

学位論文

哺乳類ミトコンドリア翻訳因子の転写制御
機構に関する研究

林 立平

東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻

指導教官 上田 卓也

目次

緒言	p4
1. ヒトミトコンドリア翻訳開始因子 IF2 (hIF2mt)遺伝子の転写促進に関わる因子の同定	p8
1-1. 序論	p8
1-2. 実験結果	p9
1-3. 考察	p16
1-4. 図、表、補足データ	p20
2. NRF-2 を介したミトコンドリア翻訳因子遺伝子の転写調節機構の解明	p52
2-1. 序論	p52
2-2. Tandem affinity purification 法 (TAP 法) を用いた、NRF-2 の転写補因子の同定の試み	p54
2-2-1. 序論	p54
2-2-2. 実験結果	p55
2-2-3. 考察	p57
2-2-4. 図	p58
2-3. NRF-2 β と NRF-2 γ で転写促進活性が異なるメカニズムの解明	p64
2-3-1. 序論	p64
2-3-2. 実験結果	p64
2-3-3. 考察	p70
2-3-4. 図	p73
2-4. NRF-2 $\alpha\beta/\alpha\gamma$ の核内輸送機構の解明	p86
2-4-1. 序論	p86
2-4-2. 実験結果	p88

2-4-3. 考察	p96
2-4-4. 図	p102
結語	p118
実験材料と実験方法	p120
略語	p133
謝辞	p134
参考文献	p135

緒言

ミトコンドリアは真核生物が保持する細胞内器官である。ミトコンドリアは内膜と外膜から成る脂質二重膜で囲まれており、細胞質とミトコンドリア内部との間で、物質のやり取りが絶えず行なわれている。例えば、ミトコンドリアは脂肪酸の分解や解糖系で生じた代謝産物を取り込み、酸化的リン酸化により ATP を合成する。また、膜間領域に存在する cytochrome *c* や apoptosis inducing factor は、外膜の透過性が高まることによって細胞質に放出され、様々な経路を活性化し、アポトーシスを引き起こす^{1,2}。細胞質のカルシウムイオン濃度は、ミトコンドリアによる取り込み、放出によっても制御されており、ミトコンドリア内部のカルシウムイオン濃度変化は、ミトコンドリアでの ATP 合成効率、アポトーシスの誘導にも密接に関与する³。従ってミトコンドリアは、細胞が活動するためのエネルギーを産生する一方で、細胞死を引き起こすという、細胞の生死をコントロールする上で重要な役割を担っている。

ミトコンドリアの機能異常と、神経変性疾患や、糖尿病などのエネルギー代謝異常との関連が示唆され^{4,5}、また、細胞の分化、がん化、老化に伴って、ミトコンドリアは様々な形態、性質を変えることから⁶⁻⁸、これらの高次現象を理解し、疾患の治療に結び付けるためには、ミトコンドリアでの生合成を制御する機構を明らかにすることが不可欠である。

ミトコンドリアは、核ゲノムとは異なる独自のゲノム DNA を持っている。哺乳類ミトコンドリアのゲノム DNA は約 16kb の環状二本鎖 DNA で、ミトコンドリアでの蛋白質合成に用いられる 2 つの ribosomal RNA、22 個の transfer RNA に加えて、13 個の呼吸鎖サブユニットをコードしている⁹。ミトコンドリア DNA の複製、転写に関わる因子や、蛋白質合成に用いられる翻訳因子、リボソーム蛋白質は全て核ゲノムにコードされており、細胞質で作られてからミトコンドリアに運ばれる。ミトコンドリアの蛋白質合成系は、クロラムフェニコールやアミノグリコシドなどの抗生物質に対する感受性が等しいことや¹⁰、翻訳開始因子や翻訳伸長因子の多くは一次構造に類似性があるなど¹¹⁻¹³、バクテリアの蛋白質合成系と多くの共通点を持つ。一方で、messenger RNA の 5' leader 配列を持たないことや¹⁴、異常な構造を持った transfer RNA が存在すること¹⁵、ユニバーサルな遺伝暗号とは異なるコドンを持つことなど¹⁶、他の蛋白質合成系に見られない多くのユニークな特徴を持つ。これまで、酵母や哺乳動物などの翻訳開始因子、翻訳伸長因子が同定され、精製した蛋白質を用いて機能解析が行われてきたが¹⁷、特に *in vitro* で、開始反応を含めた蛋白質合成系が再構成できていないなどの理由から、蛋白質合成の素過程の分子機構は不明な点が多い。

ミトコンドリアゲノム、核ゲノムの変異に起因したミトコンドリア蛋白質合成の欠陥によって、疾患が引き起こされる例が数多く知られている。例えば、ミトコンドリアゲノムの場合、transfer RNA-leucine(UUR)の A3243G 変異や、12S ribosomal RNA の A1555G 変異によって、それぞれ

MELAS と呼ばれるミトコンドリア脳筋症や言語習得前難聴を引き起こす^{18,19}。また、核ゲノムにコードされるミトコンドリア翻訳伸長因子 G1、Tu、Ts の変異と、致死性肝障害、乳酸アシドーシスや脳症との関連が示唆されている²⁰⁻²²。後者では、心臓や肝臓などで翻訳因子の蛋白質量の減少が見られ、それに伴って呼吸鎖サブユニットの発現量が低下する²³。これらの疾患の発症機構を解明し、治療につなげるためには、ミトコンドリアの蛋白質合成の分子機構や、翻訳因子の遺伝子発現制御機構を明らかにすることが重要である。

ミトコンドリアでの酸化的リン酸化による ATP 合成は、NADH やコハク酸を原料として H⁺を膜間領域に汲み上げる 4 つの呼吸鎖複合体 (NADH dehydrogenase、succinate dehydrogenase、cytochrome *bcl* complex、cytochrome *c* oxidase) と、H⁺の濃度勾配を利用して ADP とピロリン酸から ATP を合成する ATP 合成酵素によって行なわれている。これらの酸化的リン酸化に関わる蛋白質複合体は、ミトコンドリアゲノムにコードされる遺伝子と、核ゲノムにコードされる遺伝子から構成されている。そのため、様々な場面において、核とミトコンドリアの遺伝子発現が協調する仕組みが存在する。例えば、ラットの様々な組織から採った RNA を用いた northern hybridization の結果から、核コードとミトコンドリアコードの cytochrome *c* oxidase subunit、ATP synthase subunit の発現量比が組織間でほぼ比例することが報告されている^{24,25}。また、ラットの骨格筋に慢性的に電気刺激を与え続けると、cytochrome *c* oxidase の活性が増加するのに伴って、核、ミトコンドリアそれぞれにコードされる cytochrome *c* oxidase subunit の mRNA 量が協調して増加することや²⁶、産まれた直後のラットで好氣的呼吸が始まるのに呼応してミトコンドリアでの酸化的リン酸化活性が増加するのと同調して、脳や骨格筋で、核、ミトコンドリアコードの cytochrome *c* oxidase subunit の mRNA 量の増加が見られることが報告されている²⁷。これらのことは、哺乳動物の組織の分化や、骨格筋の発達、個体の環境の変化に応じて、細胞がミトコンドリアの酸化的リン酸化活性を調節するために、核とミトコンドリアの遺伝子発現が協調する仕組みが存在し、特に転写段階での制御が重要であることを示唆している。

核ゲノムにコードされる、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化に関わる遺伝子の転写制御には、DNA と直接結合する転写因子群と、DNA とは直接結合しない転写補因子群の両方が関与することが分かってきた。

哺乳動物の核ゲノムにコードされる cytochrome *c*、cytochrome *c* oxidase subunit 遺伝子のプロモーター解析から転写因子 nuclear respiratory factor 1、2 (NRF-1、NRF-2) が同定され^{28,29}、これらがプロモーター領域に結合し、遺伝子の転写を促進することが明らかになった。その後、ATP synthase subunit³⁰ やヘム合成に関わる遺伝子³¹ の転写も促進することが明らかになり、NRF-1、NRF-2 は広範なミトコンドリアの酸化的リン酸化に関与する遺伝子の転写活性化に関与することが分かってきた³²。特に、ミトコンドリア DNA の転写・複製に関わる mitochondrial transcription factor

A、B1、B2 (TFAmt、TFB1mt、TFB2mt)遺伝子の転写を促進することから^{33,34}、NRF-1とNRF-2は cytochrome c oxidase subunit の遺伝子の核ゲノムとミトコンドリアゲノムの両方の遺伝子発現に関与することが明らかにされた。NRF-1、NRF-2 の認識配列は、ひとつの遺伝子のプロモーター領域に両方とも見られる場合と、片方のみが存在する場合があり、NRF-1 と NRF-2 は、協同的または相補的にこれらの遺伝子の転写を制御していると考えられる³²。NRF-1、NRF-2 は、甲状腺ホルモンによる肝臓でのエネルギー代謝の活発化や、ラットの運動による骨格筋でのミトコンドリア量の増加に先立って発現量が増加することから^{35,36}、ミトコンドリアでのエネルギー産生に特異的な役割が示唆される。NRF-1、NRF-2 はともにマウスの胚発生の初期から様々な組織に渡って発現しており、また、ノックアウトマウスはいずれも着床前後に致死になることから、哺乳動物の初期発生にも必要であることが分かっている^{37,38}。Tfam 遺伝子のノックアウトマウスも胚発生の初期に致死になることから³⁹、ミトコンドリアゲノムの遺伝子発現の欠陥が、NRF-1、NRF-2 の欠損によって致死になる原因のひとつだと考えられる。NRF-2 は GA binding protein (GABP)^{40,41} または E4TF1⁴² という別名でも呼ばれているが、本論文ではミトコンドリア関連遺伝子の転写に着目しているため、NRF-2 の呼び名で統一する。

近年、転写因子 PPAR γ と結合する蛋白質として、PPAR gamma coactivator 1 α (PGC-1 α)が同定され⁴³、PGC-1 α は thyroid hormone receptor β 、脂肪酸酸化経路の酵素遺伝子の転写に関わる PPAR α 、NRF-1 などの、ミトコンドリアでのエネルギー代謝に関与する転写因子と直接結合し、協同的に転写を促進することが明らかにされた^{43,44}。その後同定された類似の蛋白質、PGC-1 β 、PRCを含めた PGC-1 family は、寒冷環境での褐色脂肪組織の熱産生⁴³、飢餓時の肝臓における糖新生⁴⁵、細胞増殖に伴って発現量が増加する⁴⁶。また、PGC-1 family の発現異常と、2 型糖尿病や心疾患などの、エネルギー代謝の異常から起こる疾患との関連が明らかにされている⁴⁷。これらのことは、哺乳動物のエネルギー代謝の恒常性と可塑性を維持するために、PGC-1 family の発現量や活性の調節、また、ミトコンドリアのエネルギー代謝に関与する遺伝子の転写制御が重要な役割を担っていることを示唆している。

これらの背景から、哺乳類ミトコンドリアの蛋白質合成の制御機構を理解するために、ミトコンドリアの蛋白質合成に関わる遺伝子の転写制御機構を明らかにすることが必要であると考えた。これまで、哺乳類ミトコンドリア翻訳因子の転写に関与する因子は同定されていない。本論文ではまず、ミトコンドリアの蛋白質合成に必須の遺伝子であるヒトミトコンドリア翻訳開始因子 initiation factor 2 (hIF2mt) 遺伝子を例に、ミトコンドリア翻訳因子の遺伝子の転写に関与する因子を同定することを目指した。hIF2mt 遺伝子の転写開始点近傍には NRF-2 の推定認識配列が存在する。本論文では、*in vitro* および *in vivo* で NRF-2 が hIF2mt 遺伝子の転写開始点近傍に特異的に結合することを明らかにし、reporter assay を用いて NRF-2 の結合部位が hIF2mt 遺伝子の転写促進に

必要であることを示した。また、*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遺伝子の転写に広く関与することを意味している。

前述のように、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化に関わる遺伝子は、組織または細胞のエネルギー需要に応じて転写段階での発現制御を受ける。翻訳因子も含めて、ミトコンドリアの遺伝子発現に関与する遺伝子や、電子伝達系サブユニットの遺伝子の多くが、NRF-2 によって転写を促進されることが分かってきた。では、これらの遺伝子の転写は、NRF-2 によってどのように制御されるだろうか。NRF-2 は、転写促進活性の異なる複数のサブユニットを持っている。NRF-2 は DNA 結合ドメインを持つ α サブユニットと、DNA 結合ドメインを持たない β/γ サブユニットから構成され⁴⁸、NRF-2 による転写促進には 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こと、 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明らかにされている⁴⁹。また、 β/γ サブユニットは組織間で発現量比が異なり、ミトコンドリアの含有量の多い肝臓や骨格筋において β サブユニットの割合が高く、ミトコンドリアの含有量が少ない精巢では γ サブユニットの割合が高いことが知られる⁴¹。このことから、NRF-2 は、組織間で β/γ サブユニットの発現量比を調節することで、ミトコンドリア翻訳因子や電子伝達系サブユニットなどの酸化的リン酸化に関わる遺伝子の転写制御を行なっていると考えられる。本論文では、 β/γ サブユニットの違いに着目し、転写促進活性が異なるメカニズムを明らかにすることで、NRF-2 がミトコンドリア蛋白質の転写をどのように制御しているかを理解したいと考えた。

1. ヒトミトコンドリア翻訳開始因子 IF2 (hIF2mt)遺伝子の転写促進に関わる因子の同定

1-1. 序論

哺乳類ミトコンドリアの蛋白質合成に関わる遺伝子は、核ゲノムにコードされているもので、initiation factor 2¹¹、initiation factor 3⁵⁰、elongation factor Tu¹²、elongation factor Ts¹³、elongation factor G⁵¹、release factor 1⁵²、ribosome recycling factor⁵²、methionyl transfer RNA transformylase⁵³、CCA adding enzyme⁵⁴、aminoacyl transfer RNA synthetase のうち数個⁵⁵⁻⁵⁷、約 90 個の ribosomal protein⁵⁸⁻⁶⁰が単離され、アミノ酸配列の決定、cDNA のクローニングがなされている。哺乳類ミトコンドリアの蛋白質合成に関わる遺伝子の中で、これまで hIF2mt と ribosomal protein S12 でゲノム領域がクローニングされている^{61,62}。hIF2mt 遺伝子について、転写開始点近傍の 0.5～1.7kb の領域が SV40 virus のプロモーターと同等の転写活性を持つことが示されているが⁶¹、詳細な cis element は決定されていない。そこで、Mary A. Farwell らから hIF2mt のゲノム領域の入ったプラスミドを供与頂き、本研究で詳細なプロモーター解析をすることとした。hIF2mt 遺伝子は哺乳類ミトコンドリア翻訳因子のプロモーター解析の初めての例である。IF2 は大腸菌や⁶³、酵母のミトコンドリアの⁶⁴蛋白質合成に必須の遺伝子であり、哺乳類ミトコンドリアにおいても、IF2 の発現量の調節は蛋白質合成の効率を制御する上で重要であると考えられる。本研究は、hIF2mt 遺伝子のプロモーター解析によって転写制御に関わる転写因子を同定することを目指した。さらに、*in silico* でその他のミトコンドリアの蛋白質合成に関わる遺伝子の転写開始点付近の配列を解析することで、ミトコンドリアの生合成に関わる遺伝子の転写に広く関与すると言われている NRF-1、NRF-2 の役割を、これまで詳細に調べられてきた呼吸鎖サブユニットや mitochondrial transcription factor の結果と合わせて議論したいと考えた。

1-2. 実験結果

1-2-1. hIF2mt 遺伝子のプロモーター領域の同定

hIF2mt 遺伝子の転写に必要な領域(プロモーター領域)を調べるために、hIF2mt 遺伝子の転写開始点付近のゲノム配列を組み込んだプラスミドを用いて *luciferase* reporter assay を行なった。*luciferase* reporter assay では、reporter plasmid を培養細胞に導入し、一定時間培養した後、細胞破碎液を用いて Luciferase の発光を測定する。この時、*luciferase* 遺伝子上流に組み込んだ DNA の転写活性に比例して、Luciferase の発光量が得られる。転写開始点から 1636 または 473 塩基上流から 6 塩基下流の領域を組み込んだプラスミドを Mary A. Farwell 博士から供与頂き (pLuc-1636/+6、pLuc-473/+6。Overman et al 2003 では pJF3、pJF4 と表記されている⁶¹)、さらに 5'側から段階的に削ったプラスミドを作製した。ヒトの培養細胞である HEK293T 細胞に作製したプラスミドを transfection し、24 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。その結果、転写開始点上流 1636 塩基(-1636)から-91 まで削っても Luciferase の発光量に殆ど差は見られないのに対して、-54、-41 まで削ると、約 80%、95%それぞれ発光量が低下することが分かった(図 1-1)。これらの結果から、-91/-54 と -54/-41 の領域が hIF2mt 遺伝子の転写に必要であることが分かった。また、-1636/-91 の領域は転写活性に寄与しないことが示唆された。一方で、pLuc-91/-42 は pLuc-91/+6 に比べて約 3%の Luciferase 活性しか持たないことが分かった。この結果は、-91/-42 の領域では hIF2mt 遺伝子の転写に十分ではないこと、-41/+6 の領域も転写に必要であることを示唆している。pLuc-41/+6、pLuc-91/-42 のいずれも、*luciferase* 遺伝子上流に何も組み込んでいない pLuc-none と比べると約 10 倍の Luciferase 発光量が見られることから (pLuc-41/+6: 0.027 ± 0.012 , pLuc-91/-42: 0.031 ± 0.010 , pLuc-none: 0.0027 ± 0.0009)、-41/+6、-91/-42 の領域だけでも、一部の転写活性を有することが分かった。これらの結果から、-91/+6 の領域が hIF2mt 遺伝子の転写に十分であること、-91/-54、-54/-41、-41/+6 のそれぞれの領域が最大の転写活性を得るために必要であることが分かった。

1-2-2. -91/-54、-54/-41 の領域には、転写因子 NRF-2 の推定認識配列が存在する。

続いて、Reporter assay によって同定された hIF2mt 遺伝子のプロモーター領域中で、転写の促進に寄与する cis-element を同定することを目指した。Overman et al. 2003 で示唆されているように、-54/-41 には、転写因子 NRF-2 の推定認識配列が存在する(図 1-2、downstream NRF-2 site)。NRF-2 は前述したように、ミトコンドリアの酸化的リン酸化に関わる遺伝子の転写促進に関与することが知られる。

進化工学的な手法によって、NRF-2 は 5'-(G/A)C(g)C(a)GGAA(t)G(a)T(c)-3' ([G/A]は同程度

好まれることを表し、下付きの括弧は弱い認識を表している。)に強く結合することが示され⁶⁵、NRF-2 の DNA 結合ドメインと DNA の複合体の結晶構造解析から、DNA 結合ドメイン中の α -helix が二本鎖 DNA の GGA を特異的に認識することが明らかにされている⁶⁶。従って、ACCGGAAGC は NRF-2 が結合する可能性が高いと考えられる。また reporter assay で、-54/-41 の領域を削ると hIF2mt プロモーターの転写活性が著しく低下したことから、-54/-41 に NRF-2 が結合し、転写を促進しているのではないかと考えた。

次のような理由から、-91/-54 中の ATTCCGGAAA についても、NRF-2 が結合し、hIF2mt 遺伝子の転写促進に関与しているのではないかと考えた(図 1-2、upstream NRF-2 site)。第一に、reporter assay で、-91/-54 の領域を削ると転写活性が低下すること。第二に、プロモーター中に NRF-2 の認識配列がタンデムに並んだ例が多くあること^{29,48,67}。第三に、mouse と rat の IF2mt 遺伝子の推定転写開始点近傍には、NRF-2 が認識する consensus 配列と近い配列が 2 箇所存在すること(図 1-3)が挙げられる。NRF-2 は転写が始まる方向に対して認識配列が逆向きでも転写を促進することが知られている^{68,69}。また、NRF-2 は中央の GGAA(t)の 2 塩基上流が'A'の場合や^{70,71}、2 塩基下流が'A'の場合も^{29,72} 結合できるという報告があり、consensus 配列とは多少異なる配列でも結合し得ると考えた。

ここで、NRF-2 遺伝子の構造について概説する(図 1-4)。NRF-2 は DNA 結合ドメインを持つ α サブユニットと、DNA 結合ドメインを持たない β サブユニットから成るヘテロダイマーである。NRF-2 α の DNA 結合ドメインは Ets domain と呼ばれ、類似のドメインを持つ蛋白質が、哺乳類では約 30 個知られている⁷³。NRF-2 α は Ets domain の他に pointed domain と呼ばれる構造を持つ。pointed domain は、いくつかの NRF-2 α 以外の Ets family にも見られ、ホモダイマーを形成したり⁷⁴、別の蛋白質との結合部位になることが知られるが⁷⁵、NRF-2 α の pointed domain の binding partner は見つかっておらず、また pointed domain を含めて、NRF-2 α の Ets domain 以外のドメインの役割は殆ど分かっていない。NRF-2 β は、N 末の 4 つの ankyrin repeat を介して NRF-2 α の C 末の Ets domain と結合する。NRF-2 α 、NRF-2 β 、DNA の複合体の結晶構造が解かれており、NRF-2 α に特有の、Ets domain の C 末側にある α -helix が NRF-2 β との結合に寄与していることが分かっている⁶⁶。NRF-2 β には択一的スプライシングによって C 末の数十アミノ酸が異なるイソ型 NRF-2 γ が存在し⁴⁸、NRF-2 α 、NRF-2 β 、NRF-2 γ は哺乳類に保存されている。NRF-2 $\alpha\beta$ と NRF-2 $\alpha\gamma$ の解離定数はほぼ等しく、0.6~0.8 nM である⁷⁶。NRF-2 β と NRF-2 γ には 12 アミノ酸が中央のドメインに挿入されたイソ型がヒトでのみ見つかったが、挿入された 12 アミノ酸の機能は未知である⁴⁸。本論文では、ヒトとラットに保存されている、12 アミノ酸が挿入されていない NRF-2 β 、NRF-2 γ の cDNA を用いて、培養細胞内で発現させる plasmid と大腸菌を形質転換する plasmid を作製した。

