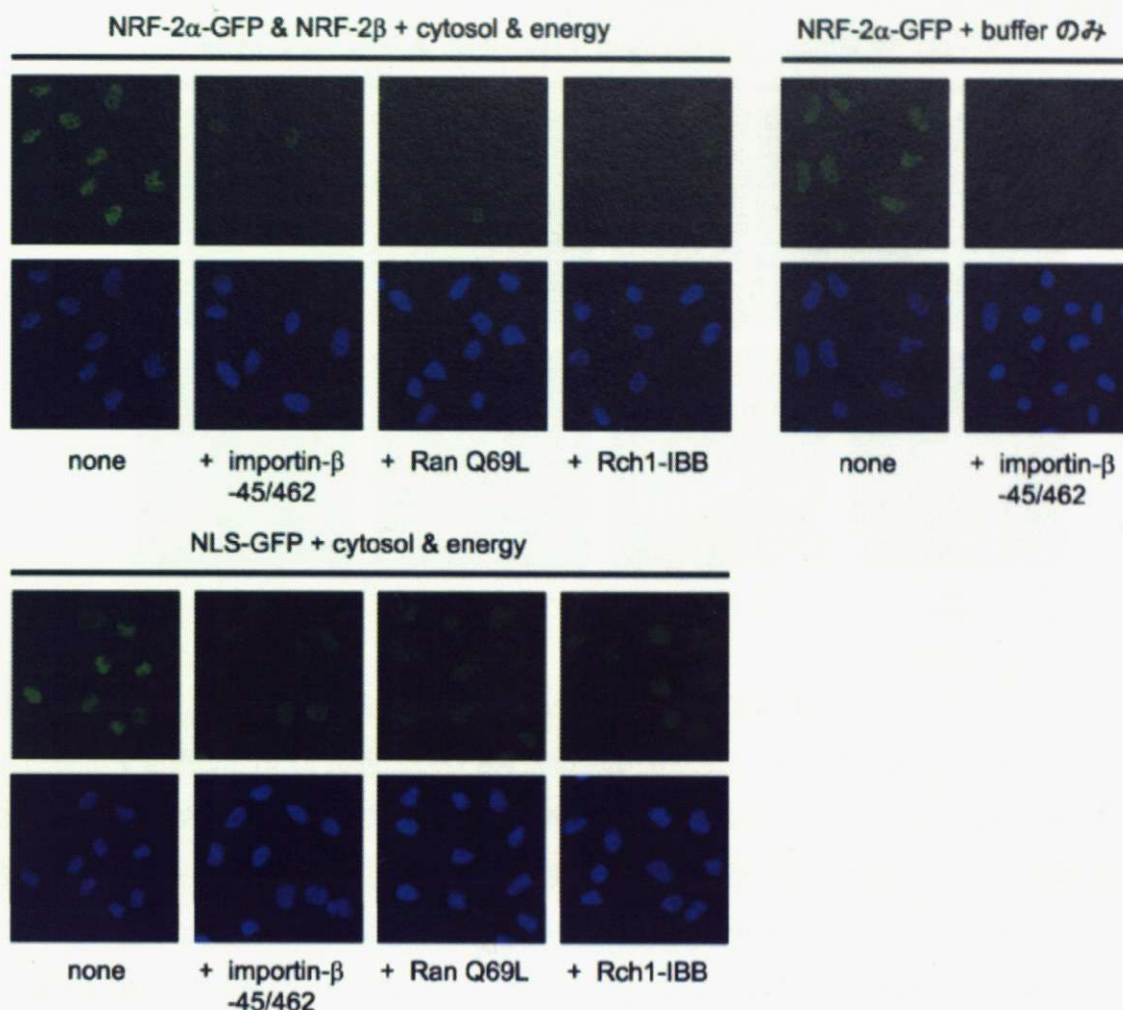


図 2-4-5. NRF-2 α β の核内輸送には importin- β が必要である。

Digitonin で処理した HeLa 細胞に 0.5 μ M NRF-2 α -GFP(上段、左右)、NRF-2 β (上段左)、NLS-GFP(下段)、エネルギーと細胞質(上段左と下段)を加えて 1 h 30°C で incubate し、核に蓄積した GFP 融合蛋白質を観察した(緑)。Hoechst 33342 を用いて核 DNA を染色した(青)。反応液中に 5 μ M importin- β -45/462、10 μ M RanQ69L、2.5 μ M GST-Rch1-1/69 (Rch1-IBB)を加え、核内輸送の阻害効果を調べた。Importin- β -45/462 は、核膜孔に不可逆的に結合して、核膜孔を通過する輸送全般を阻害する。RanQ69L は importin- β family に結合して基質との結合を妨げる。Rch1-IBB は importin- β に特異的に結合して基質との結合を妨げる。NRF-2 α -GFP & NRF-2 β の核内輸送はこれらいずれの inhibitor を用いても阻害されたことから、NRF-2 α β は importin- β に依存した経路で核に運ばれることが示唆された。SV40 T-antigen 由来の核移行シグナルを付加した GFP(NLS-GFP)でも同様に、importin- β -45/462、RanQ69L、Rch1-IBB によって核内輸送が阻害された(下段)。

NRF-2 α -GFP & NRF-2 β + importin- β , RanGDP, NTF2

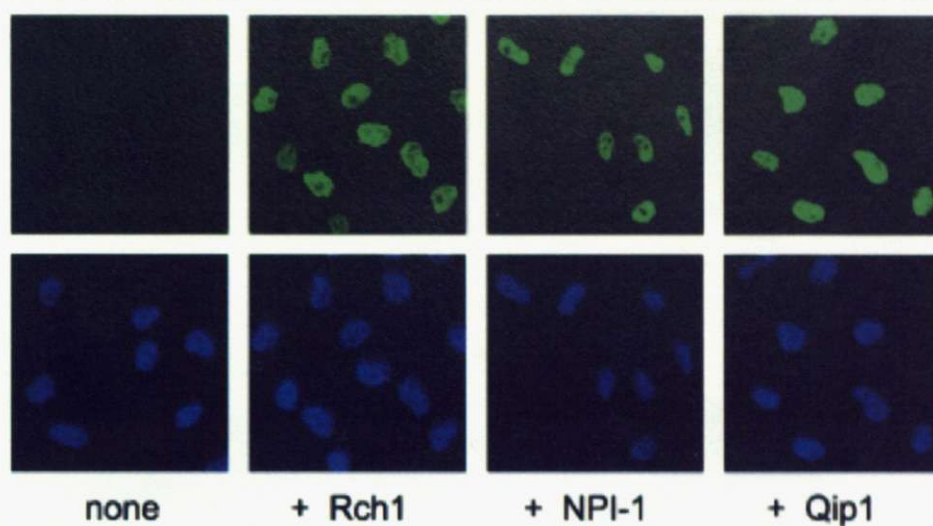


図 2-4-6. NRF-2 $\alpha\beta$ の核内輸送には importin- α が必要である。

Digitonin で処理した HeLa 細胞に、0.5 μ M NRF-2 α -GFP、0.5 μ M NRF-2 β 、0.5 μ M importin- β 、2.5 μ M RanGDP、2.5 μ M NTF2 に、buffer のみ、もしくは 0.5 μ M Rch1、NPI-1、Qip1 を加えて 1 h 30°C で incubate し、核に蓄積した GFP 融合蛋白質を観察した(緑)。Hoechst 33342 を用いて核 DNA を染色した(青)。NTF2 は RanGDP を核内に運ぶ。RanGDP と NTF2 は importin- β 依存の核内輸送を促進させるために加えた。Rch1、NPI-1、Qip1 のいずれも NRF-2 α -GFP & NRF-2 β を効率よく核に運んだが、importin- α を加えないと NRF-2 α -GFP & NRF-2 β は殆ど核に運ばれなかった。

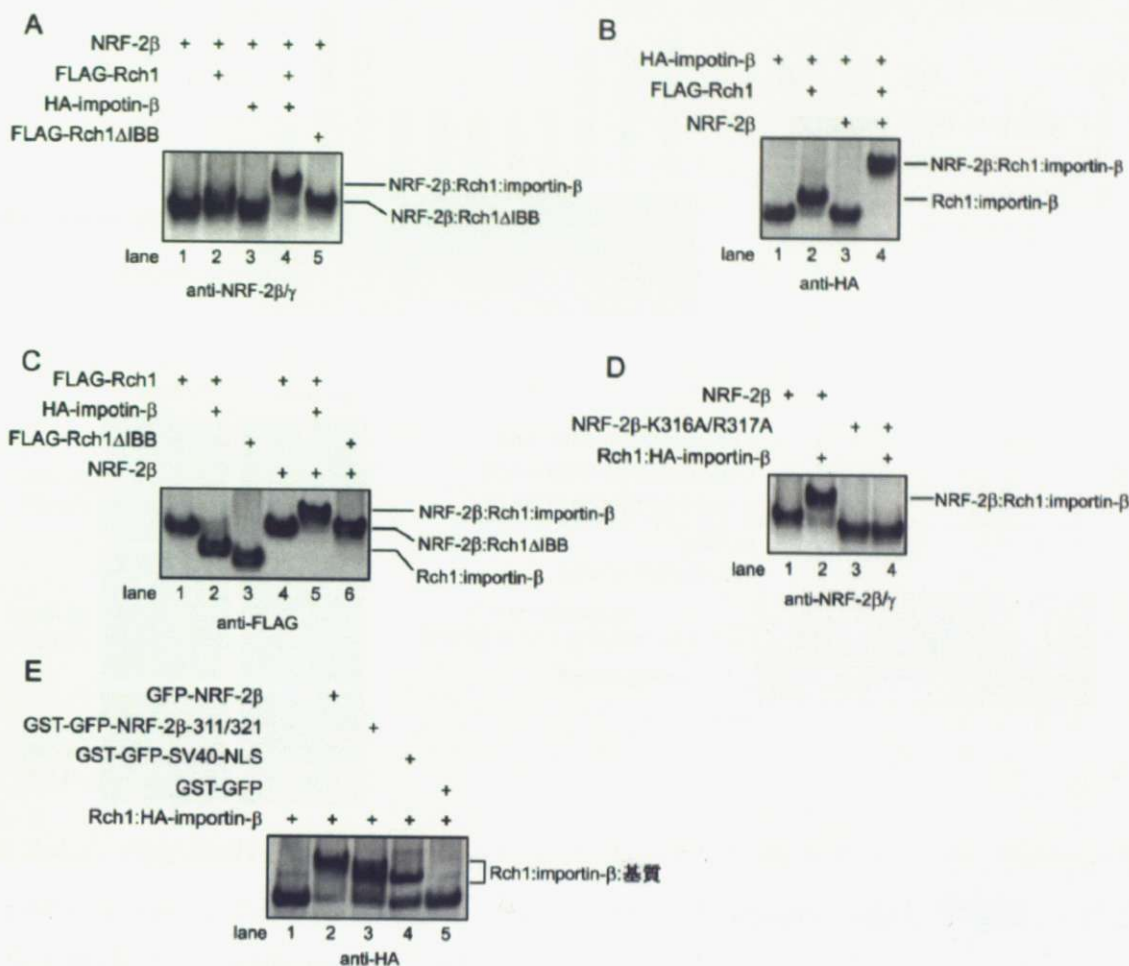


図 2-4-7. NRF-2βと importin-αの結合には importin-βが必要である。また、NRF-2βの Lys316 と Arg317 が importin-α:importin-β複合体との結合に必要である。

A-E. 1 μM の recombinant NRF-2β、FLAG-Rch1、Rch1、FLAG-Rch1ΔIBB、HA-importin-β、GFP-NRF-2β、GST-GFP-NRF-2β-311/321、GST-GFP-SV40-NLS、GST-GFP を混ぜて、4℃で 1 h incubate した後、非変性 PAGE で蛋白質複合体を分離した。ゲルを nitrocellulose 膜に転写して、anti-NRF-2β/γ抗体(AとD)、anti-HA 抗体(BとE)、anti-FLAG 抗体(C)で western hybridization を行なった。それぞれのバンドに含まれる蛋白質複合体を示した(X、Y、Z を含む場合、X:Y:Z と表記した)。Rch1 と HA-importin-βの両方を加えた場合、Rch1:HA-importin-βと表記した。

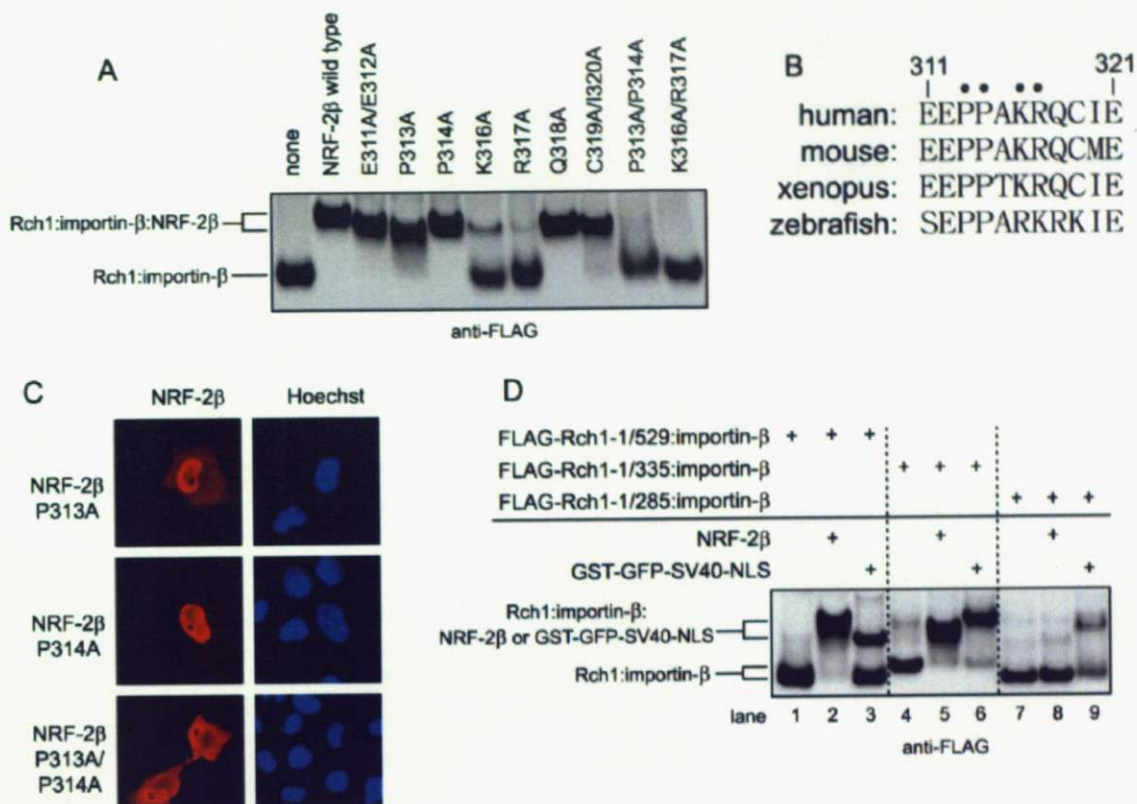


図 2-4-8. NRF-2 β の NLS 中で Lys316 と Arg317 に加えて Pro313、Pro314 も importin- α :importin- β との結合に必要である。NRF-2 β は importin- α の N 末領域、1 番目から 6 番目の armadillo repeats に結合する。