1-2-3. NRF-2 は-91/-54、-54/-41 のそれぞれの領域に配列特異的に結合する。

まず、downstream、upstream NRF-2 site に NRF-2 が結合するかどうかを、electrophoresis mobility shift assay (EMSA)を用いて調べた。³²P でラベルした二本鎖 DNA プローブに核抽出液を混ぜ、氷上で 15 分間 incubate した後、Native-PAGE で DNA-protein 複合体を分離した。-56/-32 のプローブに核抽出液を加えると二本のバンドが現れた(図 1-5, lane 2)。NRF-2 は中央の GG を TC もしくは TT に置換すると DNA に結合できなくなることが知られている^{29,48}。二本のバンドは、ラベルしていない competitor DNA を 100 倍量加えると消失したのに対し、5'-ACCGGAAGC-3'を 5'-ACCTTAAGC-3'に置換した competitor DNA を加えても影響を受けなかった(lane 3, 4)。また、NRF-2 の認識配列を含むコントロール DNA を加えると、野生型の competitor DNA と同様、影響を受けることから(lane 5)、バンド A、B は NRF-2 と配列特異性の同じ蛋白質が 5'-ACCGGAAGC-3'に結合したバンドであることが分かった。更に、NRF-2 α 、NRF-2 β/γ に対する抗体を反応液中加入すると、DNA と蛋白質の複合体形成が阻害されることから(lane 6, 7)、バンド A は NRF-2 α と NRF-2 β/γ を含み、バンド B は NRF-2 α のみを含むバンドであることが示唆された。Pre-immune sera を加えても二本のバンドとも影響を受けなかったことから(lane 8)、NRF-2 に対する抗体の特異的な効果であると考えられる。

hIF2mt 遺伝子の-56/-32 プローブと、精製した recombinant NRF-2 protein を用いて EMSA を行なった(図 1-6)。NRF-2 α は単独で DNA と結合するが、NRF-2 β は単独では DNA と結合しない(lane 2, 4)。NRF-2 β を加えた場合のみ黒丸のバンドが現れたことから、黒丸のバンドは NRF-2 α と NRF-2 β の両方を含むと考えられる(lane 5)。更にこのバンドは、図 1-5 で、NRF-2 α と NRF-2 β/γ に対する抗体の両方に対して感受性のあったバンド A とほぼ同じ移動度であった。これらのことから、NRF-2 α 単独、もしくは NRF-2 α と NRF-2 β/γ の複合体が downstream NRF-2 site に結合することが確かめられた。Recombinant NRF-2 α と DNA の複合体(白丸)は、核抽出液を加えた時に現れたバンド B よりもわずかに移動度が小さくなった(lane 1, 5)。現在のところ、recombinant NRF-2 α と HEK293T 細胞中の NRF-2 α で、単独で DNA と結合している場合に移動度が異なる原因は分かっていない。HEK293T 細胞の核抽出液と recombinant NRF-2 α を SDS-PAGE で分離して anti-NRF-2 α 抗体で western hybridization を行ったところ、HEK293T 細胞の内在性の NRF-2 α は recombinant NRF-2 α とほぼ同じ移動度であったことから(補足図 1-1)、内在性の NRF-2 α に何らかの翻訳後修飾があったとしても、SDS-PAGE での移動度の差には現れないと考えられる。

次に、downstream NRF-2 site に NRF-2 が結合するかどうかを、EMSA を用いて調べた。-56/-32 と同様に、³²P ラベルした hIF2mt、-91/-66 の二本鎖 DNA プローブと、HEK293T 細胞の核抽出液 (NEs) を用いて実験を行なった。Downstream NRF-2 site は、NRF-2 の結合の仕方が 5'-ATTCGGGAAA-3'と、5'-ATTCCGGAAA-3'の二通り考えられる。そのため、competitor DNA

として用いた -91/-66-mut では、どちらの場合も NRF-2 との結合が阻害されるように、5'-ATTCCGGAAA-3'を5'-ATTAATTAAA-3'に置換した。バンド C、D は、-91/-66 wild type もしくは RCO の competitor DNA を加えた場合、消失したのに対し、-91/-66-mut を加えても影響を受けなかったことから (lane 2-5)、NRF-2 と配列特異性の同じ蛋白質が 5'- ATTCCGGAAA -3'に結合したバンドであることが分かった。バンド C は、NRF-2 α と NRF-2 β/γ に対する抗体の両方に対して感受性のあったことと (lane 6-8)、-56/-32 のプローブを用いた時に現れたバンド A とほぼ同じ移動度であったことから、NRF-2 α と NRF-2 β/γ を含むバンドであると考えられる。バンド D は、NRF-2 α と NRF-2 β/γ に対する抗体のどちらを加えても影響を受けなかったことから (lane 6-8)、DNA 結合の配列特異性が類似の、NRF-2 とは異なる蛋白質によるバンドであることが示唆された。図 1-5 と図 1-7 の結果から、NRF-2 は hIF2mt プロモーター中の -91/-54、-54/-41 の領域にそれぞれ結合することが分かった。

1-2-4. Upstream、downstream NRF-2 site は、hIF2mt プロモーターの転写活性に必要である。

Upstream、downstream NRF-2 site が hIF2mt プロモーターの転写活性に必要であることを調べるために、hIF2mt プロモーターを *luciferase* 遺伝子上流に組み込んだプラスミド (pLuc-91/+6、図 1-1 参照) に変異を導入して、転写活性を調べる実験を行なった。Upstream、downstream NRF-2 site のそれぞれに (U-mut、D-mut)、もしくは両方ともに (UD-mut)、EMSA で NRF-2 と結合しなくなることが分かった変異を導入し、野生型の pLuc-91/+6 と転写活性を比較した (図 1-8)。その結果、pLuc-91/+6-U-mut、pLuc-91/+6-D-mut とともに、転写活性が約 7 割から 9 割低下することが分かった。pLuc-91/+6-UD-mut ではさらに転写活性が低下することから、upstream、downstream NRF-2 site の両方ともが hIF2mt プロモーターの最大の転写活性に必要であること、またどちらか一方でも一部の転写活性を有することが分かった。

1-2-5. NRF-2 は、hIF2mt プロモーターの転写を促進する。

NRF-2 が hIF2mt プロモーターの転写を促進するかどうかを調べるために、hIF2mt プロモーターの NRF-2 site を含む領域を *luciferase* 遺伝子上流に組み込んだプラスミド (pLuc-91/-42、図 1-1、1-2 参照) に、NRF-2 α 、NRF-2 β の発現ベクターを co-transfection する実験を行なった。これにより、reporter plasmid が導入された細胞で NRF-2 を過剰に発現させることができる。精製した recombinant NRF-2 protein と、核抽出液、DNA を混ぜて *in vitro* で転写を行なう実験で、NRF-2 α と NRF-2 β の両方が転写の促進に必要であることが示されている⁷⁰。本実験でも、NRF-2 α と NRF-2 β の両方を過剰発現させたときに、最も転写を促進する効果が見られた (図 1-9)。NRF-2 α を単独で過剰発現させても転写を促進する効果が見られなかったのに対し、NRF-2 β を単独で過

剰発現させると、約2倍転写を促進した(考察参照)。また、upstream、downstream NRF-2 site それぞれに変異を導入すると、NRF-2 の過剰発現による効果が抑えられた。NRF-2 site 両方ともに変異を導入すると、NRF-2 の過剰発現による効果が全く見られなくなった。これらの結果から、NRF-2 は upstream、downstream NRF-2 site それぞれに結合して hIF2mt プロモーターの転写を促進すること、また、NRF-2 site が両方とも存在する場合に最も転写を促進することが分かった。

1-2-6. hIF2mt プロモーター中には、upstream、downstream NRF-2 site 以外にも転写活性に必要な cis-element が存在するが、trans-element の同定には至っていない。

HEK293T 細胞に pLuc-91/-42 を transfection した場合、pLuc-91/+6 に比べて Luciferase の発光量が約 3%に低下したことから(図 1-1)、-42/+6 の領域にも hIF2mt プロモーターの転写促進に必要な cis-element が存在するのではないかと考えた。そこで、hIF2mt の転写開始点の下流 6 塩基(+6)から段階的に削った reporter plasmid を作製し、HEK293T 細胞に transfection する実験を行った。その結果、+6 から-15 まで削っても Luciferase の発光量に殆ど差は見られないのに対して、-28 まで削ると、約 90%発光量が低下することが分かった(図 1-10)。このことから、-28/-15 の領域が hIF2mt プロモーターの転写促進に必要であることが分かった。しかし、既知の転写因子の認識配列を集めた database、TESS (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>)を用いて、この領域に含まれる転写因子の推定認識配列を検索したが、有意に相同性が見られる配列は同定できなかった。-28/-15 の領域に結合し、転写の促進に関与する転写因子は、これまでのところ同定できていない。

1-2-7. NRF-2 は、細胞内で hIF2mt 遺伝子の転写開始点近傍に結合している。

細胞内で内在性の NRF-2 が hIF2mt 遺伝子のプロモーター領域に結合しているかどうかを調べるために、chromatin immuno-precipitation assay (ChIP assay)を行なった。ChIP assay では、細胞をホルマリンで固定化し、超音波破碎で染色体を 0.2~3 kb の DNA に断片化する。断片化された DNA は、細胞内で結合していた蛋白質がホルマリンによって繋ぎ止められた状態で保持される。DNA と蛋白質の複合体を転写因子に対する抗体で免疫沈降し、共沈してくる DNA を PCR で増幅する。ゲノム上で転写因子が結合している部位を含む領域は PCR で増幅されるが、転写因子が結合していない領域は PCR で増幅されない。

まず、affinity 精製した anti-NRF-2 α 、anti-NRF-2 β/γ 抗体を用い、HeLa 細胞の核破碎液を SDS-PAGE で分離して immuno-blot を行った。Anti-NRF-2 α 抗体では NRF-2 α 単一のバンドが、anti-NRF-2 β/γ 抗体では NRF-2 β のイソ型のバンドが 4 本検出された(補足図 1-2)。このことから、anti-NRF-2 α 、anti-NRF-2 β/γ 抗体ともに、それぞれ NRF-2 α 、NRF-2 β/γ を特異的に認識することが

分かった。次に、NRF-2 α -FLAG もしくは FLAG-NRF-2 β を過剰発現させた HEK293T 細胞の細胞破碎液を用いて、免疫沈降の実験を行なった。Anti-NRF-2 α 、anti-NRF-2 β / γ 抗体を用いて免疫沈降を行なったところ、negative control の anti-PKC δ 抗体に比べて有意に NRF-2 α -FLAG もしくは FLAG-NRF-2 β を共沈してくることが分かった(補足図 1-3)。また、anti-NRF-2 α 抗体を用いた場合、FLAG-NRF-2 β も共沈してきた。このことは、過剰発現した FLAG-NRF-2 β と内在性の NRF-2 α の複合体が、anti-NRF-2 α 抗体と共沈してきたためだと考えられる。Anti-NRF-2 α 、anti-NRF-2 β / γ 抗体それぞれを用いて ChIP assay を行なうこととした。

HEK293T 細胞を固定化し、免疫沈降を行なう前の破碎液を脱架橋し、ゲノム DNA が短い断片 (0.2~3 kb) に切断されていることを確かめた(補足図 1-4)。次に、定量的 PCR を行なうための primer を作製した。hIF2mt 遺伝子の転写開始点近傍、二つの NRF-2 site を含む領域を増幅する proximal primer set (-98/-78, +6/-15) と、転写開始点の約 1.6kb 上流を増幅する distal primer set (-1608/-1586, -1537/-1517) を用いた。ゲノム DNA を鋳型として定量的 PCR を行なった際に、それぞれの primer set が目的の断片を増幅すること、また、目的の断片以外の PCR 産物が増幅されないことを確かめた(補足図 1-5)。Anti-NRF-2 α 抗体と anti-PKC δ 抗体を用いてそれぞれ ChIP を行ない、回収した DNA を鋳型として、real time PCR を行なった。その結果、IF2mt proximal primer set で増幅される DNA 量は、anti-PKC δ 抗体に対して anti-NRF-2 α 抗体を用いた場合約 6 倍だったのに対して、IF2mt distal primer set で増幅される DNA 量は、anti-PKC δ 抗体と anti-NRF-2 α 抗体でほぼ同じであった(図 1-11)。Anti-NRF-2 β / γ 抗体を用いた場合も同様に、IF2mt proximal primer set で増幅される DNA 量は、anti-PKC δ 抗体に対して anti-NRF-2 β / γ 抗体を用いた場合約 4 倍だったのに対して、IF2mt distal primer set で増幅される DNA 量は、anti-PKC δ 抗体と anti-NRF-2 β / γ 抗体でほぼ同じであった(図 1-11)。これらの結果から、細胞内で、NRF-2 α と NRF-2 β / γ は、hIF2mt 遺伝子の転写開始点近傍に結合しているが、転写開始点の上流約 1.6kb には結合していないことが分かった。本研究の reporter assay の結果と(図 1-9)これまでの知見から^{49,70}、NRF-2 による転写促進には NRF-2 α と NRF-2 β / γ の両方が必要であることが分かっている。このことから、NRF-2 α と NRF-2 β / γ が細胞内で hIF2mt 遺伝子の転写開始点近傍に結合し、転写促進に寄与していることが示唆された。

1-2-8. ヒトゲノム上の全遺伝子の中で、ミトコンドリアのタンパク質合成に関わる遺伝子の転写開始点近傍に、NRF-2 の推定認識配列が多く見られる。

まず、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を取得した。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 (-1500/+500)を、推定プロモーター領域として取得した。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。

非重複プロモーターセットの各々の配列について、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'とその相補配列を認識配列として検索を行った。進化工学的な手法で明らかにされた 'consensus 配列'、5'-(G/A)C(g)C(a)GGAA(t)G(a)T(c)-3'⁶⁵の中で、GGAA(t)の 3 塩基上流の(G/A)は特異性が低いこと⁶⁵、また GGAA(t)の上流の 2 塩基は、ミトコンドリアの酸化的リン酸化に関わる遺伝子の多くの場合、CC が保存されていることから^{29,33,48}、5'-CCGGA(A or T)G(T or C)-3'について検索を行った。NRF-1 は、gel shift assay や UV crosslinking の実験によって、結合することが示されている配列の共通性から、5'-(T or C)GCGCA(T or C)GCGC(A or G)-3'が 'consensus 配列'であることが示唆されているが⁷⁷、もっとも 5'側の(T or C)の保存性が低いことと、6 割以上が 'consensus 配列'とは一塩基異なる配列であることから⁷⁷、5'-GCGCA(T or C)GCGC(A or G)-3'と一塩基の違いを許容した配列群を NRF-1 の認識配列として検索を行なった。その結果、ヒトゲノムの全遺伝子 17,823 個のプロモーター配列のうち、2,874 遺伝子 (16.1%)で NRF-1 の認識配列が、3,729 遺伝子 (20.9%)で NRF-2 の認識配列が存在することが分かった(表 1-12)。Gene ontology, GO: 5739 (mitochondrion)を持つか、遺伝子名に mitochondria(l)を含む遺伝子を「ミトコンドリア遺伝子」とし、「ミトコンドリア遺伝子」443 個のプロモーター配列について、NRF-1、NRF-2 の認識配列が存在するかどうかを調べたところ、「ミトコンドリア遺伝子」で、ヒトゲノム全遺伝子に対して NRF-1、NRF-2 ともに認識配列が高頻度で存在することが分かった(NRF-1: 103 個[23.3%]、NRF-2: 148 個[33.4%]、表 1-12)。これらの結果は、NRF-1 と NRF-2 が、核にコードされる、ミトコンドリアでの生合成に関わる遺伝子の転写促進に広く関与する、というこれまでの知見を裏付けるものである。さらに、「ミトコンドリア遺伝子」の中で、ミトコンドリアのタンパク質合成に関わる遺伝子 92 個について、NRF-1、NRF-2 の認識配列が存在するかどうかを調べたところ、NRF-1 の認識配列はヒトゲノム全遺伝子と同程度存在したのに対して(18 個[19.6%])、NRF-2 の認識配列はヒトゲノム全遺伝子の約 2 倍の頻度で存在することが分かった(39 個[42.4%])。このことは、NRF-2 がミトコンドリアのタンパク質合成に関わる遺伝子の転写促進に特異的な役割を担っていることを示唆している。

1-3. 考察

本研究で、hIF2mt 遺伝子の転写に必要な領域、プロモーター領域-91/+6 を決定し、-91/-54 と -54/-41 領域に含まれる、それぞれ upstream、downstream NRF-2 site が hIF2mt 遺伝子の転写促進に必要であることを明らかにした。EMSA を用いて NRF-2 が upstream、downstream site に配列特異的に結合することを明らかにした。Reporter assay を用いて、NRF-2 が hIF2mt プロモーターの転写を促進すること、転写促進には NRF-2 α と NRF-2 β の両方が必要であること、upstream site と downstream site の両方が存在することで、NRF-2 による転写促進の効率が最大になることが分かった。また ChIP assay によって、NRF-2 α と NRF-2 β/γ が HEK293T 細胞内で hIF2mt 遺伝子の転写開始点近傍に結合していることを明らかにした。最後に、ヒト全遺伝子の転写開始点近傍の配列を用いた *in silico* 解析によって NRF-2 の推定認識部位がミトコンドリアの蛋白質合成に関わる遺伝子の転写開始点近傍に高頻度で現れることを明らかにした。

NRF-2 の認識部位だけでは hIF2mt プロモーターの転写活性には十分ではなく、NRF-2 認識部位は、-41/+6 の領域中の cis-element と協同的に転写を促進している。

本研究で、hIF2mt 遺伝子の転写に必要な領域、プロモーター領域-91/+6 を決定し、-91/-54 と -54/-41 領域に含まれる、それぞれ upstream、downstream NRF-2 site が hIF2mt 遺伝子の転写促進に必要であることを明らかにした。一方で、-91/-42 の領域では転写活性に十分ではなく、-41/+6 の領域も転写に必要であることが分かった。-91/-42、-41/+6 単独での転写活性が-91/-42 の約 3% しか見られないことから、-91/-42 と-41/+6 の領域は協同的に働いて hIF2mt 遺伝子の転写を促進していると考えられる。他の遺伝子のプロモーターでは、転写因子 Sp1 や CREB が NRF-2 の認識部位の近傍に結合し、NRF-2 と協同的に転写を促進する例が知られている⁷⁸⁻⁸⁰。-41/+6 の領域に結合する転写因子は同定できていないが、-91/-42 に結合した NRF-2 と協同的に転写を促進していると考えられる。

hIF2mt 遺伝子のプロモーター領域-91/+6 中には upstream、downstream NRF-2 site 以外に NRF-2 の認識部位は存在しないと考えられる。

hIF2mt 遺伝子のプロモーター領域には upstream、downstream NRF-2 site 以外に、NRF-2 が認識するコアの部分、5'-GGA(A/T)-3'を含む配列が-62/-59 と+2/+5 の 2 箇所存在する(図 1-2)。+2/+5 の領域を削っても hIF2mt プロモーターの転写活性に殆ど影響が見られないことから(図 1-10)、+2/+5 は hIF2mt 遺伝子の転写促進に寄与しないと考えられる。また、upstream、downstream NRF-2 site の両方に変異を導入すると、NRF-2 α と NRF-2 β の過剰発現による転写促進が見られなくなることから、-62/-59 も NRF-2 による転写促進には寄与しないと考えられる。した

がって hIF2mt プロモーター中で NRF-2 が結合し、転写活性に寄与する部位は upstream、downstream NRF-2 site の 2 箇所のみであると考えられる。

Downstream NRF-2 site よりも upstream NRF-2 site の方が、hIF2mt プロモーターの転写促進への寄与は大きい。

Downstream NRF-2 site に変異を導入した場合の方が、upstream NRF-2 site に変異を導入した場合と比べて、hIF2mt プロモーターの転写活性が大きく低下したことから(図 1-8)、upstream site と downstream site では downstream NRF-2 site の方が hIF2mt プロモーターの転写活性への寄与が大きいと考えられる。これは、NRF-2 が upstream site よりも、downstream site の方に強く結合すること(図 1-7、lane 2、9)、hIF2mt プロモーターの upstream site のみが存在する場合(pLuc-91/-42-D-mut)よりも downstream site のみが存在する場合(pLuc-91/-42-U-mut)の方が、NRF-2 α と NRF-2 β の過剰発現による転写促進の効果が大きく見られたことと一致する(図 1-9)。

NRF-2 の認識配列が遺伝子のプロモーター中に 2 個以上存在し、それぞれが転写活性に寄与している例は数多く知られている^{29,48,67}。NRF-2 β サブユニットの C 末のドメインは leucine zipper 様の構造を取っており⁶⁵、NRF-2 $\alpha\beta$ が DNA と結合している場合に、DNA 上で heterotetramer を形成し⁸¹、複数の認識配列が並ぶことで NRF-2 と DNA との結合が強められることが明らかにされている⁴⁸。このため、複数の認識配列が並ぶことで、NRF-2 がプロモーター領域に結合しやすくなり、より効率的に転写を促進することができると考えられる。一方で、プロモーター中に単一の NRF-2 認識部位しか存在しない例も数多く知られている⁸²⁻⁸⁴。したがって、プロモーター中に複数の NRF-2 認識配列が存在することは、NRF-2 による転写促進に有利に働くことがあるが、必ずしも必要ではないと考えられる。

***In silico* 解析から示唆された、ミトコンドリアの蛋白質合成に関わる遺伝子の転写制御における NRF-2 の役割**

NCBI reference sequence を元として、ヒトゲノム全 17,832 遺伝子の転写開始点近傍-1500/+500 に見られる NRF-1、NRF-2 の推定認識配列を検索したところ、2,874 遺伝子(16.1%)で NRF-1 の認識配列が、3,729 遺伝子(20.9%)で NRF-2 の認識配列が存在することが分かった(表 1-12)。このうち NRF-1 では 2,209 遺伝子(76.9%)が、NRF-2 では 2,592 遺伝子(69.5%)が、-500/+200 の領域に推定認識配列を含んでいた。既知の NRF-1 と NRF-2 の認識配列は、殆どの場合転写開始点近傍に見られる。本研究で用いたプロモーターセットでも、NRF-1 と NRF-2 の推定認識配列は転写開始点近傍により高頻度で現れたことから、NRF-1 と NRF-2 は主に転写開始点近傍の数百塩基に結合することで、転写制御に関与していることが示唆される。

本研究では NRF-2 の認識配列として 5'-CCGGA(A/T)G(T/C)-3' とその相補配列を用いて検索を行った。NRF-2 は中央の GGAA(t) の 2 塩基上流が 'A' の場合や^{70,71}、2 塩基下流が 'A' の場合も^{29,72} 結合できるという報告がある。また、hIF2mt 遺伝子の upstream NRF-2 site の場合、5'-GGAA-3' の 1 塩基下流が 'A' または 'T' である。したがって NRF-2 は 5'-CCGGA(A/T)G(T/C)-3' に強く結合するが、consensus 配列と異なっているにもかかわらず、NRF-2 が結合して転写を促進する場合がありますと考えられる。17,832 個のプロモーターセットについて、5'-CGGA(A/T)G-3' とその相補配列を含むプロモーターを検索したところ、11,346 個の遺伝子 (63.7%) がヒットした。Upstream NRF-2 site のように 5'-GGA(A/T)-3' の両脇の塩基の違いも許容した場合、NRF-2 の推定認識配列を含むプロモーターの数はさらに増え、また NRF-2 の認識配列として機能しないものが多く含まれると考えられるため、本研究では NRF-2 との affinity が強く、また実験的に NRF-2 の認識部位であることが確かめられている配列の多くで共通する 5'-CCGGA(A/T)G(T/C)-3' とその相補配列を用いて検索を行った。このため、検索の結果ヒットしなかった遺伝子でも、NRF-2 の認識配列として機能する部位を含むものが存在することは否定できない。

本研究の *in silico* 解析の結果、NRF-1 と NRF-2 の認識配列ともに、ゲノム全遺伝子に対して「ミトコンドリア遺伝子」の転写開始点近傍に多く見られた (表 1-12)。このことは、NRF-1 と NRF-2 がミトコンドリアでの生合成に関わる遺伝子の転写に広く関与するというこれまでの知見と一致する。一方で、ミトコンドリアの蛋白質合成に関わる遺伝子では、NRF-2 の推定認識配列が多く見られたが、NRF-1 の推定認識配列は、ヒトゲノム全遺伝子とほぼ同程度の割合で存在した。このことは、NRF-1 に比べて NRF-2 の方が、ミトコンドリアの蛋白質合成に関わる遺伝子の転写に強く関与していることを示唆している。

近年、哺乳類ミトコンドリアの蛋白質合成に関わる遺伝子の中で、mitochondrial ribosomal protein S12 (MRPS12) 遺伝子についても詳細なプロモーター解析が行われ、NRF-2 の他に、転写因子 NF-Y が転写開始点近傍に結合して転写を促進することが示された⁸⁵。NF-Y は細胞周期の制御や DNA 合成に関与する遺伝子の転写促進に関与することが知られており⁸⁶⁻⁸⁸、NF-Y の、細胞増殖とミトコンドリアにおける ATP 産生を協調させる役割が示唆されている。NRF-2 についても、細胞周期の制御や DNA 合成に関わる遺伝子^{84,89}、細胞質のリボソーム蛋白質遺伝子の転写を促進することが知られている⁹⁰。したがって NRF-2 と NF-Y は、細胞増殖に必要な遺伝子とミトコンドリアの蛋白質合成に関わる遺伝子の両方の転写を促進することから、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化を促進することで、細胞増殖時に必要となるエネルギーを供給する役割があると考えられる。

NRF-2 は、核とミトコンドリアにコードされる、ミトコンドリアの酸化的リン酸化に関わる遺伝子の転

写を促進する。

本研究で、NRF-2 が hIF2mt 遺伝子のプロモーター領域に結合し、転写を促進することを明らかにした。NRF-2 は NRF-1 とともに、ミトコンドリア DNA の複製・転写に関与する遺伝子の転写活性化に関わることが知られている。本研究の結果は、NRF-2 がミトコンドリアの蛋白質合成に関与する遺伝子の転写活性化にも関わることを示しており、NRF-2 が、DNA の複製・転写、翻訳の全ての過程でミトコンドリア DNA にコードされる遺伝子の遺伝子発現を促進する役割を担うことを意味している。また NRF-2 と NRF-1 は、核にコードされる電子伝達系サブユニットの遺伝子の転写も活性化することが知られる。ミトコンドリアの酸化的リン酸化に関与する遺伝子は、核ゲノムとミトコンドリアゲノムの両方にコードされており、それぞれの遺伝子発現が細胞のエネルギー需要に応じて協調する仕組みが存在する(序論参照)。本研究とこれまでの知見によって、NRF-2 と NRF-1 による転写促進が、核とミトコンドリアゲノムの遺伝子発現を協調させるメカニズムのひとつであることが明らかになった。

1-4. 図、表、補足データ

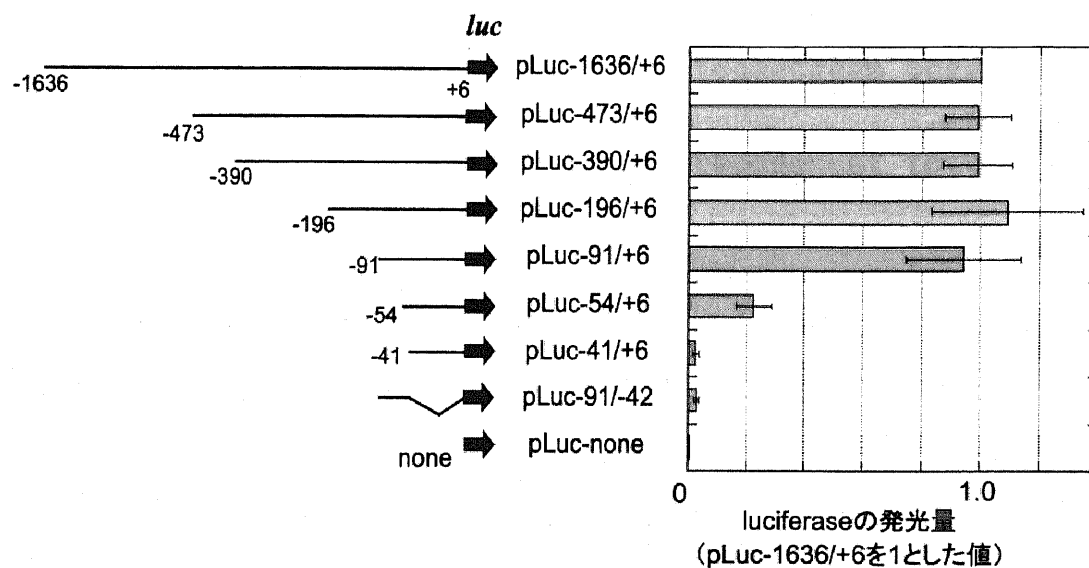


図 1-1. hIF2mt 遺伝子のプロモーター領域の同定

HEK293T 細胞に luciferase reporter plasmid を transfection し、24 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 3~4 回繰り返して、測定値を pLuc-1636/+6 に対する相対値で表した。値は平均値±標準偏差で示した。番号は転写開始点⁶¹に対する相対位置。転写開始点の上流 1636 塩基(-1636)から-91 まで削っても Luciferase の発光量に殆ど差は見られないのに対して、-54、-41 まで削ると、約 80%、95%それぞれ発光量が低下することが分かった。

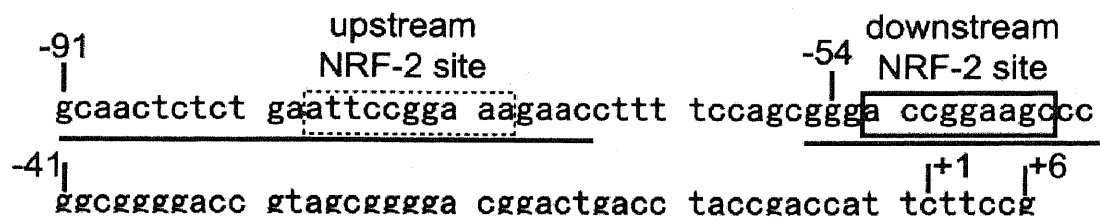


図 1-2. hIF2mt 遺伝子のプロモーター領域の NRF-2 site。

hIF2mt 遺伝子のプロモーター領域-91/+6 の塩基配列を示した。転写開始点を+1 で示した⁶¹。下線は EMSA で用いたプローブの範囲。

```

mouse  TAGCCGGCCTCCACCAGCCACAGACAACCCAGAATTCATGGGGAAGCTGCTTCCGGCGG
rat     CCGCCGGCCTCTATCAGCCACAGACAACCCGGAATTCAGTGGGAAAGCTGCTTCCGGCGG
          ***** * ***** ***** **** *****
                               +1 (mouse)
mouse  TACCGGAAGCACGACGGGGACCTCACGGAAGGGACGGACTGAATGACCCACAATTCTCCT
rat     TACCGGAAGCACGACGGGGACCTTGCAGGAAGGAACGGACTGAGTGACCCACAGTTCTCCT
          ***** ***** ***** ***** *****
mouse  GGGTCCGGAGGGCGACCTCGCCTGGGAGTTGAGTGAGTGGGGTCTCTGCGCTAGGGTGGT
rat     GGGTCCGGAAGGCGACCTCGCCTGGGAACTGAGTGAGTGGGGTTTCTACGCTAAGATGGT
          ***** ***** ***** **** ***** *

```

図 1-3. mouse、rat の IF2mt 遺伝子の転写開始点付近には、NRF-2 の推定認識配列が二箇所存在する。

mouse: NW_000035 (Genbank)、rat: NW_047431 (Genbank)をそれぞれ参照した。mouse の EST clone、BB624506 (RIKEN 完全長 cDNA library 由来⁹¹⁾)の配列を元に転写開始点を推測した。mouse の推定転写開始点は、rat では EST clone、CK357959 (Genbank)の 5'末端の 302 塩基上流にあたる。NRF-2 の推定認識配列を四角で囲んだ。mouse と rat で同じ塩基の箇所を*で示した。

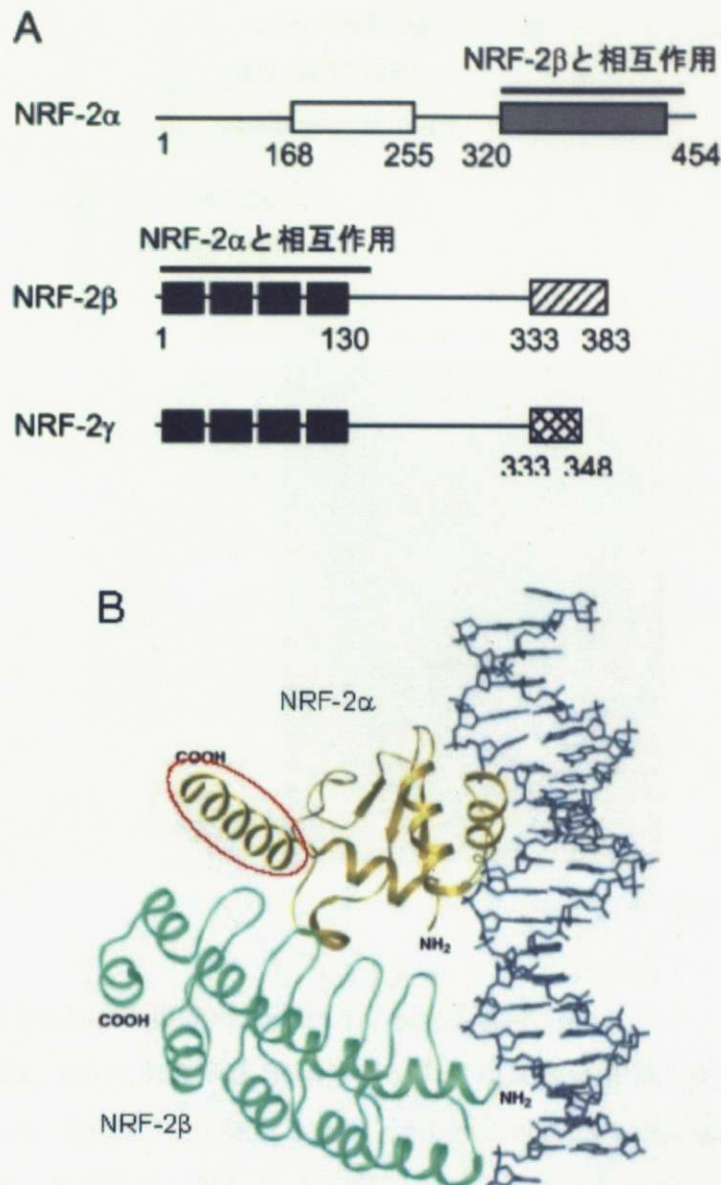


図 1-4. NRF-2 の一次構造と、DNA との複合体の結晶構造

A. NRF-2 α 、NRF-2 β 、NRF-2 γ 遺伝子の一次構造。NRF-2 α ; 白四角, pointed domain; 灰色四角, Ets domain を持つ。Ets domain は DNA に結合するとともに、NRF-2 β とも結合する。pointed domain は他の Ets domain にも見られる構造で、単独で結晶構造が解かれている⁹²。NRF-2 α の Ets domain 以外の部分は pointed domain も含めて機能が分かっていない。NRF-2 γ は、NRF-2 β と同一の遺伝子座から択一的スプライシングによって生じるイソ型で、C 末の数十アミノ酸が異なる⁴⁸。それぞれ斜線四角、網四角で表した。4 つの ankyrin repeat(黒四角)で NRF-2 α との結合には必要十分である。B. NRF-2 α -311/430 (金色)、NRF-2 β -1/157 (緑)、二本鎖 DNA: 5'..ACCGGAAGT..3'(青)の複合体の結晶構造⁶⁶。Ets domain の C 末側にある helix(赤丸で囲んだ)は Ets family の中で NRF-2 α のみに存在し、NRF-2 β / γ との相互作用に必要である。

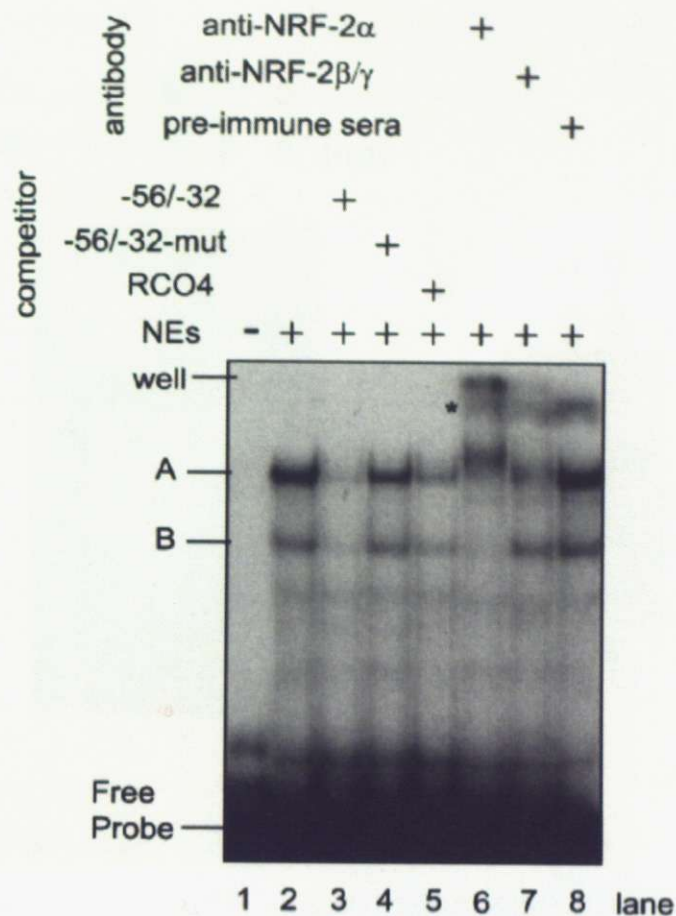


図 1-5. NRF-2 は hIF2mt プロモーターの-56/-32 に結合する。

^{32}P 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 (NEs) を用いて EMSA を行なった。反応液 15 μl 中に、5 fmol ^{32}P -probe、500 fmol cold competitor、5 μg NEs、1 μl antisera を加えた。-56/-32-mut では、5'-ACCGGAAGC-3' を 5'-ACCTTAAGC-3' に置換した。RCO4 は NRF-2 の認識配列を含む DNA のコントロール⁴⁸。Lane 2-5 から、バンド A、B は NRF-2 の認識配列に配列特異的に結合した蛋白質によるバンドであることが分かった。また、lane 6-8 から、バンド A は NRF-2 α と NRF-2 β/γ を含み、バンド B は NRF-2 α のみを含むことが示唆された。'*' のバンドは、pre-immune sera を加えた場合も見られることから、抗体と probe DNA の非特異的な結合によって生じたバンドであると考えられる。

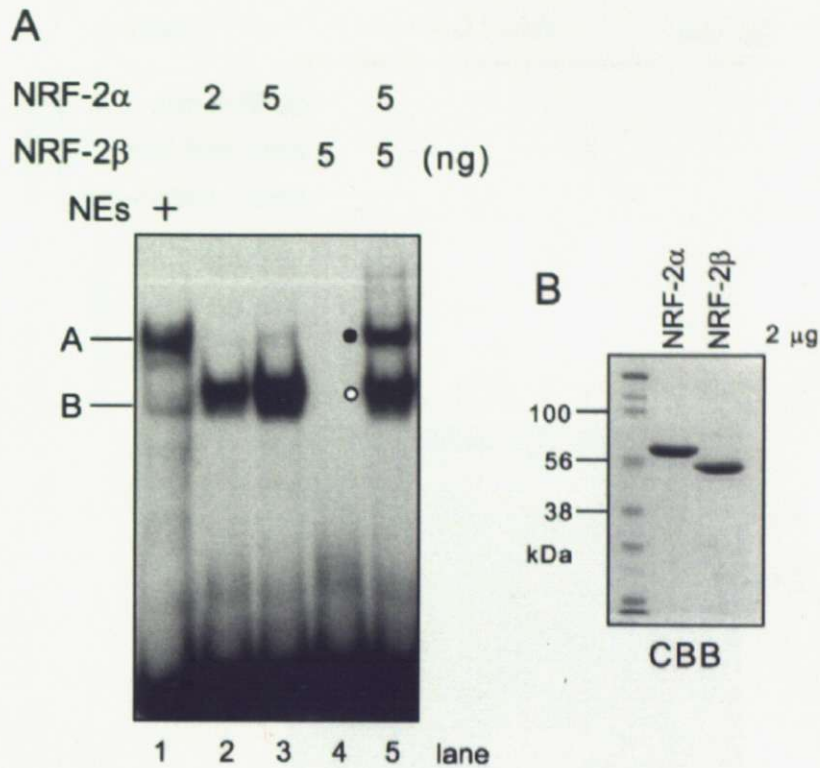


図 1-6. Recombinant NRF-2 protein は hIF2mt -56/-32 に結合する。

A. 32 P ラベルした hIF2mt、-56/-32 プローブと、HEK293T 細胞の核抽出液 (NEs)、または精製した NRF-2 α 、NRF-2 β の recombinant protein を用いて EMSA を行なった。白丸は NRF-2 α のみを含み、黒丸は NRF-2 α と NRF-2 β の両方を含むバンドである。黒丸のバンドは、核抽出液を加えた時に現れたバンド A とほぼ同じ移動度である。B. Recombinant NRF-2 protein 2 μ g を SDS-PAGE で分離し、CBB で染色した。NRF-2 α は約 60kDa のところに、NRF-2 β は約 50kDa のところに単一のバンドが現れた。