A. 1 μ M の recombinant Rch1、HA-importin- β (importin- β) と、NRF-2 β の野生型もしくは部位特異的変異体を混ぜて、4°C で 1 h incubate した後、非変性 PAGE で蛋白質複合体を分離し、anti-FLAG 抗体で western hybridization を行なった。野生型 NRF-2 β (wild type)、E311A/E312A 変異体などを加えると Rch1:importin- β のバンドは上にシフトしたのに対して、K316A、R317A、P313A/P314A、K316A/R317A 変異体を加えても Rch1:importin- β のバンドは殆ど影響を受けなかった。B. 各生物種の NRF-2 β ホモログのアミノ酸配列を並べた; mouse (NP_997552)、xenopus (*X. laevis*, CAA62625)、zebrafish (NP_997877)。保存されている Pro 残基、塩基性アミノ酸、Lys/Arg 残基を黒丸で示した。C. HeLa 細胞に、pcDNA-FLAG-NRF-2 β の Pro313 と Pro314 を Ala に置換した変異体を transfection し、36 h 培養した後細胞を固定化し、anti-FLAG M2 抗体と anti-mouse IgG Alexa fluor 568 (赤) を用いて免疫染色を行なった。Hoechst 33342 を用いて核 DNA を染色した(青)。Pro313Ala 変異によって、NRF-2 β の核内局在は一部阻害されたが、Pro314Ala 変異によって NRF-2 β の核内局在は殆ど影響を受けなかった。Pro313Ala/Pro314Ala 変異体では、Pro314Ala 変異体よりもさらに核内局在が阻害された。D. 1 μ M の FLAG-Rch1 の野生型 (1/529) と欠損変異体、HA-importin- β (importin- β) と、NRF-2 β もしくは

GST-GFP-SV40-NLS を混ぜて、4°Cで 1 h incubate した後、非変性 PAGE で蛋白質複合体を分離し、anti-FLAG 抗体で western hybridization を行なった。野生型の FLAG-Rch1 と FLAG-Rch1-1/335 に NRF-2 β 、GST-GFP-SV40-NLS を加えると上にシフトするバンドが現れたが (lane 2、3、5、6)、FLAG-Rch1-1/285 は GST-GFP-SV40-NLS を加えた場合のみ上にシフトするバンドが現れた (lane 8 と 9)。

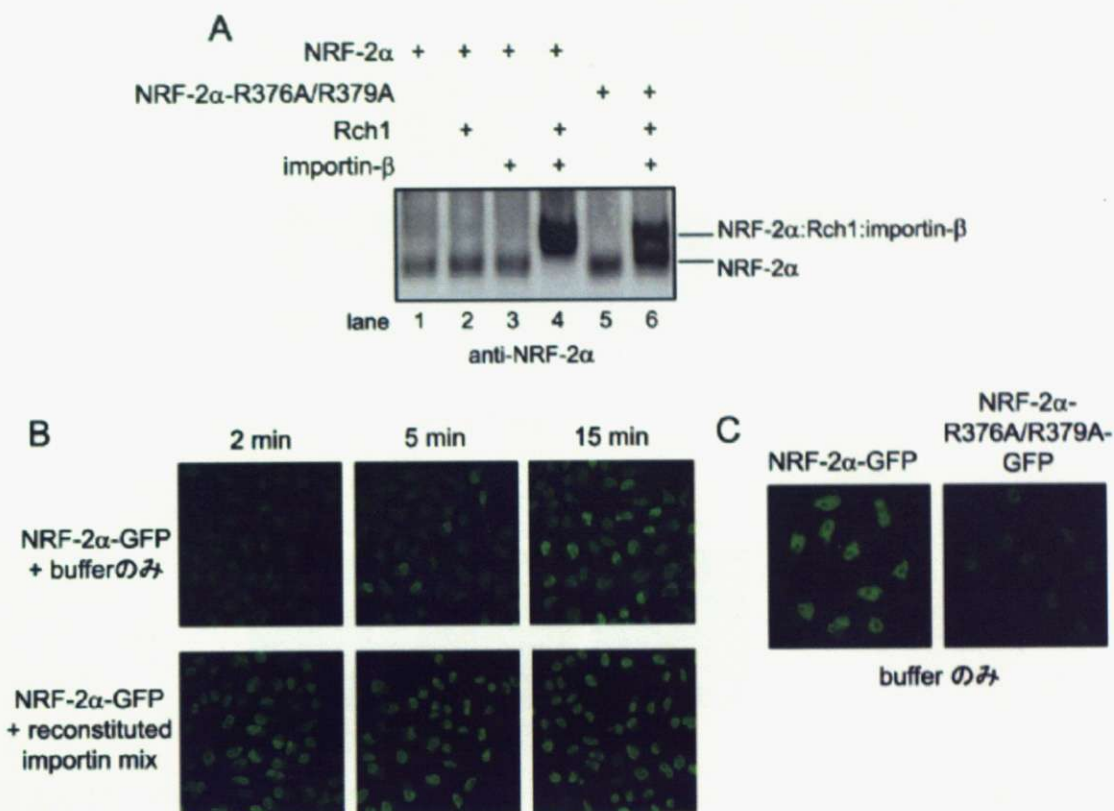


図 2-4-9. NRF-2 α 単独でも importin- α :importin- β と結合して核内に運ばれる。

A. 1 μ M の recombinant NRF-2 α (野生型もしくは R376A/R379A) と Rch1、HA-importin- β (importin- β) を混ぜて、4°C で 1 h incubate した後、非変性 PAGE で蛋白質複合体を分離した。ゲルを nitrocellulose 膜に転写して、anti-NRF-2 α 抗体を用いて western hybridization を行なった。NRF-2 α のバンドは Rch1 と importin- β の両方を加えたときのみ上にシフトした (lane 1-4)。NRF-2 α -R376A/R379A は野生型の NRF-2 α と比べて Rch1 と importin- β を加えたときにシフトするバンドの割合が少なかった (lane 4 と 6)。

B. Digitonin で処理した HeLa 細胞に、0.5 μ M NRF-2 α -GFP と、buffer のみ、もしくは 0.5 μ M Rch1、0.5 μ M importin- β 、2.5 μ M RanGDP、2.5 μ M NTF2 (reconstituted importin mix) を加えて室温で 2 min、5 min、15 min incubate し、核に蓄積した GFP 融合蛋白質を観察した。NRF-2 α -GFP は buffer のみでも核に蓄積したが、reconstituted importin mix を加えると核に蓄積する効率が高くなった。

C. Digitonin で処理した HeLa 細胞に、0.5 μ M NRF-2 α -GFP もしくは NRF-2 α -R376A/R379A-GFP に buffer のみを加えて 30 度で 1 h incubate し、核に蓄積した GFP 融合蛋白質を観察した。R376A/R379A 変異によって NRF-2 α -GFP の buffer のみでの核内輸送が阻害された。

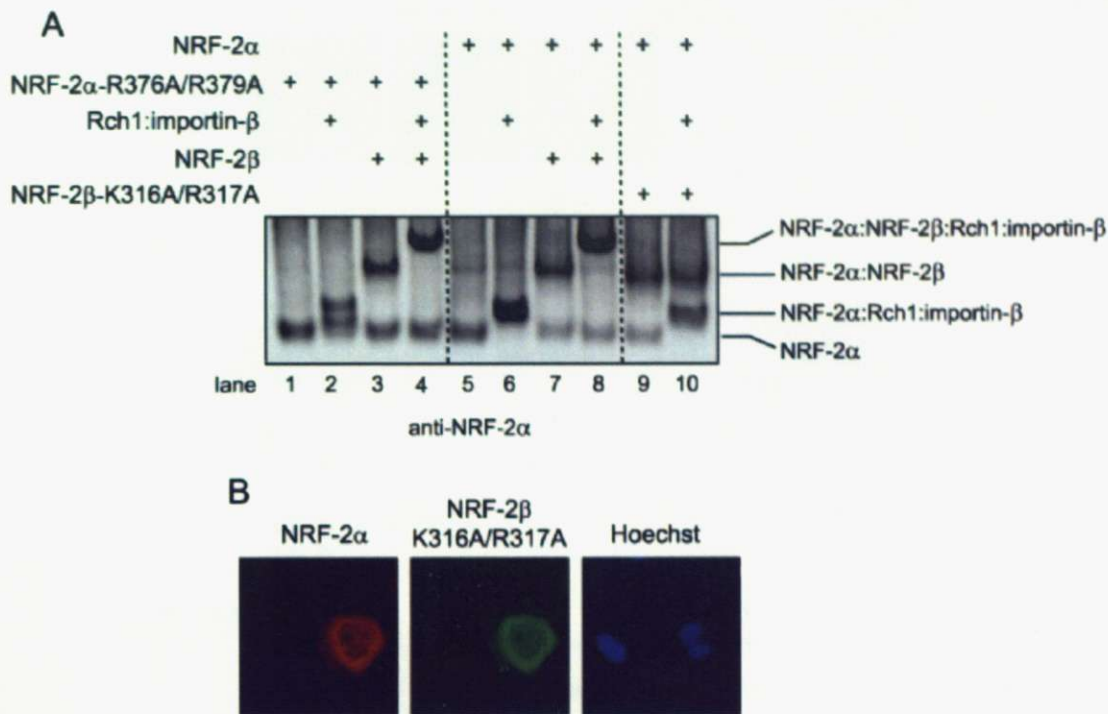


図 2-4-10. NRF-2αβは NRF-2βと importin-α:importin-βの結合に依存して核内に運ばれる。

A. 1 μM の recombinant NRF-2α(野生型もしくは R376A/R379A)、NRF-2β(野生型もしくは K316A/R317A)と Rch1、HA-importin-β(importin-β)を混ぜて、4°Cで 1 h incubate した後、非変性 PAGEで蛋白質複合体を分離した。ゲルを nitrocellulose 膜に転写して、anti-NRF-2α抗体を用いて western hybridization を行なった。NRF-2α-R376A/R379A、NRF-2β-K316A/R317A 変異体を用いても、野生型の NRF-2α、NRF-2βを用いた場合と同様に NRF-2α:NRF-2β複合体のバンドが検出された(lane 3、7、9)。NRF-2α:NRF-2βに Rch1:importin-βを加えるとバンドが上にシフトした(lane 7 と 8)。NRF-2α:NRF-2β:importin-α:importin-βのバンドは、野生型の NRF-2αの代わりに NRF-2α-R376A/R379A を用いても検出されたのに対して、野生型の NRF-2βの代わりに NRF-2β-K316A/R317A を用いると検出されなくなった(lane 4、8、10)。B. HeLa 細胞に、pcDNA-NRF-2α-FLAG と pcDNA-NRF-2β-K316A/R317A を co-transfection し、36 h 培養した後細胞を固定化して anti-FLAG M2 抗体と anti-mouse IgG Alexa fluor 568 (NRF-2α、赤)、anti-NRF-2β/γ抗体と anti-rabbit IgG FITC (NRF-2β、緑)を用いて免疫染色を行なった。Hoechst 33342を用いて核 DNA を染色した(青)。NRF-2β-K316A/R317A を共発現させると、NRF-2αは殆ど核に局在しなくなった。