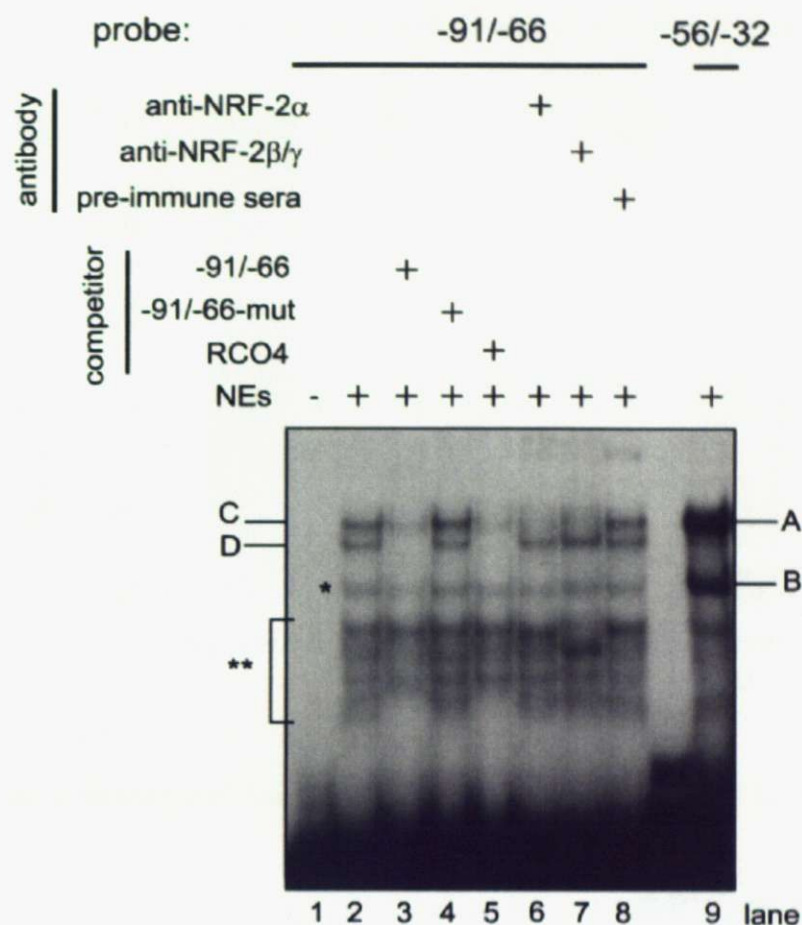


図 1-7. NRF-2 は hIF2mt プロモーターの-91/-66 に結合する。

^{32}P ラベルした hIF2mt、-91/-66 の二本鎖 DNA プローブと、HEK293T 細胞の核抽出液 (NEs) を用いて EMSA を行なった。実験条件は図 1-5 と同じである。-91/-66-mut では、5'-ATTCCGGAAA-3' を 5'-ATTAATTAAA-3' に置換した。Lane 2-5 から、バンド C、D は NRF-2 の認識配列に配列特異的に結合した蛋白質によるバンドであることが分かった。また、lane 6-8 から、バンド C は NRF-2 α と NRF-2 β/γ を含むことが示唆された。バンド C は -56/-32 のプローブを用いた時に現れたバンド A とほぼ同じ移動度であることが分かった。* のバンドは、バンド B とほぼ同じ移動度であるが、competitor や antibody の影響を殆ど受けていないことから、DNA と核抽出物液中の蛋白質の非特異的な結合によるバンドであると考えられる。** のバンド群は核抽出物を加えた lane で一様に見られることから、DNA と核抽出物液中の蛋白質の非特異的な結合によるバンドであると考えられる。

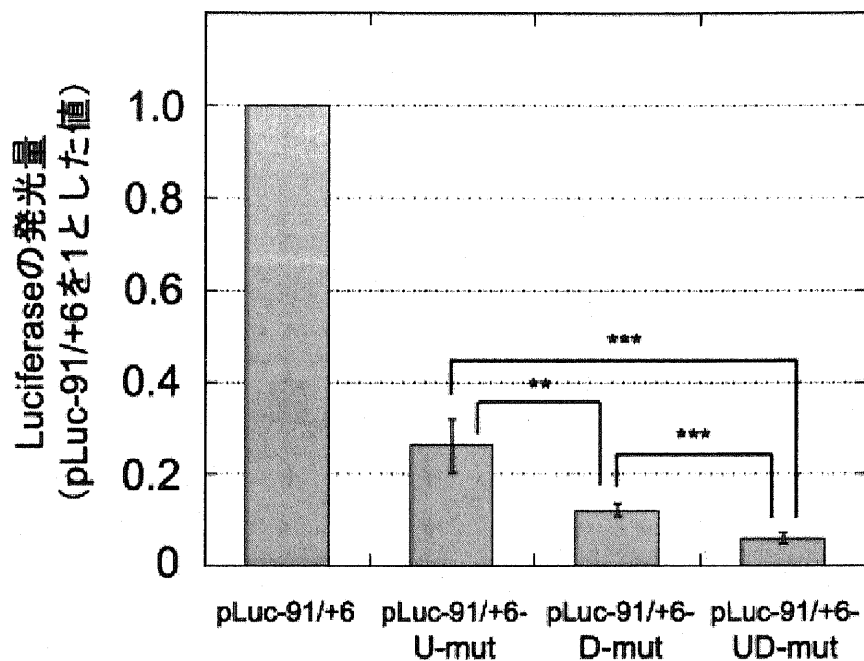


図 1-8. Upstream, downstream NRF-2 site は hIF2mt プロモーターの転写活性に必要である。

HEK293T 細胞に luciferase reporter plasmid を transfection し、24 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 3~4 回繰り返す、測定値を pLuc-91/+6 に対する相対値で表した。値は平均値±標準偏差で示した。pLuc-91/+6 に以下の変異を導入した。U-mut; 5'-ATTCCGGAAA-3' → 5'-ATTAATTAAA-3'、D-mut; 5'-ACCGGAAGC-3' → 5'-ACCTTAAGC-3'、UD-mut; U-mut と D-mut を合わせた。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。***; $p < 0.01$ 、****; $p < 0.001$ を表している。

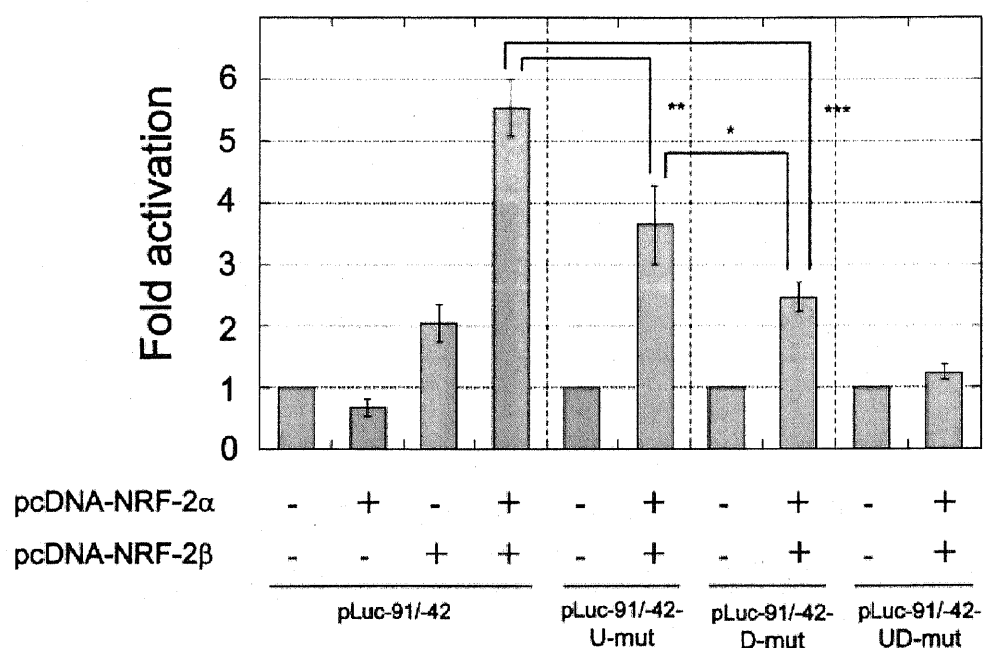


図 1-9. NRF-2 は、hIF2mt プロモーターの転写を促進する。

HEK293T 細胞に luciferase reporter plasmid と、NRF-2α、NRF-2β の発現ベクター (pcDNA-NRF-2α、pcDNA-NRF-2β) 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。pcDNA の空ベクターを加え、サンプル間で transfection する DNA の量が一定になるようにした。独立の実験を 3~4 回繰り返し、各 reporter plasmid について、空の pcDNA のみを加えた時の測定値に対する相対値で表した。値は平均値±標準偏差で示した。U-mut、D-mut、UD-mut は図 1-8 と同じである。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。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ を表している。

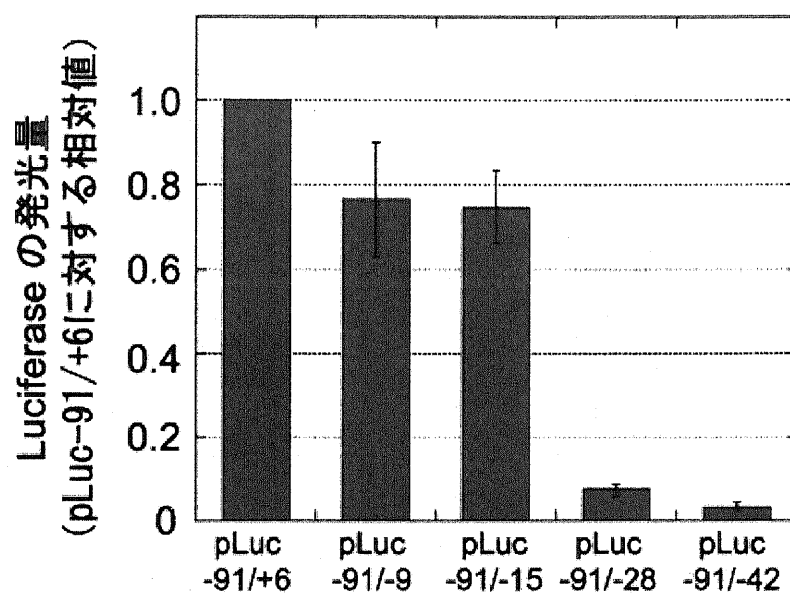


図 1-10. -15/-28 の領域は、hIF2mt プロモーターの転写促進に必要である。

HEK293T 細胞に luciferase reporter plasmid を transfection し、24 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 3~4 回繰り返し、測定値を pLuc-91/+6 に対する相対値で表した。値は平均値±標準偏差で示した。転写開始点の下流 6 塩基(+6)から-15まで削っても Luciferase の発光量に殆ど差は見られないのに対して、-28 まで削ると、約 90% 発光量が低下することが分かった。

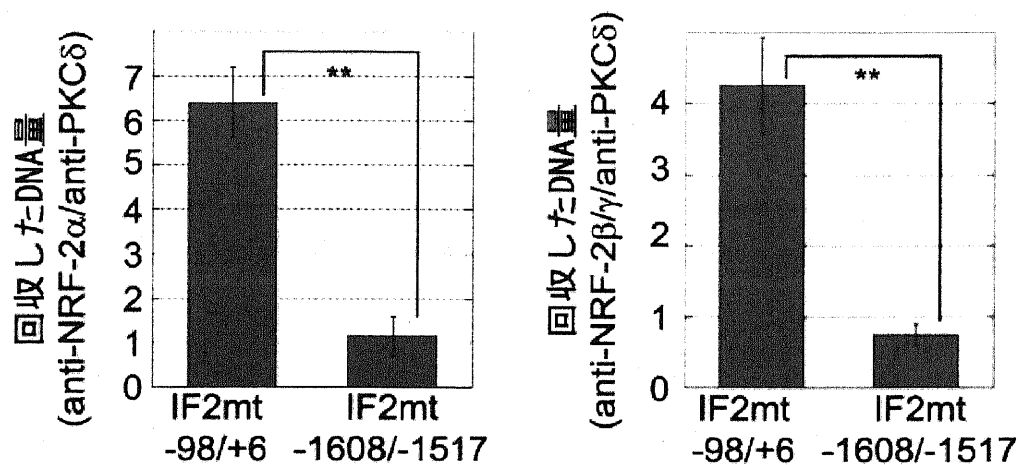


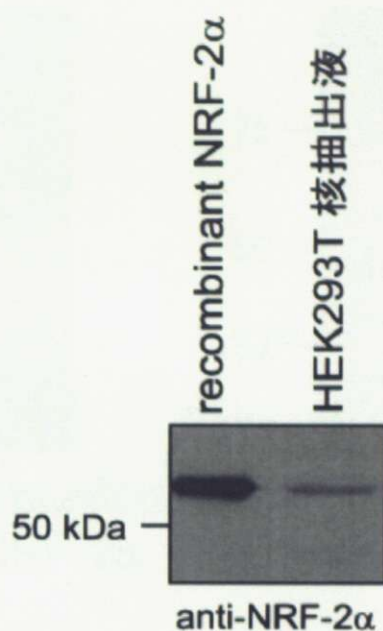
図 1-11. NRF-2 は細胞内で hIF2mt 遺伝子の転写開始点近傍に結合している (ChIP assay)。

ホルマリンで固定化した HEK293T 細胞の細胞破碎液と、anti-NRF-2αまたは anti-NRF-2β/γ 抗体と、anti-PKCδ抗体を用いて ChIP assay を行なった。回収した DNA と、hIF2mt 遺伝子の転写開始点近傍を増幅する IF2mt proximal primer set、転写開始点上流約 1.6kb を増幅する IF2mt distal primer set を用いて real time PCR を行なった (補足図 1-4 参照)。独立の実験を三回行ない、回収された DNA 量を測定した。Proximal primer set で増幅される DNA 量は、anti-PKCδ抗体に対して anti-NRF-2αもしくは anti-NRF-2β/γ抗体を用いた場合 4~6 倍だったのに対して、distal primer set で増幅される DNA 量は、anti-PKCδ抗体と anti-NRF-2αもしくは anti-NRF-2β/γ抗体でほぼ同じであった。これらの結果から、細胞内で NRF-2αと NRF-2β/γは hIF2mt 遺伝子の転写開始点近傍に結合しているが、転写開始点の上流約 1.6kb には結合していないことが示唆された。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。 $p < 0.01$ を表している。

転写因子	全ゲノム遺伝子 (17823 genes)	「ミトコンドリア遺伝子」 (443 genes)	ミトコンドリアの蛋白質合成に 関わる遺伝子 (92 genes)		
	出現頻度	出現頻度	<i>p</i> 値	出現頻度	<i>p</i> 値
NRF-1	2874 (16.1%)	103 (23.3%)	4.5×10^{-5}	18 (19.6%)	> 0.1
NRF-2	3729 (20.9%)	148 (33.4%)	1.0×10^{-10}	39 (42.4%)	4.1×10^{-10}

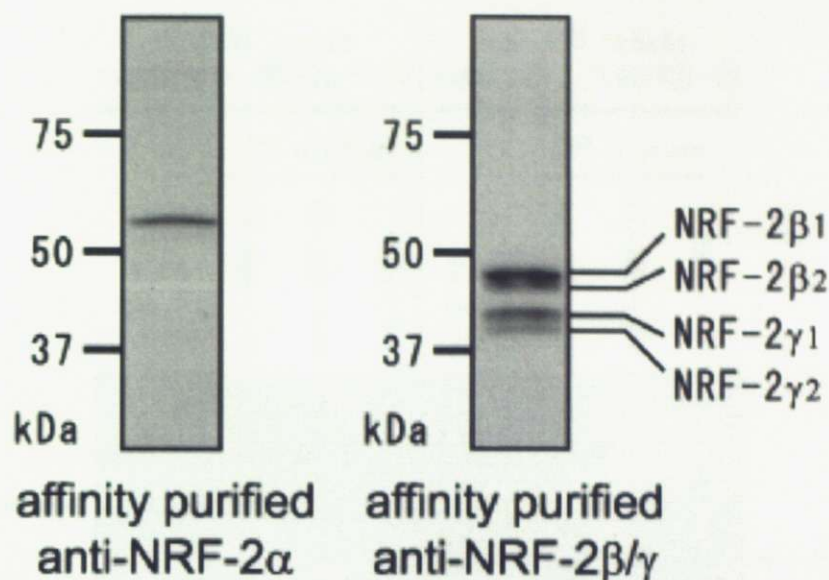
表 1-12. NRF-2 の推定認識配列は、ミトコンドリアのタンパク質合成に関わる遺伝子の転写開始点近傍に多く見られる。

遺伝子の転写開始点近傍-1500/+500 の領域に、転写因子 NRF-1 と NRF-2 の認識配列が存在するかどうかを調べ、それぞれのカテゴリー中で、認識配列を含む遺伝子の頻度を調べた。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。



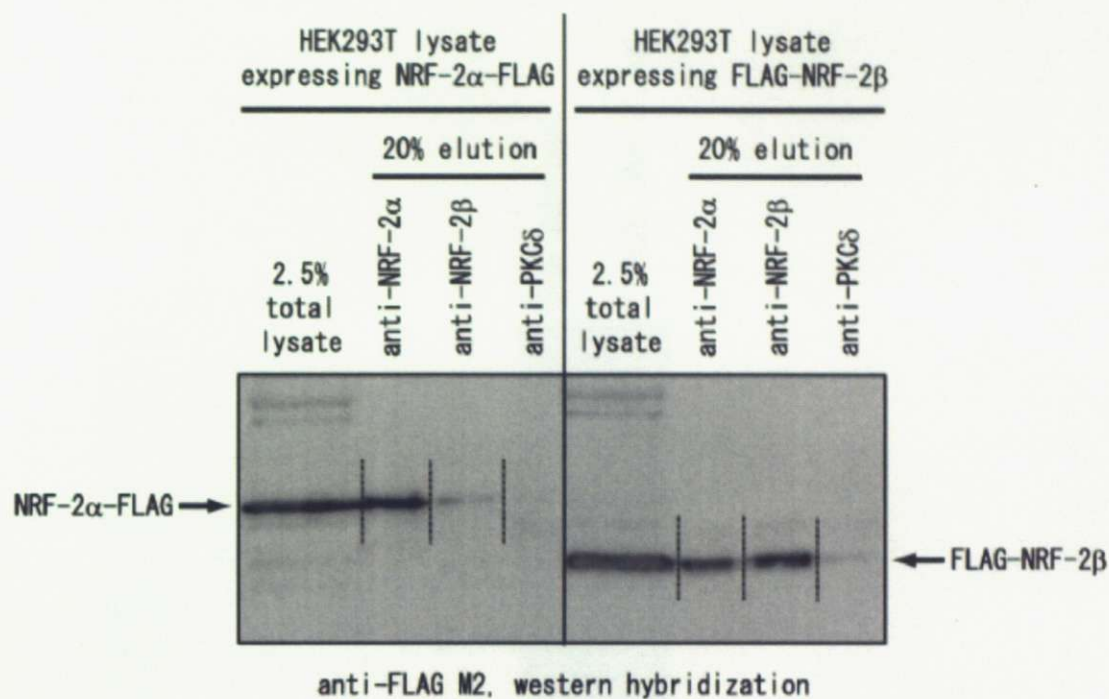
補足図 1-1. HEK293T 細胞内の NRF-2 α は、recombinant NRF-2 α と、SDS-PAGE ではほぼ同じ移動度である。

HEK293T 細胞の核抽出液 15 μ g と、recombinant NRF-2 α 10 ng を SDS-PAGE で分離して、anti-NRF-2 α 抗体を用いて western hybridization を行った。HEK293T 細胞で発現している内在性の NRF-2 α は、recombinant NRF-2 α と、SDS-PAGE でほぼ同じ移動度であることが分かった。



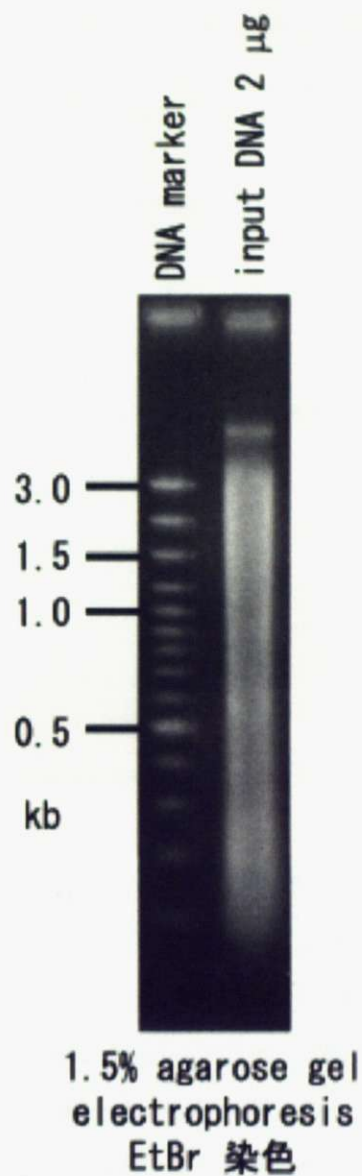
補足図 1-2. Affinity purified anti-NRF-2 α 、anti-NRF-2 β/γ 抗体は、NRF-2 α 、NRF-2 β/γ をそれぞれ特異的に認識する。