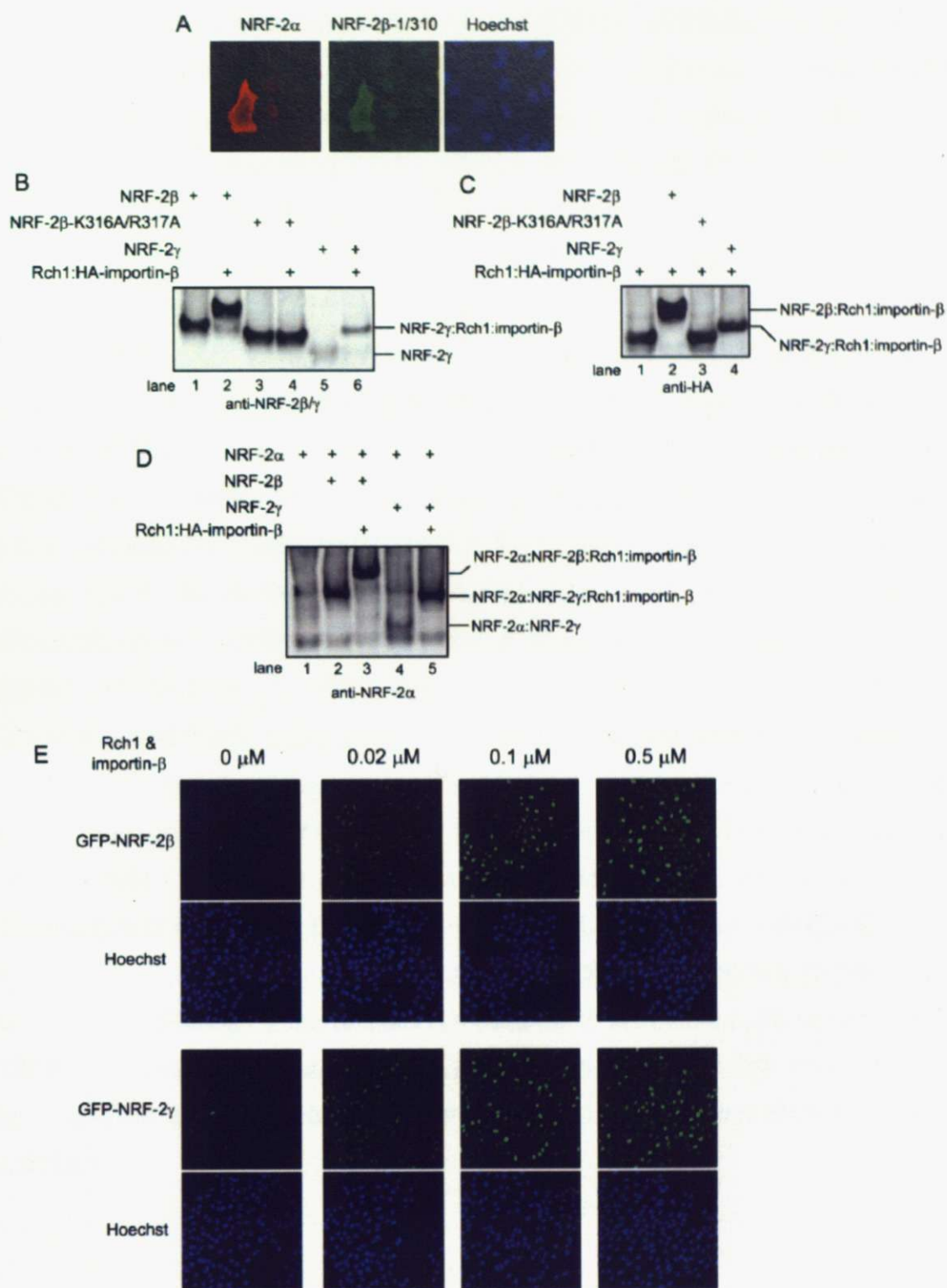


図 2-4-11. NRF-2 α γ は NRF-2 α β と同様のメカニズムで核に運ばれる。

A. HeLa 細胞に、pcDNA-NRF-2 α -FLAG と pcDNA-NRF-2 β -1/310 を co-transfection し、36 h 培養した後細胞を固定化して anti-FLAG M2 抗体と anti-mouse IgG Alexa fluor 568 (NRF-2 α 、赤)、anti-NRF-2 β / γ 抗体と anti-rabbit IgG FITC (NRF-2 β 、緑)を用いて免疫染色を行なった。Hoechst 33342 を用いて核 DNA を染色した(青)。NRF-2 β -1/310 を共発現させると、NRF-2 α は殆ど核に局在しなくなった。このことから、NRF-2 β と NRF-2 γ で共通する 1/310 の領域で、NRF-2 α の核内局在を抑制するのに十分であることが分かった。B-D. 1 μ M の recombinant NRF-2 α (野生型)、NRF-2 β (野生型もしくは K316A/R317A)、NRF-2 γ と Rch1、HA-importin- β を混ぜて、4°C で 1 h incubate した後、非変性 PAGE で蛋白質複合体を分離した。ゲルを nitrocellulose 膜に転写して、anti-NRF-2 β / γ 抗体(B)、anti-HA 抗体(C)、anti-NRF-2 α 抗体(D)を用いて western hybridization を行なった。NRF-2 β と同様、NRF-2 γ に Rch1:importin- β を加えるとバンドが上にシフトした(B、lane 1 と 2、5 と 6)。Rch1:importin- β に NRF-2 γ を加えた場合も、NRF-2 β と同様にバンドが上にシフトした(C、lane 1、2、4)。図 2-4-7D、E と結果と同じく、NRF-2 β -K316A/R317A は、Rch1:importin- β と混ぜてもお互いのバンドの移動度に変化は見られなかった(B、lane 3 と 4、C、lane 1 と 3)。これらの結果から、NRF-2 γ は NRF-2 β と同様に Rch1:importin- β と強固に結合することが分かった。また、NRF-2 α :NRF-2 γ 複合体に Rch1:importin- β を加えると、NRF-2 α :NRF-2 β 複合体と同様に上にシフトするバンドが現れた(D、lane 3 と 5)。このことから、NRF-2 α γ も NRF-2 α β と同様に Rch1:importin- β と強固に結合することが分かった。E. Digitonin で処理した HeLa 細胞に、0.5 μ M GFP-NRF-2 β もしくは GFP-NRF-2 γ と、2.5 μ M RanGDP、2.5 μ M NTF2、Rch1 と HA-importin- β (importin- β)を表示した濃度加え、室温で 20 min incubate し、核に蓄積した GFP 融合蛋白質を観察した。Hoechst 33342 を用いて核 DNA を染色した(青)。GFP-NRF-2 β も GFP-NRF-2 γ も、Rch1:importin- β を加えないと殆ど核に運ばれず、0.02 μ M の Rch1:importin- β を加えると一部が核に運ばれ、0.1 μ M、0.5 μ M の Rch1:importin- β を加えると 0.02 μ M よりも効率よく核に運ばれた。Rch1:importin- β をどの濃度で加えても、GFP-NRF-2 β と GFP-NRF-2 γ はほぼ同程度の効率で核に運ばれた。

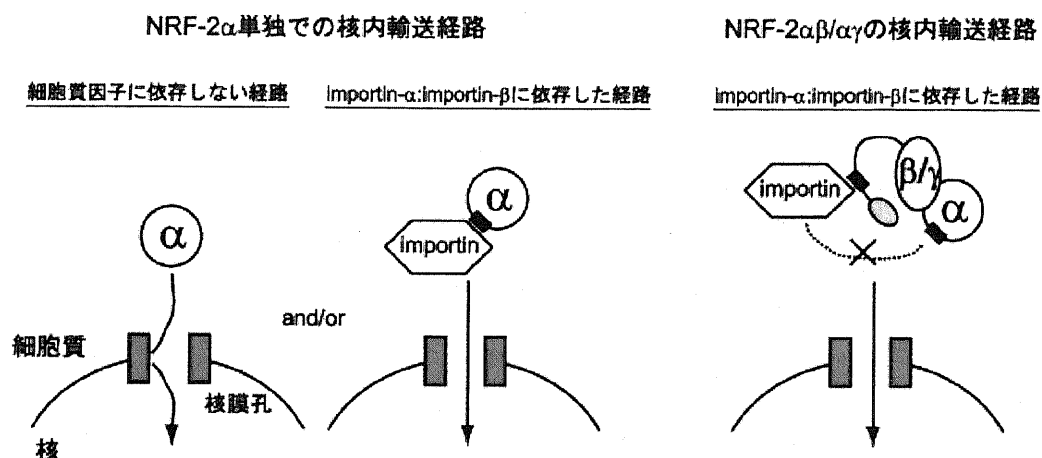
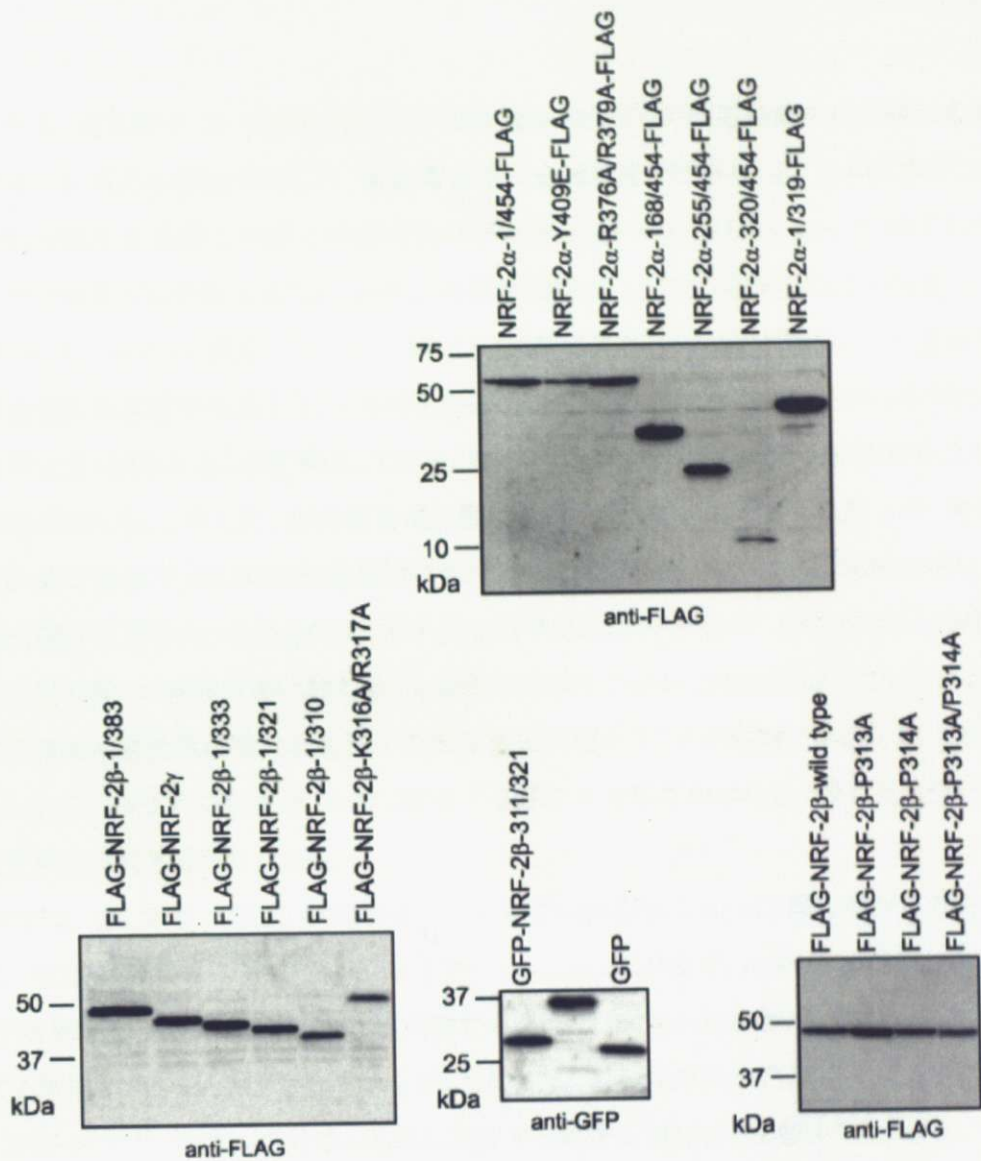


図 2-4-12. NRF-2 の核内輸送経路

NRF-2 α (図中 α)には細胞質因子に依存しない核内輸送経路と、importin- α :importin- β (図中 importin)に依存した核内輸送経路がある。細胞質因子に依存しない経路には NRF-2 α と核膜孔の相互作用が必要である。NRF-2 β/γ (図中 β/γ) 存在下では NRF-2 α 単独での輸送経路は遮断され、NRF-2 $\alpha\beta/\alpha\gamma$ の核内輸送は NRF-2 β/γ と importin- α :importin- β の相互作用に依存する。



補足図 2-4-1. 細胞内局在を調べた NRF-2 α 、NRF-2 β 、NRF-2 γ と変異体の細胞内発現チェック。

HeLa 細胞に pcDNA-NRF-2 α -FLAG、pcDNA-FLAG-NRF-2 β 、pcDNA-FLAG-NRF-2 γ 、pcDNA-GFP-NRF-2 β -311/321 とそれぞれの変異体を transfection し、36 h 培養した後細胞を回収し、 5×10^4 cells 分の細胞破碎液を SDS-PAGE で分離して anti-FLAG 抗体または anti-GFP 抗体を用いて western hybridization を行なった。いずれの変異体も、HeLa 細胞内で単一の長さの蛋白質が発現していることが確かめられた。

結語

本論文では、第1章で、転写因子 NRF-2 が哺乳類ミトコンドリアの蛋白質合成に関わる遺伝子の転写促進に必要であることを示した。蛋白質合成に必須な因子である IF2 を例に取り、hIF2mt 遺伝子の転写開始点近傍に NRF-2 の結合配列が存在し、*in vitro* 及び *in vivo* で NRF-2 が転写開始点近傍に特異的に結合すること、NRF-2 の結合領域が hIF2mt 遺伝子の転写促進に必要であることを示した。*in silico* 解析によって、NRF-2 の認識配列がミトコンドリア翻訳因子遺伝子の転写開始点近傍に高頻度で出現することを明らかにした。この結果は、NRF-2 がミトコンドリア翻訳因子の転写に広く関与することを意味している。哺乳類ミトコンドリアでは電子伝達系サブユニットの一部が合成される。このため、蛋白質合成に関わる遺伝子はミトコンドリアでの ATP 産生に関与するその他の遺伝子と同様の発現制御を受けると考えられる。NRF-2 は、ミトコンドリアでの ATP 産生に関与する核コードの遺伝子(電子伝達系サブユニットやミトコンドリア DNA の複製・転写に関わる蛋白質)の転写促進に関与することが既に知られている。本論文によって、NRF-2 が、ミトコンドリアの蛋白質合成に関わる遺伝子の転写促進に関与することが明確に示された。このことは、NRF-2 が、ミトコンドリアでの ATP 産生に関与する遺伝子の転写制御に広く関わる、というこれまでの考えを更に支持するものである。

本論文では、第2章で、NRF-2 の転写促進に必要な β/γ サブユニットは、核に局在する効率が異なるために転写促進活性に差が生じることを明らかにした。これまで、reporter plasmid と β/γ サブユニットを培養細胞に co-transfection する実験から、 β サブユニットの方が γ サブユニットよりも転写を促進する活性が高いことが示されているが、そのメカニズムは分かっていなかった。本論文では、 β サブユニットの方が γ サブユニットよりも核に局在する効率が低いことを見出した。また、 γ サブユニットに既知の核移行シグナルを付加して核局在の効率を高くすると β サブユニットと同程度の転写促進活性を持つことを示した。これまで、 β/γ サブユニットは共通の領域に核移行シグナルが存在することが示唆されており、転写促進活性の差は β/γ の核内での違いに起因すると考えられてきたが、本論文ではそれを否定し、 β/γ の核局在効率の違いを反映していることを明らかにした。