HeLa 細胞の核破砕液 20 μ g を 12% SDS-PAGE で分離し、nitrocellulose membrane に transfer した後、抗体をそれぞれ affinity purified anti-NRF-2 α : 0.15 ng/ml, anti-NRF-2 β : 0.1 ng/ml ずつ加えて、室温で 1 時間反応させた。残存の抗体を洗い流した後、anti-rabbit IgG-HRP を反応させ、ECL(Millipore)で抗体が反応したバンドを検出した。Anti-NRF-2 α では単一のバンドが検出できた。Anti-NRF-2 β では 4 本のバンドが検出された。NRF-2 β 、NRF-2 γ にはヒトの場合、 β 1、 β 2、 γ 1、 γ 2のイソ型が存在する⁴⁸。分子量から、大きい順に β 1、 β 2、 γ 1、 γ 2だと考えられる。



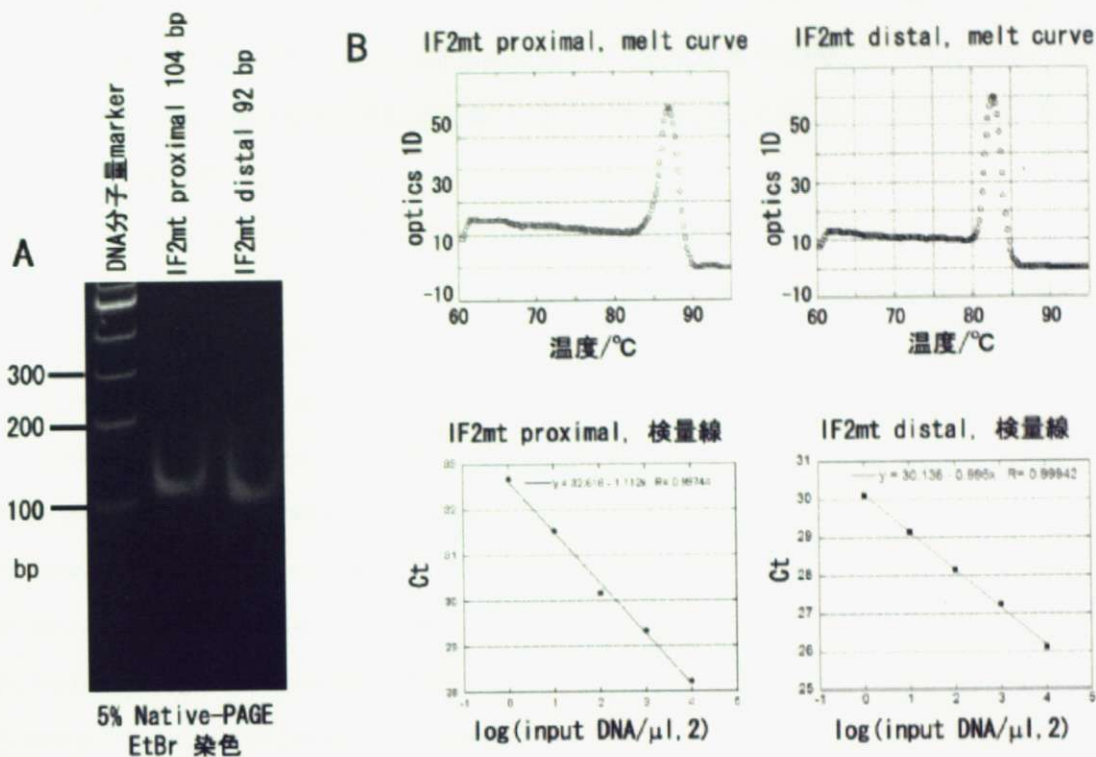
補足図 1-3. Affinity purified anti-NRF-2 α 、anti-NRF-2 β / γ 抗体を用いて免疫沈降を行なうと、それぞれ NRF-2 α 、NRF-2 β / γ を共沈してくる。

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、細胞破碎液を用いて免疫沈降を行なった。細胞破碎液に affinity purified anti-NRF-2 α 、NRF-2 β / γ 、anti-PKC δ を加え、一晚 incubate した後、protein A beads で抗体と抗体に結合してきた蛋白質を精製した。精製した画分を SDS-PAGE で分離し、anti-FLAG M2 抗体で NRF-2 α -FLAG と FLAG-NRF-2 β を検出した。Anti-NRF-2 α 抗体、anti-NRF-2 β / γ 抗体両方ともに、negative control の anti-PKC δ 抗体に比べて有意に、それぞれ NRF-2 α -FLAG と FLAG-NRF-2 β が共沈して来た。また、anti-NRF-2 α 抗体を使って免疫沈降を行なった場合、FLAG-NRF-2 β も共沈してきた。これは、過剰発現した FLAG-NRF-2 β と内在性の NRF-2 α の複合体が、anti-NRF-2 α 抗体と共沈してきたためと考えられる。



補足図 1-4. Sonication で破碎したゲノム DNA。

HEK293T 細胞をホルマリンで固定した後回収し、ChIP lysis buffer で懸濁した後、sonication でゲノム DNA をせん断した。脱架橋したあと、proteinase K 処理、RNase A 処理を行ない、ethanol 沈殿で DNA を精製した。2 μg の DNA を agarose gel electrophoresis で分離し、EtBr で染色した。



補足図 1-5. IF2 proximal、IF2 distal primer set で目的の DNA 断片が特異的に増幅される。

HEK293T 細胞を固定化し、免疫沈降を行なう前の破碎液を脱架橋し、精製したゲノム DNA を鋳型として、real time PCR を行なった。用いた primer set はそれぞれ IF2mt proximal: (-98/-78、+6/-15)、IF2mt distal: (-1608/-1586、-1537/-1517) (数字は hIF2mt 遺伝子の転写開始点を+1とした時の相対位置)。A. real time PCR を行なった後の PCR 産物を Native-PAGE で分離し、EtBr で染色した。それぞれ目的の大きさの、単一のバンドが見られた。B. それぞれの primer set で real time PCR を行なった時の melt curve と、鋳型として投入した input DNA の量を振った時の Ct 値を示した。Melt curve では、PCR cycle が終わったあとに、温度を徐々に上げ、二本鎖 DNA が解離する時の、SYBR Green の蛍光の変化を測定し、一次微分で表した。いずれの場合も、蛍光の変化が単一のピークで見られることから、単一の PCR 産物が増幅されたことが示唆された。また、代表的な検量線の結果を示した。精製した後の input DNA を 800 倍希釈し、それぞれ 1, 2, 4, 8, 16 μl 分を投入し、real time PCR を行ない、SYBR Green の蛍光の値が閾値 30 を超える Ct 値を測定した。この DNA 量の範囲では、log (input DNA/μl, 2) にほぼ比例して Ct 値が変化することから、定量的 PCR が行なえることを示している。

補足情報 1-6.

UCSC から落としてきた 23131 の refseq genes の中で、重複遺伝子を除いた 17823 genes について、名前の中に mitochondria(l)が含まれるか、5739(mitochondrion)の gene ontology を含む遺伝子(443 genes)を列挙した。

蛋白質合成に関与するもの(92 genes)には refseq ID の先頭に't'を付けた。

NM_024952 Protein c14orf159, mitochondrial precursor (UNQ2439/PRO5000).
tNM_014763 mitochondrial ribosomal protein L19
tNM_024996 G elongation factor, mitochondrial 1
NM_001861 cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1
tNM_006567 phenylalanine-tRNA synthetase 2
NM_002080 aspartate aminotransferase 2 precursor
tNM_032476 mitochondrial ribosomal protein S6
NM_006351 translocase of inner mitochondrial membrane 44
NM_001918 dihydrolipoamide branched chain transacylase
NM_000110 dihydropyrimidine dehydrogenase
NM_007169 phosphatidylethanolamine N-methyltransferase
NM_004545 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta
NM_031212 Mitochondrial RNA splicing protein 3/4 (Putative mitochondrial solute carrier splice variant).
NM_001825 sarcomeric mitochondrial creatine kinase
NM_002492 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta
tNM_152912 mitochondrial translational initiation factor 3
NM_005015 oxidase (cytochrome c) assembly 1-like
NM_001152 solute carrier family 25, member 5
tNM_181512 mitochondrial ribosomal protein L21 isoform b
NM_007220 carbonic anhydrase VB, mitochondrial precursor
NM_006004 ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein
tNM_032111 mitochondrial ribosomal protein L14
NM_000284 pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1
NM_001865 cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2
NM_014472 Putative mitochondrial space protein 32.1.
NM_000862 hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta-

tNM_004927 mitochondrial ribosomal protein L49
 tNM_016491 mitochondrial ribosomal protein L37
 NM_021830 Truncated putative T7-like mitochondrial DNA helicase.
 tNM_014078 mitochondrial ribosomal protein L13
 NM_003375 voltage-dependent anion channel 2
 NM_003562 solute carrier family 25 (mitochondrial carrier;
 NM_001003704 mitochondrial protein 18 kDa isoform b
 NM_012459 translocase of inner mitochondrial membrane 8
 NM_001361 dihydroorotate dehydrogenase precursor
 tNM_023936 mitochondrial ribosomal protein S34
 NM_000637 glutathione reductase
 NM_003201 transcription factor A, mitochondrial
 NM_015523 Oligoribonuclease, mitochondrial precursor (EC 3.1.-.-) (Small fragment nuclease) (CGI-114).
 NM_003171 suppressor of var1, 3-like 1
 NM_000086 CLN3 protein
 tNM_031420 mitochondrial ribosomal protein L9
 NM_000781 cytochrome P450, subfamily XIA precursor
 tNM_018060 mitochondrial isoleucine tRNA synthetase
 NM_012239 NAD-dependent deacetylase sirtuin 3, mitochondrial precursor (EC 3.5.1.-) (SIR2-like protein 3) (hSIRT3).
 NM_020786 [Pyruvate dehydrogenase [Lipoamide]]-phosphatase 2, mitochondrial precursor (EC 3.1.3.43) (PDP 2) (Pyruvate
 dehydrogenase phosphatase, catalytic subunit 2) (PDPC 2).
 NM_033412 mitochondrial carrier triple repeat 1
 NM_005004 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta
 NM_000309 protoporphyrinogen oxidase
 NM_004092 mitochondrial short-chain enoyl-coenzyme A
 NM_006440 thioredoxin reductase 2 isoform 1 precursor
 NM_003850 succinate-CoA ligase, ADP-forming, beta subunit
 NM_001098 aconitase 2 precursor
 tNM_032380 mitochondrial elongation factor G2 isoform 1
 NM_001867 cytochrome c oxidase subunit VIIc precursor
 NM_007101 sarcosine dehydrogenase
 tNM_033281 mitochondrial ribosomal protein S36

NM_024698 mitochondrial glutamate carrier 1

NM_003000 succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron

tNM_022839 mitochondrial ribosomal protein S11 isoform a

NM_001001973 ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1

NM_019059 translocase of outer mitochondrial membrane 7 homolog (yeast)

tNM_023937 mitochondrial ribosomal protein L34

NM_004547 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta

NM_004553 NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 6,

NM_000170 glycine dehydrogenase (decarboxylating; glycine

NM_001875 carbamoyl-phosphate synthetase 1, mitochondrial

tNM_016055 mitochondrial ribosomal protein L48

NM_003848 succinate-CoA ligase, GDP-forming, beta subunit

NM_003826 N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment

NM_004793 protease, serine, 15

tNM_032477 mitochondrial ribosomal protein L41

NM_004134 heat shock 70kDa protein 9B precursor

NM_001933 dihydrolipoamide S-succinyltransferase (E2

NM_145691 ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly

NM_198281 hypothetical protein LOC285513

NM_003634 nipsnap homolog 1

NM_001003785 ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F0

NM_001001924 mitochondrial tumor suppressor 1 isoform 1

tNM_017840 mitochondrial ribosomal protein L16

NM_014507 mitochondrial malonyltransferase isoform b

tNM_001008568 tRNA (5-methylaminomethyl-2-thiouridylate)-methyltransferase 1 (TRMT1), transcript variant 2

NM_014765 translocase of outer mitochondrial membrane 20

NM_006830 ubiquinol-cytochrome c reductase (6.4kD)

NM_001002031 ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F0

NM_020749 mitochondrial tumor suppressor 1 isoform 5

NM_004279 peptidase (mitochondrial processing) beta

NM_004564 PET112-like

NM_000021 presenilin 1 isoform I-467

NM_006003 ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske
 NM_007202 A-kinase anchor protein 10 precursor
 NM_001929 deoxyguanosine kinase isoform c precursor
 NM_001196 BH3 interacting domain death agonist isoform 2
 NM_004548 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta
 NM_002491 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta
 tNM_032112 mitochondrial ribosomal protein L43 isoform a
 NM_003705 solute carrier family 25 (mitochondrial carrier,
 NM_004046 ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1
 NM_021734 solute carrier family 25 (mitochondrial
 NM_005138 cytochrome oxidase deficient homolog 2
 tNM_138777 mitochondrial ribosome recycling factor isoform
 NM_000018 acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain
 NM_001948 dUTP pyrophosphatase
 NM_004563 phosphoenolpyruvate carboxykinase 2
 NM_052963 mitochondrial topoisomerase I
 NM_005271 glutamate dehydrogenase 1
 tNM_021134 mitochondrial ribosomal protein L23
 NM_001739 carbonic anhydrase VA, mitochondrial precursor
 NM_005001 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha
 NM_032601 Methylmalonyl-CoA epimerase, mitochondrial precursor (EC 5.1.99.1) (DL-methylmalonyl-CoA racemase).
 tNM_031903 mitochondrial ribosomal protein L32
 NM_001190 branched chain aminotransferase 2,
 NM_006980 mitochondrial transcription termination factor
 NM_007103 NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1,
 NM_000657 B-cell lymphoma protein 2 beta isoform
 NM_002489 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha
 NM_005729 peptidylprolyl isomerase F precursor
 NM_001483 nipsnap homolog 2
 NM_005000 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha
 NM_001001977 ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1
 NM_004614 thymidine kinase 2, mitochondrial

NM_001482 glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine

NM_006903 inorganic pyrophosphatase 2 isoform 2

NM_004552 NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 5,

NM_001007099 sterol carrier protein 2 isoform 1 precursor

NM_000532 propionyl Coenzyme A carboxylase, beta

NM_000408 glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2

NM_006571 dynactin 6

NM_003143 single-stranded DNA binding protein 1

tNM_031280 mitochondrial ribosomal protein S15

tNM_016503 mitochondrial ribosomal protein L30 isoform b

NM_002488 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha

NM_001003713 ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F0

NM_005518 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2

NM_001001935 ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1

NM_005035 mitochondrial DNA-directed RNA polymerase

NM_001001975 ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1

NM_016292 Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial precursor (HSP 75) (Tumor necrosis factor type 1 receptor associated protein) (TRAP-1) (TNFR- associated protein 1).

NM_004208 programmed cell death 8 isoform 1

NM_030631 solute carrier family 25 (mitochondrial

NM_012458 translocase of inner mitochondrial membrane 13

NM_001931 dihydrolipoamide S-acetyltransferase (E2

NM_001863 cytochrome c oxidase subunit VIb

NM_001151 solute carrier family 25 (mitochondrial carrier;

NM_005662 voltage-dependent anion channel 3

tNM_014175 mitochondrial ribosomal protein L15

tNM_019041 mitochondrial translational release factor

NM_001636 solute carrier family 25, member A6

NM_005881 branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase

tNM_015971 mitochondrial ribosomal protein S7

NM_000182 hydroxyacyl dehydrogenase, subunit A

NM_003849 succinate-CoA ligase, GDP-forming, alpha

NM_006067 neighbor of COX4

NM_130902 Cytochrome c oxidase polypeptide VIIb2, mitochondrial precursor (EC 1.9.3.1).

NM_005932 mitochondrial intermediate peptidase

NM_019056 NADH-ubiquinone oxidoreductase ESSS subunit, mitochondrial precursor (EC 1.6.5.3) (EC 1.6.99.3) (Complex I-ESSS) (CI-ESSS) (Neuronal protein 17.3) (p17.3) (Np17.3) (UNQ111/PRO1064).

tNM_015950 mitochondrial ribosomal protein L2

NM_000397 cytochrome b-245, beta polypeptide (chronic

NM_173827 Probable inner membrane protein OXA1L2, mitochondrial precursor.

tNM_018141 mitochondrial ribosomal protein S10

NM_020918 mitochondrial glycerol 3-phosphate

NM_032409 Serine/threonine kinase PINK1, mitochondrial precursor (EC 2.7.1.37) (PTEN induced putative kinase protein 1) (BRPK).

NM_022366 transcription factor B2, mitochondrial

tNM_139242 methionyl-tRNA formyltransferase, mitochondrial

NM_145255 mitochondrial ribosomal protein L10 isoform a

tNM_016497 mitochondrial ribosomal protein L51

NM_003366 ubiquinol-cytochrome c reductase core protein

NM_005763 aminoadipate-semialdehyde synthase

NM_005391 pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 3

NM_005530 isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha

NM_005838 glycine-N-acyltransferase isoform b

NM_004542 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha

NM_016069 mitochondria-associated granulocyte macrophage

NM_001359 2,4-dienoyl CoA reductase 1 precursor

NM_005005 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta

NM_004758 peripheral benzodiazepine receptor-associated

tNM_022100 mitochondrial ribosomal protein S14

NM_006899 isocitrate dehydrogenase 3, beta subunit isoform

tNM_005726 Ts translation elongation factor, mitochondrial

tNM_016065 mitochondrial ribosomal protein S16

NM_006294 ubiquinol-cytochrome c reductase binding

NM_021833 uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier)

NM_001866 cytochrome c oxidase subunit VIIb precursor

NM_133644 GTP binding protein 3 (mitochondrial) isoform

NM_003477 pyruvate dehydrogenase complex, component X

tNM_016034 mitochondrial ribosomal protein S2

NM_001303 heme A:farnesyltransferase

NM_004135 isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) gamma isoform

NM_003356 uncoupling protein 3 isoform UCP3L

NM_001006635 metaxin 2 isoform b

NM_000546 tumor protein p53

tNM_033362 mitochondrial ribosomal protein S12 precursor

NM_022745 ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly

NM_004375 COX11 homolog

NM_000692 aldehyde dehydrogenase 1B1 precursor

NM_001007098 sterol carrier protein X isoform 2

NM_005006 NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1,

NM_016612 mitochondrial solute carrier protein

NM_018397 Choline dehydrogenase, mitochondrial precursor (EC 1.1.99.1) (CHD) (CDH).

tNM_020409 mitochondrial ribosomal protein L47 isoform a

NM_018843 mitochondrial carrier family protein

NM_004085 translocase of inner mitochondrial membrane 8

NM_004632 death-associated protein 3

NM_001002027 ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F0

NM_172002 Co-chaperone protein HscB, mitochondrial precursor (Hsc20).

NM_016016 Mitochondrial carrier protein CGI-69 (PRO2163).

NM_002716 beta isoform of regulatory subunit A, protein

NM_003951 solute carrier family 25, member 14 isoform

tNM_019051 mitochondrial ribosomal protein L50

NM_003172 surfen 1

NM_004649 homolog of zebrafish ES1 isoform 1a precursor

NM_006118 HS1 binding protein

NM_006796 AFG3 ATPase family gene 3-like 2

NM_004550 NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2,

NM_001919 dodecenoyl-Coenzyme A delta isomerase (3,2

NM_005589 aldehyde dehydrogenase 6A1 precursor

NM_030663 mitochondrial capsule selenoprotein

NM_004435 endonuclease G precursor

tNM_014018 mitochondrial ribosomal protein S28

NM_005333 holocytochrome c synthase (cytochrome c

NM_000456 Homo sapiens sulfite oxidase (SUOX), nuclear gene encoding mitochondrial protein

NM_004052 BCL2/adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3

NM_203306 hypothetical protein MGC39606

NM_031481 solute carrier family 25 (mitochondrial carrier), member 18

tNM_022061 mitochondrial ribosomal protein L17

NM_000019 acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1 precursor

NM_000282 propionyl-Coenzyme A carboxylase, alpha

NM_199227 Mitochondrial methionine aminopeptidase 1 (EC 3.4.11.18).

NM_004077 citrate synthase precursor, isoform a

NM_007319 presenilin 1 isoform I-374

NM_001001563 translocase of inner mitochondrial membrane 50

NM_015160 mitochondrial matrix processing protease, alpha

tNM_032351 mitochondrial ribosomal protein L45

NM_005956 methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1

NM_000056 branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta

NM_000785 cytochrome P450, family 27, subfamily B,

NM_030579 cytochrome b5 outer mitochondrial membrane

tNM_016067 mitochondrial ribosomal protein S18C

NM_000240 monoamine oxidase A

NM_000481 aminomethyltransferase (glycine cleavage system

NM_004331 BCL2/adenovirus E1B 19kD-interacting protein

tNM_022163 mitochondrial ribosomal protein L46

NM_003355 uncoupling protein 2

NM_001172 arginase, type II precursor

tNM_024026 mitochondrial ribosomal protein 63

NM_002085 glutathione peroxidase 4

NM_180991 solute carrier organic anion transporter family,

NM_022341 Peptide deformylase, mitochondrial precursor (EC 3.5.1.88) (PDF) (Polypeptide deformylase).

NM_006111 acetyl-coenzyme A acyltransferase 2

NM_005918 mitochondrial malate dehydrogenase precursor

NM_006839 inner membrane protein, mitochondrial

NM_013337 translocase of inner mitochondrial membrane 22

NM_014252 solute carrier family 25 (mitochondrial carrier;

NM_002496 NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8,

tNM_020191 mitochondrial ribosomal protein S22

tNM_022497 mitochondrial ribosomal protein S25

NM_004549 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex

NM_004374 cytochrome c oxidase subunit VIc proprotein

NM_006359 solute carrier family 9 (sodium/hydrogen

NM_006834 RAB32, member RAS oncogene family

NM_014341 mitochondrial carrier homolog 1

NM_006012 endopeptidase Clp precursor

NM_002611 pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 2

NM_004453 electron-transferring-flavoprotein

tNM_005830 mitochondrial ribosomal protein S31

NM_052845 Cob(I)yrinic acid a,c-diamide adenosyltransferase, mitochondrial precursor (EC 2.5.1.17) (Cob(I)alamin
adenosyltransferase) (Methylmalonic aciduria type B protein).

NM_001686 ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1

NM_145305 mitochondrial solute carrier protein

tNM_181441 mitochondrial ribosomal protein L55 isoform a

tNM_006428 mitochondrial ribosomal protein L28

NM_001697 mitochondrial ATP synthase, O subunit precursor

tNM_032014 mitochondrial ribosomal protein S24

NM_002635 solute carrier family 25 member 3 isoform b

NM_000782 cytochrome P450, family 24 precursor

NM_032315 mitochondrial carrier protein MGC4399

NM_003488 A-kinase anchor protein 1 isoform 1 precursor

NM_005984 solute carrier family 25 (mitochondrial carrier;

NM_012460 translocase of inner mitochondrial membrane 9

NM_006358 solute carrier family 25 (mitochondrial carrier;

NM_014342 mitochondrial carrier homolog 2

NM_002494 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex

NM_002612 pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4

NM_013267 glutaminase 2 (liver, mitochondrial)

NM_000032 aminolevulinate, delta-, synthase 2

NM_006114 mitochondrial outer membrane protein TOM40

NM_004051 3-hydroxybutyrate dehydrogenase (heart, mitochondrial)

NM_207397 EAPG6122

NM_001001503 NADH-ubiquinone oxidoreductase flavoprotein 3

NM_006476 ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F0

tNM_002453 mitochondrial translational initiation factor 2

NM_001002014 ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F0

NM_004299 ATP-binding cassette, sub-family B, member 7

NM_006636 methylene tetrahydrofolate dehydrogenase 2

NM_004541 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha

NM_000097 coproporphyrinogen oxidase

tNM_005548 lysyl-tRNA synthetase

NM_013391 Dimethylglycine dehydrogenase, mitochondrial precursor (EC 1.5.99.2) (ME2GLYDH).

NM_015697 Para-hydroxybenzoate--polyprenyltransferase, mitochondrial (EC 2.5.1.-).

tNM_015936 Probable tyrosyl-tRNA synthetase, mitochondrial precursor (EC 6.1.1.1) (Tyrosine--tRNA ligase) (TyrRS) (CGI-04).

NM_000017 acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-2 to C-3 short

NM_001001931 mitochondrial tumor suppressor 1 isoform 4

NM_006327 translocase of inner mitochondrial membrane 23

tNM_003776 mitochondrial ribosomal protein L40

NM_004483 glycine cleavage system protein H (aminomethyl

tNM_020236 mitochondrial ribosomal protein L1

tNM_053035 mitochondrial ribosomal protein S33

tNM_015084 mitochondrial ribosomal protein S27

NM_000030 alanine-glyoxylate aminotransferase

NM_001398 peroxisomal enoyl-coenzyme A hydratase-like

NM_020201 5',3'-nucleotidase, mitochondrial precursor

NM_005009 nucleoside-diphosphate kinase 4

NM_001003941 oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase

NM_005412 serine hydroxymethyltransferase 2

NM_004146 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta

NM_006680 malic enzyme 3, NADP(+)-dependent,

NM_177478 mitochondrial ferritin

NM_002610 pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1

NM_000140 ferrochelatase

NM_002396 malic enzyme 2, NAD(+)-dependent, mitochondrial

tNM_138395 Mitochondrial methionyl-tRNA synthetase.

tNM_018997 mitochondrial ribosomal protein S21

tNM_015956 mitochondrial ribosomal protein L4 isoform a

NM_000143 fumarate hydratase precursor

tNM_016070 mitochondrial ribosomal protein S23

NM_032730 NOGO-interacting mitochondrial protein short isoform.

NM_002490 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha

NM_000920 pyruvate carboxylase precursor

tNM_032479 mitochondrial ribosomal protein L36

tNM_014180 mitochondrial ribosomal protein L22

NM_004003 carnitine acetyltransferase isoform 2

tNM_053050 mitochondrial ribosomal protein L53

NM_182971 Cytochrome c oxidase polypeptide VIII isoform 3, mitochondrial precursor (EC 1.9.3.1) (Cytochrome c oxidase subunit 8-3) (COX VIII- 3).

NM_014820 translocase of outer mitochondrial membrane 70

NM_000784 cytochrome P450, family 27, subfamily A,

NM_020243 mitochondrial import receptor Tom22

tNM_172251 mitochondrial ribosomal protein L54

tNM_022915 mitochondrial ribosomal protein L44

NM_000498 cytochrome P450, subfamily XIB polypeptide 2

NM_016206 colon carcinoma related protein

NM_016013 Complex I intermediate-associated protein 30, mitochondrial precursor (CGI-65).

NM_003374 voltage-dependent anion channel 1

tNM_133645 mitochondrial translation optimization 1 homolog

NM_000198 hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta-

NM_003365 ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I

NM_016020 transcription factor B1, mitochondrial

NM_001002256 ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F0

NM_004255 cytochrome c oxidase subunit Va precursor

NM_001132 AFG3 ATPase family gene 3-like 1

NM_000387 carnitine/acylcarnitine translocase

NM_001876 carnitine palmitoyltransferase 1A

NM_004074 cytochrome c oxidase subunit 8A

NM_030780 mitochondrial folate transporter/carrier

NM_016077 Peptidyl-tRNA hydrolase 2, mitochondrial precursor (EC 3.1.1.29) (PTH 2) (Bcl-2 inhibitor of transcription 1) (CGI-147).

NM_000101 cytochrome b, alpha polypeptide

tNM_015969 mitochondrial ribosomal protein S17

NM_004718 cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2

tNM_021821 mitochondrial ribosomal protein S35

tNM_024540 mitochondrial ribosomal protein L24

NM_004493 hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, type II

NM_001003803 ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F0

NM_031947 solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; ornithine transporter) member 2

NM_002168 isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+),

NM_000436 3-oxoacid CoA transferase 1 precursor

NM_004168 succinate dehydrogenase complex, subunit A,

tNM_015340 leucyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial

NM_005390 pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 2

tNM_032478 mitochondrial ribosomal protein L38

NM_207117 Hepatocellular carcinoma-downregulated mitochondrial carrier protein.

NM_018307 Mitochondrial Rho 1.

NM_000497 cytochrome P450, subfamily XIB (steroid

NM_007294 breast cancer 1, early onset
 NM_001916 cytochrome c-1
 NM_001698 AU RNA-binding protein/enoyl-Coenzyme A
 NM_005003 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, alpha/beta
 tNM_018135 mitochondrial ribosomal protein S18A
 NM_006809 translocase of outer mitochondrial membrane 34
 NM_004589 cytochrome oxidase deficient homolog 1
 NM_006335 translocase of inner mitochondrial membrane 17
 NM_004957 folylpolyglutamate synthase
 NM_000709 branched chain keto acid dehydrogenase E1, alpha
 NM_012140 solute carrier family 25 (mitochondrial carrier;
 NM_002860 pyrroline-5-carboxylate synthetase
 tNM_014050 mitochondrial ribosomal protein L42 isoform a
 tNM_004294 mitochondrial translational release factor 1
 NM_005689 ATP-binding cassette, sub-family B, member 6
 NM_004544 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha
 tNM_002949 mitochondrial ribosomal protein L12
 NM_004214 FGF intracellular binding protein isoform b
 NM_002693 polymerase (DNA directed), gamma
 NM_000925 pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta
 NM_000714 peripheral benzodiazepine receptor isoform PBR
 NM_000636 superoxide dismutase 2, mitochondrial
 NM_000144 frataxin isoform 1 preproprotein
 NM_004110 ferredoxin reductase isoform 2 precursor
 tNM_016050 mitochondrial ribosomal protein L11 isoform a
 NM_001609 acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched
 NM_001608 acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long chain
 NM_004551 NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3,
 NM_002715 protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic
 NM_006660 ClpX caseinolytic protease X homolog
 tNM_014046 mitochondrial ribosomal protein S18B
 NM_181790 G protein-coupled receptor 142

NM_005327 L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, short

NM_007100 ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F0

NM_052901 Small calcium-binding mitochondrial carrier 2.

NM_012332 Mitochondrial Acyl-CoA Thioesterase

NM_032549 IMP2 inner mitochondrial membrane protease-like

NM_012456 translocase of inner mitochondrial membrane 10

NM_001864 cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 1

NM_000108 dihydrolipoamide dehydrogenase precursor

NM_004844 SH3-domain binding protein 5 (BTK-associated)

NM_000255 methylmalonyl Coenzyme A mutase precursor

NM_004546 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta

tNM_182640 mitochondrial ribosomal protein S9

NM_004328 BCS1-like

NM_173575 serine/threonine kinase 32C

tNM_016504 mitochondrial ribosomal protein L27 isoform a

NM_024103 solute carrier family 25 (mitochondrial carrier;

tNM_014161 mitochondrial ribosomal protein L18

NM_000098 carnitine palmitoyltransferase II

NM_002157 10 kDa heat shock protein, mitochondrial (Hsp10) (10 kDa chaperonin) (CPN10).

NM_007215 polymerase (DNA directed), gamma 2, accessory

NM_013386 Mitochondrial ATP-Mg/Pi carrier.

NM_002495 NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 4,

tNM_030811 mitochondrial ribosomal protein S26

NM_001625 adenylate kinase 2 isoform a

NM_004277 solute carrier family 25, member 27

NM_004109 ferredoxin 1 precursor

tNM_017446 mitochondrial ribosomal protein L39 isoform a

tNM_031902 mitochondrial ribosomal protein S5

tNM_017646 tRNA isopentenyltransferase, mitochondrial precursor (EC 2.5.1.8) (Isopentenyl-diphosphate:tRNA isopentenyltransferase) (IPP transferase) (IPTase) (IPPT) (hGRO1).

tNM_016640 mitochondrial ribosomal protein S30

NM_004075 cryptochrome 1 (photolyase-like)

NM_000690 mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2

NM_007208 mitochondrial ribosomal protein L3

tNM_015836 mitochondrial tryptophanyl tRNA synthetase 2

NM_005834 translocase of inner mitochondrial membrane 17

NM_006793 peroxiredoxin 3 isoform a precursor

NM_025196 GrpE-like 1, mitochondrial

NM_020990 ubiquitous mitochondrial creatine kinase

tNM_003321 Tu translation elongation factor, mitochondrial

NM_152407 GrpE-like 2, mitochondrial

tNM_017971 mitochondrial ribosomal protein L20

2. NRF-2 を介したミトコンドリア翻訳因子遺伝子の転写調節機構の解明

2-1. 序論

hIF2mt 遺伝子のプロモーター解析によって、NRF-2 が hIF2mt 遺伝子の転写促進に関与することが分かった。また、*in silico* 解析によって、NRF-2 はミトコンドリアの蛋白質合成に関わる遺伝子の転写に広く関与することが示唆された。NRF-2 は、電子伝達系サブユニットの遺伝子や、ミトコンドリア DNA の複製・転写に関わる遺伝子の転写も促進することから、NRF-2 はミトコンドリアの酸化的リン酸化に関わる遺伝子の転写に広く関与することが明らかになった。しかし、組織または細胞のエネルギー需要に伴って、NRF-2 を介した転写がどのように制御され、標的遺伝子の遺伝子発現が調節されているかは、殆ど理解されていない。

ミトコンドリア含有量の異なる組織間で、NRF-2 β サブユニットと NRF-2 γ サブユニットの発現量比を変えることで、NRF-2 の標的遺伝子の発現量が制御されている。

NRF-2 は DNA 結合ドメインを持つ α サブユニットと、DNA 結合ドメインを持たない β サブユニットから構成されている。NRF-2 β には択一的スプライシングによって C 末の数十アミノ酸が異なるイソ型 NRF-2 γ が存在する⁴⁸。NRF-2 の認識配列を含むプロモーターを組み込んだ reporter plasmid と、NRF-2 の各サブユニットを過剰発現させる plasmid を培養細胞に co-transfection する実験から、NRF-2 による転写促進には 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こと、 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強いことが明らかにされている⁴⁹。NRF-2 α 、NRF-2 β/γ の cDNA を用いて、ラットの様々な組織から抽出した total RNA に対して northern blotting を行なった結果、NRF-2 α 、NRF-2 β/γ ともに様々な組織に広く発現していること、NRF-2 β と NRF-2 γ の発現量比が組織によって異なることが明らかにされた⁴¹。特に、ミトコンドリアの含有量の多い肝臓や骨格筋において β サブユニットの割合が高く、ミトコンドリアの含有量が少ない精巣では γ サブユニットの割合が高いことが分かった⁴¹。また、同様のことが、ヒトの組織を用いた northern blotting の結果から、Suzuki らによっても指摘されている⁷⁶。核にコードされる電子伝達系サブユニットの一つ、 β -F1-ATPase 遺伝子と、ミトコンドリアにコードされる COIII+ATP6+8 遺伝子の cDNA を用いた northern hybridization によって、これらの遺伝子の mRNA は心臓、脳、肝臓、骨格筋で多く発現していて、肺や精巣では発現量が少ないことが示されている²⁴。hIF2mt 遺伝子についても同様の実験が行なわれており、hIF2mt mRNA は心臓、腎臓、肝臓、骨格筋で多く発現しており、肺や胎盤で発現量が少ないことが分かっており¹¹、ミトコンドリア翻訳因子と電子伝達系サブユニットの遺伝子は組織間で同様の転写制御を受けることが示唆される。また、 β サブユニッ

トと γ サブユニットの発現ベクターの量比を変えて培養細胞に transfection する実験から、細胞内での β/γ サブユニットの発現量比によって NRF-2 の転写促進活性が調節され得ることが示されている⁷⁶。これらの知見から、NRF-2 は、組織間で β/γ サブユニットの発現量比を調節することで、ミトコンドリア翻訳因子や電子伝達系サブユニットなどの酸化的リン酸化に関わる遺伝子の転写制御を行なっていると考えられる。

NRF-2 β と NRF-2 γ で、転写を促進する活性が異なる原因は分かっていない。

NRF-2 β と NRF-2 γ は N 末の大部分を占める 1/333 アミノ酸は同一で、それぞれ C 末端の 50 塩基、14 塩基の特異的なドメインを含んでいる⁴⁸。NRF-2 β サブユニットの C 末のドメインは leucine zipper 様の構造を取っており⁶⁵、NRF-2 $\alpha\beta$ が DNA と結合している場合に、DNA 上で heterotetramer を形成し⁸¹、複数の認識配列が並ぶことで NRF-2 と DNA との結合が強められることが明らかにされている⁴⁸。NRF-2 γ は homodimer を形成しないため、複数の NRF-2 認識配列が並んだプロモーターの転写促進活性は NRF-2 β よりも低くなると考えられるが、NRF-2 認識配列が一つしか存在しない場合でも、NRF-2 β と比べて NRF-2 γ の方が、転写促進活性が低いことが示されており⁴⁹、NRF-2 β と NRF-2 γ で転写促進活性が異なる原因は、NRF-2 β の homodimer 化による DNA との結合力の増加以外にあると考えられ、その原因は現在まで明らかにされていない。そこで、本研究では、NRF-2 β と NRF-2 γ の転写促進活性が異なる原因を明らかにしたいと考えた。

2-2. Tandem affinity purification 法 (TAP 法) を用いた、NRF-2 の転写補因子の同定の試み

2-2-1. 序論

NRF-2 β とNRF-2 γ で転写促進活性が異なる原因として、NRF-2 β とNRF-2 γ で相互作用が異なる因子が存在し、NRF-2 β に対してのみ結合して転写を促進する、もしくはNRF-2 γ に対してのみ結合して転写を阻害しているのではないかと考えた。また、NRF-2 とともに、ミトコンドリアの酸化的リン酸化に関わる遺伝子の転写を促進することが知られる NRF-1 については、細胞のエネルギー需要などに応答して活性化する転写補因子 PGC-1 family が NRF-1 と結合して、標的遺伝子の転写を促進するメカニズムが知られている⁴⁴。しかし、NRF-2 と PGC-1 family との直接の相互作用は報告されておらず、PGC-1 family 以外に、NRF-2 と相互作用して転写を制御する補因子が存在する可能性がある。そこで、本研究では、tandem affinity purification 法 (TAP 法) と呼ばれる方法を用いて、NRF-2 β/γ と結合して、NRF-2 を介した転写を制御する補因子を同定することを目指した。

TAP 法は、標的となる遺伝子にタグを付けた蛋白質を細胞内で発現させ、細胞破碎液からタグに対するアフィニティ精製を行ない、標的蛋白質と結合した蛋白質を精製する、という方法である⁹³。この時、複数のタグを用いて段階的な精製を行なうことで、アフィニティビーズに非特異的に吸着した蛋白質を極力除くことができる。TAP 法は、yeast two hybrid 法などと異なり、標的蛋白質と間接的に相互作用した蛋白質も精製することができること、また、精製した蛋白質を用いた pull-down 法などと異なり、タグの付いた標的遺伝子を細胞内で発現させるため、より生理的な相互作用を持つ蛋白質複合体を精製することができる、と言った利点がある。本研究では、NRF-2 β/γ に複数のタグを付けた遺伝子を HEK293T 細胞に発現させ、細胞内で NRF-2 β/γ と相互作用する蛋白質を同定することを目指した。

2-2-2. 実験結果

2-2-2-1. NRF-2 β の TAP construct の作製

まず、NRF-2 γ と比べて転写を促進する活性が高いと示唆されている NRF-2 β について、TAP を行なうための construct を作製した。TAP 法を開発した原著論文では、酵母の SmX4p 蛋白質に種々のタグを付けて細胞内で発現させ、細胞破碎液から精製を行ない、精製の効率が最も高かったもの二つ、protein A と CBP (calmodulin-binding peptide)を選択した⁹³。細胞破碎液を調製し、IgG beads (protein A と結合する)で精製を行った後、TEV protease で protein A を除去して SmX4p を含む画分を溶出させる。最後に calmodulin beads (CBP と結合する)を用いて IgG beads の溶出画分を精製する。本研究では、NRF-2 β の N 末もしくは C 末にタグを付加して TAP を行なうための construct を EUROSCARF (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>) から譲り受けた。

NRF-2 β -N 末タグ (protein A-TEV-CBP-NRF-2 β)、NRF-2 β -C 末タグ (NRF-2 β -CBP-TEV-protein A)を pcDNA に組み込んだ plasmid を調製し、HEK293T 細胞に transfection した。36 h 培養後、細胞を破碎し、細胞破碎液を SDS-PAGE で分離し、anti-NRF-2 β / γ 抗体を用いて western hybridizationを行った。いずれの construct も細胞内でタグを付加していない NRF-2 β と同程度の発現が確認できた (図 2-2-1A)。pcDNA-NRF-2 β -TAP construct を、NRF-2 の認識配列を含むプロモーターを組み込んだ reporter plasmid と co-transfection する実験を行ったところ、タグを付加していない NRF-2 β と比べて、転写を促進する活性が低いことが分かった (図 2-2-1B)。これらの結果から、タグを付加したことによって、NRF-2 β -N 末タグ、NRF-2 β -C 末タグは転写を促進する活性が損なわれたと考えられる。NRF-2 β -N 末タグ、NRF-2 β -C 末タグを細胞内で発現させて精製を行っても、NRF-2 β の転写促進に関与する因子が精製されることは期待できない。そこで、protein A と CBP を N 末と C 末に分けて付加した NRF-2 β の construct を試すことにした。

protein A-TEV-NRF-2 β 、NRF-2 β -TEV-protein A、CBP-NRF-2 β 、NRF-2 β -CBP を pcDNA に組み込んだ plasmid を調製し、HEK293T 細胞に transfection した。NRF-2 β -CBP 以外の construct は、細胞内で効率よく発現することが確認できた (図 2-2-2A)。さらに、reporter assay を用いて、CBP-NRF-2 β はタグを付加していない NRF-2 β と同程度、転写を促進する活性があることが分かった (図 2-2-2B)。しかし、CBP-NRF-2 β を発現させた HEK293T 細胞の核抽出液を用いて、calmodulin beads での精製を行ったところ、calmodulin beads では CBP-NRF-2 β をうまく精製できないことが分かった (図 2-2-2C)。NRF-2 β の N 末に CBP を付加すると、転写を促進する活性は保たれるが、CBP が calmodulin と結合できなくなることが示唆された。これは、NRF-2 β の N 末に大きなタグを付加すると、立体障害が生じたためではないかと考え、8 アミノ酸のペプチドタグ、FLAG タグを NRF-2 β の N 末に付加した construct を試すこととした。

FLAG-NRF-2 β -TEV-protein A (F-NRF-2 β -P と略す) を pcDNA に組み込んだ plasmid を調製した。reporter assay を用いて、F-NRF-2 β -P はタグを付加していない NRF-2 β と同程度、転写を促進する活性があることを確かめた(図 2-2-3)。

2-2-2-2. F-NRF-2 β -P construct を発現させた HEK293T 細胞の核抽出液を用いて TAP を行なったが、NRF-2 α 以外で NRF-2 β と有意に結合する因子は同定できていない。