第2章では、 β/γ サブユニットの核局在効率の違いを明らかにするために、NRF-2 α 、NRF-2 β/γ の核内輸送の分子機構について解析を行なった。それぞれのサブユニットの欠損変異体と部位特異的変異体の細胞内局在を調べる実験と、*in vitro* 核移行の実験から、 α サブユニットと β/γ サブユニットは単独でも核に運ばれるが、 α サブユニットと β/γ サブユニットが複合体を形成した場合、 $\alpha\beta/\alpha\gamma$ の核内輸送は β/γ サブユニットに依存することを示した。NRF-2 α は Ets domain と呼ばれる DNA 結合ドメインを持つ転写因子ファミリーに属している。多くの場合、核内輸送は Ets protein 自身に委ねられるが、NRF-2 の場合は Ets protein とは異なるサブユニットに委ねられるという特異な

メカニズムが明らかにされた。このことの生理的意義は、転写促進活性を持つ $\alpha\beta/\alpha\gamma$ 複合体のみが核に運ばれることを保証することと、 β/γ サブユニットの核局在効率の違いを生み出すことができることにあると考えられる。また、 β/γ サブユニットは共通の核移行シグナルを持ち、共に importin- α :importin- β によって核に運ばれることが分かった。細胞内で β/γ サブユニットの核局在効率の差を生み出す仕組みを明らかにすることが今後の課題である。

NRF-2 が転写促進活性に違いのある複数のサブユニットを持つ生理的意義は何であるか。サブユニットによって細胞内局在を変化させ、それによって転写促進活性を調節し得ることが分かったが、どのような局面で β/γ サブユニットの使い分けが行なわれているかは分かっていない。核局在効率の低い γ サブユニットもある程度の転写促進活性を示すことから、 β/γ サブユニットの使い分けによって NRF-2 を介した転写促進にわずかな違いしか生じないと考えられる。ミトコンドリアの蛋白質以外にも、DNA 合成酵素や細胞質のリボソーム蛋白質などの細胞の増殖に関わる蛋白質や、筋繊維特異的な蛋白質など、NRF-2 の標的遺伝子は多種多様である。このため、NRF-2 による転写制御には、様々なやり方が備わっていることが、生物にとって有利に働くと考えられる。NRF-2 は、蛋白質量の変化や α サブユニットのリン酸化によって転写促進活性を調節することが知られるが、 β/γ サブユニットの使い分けはNRF-2による転写制御の手段の一つとして重要なのではないだろうか。NRF-2 のサブユニットの使い分けによる転写制御がどのような場面で行なわれ、また標的遺伝子によってどのような違いが見られるのかを明らかにすることが今後の課題である。

実験材料と実験方法

細胞培養

HEK293T 細胞と HeLa 細胞は 10[v/v]% FBS、100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin (Gibco)を含む DMEM 培地で、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

Plasmid の構築

Reporter plasmid の構築

hIF2mt 遺伝子の転写開始点近傍のゲノム領域を *luciferase* 遺伝子上流に組み込んだ plasmid、pLuc-1636/+6 と pLuc-473/+6 は Department of Biology, East Carolina University, USA の Mary Farwell 博士から頂いた(Overman et al., 2003 では pJF3、pJF4 と表記されている⁶¹⁾。pLuc-390/+6、pLuc-196/+6、pLuc-91/+6、pLuc-54/+6、pLuc-41/+6、pLuc-91/-9、pLuc-91/-15、pLuc-91/-28、pLuc-91/-42 は、pLuc-1636/+6 を鋳型として目的の領域を PCR で増幅し、pGL3-Basic (Promega)に組み込んだ(*BglIII/KpnI*)。pGL3-Basicの空ベクターを pLuc-none と表記した。QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene)を用いて upstream、downstream NRF-2 site に変異を導入した。

NRF-2α、NRF-2β、NRF-2γの哺乳類培養細胞用発現 plasmid の構築

Human NRF-2αの ORF は EST clone BC035031 (Genbank)から、human NRF-2βの ORF は東京工業大学大学院生命理工学研究科、半田宏先生から頂いた cDNA⁸⁰ を元に PCR で増幅して pcDNA3.1 (invitrogen)の CMV promoter の下流に組み込んだ(pcDNA-NRF-2α [*NotI/ApaI*]、pcDNA-NRF-2β [*BamHI/NotI*])。FLAG epitope (DYKDDDDK、gactacaaggacgacgatgacaag)は、NRF-2αの C 末端に GS を挟んで QuickChange で作製し、NRF-2βの N 末端の *NheI/HindIII* に組み込んだ。pcDNA-NRF-2α、pcDNA-NRF-2βの欠損変異体、部位特異的変異体は QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene)を用いて作製した。pcDNA-NRF-2γは NM_002041 (NCBI reference sequence)の配列を元に、pcDNA-NRF-2βから QuickChange を用いて作製した。SV40 T-antigen 由来の NLS (PKKKRKV¹⁰⁸、ccgaagaagaagagaaaggta)は、QuickChange を用いて pcDNA-FLAG-NRF-2β/γ/β-1/333 の FLAG epitope と NRF-2β/γ/β-1/333 の ORF の間に組み込んだ(MDYKDDDDKLPKKRKVG-S-NRF-2β/γ/β-1/333 の ORF-)。

Tandem affinity purification に用いた plasmid の構築

EUROSCARF (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>) から供与いただいた TAP N 末タグ (protein A-TEV-CBP)、TAP C 末タグ (CBP-TEV-protein A) の ORF を PCR で増幅し、pcDNA3.1 に、それぞれ NRF-2βの ORF の N 末側、C 末側に組み込んだ。pcDNA-protein

A-TEV-CBP-NRF-2 β (*BamHI/NotI* 、 *NotI/ApaI*) 、 pcDNA-NRF-2 β -CBP-TEV-protein A (*NotI/BamHI* 、 *BamHI/HindIII*) 、 pcDNA-protein A-TEV-NRF-2 β (*KpnI/BamHI* 、 *BamHI/NotI*) 、 pcDNA-NRF-2 β -TEV-protein A (*BamHI/NotI* 、 *NotI/ApaI*) 、 pcDNA-CBP-NRF-2 β (*KpnI/BamHI* 、 *BamHI/NotI*) 、 pcDNA-NRF-2 β -CBP (*BamHI/NotI* 、 *NotI/ApaI*) 、 pcDNA-FLAG-NRF-2 β -TEV-protein A (*NheI/HindIII* 、 *BamHI/NotI* 、 *NotI/ApaI*) 。

大腸菌発現 plasmid の構築

NRF-2 α の ORF を PCR で増幅し、pET17b、pET20b (Novagen) に組み込んだ (pET17b-NRF-2 α 、pET20b-NRF-2 α 、 [*NdeI/HindIII*]) 。 pET20b-NRF-2 α から QuickChange を用いて pET20b-NRF-2 α -Y409E と pET20b-NRF-2 α -R376A/R379A を作製した。pGEX-NRF-2 β は東京工業大学の半田宏先生から頂いた⁸⁰。pGEX-NRF-2 β から QuickChange を用いて pGEX-NRF-2 γ と pGEX-NRF-2 β の欠損変異体、部位特異的変異体を作製した。Mouse Rch1、NPI-1、Qip1、HA-tagged importin- β 、human Ran GTPase、RanQ69L 変異体、human NTF2/p10 の発現 plasmid は大阪大学大学院生命機能研究科、米田悦啓先生から頂いた (pGEX-Rch1、pGEX-NPI-1、pGEX-Qip1、pGEX-HA-importin- β 、pET-Ran、pET-RanQ69L、pET-NTF2^{118,135-139})。QuickChange を用いて FLAG-epitope を Rch1 の ORF の上流に組み込んだ (pGEX-FLAG-Rch1、GST の ORF-GS-FLAG-Rch1 の ORF)。QuickChange を用いて、pGEX-Rch1、pGEX-FLAG-Rch1、pGEX-HA-importin- β の欠損変異体を作製した。

その他の plasmid の構築

GAL4-DNA binding domain の ORF は、東京大学大学院新領域創成科学研究科、伊藤隆司先生から頂いた cDNA を元に PCR で増幅し、pcDNA3.1 に組み込んだ (pcDNA-GAL4-DBD [*KpnI/NotI*]) 。 pcDNA-GAL4-DBD を用いて Quickchange で GAL4-DBD の C 末に FLAG-epitope を挿入した (pcDNA-GAL4-DBD-FLAG)。GAL4-DBD と NRF-2 サブユニットの融合蛋白質は次のようにして作製した。NRF-2 α の ORF を GAL4-DBD の N 末側に組み込んだ plasmid を作製し (*HindIII/KpnI*) 、 QuickChange で NRF-2 α の N 末領域を削った (pcDNA-NRF-2 α -320/454-GAL4-DBD)。NRF-2 β の ORF を GAL-DBD の C 末側に組み込んだ plasmid を作製し (*NotI/ApaI*) 、 QuickChange で NRF-2 γ 、NRF-2 β -1/333 を作製した (pcDNA-GAL4-DBD-NRF-2 β 、 pcDNA-GAL4-DBD-NRF-2 γ 、 pcDNA-GAL4-DBD-NRF-2 β -1/333) 。 GFP の ORF を PCR で増幅してそれぞれ pcDNA3.1 (pcDNA-GFP [*KpnI/BamHI*]) 、 pGEX-4T (GE Healthcare) に組み込んだ (pGEX-GFP [*BamHI/BamHI*]) 。 pcDNA-SV40-NLS-GFP、pGEX-SV40-NLS-GFP、pGEX-GFP-SV40-NLS、pGEX-GFP-NRF-2 β -311/321 はそれぞれ QuickChange を用いて作製した。GFP-NRF-2 β 、NRF-2 α -GFP の ORF を PCR で増幅し、それぞれ pGEX-NRF-2 β 、pET20b-NRF-2 α に restriction

site-free method¹⁴⁰を用いて組み込んだ(pGEX-GFP-NRF-2 β 、pET20b-NRF-2 α -GFP)。

Recombinant protein の発現、精製

Tag を付加していない NRF-2 α の精製方法は Thompson et al., 1991 に従った⁴⁰。pET17b-NRF-2 α を BL21(DE3) に形質転換して 37°C で O.D.600 0.5 まで培養した後、0.1 mM IPTG を加えて蛋白質発現を誘導し、25°C で 12 時間培養した。菌体を回収して buffer A (75 mM Tris-HCl [pH 8.0]、100 mM KCl、1 mM DTT、0.2 mM PMSF) を加えて懸濁し、sonication で菌体を破碎した。菌体破碎液から S100 画分を回収し、Q-Sepharose HP column (GE Healthcare) を用いて KCl の濃度勾配を利用して NRF-2 α を含む画分を精製した (0.18 – 0.25 M KCl)。NRF-2 α を含む画分を buffer B (75 mM Tris-HCl [pH 7.5]、50 mM KCl) で透析し、SP-Sepharose HP column (GE Healthcare) を用いて KCl の濃度勾配を利用して NRF-2 α を含む画分を精製し (0.05– 0.3 M KCl)、buffer C (20 mM Tris-HCl [pH 8.0]、100 mM KCl、10[v/v]% glycerol) で透析して -80°C で保存した。タグを付加していない recombinant NRF-2 α は、図 1-6 の EMSA、補足図 1-1 と補足図 2-3-1 の western hybridization、抗体作製、抗体の affinity 精製に用いた。

pET20b-NRF-2 α 、 pET20b-NRF-2 α -Y409E 、 pET20b-NRF-2 α -R376A/R379A 、 pET20b-NRF-2 α -GFP を BL21(DE3) に形質転換して、37°C で O.D.600 0.5 まで培養した後、0.1 mM IPTG を加えて蛋白質発現を誘導し、25°C で 12 時間培養した。菌体を回収して buffer D (20 mM リン酸カリウム [pH 7.3]、100 mM KCl、5 mM 2-mercaptoethanol、0.2 mM PMSF) を加えて懸濁し、sonication で菌体を破碎した。菌体破碎液から S100 画分を回収し、Ni²⁺ precharged Hi-Trap chelating column (GE Healthcare) を用いて imidazole の濃度勾配を利用して精製した。NRF-2 α -His を含む画分を buffer D で透析した後、Q-Sepharose HP column を用いて精製した。蛋白質は 10[v/v]% glycerol を含む transport buffer (10 mM Hepes-KOH [pH 7.3]、110 mM 酢酸カリウム、5 mM 酢酸ナトリウム、2 mM 酢酸マグネシウム、0.2 mM EGTA、0.5 mM DTT) で透析して -80°C で保存した。NRF-2 α -His、NRF-2 α -Y409E-His、NRF-2 α -R376A/R379A-His は図 2-4-1 の GST pull-down assay、図 2-4-9 の gel shift assay で用いた。NRF-2 α -GFP-His は *in vitro* nuclear import assay に用いた。

pGEX-NRF-2 β 、pGEX-NRF-2 γ 、pGEX-GFP-NRF-2 β 、pGEX-GFP-NRF-2 γ 、pGEX-Rch1、pGEX-NPI-1、pGEX-Qip1、pGEX-FLAG-Rch1、pGEX-FLAG-Rch1-70/529 (FLAG-Rch1 Δ IBB)、pGEX-HA-importin- β 、pGEX-Rch1-1/69 (Rch1-IBB)、pGEX-HA-importin- β -45/462、pGEX-GFP、pGEX-SV40-NLS-GFP、pGEX-GFP-SV40-NLS を Rosetta (Novagen) に形質転換して、37°C で O.D.600 0.5 まで培養した後、0.1 mM IPTG を加えて蛋白質発現を誘導し、25°C で 12 時間培養した。菌体を回収して buffer D を加えて懸濁し、sonication で菌体を破碎した。菌体破碎液から S100

画分を回収し、GSTrap FastFlow (GE Healthcare)を用いて 10 mM glutathione を用いて精製した。GST 融合蛋白質を 4°C で buffer D で透析しながら thrombin protease (GE Healthcare)を用いて GST を切断した。切断した GST は GSTrap FastFlow と Q-Sepharose HP を用いて除いた。GST 融合蛋白質、もしくは GST から切断した蛋白質は 10[v/v]% glycerol を含む transport buffer で透析して -80°C で保存した。また、抗体作製に用いた NRF-2β は buffer C で透析した。SV40-NLS-GFP は *in vitro* nuclear import assay に、GST-GFP-SV40-NLS は gel shift assay に用いた。

Recombinant Ran、RanQ69L、NTF2 はそれぞれ Bischoff et al., 1994、Tachibana et al., 1996 を参考にして発現、精製した^{138,141}。pET-Ran、pET-RanQ69L を Rosetta に形質転換して、37°C で O.D.600 0.5 まで培養した後、0.1 mM IPTG を加えて蛋白質発現を誘導し、25°C で 12 時間培養した。菌体を回収して buffer D を加えて懸濁し、sonication で菌体を破碎した。菌体破碎液から S100 画分を回収し、25[w/v]% 硫酸アンモニウムを加えて可溶性画分を回収し、合計で 35[w/v]% の硫酸アンモニウムを加えて Ran、RanQ69L を沈殿させ、buffer D で懸濁して透析を行なった。透析した菌体破碎液を Q-Sepharose HP、SP-Sepharose にかけて flow through を回収した。RanGDP は 10[v/v]% glycerol と 10 μM GDP を含む transport buffer で、RanQ69L は 10[v/v]% glycerol を含む transport buffer でそれぞれ透析し、限外ろ過膜 Amicon Ultra 10K (Millipore) で濃縮した後 -80°C で保存した。pET-NTF2 を Rosetta に形質転換して、1 L の LB 培地で、37°C で O.D.600 0.5 まで培養した後、0.1 mM IPTG を加えて蛋白質発現を誘導し、25°C で 12 時間培養した。菌体を回収して buffer D を加えて懸濁し、sonication で菌体を破碎した。菌体破碎液から S100 画分を回収し、HiPrep Q XL 20 ml につけ、flow through を 50 ml ずつ分画し、NTF2 を含む画分を回収した。精製した NTF2 蛋白質を 10[v/v]% glycerol を含む transport buffer で透析し、限外ろ過膜 Amicon Ultra 10K (Millipore) で濃縮した後 -80°C で保存した。

精製した蛋白質は Bradford 法、protein-assay (Bio-Rad)を用いて濃度を測定し、bovine serum albumin で標準化した。

抗体作製

Recombinant NRF-2α、NRF-2β をウサギに投入し、約 2 ヶ月育てた後、血清を得た(抗血清)。200 μl の NHS-activated Sepharose 4 FF (GE Healthcare)に抗血清作製に用いた 500 μg の NRF-2α、NRF-2β を共有結合させた樹脂を調製した。それぞれの樹脂を PBS で平衡化した後、2 ml の抗血清を加えて二時間室温で incubate した。樹脂を 1 ml の PBS で 4 回洗ったあと、200 μl の 0.1 M glycine-HCl (pH 2.5)を 4 回加えて樹脂に結合した抗体を溶出した。溶出した抗体 800 μl に 500 μl の 0.5 M Tris-HCl (pH 8.5)を直ちに加えて、10[v/v]% glycerol を含む PBS で透析した (affinity purified anti-NRF-2α 抗体、anti-NRF-2β/γ 抗体)。抗血清は EMSA に用いた。Affinity 精

製した抗体は western hybridization、ChIP assay、免疫染色に用いた。

luciferase reporter assay

HEK293T 細胞を 6well plate に 1×10^5 cells/well まいた後、24 h 培養し、200 ng *firefly luciferase* plasmid (pLuc-x もしくは pFR-Luc [Stratagene]) と 40 ng の phRL-TK (*renilla firefly* をコードする control plasmid, Promega) を、LipofectAMINE Reagent (invitrogen) を用いて transfection した。以降、他の実験でも transfection には全て LipofectAMINE Reagent を用いた。表記のあるところでは pcDNA-NRF-2 α 、NRF-2 β 、NRF-2 γ 、pcDNA-GAL4-DBD 融合蛋白質を 200 ng ずつ transfection した。また、pcDNA の空ベクターを加えて transfection した DNA の量が well 間で一定になるようにした。Transfection に用いた DNA は全て Endotoxin Removal Kit (Qiagen) を用いて精製した。3 h の transfection の後 24 h (図 1-1) または 36 h (それ以外) 培養した後細胞を回収し、passive lysis buffer (Promega) を用いて破碎した。細胞破碎液を用いて Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) で Luciferase の発光量を測定した。それぞれの well で 2 回の測定値の平均をとった。phRL-TK は well 間の transfection 効率と細胞数の差を補正するために加えており、Firefly Luciferase の発光量を Renilla Luciferase の発光量で割った値を「Luciferase の発光量」とした。

細胞破碎液、核抽出液(核破碎液)、細胞質画分の調製

細胞破碎液 (total lysate)

HEK293T 細胞または HeLa 細胞を 60~80% confluent まで培養した後回収し、0.5 mM DTT と complete EDTA-free protease inhibitor mixture tablet (Roche) を含む hypotonic buffer (10 mM Hepes-KOH [pH 7.6], 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂) で懸濁し、sonication で細胞を破碎した。細胞破碎液は -30°C で保存し、western hybridization に用いた。

核抽出液(核破碎液)と細胞質画分

核画分と細胞質画分の分画は Dignam et al., 1983 の方法を参考にした⁹⁴。HEK293T 細胞または HeLa 細胞を 60~80% confluent まで培養した後回収し、0.1[v/v]% NP-40、0.5 mM DTT、complete EDTA-free protease inhibitor mixture tablet を含む hypotonic buffer (10 mM Hepes-KOH [pH 7.9], 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂) で懸濁し、10 分間氷上で放置した後、1kg で遠心して上清を細胞質画分とした。0.1% の NP-40 で処理した場合、細胞膜と細胞質のオルガネラの膜画分は可溶化するが、核膜は保持される。不溶性画分を hypotonic buffer で一度洗ったあと、核画分の 4 分の 1 の容量の low salt buffer (20 mM Hepes-KOH [pH 7.9], 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, complete EDTA-free protease inhibitor mixture tablet, 25[v/v]% glycerol)、high salt buffer (low salt buffer と同じ組成、但し 1.2 M KCl) を順に加えて氷上で 30 min

放置した後、25kg で遠心して上清を取った(核抽出液、nuclear extracts [NEs])。Hypotonic buffer で一度洗ったあと、もう一度 0.5 mM DTT、complete EDTA-free protease inhibitor mixture tablet を含む hypotonic buffer で懸濁し、sonication で核画分を破碎した(核破碎液)。核抽出液は-80°Cで保存し、EMSA、tandem affinity purification、western hybridization(図 2-2-4、4-3-1、4-3-5)で用いた。核破碎液は、-30°Cで保存し、western hybridization(図 2-3-2、図 2-3-3)で用いた。

In vitro nuclear import assay に用いた細胞質画分

Adam et al., 1990 の方法を参考にして調製した¹¹⁰。HeLa 細胞を 60~80% confluent まで培養した後回収し、PBS で洗ったあと lysis buffer (10 mM Hepes-KOH [pH 7.3]、10 mM 酢酸ナトリウム、2 mM 酢酸マグネシウム、0.5 mM DTT、complete EDTA-free protease inhibitor mixture tablet) で懸濁して氷上で 10 分間放置し、homogenizer で 20 回 stroke し、10 kg で 20 min 遠心してその上清をとった。上清を transport buffer で一晚透析した後 complete EDTA-free protease inhibitor mixture tablet を溶かして-80°Cで保存した。

細胞破碎液、核抽出液(核破碎液)、細胞質画分は Bradford 法、protein-assay (Bio-Rad)を用いて濃度を測定し、bovine serum albumin で標準化した。

Electrophoresis mobility shift assay (EMSA)

T4 polynucleotide kinase (Toyobo)を用いて、sense oligonucleotide (hIF2mt プロモーター領域、-56/-32, 5'-CGGGACCGGAAGCCCGCGGGGACC-3'; -91/-66, 5'-GCAACTCTCTGAATTCCGGAAAGAAC-3')を[γ -³²P]-ATP で標識し、ゲルろ過カラム G-25 (GE Healthcare)で未反応の[γ -³²P]-ATPを除いた後、未標識の antisense oligonucleotideを加えて 90°Cで 5 min boil した後、室温で放置して二本鎖 DNA を形成させた。15 μ l の反応系(20 mM Hepes-KOH [pH 7.9]、100 mM KCl、1 mM EDTA、1 mM DTT、0.3 mg/ml bovine serum albumin、0.066 mg/ml Poly[dI-dC] [GE Healthcare]、12[v/v]% glycerol)に、5 fmol の標識した二本鎖 DNA probe と 5 μ g の核抽出液もしくは 2-10 ng の recombinant protein、500 fmol の未標識の competitor DNAを加えて氷上で 15 min 放置した後、15 μ l 中の 5 μ l を 0.25xTBE/5[w/v]% PAGE にロードし、予め 4°Cで冷やした 0.25xTBE buffer で 100 V 定電流、70 min 電気泳動を行ない、ゲルを 3MM のろ紙に移した後乾燥させ、imaging plate (FujiFilm)または autoradiography で感光させた。Anti-NRF-2 α 抗体(抗血清)、anti-NRF-2 β/γ 抗体(抗血清)は 15 μ l に対して 1 μ l 加えた。Competitor DNA の塩基配列は、-56/-32-mut, 5'-CGGGACCTTAAGCCCGCGGGGACC-3'; -91/-66-mut, 5'-GCAACTCTCTGAATTAATTAAAGAAC-3'; rat cytochrome c oxidase subunit IV (RCO4), 5'-CGGGACCCGCTCTTCCGGTCGCGAA-3'。

免疫沈降

HEK293T細胞にpcDNA-NRF-2 α -FLAGもしくはpcDNA-FLAG-NRF-2 β をtransfectionし、36 h培養した後、細胞を回収し、lysis buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.15 M NaCl, 1[v/v]% Triton X-100, 0.5[v/v]% NP-40, 1 mM EDTA, complete EDTA-free protease inhibitor mixture)で細胞を懸濁し、sonication で細胞を破碎した(細胞破碎液)。約 3×10^6 cells 分の細胞破碎液に 5 μ l の protein A magnetic beads (New England Biolab)を加えて 4°Cで 1 h incubate した。Protein A beads に結合しなかった画分に、0.5 μ g の affinity purified anti-NRF-2 α 、NRF-2 β / γ 、または anti-PKC δ 抗体 (Santa cruz, sc937, rabbit polyclonal antibody)を加えて 4°Cで一晩 incubate した後、5 μ l の protein A beadsを加えて 4°Cで 1 h incubate した。Protein A beads を 800 μ l の lysis buffer で 2 回洗ったあと、100 μ l の SDS-sample buffer (50 mM Tris-HCl [pH 6.8], 2[w/v]% SDS, 70 mM 2-mercaptoethanol, 10[v/v]% glycerol)で protein A beads に結合した蛋白質を溶出した。溶出した画分を SDS-PAGE で分離し、anti-FLAG M2 抗体で western hybridization を行なった。

Chromatin immuno-precipitation assay (ChIP assay)

ChIP assay は Shang Y et al., 2000 の方法を参考にして行なった¹⁴²。 1×10^6 の HEK293T 細胞を 10 cm dish にまいてから 2 日間培養し、培地に最終濃度 1[v/v]% formaldehyde を加えて 37°Cで 10 min incubate して染色体 DNA と蛋白質を架橋した。その後、最終濃度 0.25 M glycine を加えて室温で 15 min incubate して架橋を止めた。培地を捨てて 1 ml の PBS で洗った後、1ml PBS を加えてスクレイパーで細胞をかき集めた。細胞を回収し、300 μ l の ChIP lysis buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.15 M NaCl, 1[v/v]% Triton X-100, 0.5[v/v]% NP-40, 1[w/v]% SDS, 1 mM EDTA, complete EDTA-free protease inhibitor mixture)で懸濁して、氷上で 10 min incubate した後 sonication で染色体 DNA を切断した(ChIP lysate)。Sonication は、Branson sonifier digital 450 を用いて、power 50%、5 sec ON/15 sec OFF、ON の時間の合計 5 min 氷上で行なった。50 μ l の ChIP lysate に 9 倍量の ChIP binding buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.15 M NaCl, 1[v/v]% Triton X-100, 0.5[v/v]% NP-40, 1 mM EDTA)と 10 μ g のサケ精子 DNA、5 ml protein A magnetic beadsを加えて 4°Cで 1 h incubate した。Protein A beads に結合しなかった画分に、0.5 μ g の affinity purified anti-NRF-2 α 、NRF-2 β / γ 、または anti-PKC δ 抗体を加えて 4°Cで一晩 incubate した後、5 μ l の protein A beadsを加えて 4°Cで 1 h incubate した。Protein A beads を 500 μ l の low salt buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.15 M NaCl, 1[v/v]% Triton X-100, 0.1[w/v]% SDS, 2 mM EDTA)で一回、500 μ l の high salt buffer (low salt buffer と同じ組成、但し 0.5 M NaCl)で二回、500 μ l の LiCl buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.25 M LiCl, 1[v/v]% NP-40, 1[w/v]% Na-deoxycholate, 1 mM EDTA)で一回、500 μ l の TE buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA)で二回洗った。それ

それぞれの wash buffer で beads を懸濁した後 3 min 氷上で incubate してから beads の結合しなかった画分を取り除いた。Beads に 100 μ l の ChIP elution buffer (10 mM DTT, 1[w/v]% SDS, 0.1 M NaHCO_3)を加えて 10 min 室温で incubate した後 beads から溶出した画分 (ChIP elution)を回収した。Elution は 2 回行ない、混ぜ合わせた。200 μ l の ChIP elution に 8 μ l の 5 M NaCl を加えて 65°C で 6 h incubate し、DNA と蛋白質を脱架橋した。脱架橋した ChIP elution に 4 μ l 0.5 M EDTA、8 μ l 1 M Tris-HCl (pH 6.8)、0.3 μ l 20 mg/ml proteinase K を加えて 45°C で 1 h incubate し、残存した蛋白質を分解した。ChIP elution を phenol-chloroform 処理を行なった後、回収した DNA を Qiagen PCR purification kit で精製した。50 μ l の ddH₂O で溶出した。回収した 50 μ l の DNA 溶液のうち、5 μ l を real-time PCR に用いた。50 μ l の ChIP lysate を脱架橋し、proteinase K 処理を行なった後、ethanol 沈殿し、120 μ l の RNase A 溶液 (100 μ g/ml、TE buffer) で懸濁して 37°C で 1 h incubate した後 PEG8000 で DNA を沈殿させ、ddH₂O で沈殿を溶解し、agarose gel 電気泳動で ChIP lysate 中のゲノム DNA の長さを確認した。50 μ l の ChIP lysate を 9 倍量の ChIP binding buffer と 10 μ g のサケ精子 DNA、5 μ l protein A magnetic beads を加えて 4°C で 1 h incubate し、beads と結合しなかった画分を回収し、免疫沈降を行わずに、脱架橋以降の反応を行ったものを input DNA とし、real-time PCR に用いた。Input DNA に対して anti-NRF-2 α 、anti-NRF-2 β / γ 抗体を用いた ChIP で回収された DNA は proximal primer set、distal primer set とともに、約 0.02~0.2% であった。