F-NRF-2 β -P の construct を用いて TAP を行なうこととした。pcDNA-F-NRF-2 β -P を HEK293T 細胞に導入し、36 h 培養した後、Dignam らの方法を用いて核抽出液を調製した。Dignam らの方法では、細胞を回収した後に、低張液に浸して細胞膜を破碎する。この時、核膜はラミンなどの強固な構造物によって支えられているため、壊れずに保持される。可溶化した細胞質画分を除去した後、核を高張液に浸し、浸透圧の差を利用して核の内容物を核膜の外に出させて回収する⁹⁴。核抽出液と細胞質画分を SDS-PAGE で分離して、anti-NRF-2 β / γ 抗体で western hybridization を行ったところ、pcDNA-F-NRF-2 β -P を単独で HEK293T 細胞に導入した場合、F-NRF-2 β -P は殆どが核を除いた細胞質画分に含まれることが分かった(図 2-2-4)。一方で、pcDNA-F-NRF-2 β -P と pcDNA-NRF-2 α を co-transfection すると、核抽出液中に含まれる F-NRF-2 β -P の量が増加した(図 2-2-4)。この結果は、細胞内で F-NRF-2 β -P を単独で過剰発現させた場合、核画分には殆ど含まれず、NRF-2 α を共発現させると、顕著に核画分に含まれるようになることを意味している。しかし、免疫染色と顕微鏡観察によって、NRF-2 β の細胞内局在を調べた Sawa らの知見からは、NRF-2 β は NRF-2 α の助けを借りずに単独で核に運ばれることが示唆されている⁴⁹。この相違点と、そこから生じた問題点については、2-3 章以降で述べる。

HEK293T 細胞に pcDNA-F-NRF-2 β -P と pcDNA-NRF-2 α を co-transfection し、36 h 培養した後、細胞を回収して核抽出液を調製し、TAP を行った。核抽出液 3 mg と IgG sepharose 50 μ l を混ぜ、4°Cで一晩 incubate した。Beads に結合しなかった画分を洗い流し、TEV protease 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(TEV 後)、残り と anti-FLAG M2-agarose 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洗い流した後、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-poly-acrylamide gel に load した。SDS-PAGE を行った後、銀染色で蛋白質のバンドを染色した(図 2-2-5)。F-NRF-2 β -P と NRF-2 α を過剰発現させた細胞の核抽出液からは、FLAG-NRF-2 β と NRF-2 α のバンドが確認できた。この二本のバンド以外で、F-NRF-2 β -P と NRF-2 α を過剰発現させた細胞の核抽出液のみに、有意に存在するバンドは見られなかった。

2-2-3. 考察

TAP 法で、NRF-2 β と有意に結合する因子が同定できていない原因と、解決すべき問題点を以下に考察する。

考えられる原因 1. 本研究で用いた NRF-2 β の TAP construct は、CMV promoter によって細胞内で過剰発現させており、NRF-2 β TAP construct が細胞内で相互作用する因子に対して相対的に発現量が多いために、TAP で同定できなかったのではないかと考えられる。HEK293T 細胞に、F-NRF-2 β -P と NRF-2 α を過剰発現させ、細胞質画分を用いて TAP を行なったところ、anti-FLAG M2-agarose の溶出画分から Heat shock 70kDa protein 9 (gi: 12653415、バンド 2)と HSPA8 protein (gi: 48257068、バンド 3)が検出された(図 2-2-6)。NRF-2 β TAP construct が細胞質で過剰に発現することで、正しく折れ畳まれなかった蛋白質が heat shock protein に認識されたと考えられる。このことから、NRF-2 β TAP construct を過剰発現させると、細胞内で相互作用する因子が相対的に希薄になることに加えて、細胞内で通常起こらない蛋白質との相互作用が見られるという問題点があることが示唆された。今後、NRF-2 β TAP construct の転写プロモーターを、発現量の低いプロモーターに変更して実験を行なう必要があると考えられる。

考えられる原因 2. NRF-2 β と結合する因子の相互作用が、一過性であるか、または弱いために精製の過程で NRF-2 β TAP construct と解離してしまったのではないかと考えられる。Dignam らの方法では核抽出液を調製する際、単離した核を高塩濃度のバッファーに浸して核の内容物を抽出する(実験方法参照)。この際、核の抽出液の塩濃度は 0.3 M KCl になるが、この塩濃度条件下では NRF-2 β と結合する因子の相互作用が損なわれる可能性がある。核抽出液を調製する際に、高塩濃度のバッファーに浸す代わりにソニケーションで核を破碎する方法が考えられるが、NRF-2 β はゲノム DNA と相互作用しており、ソニケーションで核を破碎するとゲノム DNA が除けないので、DNA を介して間接的に相互作用する因子も取れてくると考えられる。これらの問題を解決するためには、細胞を破碎する前にクロスリンカーで NRF-2 β を含む複合体を安定化してから、高塩濃度のバッファーに浸して核抽出液を採り、TAP を行なう方法が考えられる。

NRF-2 β に FLAG タグと protein A タグを付加しても細胞内での転写促進活性は野生型とほぼ変わらなかったが、タグによる精製を行なう際に立体障害で結合していた蛋白質が解離してしまう可能性がある。FLAG タグ、protein A タグを他のタグに入れ替えることや、anti-NRF-2 β / γ 抗体を用いた免疫沈降など、精製の方法についても検討する必要があると考えられる。

2-2-4. 図

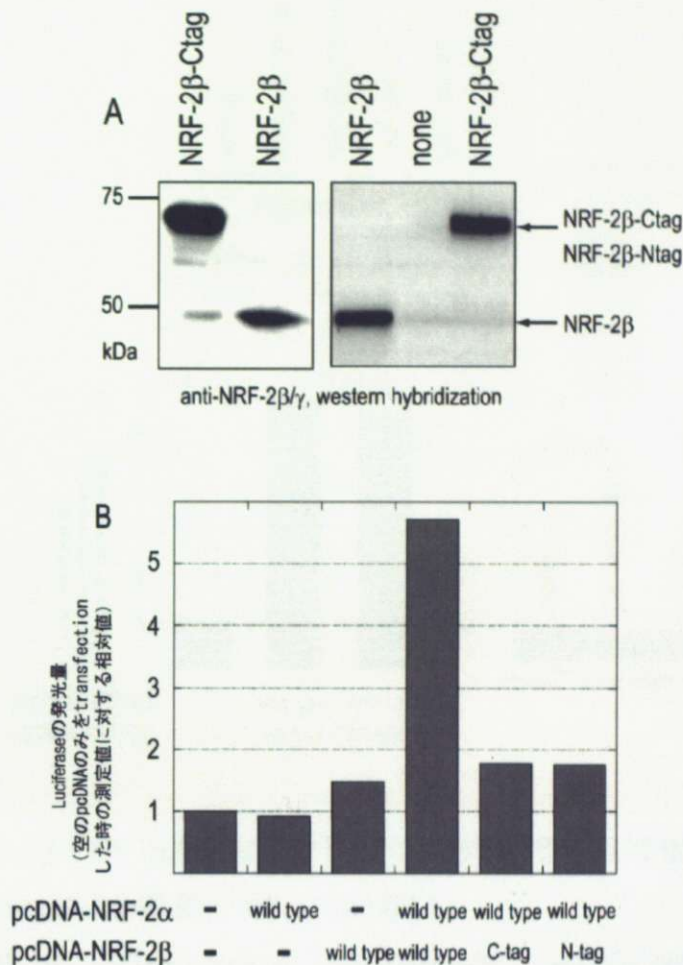


図 2-2-1. TAP タグを NRF-2β の N 末もしくは C 末に付加すると転写を促進する活性が損なわれる。

A. HEK293T 細胞に pcDNA-NRF-2β、pcDNA-NRF-2β-CBP-TEV-protein A (NRF-2β-Ctag)、pcDNA-protein A-TEV-CBP-NRF-2β (NRF-2β-Ntag) を transfection し、36 h 培養した後、細胞破砕液を用いて western hybridization を行った。約 2×10^4 個の細胞を 20 μ l の SDS sample buffer で溶かして SDS-poly-acrylamide gel に load した。'none' は DNA を transfection していない細胞の破砕液を load した。NRF-2β-Ctag と NRF-2β-Ntag はタグを付加していない NRF-2β と同程度発現することが分かった。B. HEK293T 細胞に hIF2mt プロモーターの NRF-2 site を含む reporter plasmid、pLuc-91/-42 と、pcDNA-NRF-2α、pcDNA-NRF-2β を co-transfection し、36 h 培養した後、細胞破砕液を用いて Luciferase の発光量を測定した。値は空の pcDNA のみを加えた時の測定値に対する相対値で表した。タグを付加していない NRF-2β と比べて NRF-2β-Ctag と NRF-2β-Ntag は転写を促進する活性が低いことが分かった。

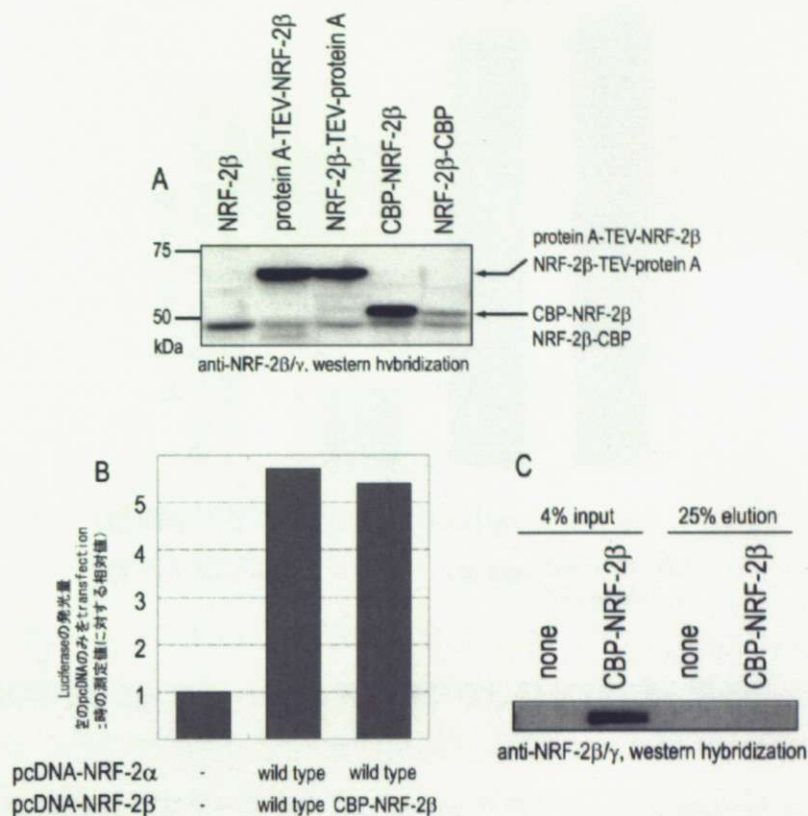


図 2-2-2. NRF-2β-CBP はタグなしの NRF-2βと同程度の転写促進活性を持つが、calmodulin beads による精製がうまく行かない。

A. pcDNA-NRF-2β、pcDNA-protein A-TEV-NRF-2β、pcDNA-NRF-2β-TEV-protein A、pcDNA-CBP-NRF-2β、pcDNA-NRF-2β-CBPを HEK293T 細胞に transfection し、36 h 培養した後、細胞破碎液を用いて western hybridization を行った。約 2×10^4 個の細胞を 20 μ l の SDS sample buffer で溶かして SDS-poly-acrylamide gel に load した。protein A-TEV-NRF-2β、NRF-2β-TEV-protein A、CBP-NRF-2β は効率よく発現することが分かった。B. HEK293T 細胞に hIF2mt プロモーターの NRF-2 site を含む reporter plasmid、pLuc-91/-42 と、pcDNA-NRF-2α、pcDNA-NRF-2β 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。値は空の pcDNA のみを加えた時の測定値に対する相対値で表した。CBP-NRF-2β はタグを付加していない NRF-2β とほぼ同程度、転写を促進することが分かった。C. HEK293T 細胞に pcDNA-NRF-2α と pcDNA-CBP-NRF-2β を co-transfection し、36 h 培養した後、Dignam らの方法を用いて核抽出液を採った。'none' は、DNA を transfection していない細胞から核抽出液を採った。核抽出液 500 μ g (input) と calmodulin beads 10 μ l を混ぜ、wash した後、10 mM EGTA で溶出した。CBP-NRF-2β を含む核抽出液でも、calmodulin beads で精製した後の溶出画分に蛋白質が検出されなかった。

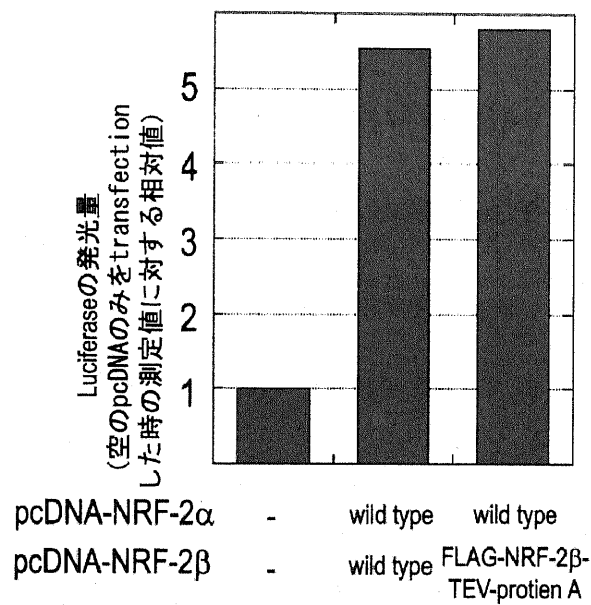


図 2-2-3. FLAG-NRF-2β-TEV-protein A はタグなしの NRF-2βと同程度の転写促進活性を持つ。

HEK293T 細胞に hIF2mt プロモーターの NRF-2 site を含む reporter plasmid、pLuc-91/-42 と、pcDNA-NRF-2α、pcDNA-NRF-2β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。値は空の pcDNA のみを加えた時の測定値に対する相対値で表した。FLAG-NRF-2β-TEV-protein A はタグを付加していない NRF-2βとほぼ同程度、転写を促進することが分かった。

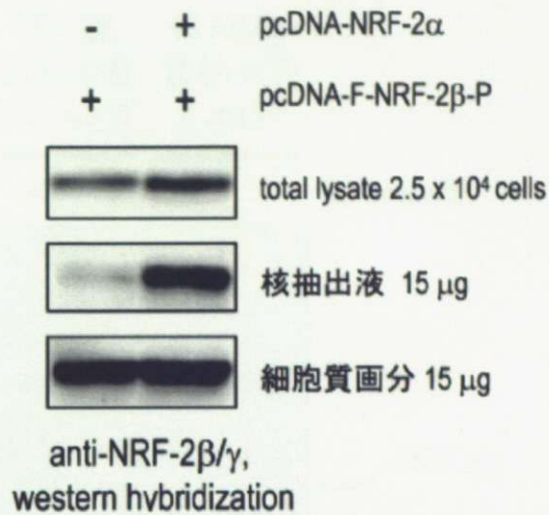


図 2-2-4. F-NRF-2 β -P は、単独で発現させても核抽出液中には殆ど含まれないが、NRF-2 α を共発現させると、顕著に核抽出液中に含まれるようになる。

HEK293T 細胞に pcDNA-F-NRF-2 β -P を単独で、もしくは pcDNA-NRF-2 α と co-transfection し、36 h 培養した後、Dignam らの方法で細胞質画分と核抽出液を分画した。また、約 2.5 x 10⁴ 個の細胞を分取し、20 μ l の SDS sample buffer で溶かした (total lysate)。Total lysate、細胞質画分、核抽出液をそれぞれ SDS-PAGE で分離し、anti-NRF-2 β / γ 抗体を用いて western hybridization を行ない、F-NRF-2 β -P のバンドを検出した。細胞質画分に含まれる F-NRF-2 β -P の量は、NRF-2 α の共発現の有無で殆ど変化がないのに対し、核抽出液中に含まれる F-NRF-2 β -P の量は NRF-2 α を共発現すると顕著に増加した。

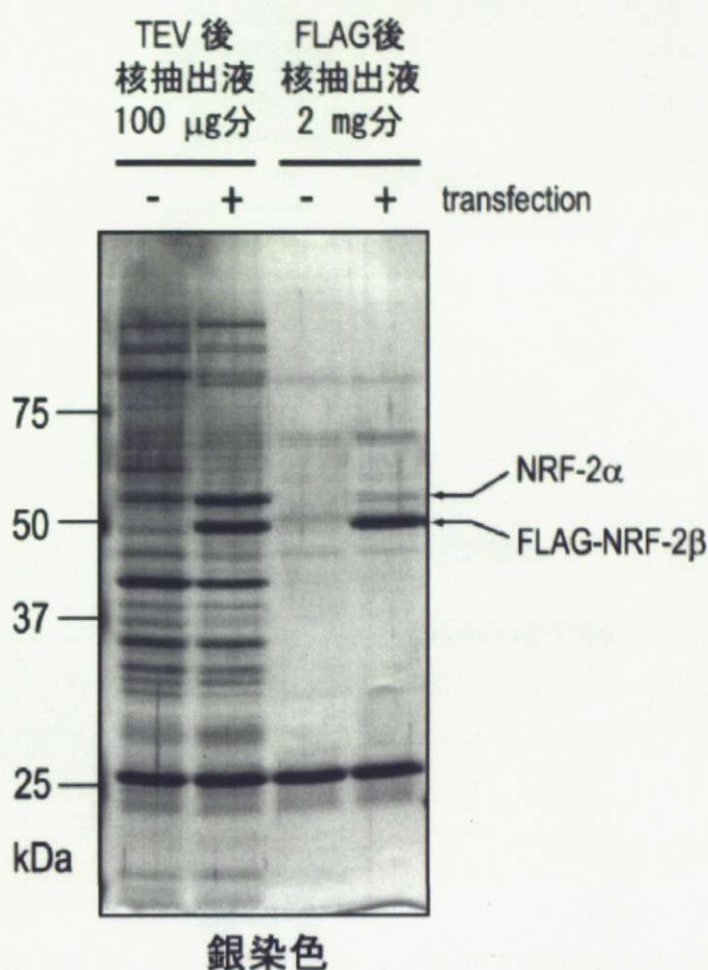


図 2-2-5. F-NRF-2 β -P construct を発現させた HEK293T 細胞の核抽出液を用いて行なった TAP。

HEK293T 細胞に pcDNA-F-NRF-2 β -P と pcDNA-NRF-2 α を co-transfection し、36 h 培養した後、核抽出液を採った。核抽出液 3 mg と IgG sepharose 50 μ l を混ぜ、4°C で一晩 incubate した。Beads に結合しなかった画分を洗い流し、TEV protease 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 (TEV 後)、残り と anti-FLAG M2-agarose 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洗い流した後、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-poly-acrylamide gel に load した。SDS-PAGE を行った後、銀染色で蛋白質のバンドを染色した。F-NRF-2 β -P と NRF-2 α を過剰発現させた細胞の核抽出液からは、FLAG-NRF-2 β と NRF-2 α のバンドが確認できた。この二本のバンド以外で、F-NRF-2 β -P と NRF-2 α を過剰発現させた細胞の核抽出液のみに、有意に存在するバンドは見られなかった。

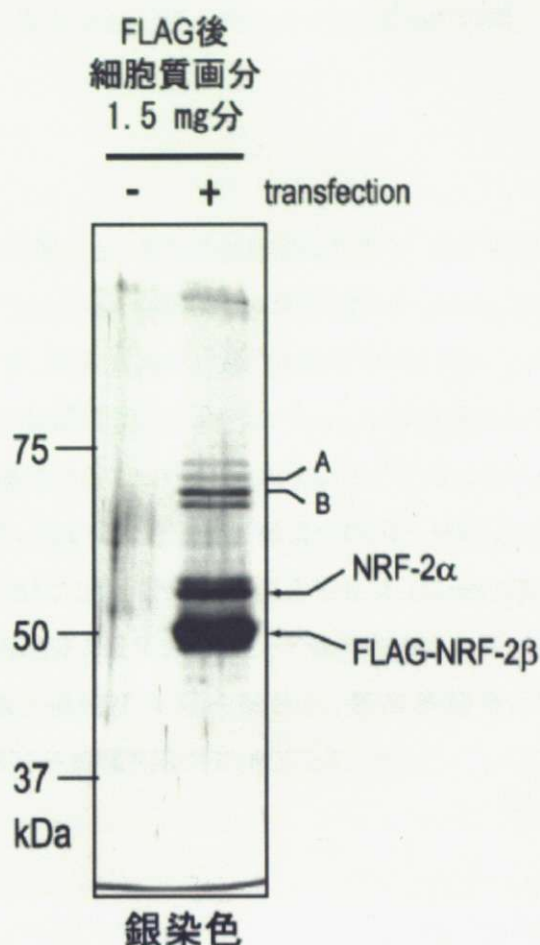


図 2-2-6. F-NRF-2 β -P construct を発現させた HEK293T 細胞の細胞質画分を用いて行なった TAP。

HEK293T 細胞に pcDNA-F-NRF-2 β -P と pcDNA-NRF-2 α を co-transfection し、36 h 培養した後、細胞質画分を採った。細胞質画分 3 mg と IgG sepharose 50 μ l を混ぜ、4°C で一晩 incubate した。Beads に結合しなかった画分を洗い流し、TEV protease を加えて 16°C で 2 h 処理した。Beads から溶出した画分と anti-FLAG M2-agarose 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洗い流した後、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-poly-acrylamide gel に load した。SDS-PAGE を行った後、銀染色で蛋白質のバンドを染色した。F-NRF-2 β -P と NRF-2 α を過剰発現させた細胞の細胞質画分からは、FLAG-NRF-2 β と NRF-2 α のバンド以外に 70 kDa 付近に 4 本のバンドが確認できた。このうち、バンド A とバンド B は、質量分析の結果、Heat shock protein の一種であることが分かった。