定量的 PCR (Real-time PCR)

DNA 溶液と proximal primer set (-98/-78-f, 5'-GGCGACAGCAACTCTCTGAAT-3'; +6/-15-r, 5'-CGGAAGAATGGTCGGTAGGTC-3', 5 pmol ずつ、数字は hIF2mt 遺伝子の転写開始点に対する相対位置) もしくは distal primer set (-1608/-1586-f, 5'-GAGAGGTGGTGATGGTTGTGGTC-3'; -1537/-1517-r, 5'-TATTACTGCCTGCCCCCAGAG-3', 5 pmol ずつ) と SYBR premix Ex Taq (Takara) を等量混ぜて Smart Cycler II (Takara) で real-time PCR を行なった。PCR の条件は 95°C 30 sec の後、(95°C 5 sec, 60°C 20 sec) を 50 cycle 行ない SYBR green の蛍光強度が 30 になる cycle 数 (Ct 値) を測定した。ChIP elution を用いた PCR は 2 回行ない、平均値を取った。また、全ての PCR で 65°C から 95°C まで 0.2 sec/deg で melt curve を測定し、単一の PCR 産物が増幅されていることを確かめた。Real-time PCR の一部を agarose gel 電気泳動し、目的の長さの DNA が増幅されていることを確かめた。

ヒトゲノム全遺伝子の転写開始点近傍に存在する、NRF-2、NRF-1 の推定認識配列の *in silico* 解析

公開されているヒトゲノムの塩基配列から、全遺伝子の推定プロモーター配列の取得した。UCSC table browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables>) を用いて、human genome NCBI build 35 から、'NM_' で始まる NCBI reference sequence 23,131 個について (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>)、5'末端を推定転写開始点とし、5'末端の上流 1500 塩基から 500 塩基下流の領域を、推定プロモーター領域として download した。23,131 個の推定プロモーター配列のうち、同じ accession number を持つものと、少なくとも 500 塩基以上完全に重複する配列を、一つを除いて全て削除し、17,832 個の配列を含む非重複プロモーターセットを得た。500 塩基以上重複する配列を検索し、ひとつを除いて残りを削除する方法については perl programming、promoter_extract.pl に示した。非重複プロモーターセットについて、NRF-2 と NRF-1 の認識配列が存在するかどうかを調べた。NRF-2 については 5'-CCGGA(A or T)G(T or C)-3'とその相補配列、NRF-1 については 5'-GCGCA(T or C)GCGC(A or G)-3'と一塩基の間違いを許容した配列群を認識配列として検索を行なった。割合の差の検定を行ない、統計的有意差 p 値を算出した。標準化変換 z は以下の等式に基づいて計算した。 $z = (p_1 - p_2) / (pq/n_1 + pq/n_2)^{1/2}$, $p = (r_1 + r_2) / (n_1 + n_2)$, $q = 1 - p$ 。この等式中で、'ni'はグループ'i'に含まれる遺伝子の数を、'pi'はグループ'i'中でヒットした遺伝子の割合を、'ri'はグループ'i'でヒットした遺伝子の数をそれぞれ表している。17,832 個の reference sequence のうち、GO: 5739 (mitochondrion)もしくは遺伝子の名前に mitochondria(l)を含む 443 個を「ミトコンドリア遺伝子」とした。それぞれの reference sequence について、SeqHound APIを用いて GO idを調べた¹⁴³。また、遺伝子名は UCSC table browser で用いられている名前を使った。

Perl script

Promoter_extract.pl script

```
use strict;

open PROMOTERS, "human_promoters.txt";      #NM_*****
my @list_promoters = <PROMOTERS>;           #atgctgatcgtag.....
my %hash_promoters = @list_promoters;        #NM_XXXXXX
my @sort_refs = sort keys %hash_promoters;    #catgctgatgcta...   という形式のファイルを開く。
                                              #NM_の番号順に並べる

open OUTPUT2, ">> human_promoters_nonred_sort.txt";

my @redundant_refs;

my $n = 0;                                  #NM_の番号の小さい順から、3'末端の 500 塩基を取り出し、それよりも
```

```

while ($sort_refs[$n]){      #番号の大きな NM_ の配列に重複する部分が含まれていたら、番号の
my $m = $n + 1;             #大きな NM_ を重複する NM_ のリストに追加する。
my $seq1 = substr($hash_promoters{$sort_refs[$n]},-501,500);
while ($sort_refs[$m]){
  if ($hash_promoters{$sort_refs[$m]} =~ m/$seq1/g){
    push @redundant_refs, $sort_refs[$m];
  }
  $m++;
}
$n++;
}

my @half_nonred_refs;        #重複する NM_ のリストに含まれない
my $half_redundant_refs = join "",@redundant_refs;    #NM_ の配列だけを抽出する。
foreach (@sort_refs){
  push @half_nonred_refs, $_ unless $half_redundant_refs =~ m/$_/g;
}

$n = 0;                      #NM_ の番号の小さい順から、3'末端の 500 塩基を取り出し、
while ($half_nonred_refs[$n]){ #それよりも番号の小さい NM_ の配列に重複する部分が含まれて
my $l = 0;                    #いたら、番号の小さな NM_ を重複する NM_ のリストに追加する。
my $seq2 = substr($hash_promoters{$half_nonred_refs[$n]},-501,500);
while ($l < $n){
  if ($hash_promoters{$half_nonred_refs[$l]} =~ m/$seq2/g){
    push @redundant_refs, $half_nonred_refs[$l];
  }
  $l++;
}
$n++;
}

my $seq_redundant_refs = join "",@redundant_refs;    #重複する NM_ のリストに含まれない

```

```
foreach (@half_nonred_refs){                                #NM_の配列だけを抽出する。
    print OUTPUT2 $_, $hash_promoters{$_} unless $seq_redundant_refs =~ m/$_/g;
}
```

Tandem Affinity Purification (TAP)

2×10^6 個の HEK293T 細胞を 15 cm dish にまき、24 h 培養した後、2 μ g pcDNA-FLAG-NRF-2 β -TEV-protein A と 2 μ g pcDNA-NRF-2 α を co-transfection し、36 h 培養した後、核抽出液と細胞質画分を調製した。核抽出液または細胞質画分 3 mg に 1 ml の TAP binding buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.15 M NaCl, 0.2[v/v]% NP-40, 0.5 mM EDTA) と IgG sepharose (GE Healthcare) 50 μ l を加え、4°C で一晩 incubate した。Beads に結合しなかった画分を 250 μ l の TAP binding buffer で 4 回洗った後、50 U の AcTEV protease (Invitrogen) を加えて 16°C で 2 h 処理した。ここで、FLAG-NRF-2 β -TEV-protein A から protein A が切り離される。Beads から溶出した画分のうち、30 分の一を分取し、残り と anti-FLAG M2-agarose (Sigma) 25 μ l を混ぜ、4°C で 1 h incubate した。Beads に結合しなかった画分を 250 μ l の TAP binding buffer で 4 回洗った後、125 μ l の 0.1 mg/ml FLAG peptide で beads に結合した画分を溶出した (FLAG 後)。溶出した画分を TCA 沈殿で濃縮し、SDS-PAGE で分離した後、銀染色で蛋白質のバンドを染色した。

2×10^6 個の HEK293T 細胞を 15 cm dish にまき、24 h 培養した後、pcDNA-NRF-2 α と pcDNA-CBP-NRF-2 β を co-transfection し、36 h 培養した後、核抽出液を採った。核抽出液 500 μ g に、1 ml の binding buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.15 M NaCl, 0.2[v/v]% NP-40, 10 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM 酢酸マグネシウム、1 mM imidazole, 2 mM CaCl_2) と calmodulin beads (Stratagene) 10 μ l を混ぜ、4°C で一晩 incubate し、150 μ l の binding buffer で 4 回洗った後、50 μ l の elution buffer (binding buffer と組成は同じ、但し、2 mM CaCl_2 の代わりに 10 mM EGTA を含む) で溶出した。溶出した画分を SDS-PAGE で分離し、western hybridization を行なった。

免疫染色

2×10^4 個の HeLa 細胞を Permax Plastic Slide (Nunc) にまき、24 h 培養した後、pcDNA-NRF-2 α -FLAG、NRF-2 β 、FLAG-NRF-2 β 、FLAG-NRF-2 γ とそれらの変異体を合計で 100 ng transfection し、36 h 培養した後、4[v/v]% formaldehyde を含む PBS で固定し、0.1[v/v]% Triton X-100、3[w/v]% bovine serum albumin、0.5[v/v]% whole goat serum (ICN) を含む PBS に、一次抗体: mouse anti-FLAG M2 (Sigma, 2000 倍希釈)、rabbit affinity purified anti-NRF-2 β (1000 倍希釈)、二次抗体: anti-mouse IgG Alexa fluor 568 (Molecular Probes, 2000 倍希釈)、anti-rabbit IgG FITC (Sigma, 1000 倍希釈) を加えて 37°C で 1 h incubate した。核 DNA の染色には、1 μ g/ml の

Hoechst 33342 (Molecular Probes)を加えて 10 min 室温で incubate した。染色した細胞は Leica TCS SP2 spectral confocal microscope を用いて観察し、共焦点画像を撮った。取得した画像を Image J (NCBI)で解析し、Alexa fluor 568 の細胞全体に対する核の蛍光強度を測定した(図 2-3-8)。

***In vitro* nuclear import assay**

Adam et al., 1990 の方法を参考にした¹¹⁰。2x10⁴ 個の HeLa 細胞を Permax Plastic Slide (Nunc)にまき、48 h 培養した後、4°C の transport buffer (10 mM Hepes-KOH [pH 7.3]、110 mM 酢酸カリウム、5 mM 酢酸ナトリウム、2 mM 酢酸マグネシウム、0.2 mM EGTA、0.5 mM DTT)で 2 回洗った後、40 µg/ml digitonin (Calbiochem)、2[w/v]% bovine serum albumin、complete EDTA-free protease inhibitor mixture を含む transport buffer 200 µl を加えて、4°C で 5 min incubate して細胞膜の透過性を高めた。2[w/v]% bovine serum albumin を含む transport buffer で 3 回、それぞれ室温で 10 min incubate して残存の細胞質画分を洗い流した後、200 µl の import mix を加えて 30°C で 1 h もしくは室温で 2 min から 20 min incubate し、import mix を除いて直ちに 2[v/v]% formaldehyde を含む transport buffer を加えて反応を停止させ、そのまま 10 min incubate して細胞を固定化した。1 µg/ml の Hoechst 33342 を加えて 10 min 室温で incubate し、核 DNA を染色した。Leica TCS SP2 spectral confocal microscope を用いて GFP の蛍光を観察し、共焦点画像を撮った。Import mix は、2[w/v]% bovine serum albumin、complete EDTA-free protease inhibitor mixture を含む 200 µl の transport buffer に 0.5 µM GFP 融合蛋白質、7 mg/ml 細胞質画分(cytosol)、0.5 mM GTP と ATP 再生系(1 mM ATP、5 mM creatine phosphate、5 mg/ml creatine phosphokinase)を加えた。表記した箇所では、残存の ATP を除くために、5 mM glucose と 1.8 U/ml Hexokinase (Roche)を import mix に加えた。Reconstituted importin mix では、2[w/v]% bovine serum albumin と complete EDTA-free protease inhibitor mixture を含む 200 µl の transport buffer に 0.5 µM importin-α (Rch1 または NPI-1 または Qip1)、0.5 µM HA-importin-β、2.5 µM RanGDP、2.5 µM NTF2 を加えた。表記した箇所で特定の核内輸送経路を阻害するために、0.5 mg/ml wheat germ agglutinin (WGA、EY Laboratories)、10 µM RanQ69L、5 µM HA-importin-β-45/462、2.5 µM GST-Rch1-1/69 を import mix に加えた。

GST pull-down assay

10 µg の GST-NRF-2β を 10 µl の glutathione sepharose 4B (GE Healthcare)と混ぜて beads に結合しなかった画分を洗い流した後、200 µl の 0.05[v/v]% NP-40 を含む transport buffer 中で 10 µg の NRF-2α を加えて 4°C で 1 h incubate した。Beads を 300 µl の NP-40 を含む transport buffer で洗

った後、50 μ l の elution buffer (50 mM Tris-HCl [pH 6.8], 2[w/v]% SDS、10% glycerol)で beads に結合した画分を溶出した。

Gel shift assay

Gel shift assay に用いた蛋白質は、いずれも binding buffer (10[v/v]% glycerol を含む transport buffer)で透析した後-80°Cで保存した。10 μ l の binding buffer 中に recombinant protein を 1 μ M ずつ加えて 4°C で 1 h incubate した後、3 μ l を 5[w/v]% 非変性 poly-acrylamide gel (mono:bis-acrylamid = 80:1、2.5[v/v]% glycerol、20mM Tris-acetate [pH 7.4]、50 mM 酢酸カリウム、1 mM EDTA)に load した。電気泳動 buffer (20mM Tris-acetate [pH 7.4]、50 mM 酢酸カリウム、1 mM EDTA)を用いて 4°C で 3 h 電気泳動した後、nitrocellulose 膜に転写して western hybridization を行なった。

Western hybridization に用いた抗体

一次抗体: rabbit affinity purified anti-NRF-2 α 抗体、anti-NRF-2 β/γ 抗体、rabbit anti-PKC δ 抗体 (Santa cruz, sc937)、rabbit anti-EFTumt 抗体 (Department of Chemistry、University of North Carolina、USA、Linda L. Spremulli 博士から頂いた。)、mouse anti-FLAG 抗体 (Sigma)、mouse anti-HA 抗体 (Sigma)

二次抗体: anti-mouse IgG HRP conjugate (Biosource)、anti-rabbit IgG HRP conjugate (Biosource)

略語

ChIP assay、chromatin immuno-precipitation assay; EMSA、electrophoresis mobility shift assay; HEK293T 細胞、human embryonic kidney 293 T 細胞; hIF2mt、human mitochondrial translation initiation factor 2; IBB、importin beta binding domain; NLS、nuclear localization signal (NLS); NRF-1、NRF-2、nuclear respiratory factor 1、2; PGC-1、PPAR gamma coactivator 1; Rch1、RAG cohort 1; RCO4、rat cytochrome *c* oxidase subunit IV

謝辞

以下の先生方から実験材料の提供を受けました。Department of Biology, East Carolina University, USA の Mary Farwell 博士から、reporter plasmid、pLuc-1636/+6 と pLuc-473/+6 を頂きました。東京工業大学大学院生命理工学研究科、半田宏先生から、NRF-2 β の大腸菌発現 plasmid、pGEX-NRF-2 β を頂きました。大阪大学大学院生命機能研究科、米田悦啓先生から、importin とその他の核内輸送経路に関わる蛋白質の大腸菌発現 plasmid、pGEX-Rch1、pGEX-NPI-1、pGEX-Qip1、pGEX-HA-importin- β 、pET-Ran、pET-RanQ69L、pET-NTF2 を頂きました。Department of Chemistry, University of North Carolina, USA、Linda L. Spemulli 博士から、rabbit anti-bovine EF-Tumt 抗体を頂きました。また、お茶の水女子大学生物学部、宮本泰則先生から EMSA の実験方法について助言を頂きました。東京大学分子細胞生物学研究所、新井田厚司博士と、東京大学大学院新領域創成科学研究科、岡田悟さんから perl programming に関して助言を頂きました。以上の諸先生方に感謝いたします。

上田研究室において、竹内野乃博士には、全ての実験に関する数限りない助言を頂き、実験がうまく行かないときは励まされ、良い結果が出たときは共に喜びました。また、田口英樹先生、清水義宏博士には研究に関する助言を常に頂きました。車愈徹博士、長田江里子さん、笹本雅人くん、特に斉浩くんとは常に励まし合い、実験に関するたくさんのディスカッションを行ないました。これらの方々に感謝します。最後に、研究に関する様々な助言、激励を頂いた上田卓也先生に感謝いたします。

参考文献

1. Jiang, X. & Wang, X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* **73**, 87-106 (2004).
2. Modjtahedi, N., Giordanetto, F., Madeo, F. & Kroemer, G. Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends Cell Biol* **16**, 264-72 (2006).
3. Gunter, T. E., Buntinas, L., Sparagna, G., Eliseev, R. & Gunter, K. Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium* **28**, 285-96 (2000).
4. Taylor, R. W. & Turnbull, D. M. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* **6**, 389-402 (2005).
5. McFarland, R., Taylor, R. W. & Turnbull, D. M. Mitochondrial disease--its impact, etiology, and pathology. *Curr Top Dev Biol* **77**, 113-55 (2007).
6. Moyes, C. D., Mathieu-Costello, O. A., Tsuchiya, N., Filburn, C. & Hansford, R. G. Mitochondrial biogenesis during cellular differentiation. *Am J Physiol* **272**, C1345-51 (1997).
7. Preston, T. J., Abadi, A., Wilson, L. & Singh, G. Mitochondrial contributions to cancer cell physiology: potential for drug development. *Adv Drug Deliv Rev* **49**, 45-61 (2001).
8. Kujoth, G. C. et al. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* **309**, 481-4 (2005).
9. Taanman, J. W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta* **1410**, 103-23 (1999).
10. Denslow, N. D. & O'Brien, T. W. Antibiotic susceptibility of the peptidyl transferase locus of bovine mitochondrial ribosomes. *Eur J Biochem* **91**, 441-8 (1978).
11. Ma, L. & Spremulli, L. L. Cloning and sequence analysis of the human mitochondrial translational initiation factor 2 cDNA. *J Biol Chem* **270**, 1859-65 (1995).
12. Worlax, V. L., Burkhart, W. & Spremulli, L. L. Cloning, sequence analysis and expression of mammalian mitochondrial protein synthesis elongation factor Tu. *Biochim Biophys Acta* **1264**, 347-56 (1995).
13. Xin, H., Worlax, V., Burkhart, W. & Spremulli, L. L. Cloning and expression of mitochondrial translational elongation factor Ts from bovine and human liver. *J Biol Chem* **270**, 17243-9 (1995).
14. Ojala, D. K., Montoya, J. & Attardi, G. The putative mRNA for subunit II of human

- cytochrome c oxidase starts directly at the translation initiator codon. *Nature* **287**, 79-82 (1980).
15. Watanabe, Y. et al. Higher-order structure of bovine mitochondrial tRNA(SerUGA): chemical modification and computer modeling. *Nucleic Acids Res* **22**, 5378-84 (1994).
 16. Knight, R. D., Freeland, S. J. & Landweber, L. F. Rewiring the keyboard: evolvability of the genetic code. *Nat Rev Genet* **2**, 49-58 (2001).
 17. Spremulli, L. L., Coursey, A., Navratil, T. & Hunter, S. E. Initiation and elongation factors in mammalian mitochondrial protein biosynthesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **77**, 211-61 (2004).
 18. Goto, Y., Nonaka, I. & Horai, S. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* **348**, 651-3 (1990).
 19. Tekin, M. et al. Frequency of mtDNA A1555G and A7445G mutations among children with prelingual deafness in Turkey. *Eur J Pediatr* **162**, 154-8 (2003).
 20. Coenen, M. J. et al. Mutant mitochondrial elongation factor G1 and combined oxidative phosphorylation deficiency. *N Engl J Med* **351**, 2080-6 (2004).
 21. Smeitink, J. A. et al. Distinct clinical phenotypes associated with a mutation in the mitochondrial translation elongation factor EFTs. *Am J Hum Genet* **79**, 869-77 (2006).
 22. Valente, L. et al. Infantile encephalopathy and defective mitochondrial DNA translation in patients with mutations of mitochondrial elongation factors EFG1 and EFTu. *Am J Hum Genet* **80**, 44-58 (2007).
 23. Antonicka, H., Sasarman, F., Kennaway, N. G. & Shoubridge, E. A. The molecular basis for tissue specificity of the oxidative phosphorylation deficiencies in patients with mutations in the mitochondrial translation factor EFG1. *Hum Mol Genet* **15**, 1835-46 (2006).
 24. Izquierdo, J. M. & Cuezva, J. M. Evidence of post-transcriptional regulation in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **196**, 55-60 (1993).
 25. Hood, D. A. Co-ordinate expression of cytochrome c oxidase subunit III and VIc mRNAs in rat tissues. *Biochem J* **269**, 503-6 (1990).
 26. Hood, D. A., Zak, R. & Pette, D. Chronic stimulation of rat skeletal muscle induces coordinate increases in mitochondrial and nuclear mRNAs of cytochrome-c-oxidase subunits. *Eur J Biochem* **179**, 275-80 (1989).
 27. Kim, K., Lecordier, A. & Bowman, L. H. Both nuclear and mitochondrial cytochrome c oxidase mRNA levels increase dramatically during mouse postnatal development. *Biochem*

- J* **306** (Pt 2), 353-8 (1995).
28. Evans, M. J. & Scarpulla, R. C. Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences. *J Biol Chem* **264**, 14361-8 (1989).
 29. Virbasius, J. V. & Scarpulla, R. C. Transcriptional activation through ETS domain binding sites in the cytochrome c oxidase subunit IV gene. *Mol Cell Biol* **11**, 5631-8 (1991).
 30. Chau, C. M., Evans, M. J. & Scarpulla, R. C. Nuclear respiratory factor 1 activation sites in genes encoding the gamma-subunit of ATP synthase, eukaryotic initiation factor 2 alpha, and tyrosine aminotransferase. Specific interaction of purified NRF-1 with multiple target genes. *J Biol Chem* **267**, 6999-7006 (1992).
 31. Braidotti, G., Borthwick, I. A. & May, B. K. Identification of regulatory sequences in the gene for 5-aminolevulinate synthase from rat. *J Biol Chem* **268**, 1109-17 (1993).
 32. Kelly, D. P. & Scarpulla, R. C. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev* **18**, 357-68 (2004).
 33. Virbasius, J. V. & Scarpulla, R. C. Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1309-13 (1994).
 34. Gleyzer, N., Vercauteren, K. & Scarpulla, R. C. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol* **25**, 1354-66 (2005).
 35. Rodriguez-Pena, A., Escriva, H., Handler, A. C. & Vallejo, C. G. Thyroid hormone increases transcription of GA-binding protein/nuclear respiratory factor-2 alpha-subunit in rat liver. *FEBS Lett* **514**, 309-14 (2002).
 36. Murakami, T., Shimomura, Y., Yoshimura, A., Sokabe, M. & Fujitsuka, N. Induction of nuclear respiratory factor-1 expression by an acute bout of exercise in rat muscle. *Biochim Biophys Acta* **1381**, 113-22 (1998).
 37. Huo, L. & Scarpulla, R. C. Mitochondrial DNA instability and peri-implantation lethality associated with targeted disruption of nuclear respiratory factor 1 in mice. *Mol Cell Biol* **21**, 644-54 (2001).
 38. Risteovski, S. et al. The ETS transcription factor GABPalpha is essential for early embryogenesis. *Mol Cell Biol* **24**, 5844-9 (2004).

39. Larsson, N. G. et al. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* **18**, 231-6 (1998).
40. Thompson, C. C., Brown, T. A. & McKnight, S. L. Convergence of Ets- and notch-related structural motifs in a heteromeric DNA binding complex. *Science* **253**, 762-8 (1991).
41. LaMarco, K., Thompson, C. C., Byers, B. P., Walton, E. M. & McKnight, S. L. Identification of Ets- and notch-related subunits in GA binding protein. *Science* **253**, 789-92 (1991).
42. Watanabe, H., Imai, T., Sharp, P. A. & Handa, H. Identification of two transcription factors that bind to specific elements in the promoter of the adenovirus early-region 4. *Mol Cell Biol* **8**, 1290-300 (1988).
43. Puigserver, P. et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829-39 (1998).
44. Wu, Z. et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115-24 (1999).
45. Yoon, J. C. et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* **413**, 131-8 (2001).
46. Andersson, U. & Scarpulla, R. C. Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **21**, 3738-49 (2001).
47. Finck, B. N. & Kelly, D. P. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* **116**, 615-22 (2006).
48. Virbasius, J. V., Virbasius, C. A. & Scarpulla, R. C. Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters. *Genes Dev* **7**, 380-92 (1993).
49. Sawa, C. et al. Functional domains of transcription factor hGABP beta1/E4TF1-53 required for nuclear localization and transcription activation. *Nucleic Acids Res* **24**, 4954-61 (1996).
50. Koc, E. C. & Spremulli, L. L. Identification of mammalian mitochondrial translational initiation factor 3 and examination of its role in initiation complex formation with natural mRNAs. *J Biol Chem* **277**, 35541-9 (2002).
51. Barker, C., Makris, A., Patriotis, C., Bear, S. E. & Tsiichlis, P. N. Identification of the gene encoding the mitochondrial elongation factor G in mammals. *Nucleic Acids Res* **21**, 2641-7 (1993).

52. Zhang, Y. & Spremulli, L. L. Identification and cloning of human mitochondrial translational release factor 1 and the ribosome recycling factor. *Biochim Biophys Acta* **1443**, 245-50 (1998).
53. Takeuchi, N. et al. Mammalian mitochondrial methionyl-tRNA transformylase from bovine liver. Purification, characterization, and gene structure. *J Biol Chem* **273**, 15085-90 (1998).
54. Nagaike, T. et al. Identification and characterization of mammalian mitochondrial tRNA nucleotidyltransferases. *J Biol Chem* **276**, 40041-9 (2001).
55. Bullard, J. M., Cai, Y. C., Demeler, B. & Spremulli, L. L. Expression and characterization of a human mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase. *J Mol Biol* **288**, 567-77 (1999).
56. Bullard, J. M., Cai, Y. C. & Spremulli, L. L. Expression and characterization of the human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase. *Biochim Biophys Acta* **1490**, 245-58 (2000).
57. Garret, M. et al. A mammalian tryptophanyl-tRNA synthetase shows little homology to prokaryotic synthetases but near identity with mammalian peptide chain release factor. *Biochemistry* **30**, 7809-17 (1991).
58. Cavdar Koc, E., Burkhart, W., Blackburn, K., Moseley, A. & Spremulli, L. L. The small subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. Identification of the full complement of ribosomal proteins present. *J Biol Chem* **276**, 19363-74 (2001).
59. Koc, E. C. et al. The large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. Analysis of the complement of ribosomal proteins present. *J Biol Chem* **276**, 43958-69 (2001).
60. Suzuki, T. et al. Structural compensation for the deficit of rRNA with proteins in the mammalian mitochondrial ribosome. Systematic analysis of protein components of the large ribosomal subunit from mammalian mitochondria. *J Biol Chem* **276**, 21724-36 (2001).
61. Overman, R. G., Jr., Enderle, P. J., Farrow, J. M., 3rd, Wiley, J. E. & Farwell, M. A. The human mitochondrial translation initiation factor 2 gene (MTIF2): transcriptional analysis and identification of a pseudogene. *Biochim Biophys Acta* **1628**, 195-205 (2003).
62. Johnson, D. F., Hamon, M. & Fischel-Ghodsian, N. Characterization of the human mitochondrial ribosomal S12 gene. *Genomics* **52**, 363-8 (1998).
63. Laalami, S., Putzer, H., Plumbridge, J. A. & Grunberg-Manago, M. A severely truncated form of translational initiation factor 2 supports growth of Escherichia coli. *J Mol Biol* **220**, 335-49 (1991).
64. Tibbetts, A. S. et al. Mammalian mitochondrial initiation factor 2 supports yeast mitochondrial translation without formylated initiator tRNA. *J Biol Chem* **278**, 31774-80

(2003).

65. Brown, T. A. & McKnight, S. L. Specificities of protein-protein and protein-DNA interaction of GABP alpha and two newly defined ets-related proteins. *Genes Dev* **6**, 2502-12 (1992).
66. Batchelor, A. H., Piper, D. E., de la Brousse, F. C., McKnight, S. L. & Wolberger, C. The structure of GABPalpha/beta: an ETS domain- ankyrin repeat heterodimer bound to DNA. *Science* **279**, 1037-41 (1998).
67. Bannert, N., Avots, A., Baier, M., Serfling, E. & Kurth, R. GA-binding protein factors, in concert with the coactivator CREB binding protein/p300, control the induction of the interleukin 16 promoter in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1541-6 (1999).
68. Tanaka, M. et al. Cell-cycle-dependent regulation of human aurora A transcription is mediated by periodic repression of E4TF1. *J Biol Chem* **277**, 10719-26 (2002).
69. Schaeffer, L., Duclert, N., Huchet-Dymanus, M. & Changeux, J. P. Implication of a multisubunit Ets-related transcription factor in synaptic expression of the nicotinic acetylcholine receptor. *Embo J* **17**, 3078-90 (1998).
70. Watanabe, H., Wada, T. & Handa, H. Transcription factor E4TF1 contains two subunits with different functions. *Embo J* **9**, 841-7 (1990).
71. Ouyang, L., Jacob, K. K. & Stanley, F. M. GABP mediates insulin-increased prolactin gene transcription. *J Biol Chem* **271**, 10425-8 (1996).
72. Khurana, T. S. et al. Activation of utrophin promoter by heregulin via the ets-related transcription factor complex GA-binding protein alpha/beta. *Mol Biol Cell* **10**, 2075-86 (1999).
73. Sharrocks, A. D. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 827-37 (2001).
74. Kim, C. A. et al. Polymerization of the SAM domain of TEL in leukemogenesis and transcriptional repression. *Embo J* **20**, 4173-82 (2001).
75. Seidel, J. J. & Graves, B. J. An ERK2 docking site in the Pointed domain distinguishes a subset of ETS transcription factors. *Genes Dev* **16**, 127-37 (2002).
76. Suzuki, F. et al. Functional interactions of transcription factor human GA-binding protein subunits. *J Biol Chem* **273**, 29302-8 (1998).
77. Virbasius, C. A., Virbasius, J. V. & Scarpulla, R. C. NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a

- family of developmental regulators. *Genes Dev* **7**, 2431-45 (1993).
78. Galvagni, F., Capo, S. & Oliviero, S. Sp1 and Sp3 physically interact and co-operate with GABP for the activation of the utrophin promoter. *J Mol Biol* **306**, 985-96 (2001).
 79. Rosmarin, A. G., Luo, M., Caprio, D. G., Shang, J. & Simkevich, C. P. Sp1 cooperates with the ets transcription factor, GABP, to activate the CD18 (beta2 leukocyte integrin) promoter. *J Biol Chem* **273**, 13097-103 (1998).
 80. Sawada, J. et al. Synergistic transcriptional activation by hGABP and select members of the activation transcription factor/cAMP response element-binding protein family. *J Biol Chem* **274**, 35475-82 (1999).
 81. Chinenov, Y., Henzl, M. & Martin, M. E. The alpha and beta subunits of the GA-binding protein form a stable heterodimer in solution. Revised model of heterotetrameric complex assembly. *J Biol Chem* **275**, 7749-56 (2000).
 82. Fromm, L. & Burden, S. J. Synapse-specific and neuregulin-induced transcription require an ets site that binds GABPalpha/GABPbeta. *Genes Dev* **12**, 3074-83 (1998).
 83. Xue, H. H. et al. GA binding protein regulates interleukin 7 receptor alpha-chain gene expression in T cells. *Nat Immunol* **5**, 1036-44 (2004).
 84. Imaki, H. et al. Cell cycle-dependent regulation of the Skp2 promoter by GA-binding protein. *Cancer Res* **63**, 4607-13 (2003).
 85. Zanutto, E., Shah, Z. H. & Jacobs, H. T. The bidirectional promoter of two genes for the mitochondrial translational apparatus in mouse is regulated by an array of CCAAT boxes interacting with the transcription factor NF-Y. *Nucleic Acids Res* **35**, 664-77 (2007).
 86. Wasner, M. et al. Three CCAAT-boxes and a single cell cycle genes homology region (CHR) are the major regulating sites for transcription from the human cyclin B2 promoter. *Gene* **312**, 225-37 (2003).
 87. Zwicker, J. et al. Cell cycle regulation of cdc25C transcription is mediated by the periodic repression of the glutamine-rich activators NF-Y and Sp1. *Nucleic Acids Res* **23**, 3822-30 (1995).
 88. Arcot, S. S., Flemington, E. K. & Deininger, P. L. The human thymidine kinase gene promoter. Deletion analysis and specific protein binding. *J Biol Chem* **264**, 2343-9 (1989).
 89. Yang, Z. F., Mott, S. & Rosmarin, A. G. The Ets transcription factor GABP is required for cell-cycle progression. *Nat Cell Biol* **9**, 339-46 (2007).
 90. Perry, R. P. The architecture of mammalian ribosomal protein promoters. *BMC Evol Biol* **5**,

- 15 (2005).
91. Carninci, P. et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* **309**, 1559-63 (2005).
 92. Mackereth, C. D. et al. Diversity in structure and function of the Ets family PNT domains. *J Mol Biol* **342**, 1249-64 (2004).
 93. Rigaut, G. et al. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* **17**, 1030-2 (1999).
 94. Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. & Roeder, R. G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* **11**, 1475-89 (1983).
 95. Yang, S. J., Liang, H. L., Ning, G. & Wong-Riley, M. T. Ultrastructural study of depolarization-induced translocation of NRF-2 transcription factor in cultured rat visual cortical neurons. *Eur J Neurosci* **19**, 1153-62 (2004).
 96. Gugneja, S., Virbasius, J. V. & Scarpulla, R. C. Four structurally distinct, non-DNA-binding subunits of human nuclear respiratory factor 2 share a conserved transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol* **15**, 102-11 (1995).
 97. Chan, C. K., Hubner, S., Hu, W. & Jans, D. A. Mutual exclusivity of DNA binding and nuclear localization signal recognition by the yeast transcription factor GAL4: implications for nonviral DNA delivery. *Gene Ther* **5**, 1204-12 (1998).
 98. Rosmarin, A. G., Resendes, K. K., Yang, Z., McMillan, J. N. & Fleming, S. L. GA-binding protein transcription factor: a review of GABP as an integrator of intracellular signaling and protein-protein interactions. *Blood Cells Mol Dis* **32**, 143-54 (2004).
 99. Sawada, J., Goto, M., Sawa, C., Watanabe, H. & Handa, H. Transcriptional activation through the tetrameric complex formation of E4TF1 subunits. *Embo J* **13**, 1396-402 (1994).
 100. Nie, F. & Wong-Riley, M. Nuclear respiratory factor-2 subunit protein: correlation with cytochrome oxydase and regulation by functional activity in the monkey primary visual cortex. *J Comp Neurol* **404**, 310-20 (1999).
 101. Somjen, G. G. Extracellular potassium in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Physiol* **41**, 159-77 (1979).
 102. Zhang, C. & Wong-Riley, M. T. Depolarizing stimulation upregulates GA-binding protein in neurons: a transcription factor involved in the bigenomic expression of cytochrome oxidase subunits. *Eur J Neurosci* **12**, 1013-23 (2000).

103. Boulukos, K. E., Pognonec, P., Rabault, B., Begue, A. & Ghysdael, J. Definition of an Ets1 protein domain required for nuclear localization in cells and DNA-binding activity in vitro. *Mol Cell Biol* **9**, 5718-21 (1989).
104. Zhong, H. et al. Carrier-independent nuclear import of the transcription factor PU.1 via RanGTP-stimulated binding to Nup153. *J Biol Chem* **280**, 10675-82 (2005).
105. Hu, W., Philips, A. S., Kwok, J. C., Eisbacher, M. & Chong, B. H. Identification of nuclear import and export signals within Fli-1: roles of the nuclear import signals in Fli-1-dependent activation of megakaryocyte-specific promoters. *Mol Cell Biol* **25**, 3087-108 (2005).
106. Do, H. J. et al. Identification of multiple nuclear localization signals in murine Elf3, an ETS transcription factor. *FEBS Lett* **580**, 1865-71 (2006).
107. Listman, J. A. et al. Conserved ETS domain arginines mediate DNA binding, nuclear localization, and a novel mode of bZIP interaction. *J Biol Chem* **280**, 41421-8 (2005).
108. Kalderon, D., Richardson, W. D., Markham, A. F. & Smith, A. E. Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* **311**, 33-8 (1984).
109. Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A. & Dingwall, C. Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* **64**, 615-23 (1991).
110. Adam, S. A., Marr, R. S. & Gerace, L. Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J Cell Biol* **111**, 807-16 (1990).
111. Fried, H. & Kutay, U. Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci* **60**, 1659-88 (2003).
112. Kutay, U., Izaurralde, E., Bischoff, F. R., Mattaj, I. W. & Gorlich, D. Dominant-negative mutants of importin-beta block multiple pathways of import and export through the nuclear pore complex. *Embo J* **16**, 1153-63 (1997).
113. Gorlich, D., Pante, N., Kutay, U., Aebi, U. & Bischoff, F. R. Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *Embo J* **15**, 5584-94 (1996).
114. Jakel, S. & Gorlich, D. Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *Embo J* **17**, 4491-502 (1998).
115. Gorlich, D., Henklein, P., Laskey, R. A. & Hartmann, E. A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin-beta and hence transit into the nucleus. *Embo J* **15**, 1810-7 (1996).
116. Gorlich, D. et al. Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear

- localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr Biol* **5**, 383-92 (1995).
117. Imamoto, N. et al. The nuclear pore-targeting complex binds to nuclear pores after association with a karyophile. *FEBS Lett* **368**, 415-9 (1995).
 118. Imamoto, N. et al. In vivo evidence for involvement of a 58 kDa component of nuclear pore-targeting complex in nuclear protein import. *Embo J* **14**, 3617-26 (1995).
 119. Moroianu, J., Hijikata, M., Blobel, G. & Radu, A. Mammalian karyopherin alpha 1 beta and alpha 2 beta heterodimers: alpha 1 or alpha 2 subunit binds nuclear localization signal and beta subunit interacts with peptide repeat-containing nucleoporins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6532-6 (1995).
 120. Sekimoto, T., Imamoto, N., Nakajima, K., Hirano, T. & Yoneda, Y. Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1. *Embo J* **16**, 7067-77 (1997).
 121. Goldfarb, D. S., Corbett, A. H., Mason, D. A., Harreman, M. T. & Adam, S. A. Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol* **14**, 505-14 (2004).
 122. Kobe, B. Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. *Nat Struct Biol* **6**, 388-97 (1999).
 123. Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G. & Kuriyan, J. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell* **94**, 193-204 (1998).
 124. Fontes, M. R., Teh, T. & Kobe, B. Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha. *J Mol Biol* **297**, 1183-94 (2000).
 125. Matsubayashi, Y., Fukuda, M. & Nishida, E. Evidence for existence of a nuclear pore complex-mediated, cytosol-independent pathway of nuclear translocation of ERK MAP kinase in permeabilized cells. *J Biol Chem* **276**, 41755-60 (2001).
 126. Yokoya, F., Imamoto, N., Tachibana, T. & Yoneda, Y. beta-catenin can be transported into the nucleus in a Ran-unassisted manner. *Mol Biol Cell* **10**, 1119-31 (1999).
 127. Xu, L., Chen, Y. G. & Massague, J. The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGFbeta-dependent phosphorylation. *Nat Cell Biol* **2**, 559-62 (2000).
 128. Xu, L., Kang, Y., Col, S. & Massague, J. Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGFbeta signaling complexes in the

- cytoplasm and nucleus. *Mol Cell* **10**, 271-82 (2002).
129. Chen, H. B., Rud, J. G., Lin, K. & Xu, L. Nuclear targeting of transforming growth factor-beta-activated Smad complexes. *J Biol Chem* **280**, 21329-36 (2005).
 130. Dingwall, C. & Laskey, R. A. Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem Sci* **16**, 478-81 (1991).
 131. Chelsky, D., Ralph, R. & Jonak, G. Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus. *Mol Cell Biol* **9**, 2487-92 (1989).
 132. Conti, E. & Kuriyan, J. Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin alpha. *Structure* **8**, 329-38 (2000).
 133. Makkerh, J. P., Dingwall, C. & Laskey, R. A. Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids. *Curr Biol* **6**, 1025-7 (1996).
 134. Sunesen, M., Huchet-Dymanus, M., Christensen, M. O. & Changeux, J. P. Phosphorylation-elicited quaternary changes of GA binding protein in transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **23**, 8008-18 (2003).
 135. Hieda, M. et al. A monoclonal antibody to the COOH-terminal acidic portion of Ran inhibits both the recycling of Ran and nuclear protein import in living cells. *J Cell Biol* **144**, 645-55 (1999).
 136. Imamoto, N., Tachibana, T., Matsubae, M. & Yoneda, Y. A karyophilic protein forms a stable complex with cytoplasmic components prior to nuclear pore binding. *J Biol Chem* **270**, 8559-65 (1995).
 137. Sekimoto, T., Nakajima, K., Tachibana, T., Hirano, T. & Yoneda, Y. Interferon-gamma-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by the GTPase activity of Ran/TC4. *J Biol Chem* **271**, 31017-20 (1996).
 138. Tachibana, T., Hieda, M., Sekimoto, T. & Yoneda, Y. Exogenously injected nuclear import factor p10/NTF2 inhibits signal-mediated nuclear import and export of proteins in living cells. *FEBS Lett* **397**, 177-82 (1996).
 139. Tsuji, L., Takumi, T., Imamoto, N. & Yoneda, Y. Identification of novel homologues of mouse importin alpha, the alpha subunit of the nuclear pore-targeting complex, and their tissue-specific expression. *FEBS Lett* **416**, 30-4 (1997).
 140. Chen, G. J., Qiu, N., Karrer, C., Caspers, P. & Page, M. G. Restriction site-free insertion of PCR products directionally into vectors. *Biotechniques* **28**, 498-500, 504-5 (2000).

141. Bischoff, F. R., Klebe, C., Kretschmer, J., Wittinghofer, A. & Ponstingl, H. RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2587-91 (1994).
142. Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M. A. & Brown, M. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* **103**, 843-52 (2000).
143. Michalickova, K. et al. SeqHound: biological sequence and structure database as a platform for bioinformatics research. *BMC Bioinformatics* **3**, 32 (2002).