2-3. NRF-2 β と NRF-2 γ で転写促進活性が異なるメカニズムの解明

2-3-1. 序論

TAP 法で NRF-2 β を発現させ、核抽出液を採る過程で、これまでの知見と食い違う実験結果が得られた。NRF-2 β -TAP construct を単独で過剰発現させた場合、NRF-2 β -TAP construct は核抽出液中には殆ど含まれず、細胞質画分に多く含まれていた(図 2-2-4)。しかし、免疫染色と顕微鏡観察によって、NRF-2 β の細胞内局在を調べた Sawa らの知見からは、NRF-2 β は NRF-2 α の助けを借りずに単独で核に運ばれることが示唆されている⁴⁹。NRF-2 $\alpha\beta/\alpha\gamma$ の核内輸送の分子機構は、これまで殆ど理解されていないが、細胞質に留まっていた NRF-2 $\alpha\beta/\alpha\gamma$ が、視神経細胞の活性化に伴って核内に蓄積し、ミトコンドリアの電子伝達系サブユニットの転写を促進することが知られており⁹⁵、NRF-2 は細胞内局在を変化させることで転写制御を行なっていると考えられる。本研究では、細胞分画による核と細胞質の局在解析と、顕微鏡観察との相違に問題点を見出し、NRF-2 β/γ の核内局在の分子機構を調べていくことにした。

2-3-2. 実験結果

2-3-2-1. NRF-2 β は NRF-2 α と共に細胞内で過剰発現させた場合、NRF-2 γ よりも核抽出液中に含まれる割合が高い。

NRF-2 β -TAP construct では、protein A が C 末に付加されているために、立体障害によって核に運ばれにくくなっているのではないかと考え、C 末の protein A を削った NRF-2 β を発現させ、核画分と細胞質画分を分ける実験を行った。HEK293T 細胞に pcDNA-FLAG-NRF-2 β を単独で、もしくは 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 抗体を用いて western hybridization を行った。NRF-2 β -TAP construct と同様、FLAG-NRF-2 β も、NRF-2 α を共発現しない場合、殆ど核抽出液中には含まれず、NRF-2 α を共発現した場合、顕著に核抽出液中に含まれる量が増加した(図 2-3-1, lane 1, 3)。したがってこれらの結果は、NRF-2 β に protein A タグを付加したことが原因ではないと考えられる。

核抽出液を採る方法では、核と細胞質を分画した後、核画分を高張液に浸して核の内容物だけを抽出する。このため、核膜などの核の構造物と強固に結合した蛋白質は、核を高張液に浸した後の不溶性画分に残ってしまい、核抽出液には含まれない。NRF-2 β が核を高張液に浸した後の不溶性画分に含まれている可能性があると考え、核膜を含めた核画分全体に含まれる

NRF-2 β の量を調べることにした。核画分を細胞質画分と分けた後、低張液で懸濁し、ソニケーションで核を破碎して核破碎液を得た。核破碎液と細胞質画分 20 μ g ずつを SDS-PAGE で分離し、anti-FLAG M2 抗体を用いて western hybridization を行った。その結果、核破碎液を調製した場合も、FLAG-NRF-2 β は、NRF-2 α を共発現しないと殆ど核抽出液中には含まれず、NRF-2 α を共発現した場合、核破碎中に含まれる量が増加した(図 2-3-2)。したがって、FLAG-NRF-2 β を単独で過剰発現した場合に殆ど核抽出液中に含まれないのは、核の不溶性画分に残ってしまったわけではないことが分かった。

NRF-2 γ と、NRF-2 β と NRF-2 γ で共通の領域(NRF-2 β -1/333)について、NRF-2 β と同様の実験を行った。pcDNA-FLAG-NRF-2 γ もしくは pcDNA-FLAG-NRF-2 β -1/333 を単独で、もしくは pcDNA-NRF-2 α と co-transfection し、細胞質画分と核抽出液を採り、anti-FLAG M2 抗体を用いて western hybridization を行った。FLAG-NRF-2 β と同様、NRF-2 α を共発現しない場合、殆ど核抽出液中には含まれず、NRF-2 α を共発現した場合、顕著に核抽出液中に含まれる量が増加した(図 2-3-1、lane 5、7、9、11)。ところが、NRF-2 α 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たところ、FLAG-NRF-2 β に比べて、FLAG-NRF-2 γ と FLAG-NRF-2 β -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 2-3-1、lane 3、7、11)。また、FLAG-NRF-2 γ と FLAG-NRF-2 β -1/333 で、NRF-2 α を共発現した場合の核抽出液中に含まれる割合はほぼ変わらなかった(図 2-3-1、lane 7、11)。核破碎液を調製した場合もほぼ同様の結果が得られた(図 2-3-3)。これらの結果から、NRF-2 β と NRF-2 γ は、NRF-2 α が共存する場合に、核に局在する効率が異なること、NRF-2 β の C 末のドメインが核に局在する効率を増加させるのに寄与していること、NRF-2 γ の C 末のドメインは核に局在する効率に影響を及ぼさないことが示唆された。

2-3-2-2. NRF-2 γ に既知の核移行シグナル(SV40 T-antigen 由来)を付加すると、転写を促進する活性が NRF-2 β と同程度にまで増加する。

NRF-2 α が共存する場合に、NRF-2 β の方が NRF-2 γ よりも核に局在する効率が高いことが示唆された。一方で、NRF-2 α 、NRF-2 β / γ の発現ベクターと、NRF-2 の認識配列を持つプロモーターを組み込んだ reporter plasmid を培養細胞に co-transfection する実験から、NRF-2 β に比べて NRF-2 γ の方が転写を促進する活性が低いことが示唆されている⁴⁹。これらの知見から、NRF-2 γ は NRF-2 β よりも核に運ばれる効率が低いために、転写を促進する活性が低くなるのではないかと考えた。

まず、NLS を付加していない NRF-2 β 、NRF-2 γ 、NRF-2 β -1/333 について、転写を促進する活性を比較した。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-NRF-2 β 、または pcDNA-NRF-2 γ 、pcDNA-NRF-2 β -1/333 を HEK293T 細胞に 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。その結果、これまでの報告と同様、NRF-2 γ を発現させた場合、NRF-2 β と比べて転写を促進する活性が約 3 分の 1 に低下した(図 2-3-4)。NRF-2 β -1/333 を発現させた場合は、NRF-2 β と比べて転写を促進する活性が約 5 分の 1 に低下した。NRF-2 β -1/333 が全長の NRF-2 β と比べて転写を促進する活性が低いことに関して、以前にも同様の結果が報告されている⁶⁹。

次に、SV40 T-antigen 由来の核移行シグナル(PKKRKRV)を NRF-2 β 、NRF-2 γ の N 末に付加した construct を作製し(NLS-NRF-2 β 、NLS-NRF-2 γ と表記する)、転写を促進する活性を調べた。NRF-2 β / γ の N 末に FLAG-NLS を付加した pcDNA の construct を作製した。pLuc-91/-42 と pcDNA-NRF-2 α に、pcDNA-FLAG-NLS-NRF-2 β 、または pcDNA-FLAG-NLS-NRF-2 γ 、pcDNA-FLAG-NLS-NRF-2 β -1/333 を HEK293T 細胞に co-transfection し、細胞破碎液を用いて Luciferase の発光量を測定した。その結果、NLS を付加していない場合とは対照的に、FLAG-NLS-NRF-2 γ と FLAG-NLS-NRF-2 β -1/333 は、FLAG-NLS-NRF-2 β と同程度に転写を促進する活性を持つことが分かった(図 2-3-4)。

NLS を付加したことによって NRF-2 γ の核局在が促進されたかどうかを確かめるために、NRF-2 β / γ に NLS を付加した pcDNA の construct を HEK293T 細胞に transfection し、核抽出液と細胞質画分を用いて western hybridization を行った。NRF-2 α を共発現させた場合、NLS を付加したことによって、約 8 倍核抽出液中に含まれる NRF-2 γ の割合が増加することが分かった(図 2-3-1 と図 2-3-5, lane 7)。NRF-2 β 、NRF-2 β -1/333 でも同様に、NLS を付加することによって約 3 倍から 8 倍核抽出液に含まれる割合が増加した(図 2-3-1 と図 2-3-5, lane 3, 11)。NLS を付加した NRF-2 β / γ のいずれの construct も、NLS を付加していない construct と同様、NRF-2 α を共発現させなかった場合は殆ど核抽出液中には含まれなかった(図 2-3-5, lane 1, 5, 9)。これらの結果から、Dignam らの方法による核画分と細胞質画分の分画によって、核に局在する蛋白質の全てが必ずしも核画分に含まれるわけではないことが示唆された。このことに関しては 3-3-1-5 章で考察する。

続いて、pcDNA-NRF-2 α に対して co-transfection する pcDNA-NRF-2 β / γ の量を少なくした場合の NRF-2 β / γ の転写促進活性を調べた。図 2-3-1 と図 2-3-5 から、細胞分画を行なった際に核画分に含まれる割合が最も高かった NLS-NRF-2 β と中程度であった NRF-2 β と NLS-NRF-2 γ 、最も低かった NRF-2 γ に関して実験を行なった。その結果、NLS-NRF-2 γ と NRF-2 β 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(図 2-3-6、黒丸、白四角)。また、NRF-2 γ は NLS-NRF-2 γ と NRF-2 β と比べて転写促進活性が低く(図 2-3-6、白丸)、NLS-NRF-2 β は NLS-NRF-2 γ と NRF-2 β と比べて転写促進活性が高かった(図 2-3-6、黒四角)。これらの結果から、

NRF-2 β と NRF-2 γ は、核に局在する効率に比例して転写を促進する活性を有することが分かった。

核抽出液中に含まれる NRF-2 α と NRF-2 β/γ の複合体を観察するために、NRF-2 の認識配列を含む hIF2mt プロモーター、-56/-32 の二本鎖 DNA プローブを用いて EMSA を行った。pcDNA-NRF-2 α と pcDNA-NRF-2 β/γ を HEK293T 細胞に co-transfection し、核抽出液を調製して EMSA を行った。NRF-2 α を単独で過剰発現すると、NRF-2 α と DNA を含むバンドのみが強く現れた(図 2-3-7, lane 2)。NRF-2 β を共発現させると、NRF-2 α と NRF-2 β を含むバンドが現れた(図 2-3-7, lane 3)。DNA を transfection しない細胞から調製した核抽出液を用いた lane 1 では、単一のバンドが見られた。図 1-5 で同様の実験を行った時には、NRF-2 α のみを含むバンド A と、NRF-2 α と NRF-2 β/γ を含むバンド B が現れたが、図 2-3-7, lane 1 ではバンド B が弱く、検出されなかったと考えられる。NRF-2 γ もしくは NRF-2 β -1/333 を NRF-2 α と共発現させると、NRF-2 β の場合と比較して、NRF-2 α と NRF-2 β/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(図 2-3-7, lane 4, 5)。一方で、FLAG-NLS-NRF-2 γ もしくは FLAG-NLS-NRF-2 β -1/333 を NRF-2 α と共発現させた場合、NRF-2 α と NRF-2 β を含むバンドが強く見られるようになった(図 2-3-7, lane 7, 8)。NRF-2 β は、DNA と NRF-2 α 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-2 β の homodimer 化によるバンドであると考えられる。これらの結果は、NRF-2 γ 、NRF-2 β -1/333 は NRF-2 α と共発現させても NRF-2 β と比べて核抽出液中に含まれる割合が少ないのに対して(図 2-3-1, lane 3, 7, 11)、NLS を付加した NRF-2 γ 、NRF-2 β -1/333 では顕著に核抽出液に含まれるようになった(図 2-3-5, lane 7, 11)結果と一致している。また、NRF-2 β/γ construct の転写を促進する活性を調べた reporter assay の結果と比べると、EMSA で見られた NRF-2 α 、NRF-2 β/γ 、DNA の複合体の量と、転写を促進する活性とがほぼ比例していることが分かった。これらの結果から、NRF-2 β と NRF-2 γ で見られる転写促進活性の差は、NRF-2 α との複合体の核内に運ばれる効率の差を反映していると考えられる。

2-3-2-3. GAL4 DNA-binding domain (GAL4-DBD) 融合蛋白質の転写促進活性を調べる実験から、NRF-2 β /NRF-2 γ /NRF-2 β -1/333 の転写促進活性はほぼ同じであることが分かった(Gugneja S et al., 1995 の追実験)。

Gugneja らは、GAL4-DBD との融合蛋白質と、GAL DNA-binding site を chloramphenicol acetyltransferase 遺伝子上流に組み込んだ plasmid を COS 細胞に co-transfection する実験から、GAL4-DBD-NRF-2 β /NRF-2 γ /NRF-2 β -1/333 で転写を促進する活性はほぼ一定であることを示している⁹⁶。本研究でも NRF-2 β /NRF-2 γ /NRF-2 β -1/333 の N 末端に GAL4-DBD 遺伝子を組み込んだ construct を作製し、同様の実験を行なった。HEK293T 細胞に、GAL DNA-binding site を

luciferase 遺伝子の上流に組み込んだ plasmid、pFR-Luc (Stratagene) と pcDNA-GAL4-DBD-NRF-2 β /NRF-2 γ /NRF-2 β -1/333 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。その結果、Gugneja らの報告と同様、GAL4-DBD-NRF-2 β /NRF-2 γ /NRF-2 β -1/333 で転写を促進する活性はほぼ同じであった(図 2-3-8A)。

さらに、NRF-2 β / γ との結合部位のみを含む NRF-2 α の欠損変異体 NRF-2 α -320/454(図 1-4 参照)と GAL4-DBD との融合蛋白質(NRF-2 α -320/454-GAL4-DBD)と、何も付加していない NRF-2 β /NRF-2 γ /NRF-2 β -1/333 を co-transfection する実験を行なった。その結果、NRF-2 α -320/454-GAL4-DBD のみでは殆ど転写を促進する活性が見られなかったのに対して、NRF-2 β /NRF-2 γ /NRF-2 β -1/333 を co-transfection すると、GAL4-DBD-NRF-2 β /NRF-2 γ /NRF-2 β -1/333 とほぼ同程度の転写促進活性が見られた。このことから、GAL4-DBD-NRF-2 β /NRF-2 γ /NRF-2 β -1/333 で転写を促進する活性は同程度であるのは、GAL4-DBD を付加したことによる立体障害が原因ではないことが示唆された。また、これらの転写促進活性は GAL4-DBD を付加していない NRF-2 α と NRF-2 β の発現 plasmid を co-transfection しても見られないことから、GAL4-DBD 融合蛋白質に由来した活性であると考えられる(図 2-3-8A)。

GAL4-DBD 融合蛋白質の核内局在を調べるために、HEK293T 細胞に pcDNA-GAL4-DBD-NRF-2 β /NRF-2 γ /NRF-2 β -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。核抽出液と細胞質画分 15 μ g ずつを SDS-PAGE で分離し、anti-NRF-2 β / γ 抗体を用いて western hybridization を行ったところ、GAL4-DBD-NRF-2 β /NRF-2 γ /NRF-2 β -1/333 のいずれの construct も細胞質画分にはほとんど含まれず、核抽出液中に顕著に含まれることが分かった(図 2-3-8B)。このことから、GAL4-DBD 融合蛋白質は顕著に核に局在し、NRF-2 β /NRF-2 γ /NRF-2 β -1/333 間で核内局在の効率ほぼ一定であることが示唆された。

2-3-2-4. 内在性の NRF-2 β も NRF-2 γ に比べて核画分に含まれる割合が多い。

HeLa 細胞を核画分と細胞質画分とに分け、anti-NRF-2 β / γ 抗体を用いて western hybridization を行ない、核画分と細胞質画分に含まれる内在性の NRF-2 β / γ の割合を調べた。HEK293T 細胞と比べて HeLa 細胞の方が NRF-2 β に対して NRF-2 γ の発現量が多かったため、HeLa 細胞を用いて実験を行なった。核画分と細胞質画分の蛋白質量を揃えて western hybridization を行なったところ、NRF-2 β は細胞質画分に対して核画分に約 4.1 倍含まれていたのに対して、NRF-2 γ は約 1.8 倍しか含まれていなかった(図 2-3-9)。このことから、内在性の NRF-2 β も NRF-2 γ に比べて細胞質画

分に対して核画分に含まれる割合が多いことが分かった。内在性の NRF-2 α についても調べたところ、細胞質画分に対して核画分に約 1.6 倍含まれていた。HeLa 細胞内で、NRF-2 α と NRF-2 β/γ はほぼ等量存在する(補足図 2-3-1)。NRF-2 α と NRF-2 β/γ の結合定数は 0.6~0.8 nM で、強固に結合することから、NRF-2 α と NRF-2 β/γ は、細胞内で単独で存在する割合は少なく、NRF-2 $\alpha\beta$ もしくは NRF-2 $\alpha\gamma$ の状態が存在していると考えられる。これらの結果から、NRF-2 $\alpha\beta$ は核に多く存在し、NRF-2 $\alpha\gamma$ は細胞質に多く存在していることが示唆された。

2-3-2-5. 免疫染色の後の顕微鏡観察では、NRF-2 β は単独で過剰発現しても顕著に核に局在する。また NRF-2 γ を単独で過剰発現した場合も核が顕著に染色されるが、NRF-2 β に比べて細胞全体に対して核が染色される割合は低い。

NRF-2 β の細胞内局在を調べた Sawa らの報告では、NRF-2 β を単独で過剰発現させても顕著に核に局在する様子が観察されている⁴⁹。Sawa らの報告では、タグを付加していない NRF-2 β を発現させ、NRF-2 β に対する抗体で免疫染色を行っているため、内在性の NRF-2 β と区別ができない。そこで、N 末に FLAG タグを付加した NRF-2 β を細胞内で発現させ、FLAG に対する抗体で免疫染色を行ない、細胞内局在を調べることにした。顕微鏡で HEK293T 細胞を観察すると、共焦点画像では核の面積に対して細胞質の面積が小さく、核/細胞質局在を観察するには適さなかったため、代わりに HeLa 細胞を用いた。HeLa 細胞に、pcDNA-FLAG-NRF-2 β を transfection し、36 h 培養した後、ホルマリンで細胞を固定化して、anti-FLAG M2 抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、Sawa らの報告と同様、NRF-2 β を単独で過剰発現させた場合でも、約 76%が核に局在することが分かった(図 2-3-10)。また、HeLa 細胞に pcDNA-FLAG-NRF-2 γ を transfection して NRF-2 γ を単独で過剰発現させると、約 60%が核に局在した。これらの結果から、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 γ も大部分が核に局在するが、NRF-2 β に比べて核に局在する割合が低いことが分かった。この結果は、NRF-2 α を共発現させた時に、NRF-2 β の方が NRF-2 γ よりも核画分に含まれる割合が高くなる結果と一致している(図 2-3-1)。

図 2-3-1 で NRF-2 β/γ を単独で過剰発現させた場合、NRF-2 β/γ は殆ど核画分には含まれなかった。この結果は図 2-3-10 の結果と食い違う。NRF-2 α を共発現させると NRF-2 β/γ の核抽出液に含まれる量が増加することから(図 2-3-1)、NRF-2 β/γ は NRF-2 α と複合体を形成してゲノム DNA に相互作用することで、Dignam らの方法で核画分と細胞質画分とを分画した際に、核画分に保持されやすくなるのではないかと考えた。このことを検証するために、HeLa 細胞に 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。GAL4-DBD は核移行シグナルを持ち、単独で核に運ばれることが知られている⁹⁷。HeLa 細胞に pcDNA-GAL4-DBD-FLAG、もしくは

pcDNA-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。その結果、GAL4-DBD-FLAG と NLS-GFP は顕著に核に局在することが確かめられた(補足図 2-3-2A)。同様に、HeLa 細胞に pcDNA-GAL4-DBD-FLAG、もしくは pcDNA-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。Anti-FLAG M2 抗体もしくは anti-GFP 抗体を用いて western hybridization を行ったところ、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(補足図 2-3-2B)。NLS-GFP では、顕微鏡観察と細胞分画で実験結果の相違が見られたが、GAL4-DBD では両者の結果は一致していた。これらの結果は、GAL4-DBD は、核内でゲノム DNA と相互作用することで、細胞分画を行った際に核画分に保持されやすいが、NLS-GFP は核内で相互作用する構造物がないために核画分に保持されにくかったためではないかと考えられる。NRF-2 β を単独で過剰発現させた場合、顕微鏡観察では核に顕著に局在するが、細胞分画を行なうと殆どが細胞質画分に検出されるのは、このためであると考えられる。したがって、細胞分画によって核と細胞質の局在を調べるのは、実験結果の解釈を誤る可能性があるが、NRF-2 β / γ の場合、NRF-2 α を共発現すると核抽出液中に顕著に含まれるようになることから、NRF-2 β / γ に対して NRF-2 α が等量程度発現している場合には、細胞内局在を反映した結果が得られると期待できる。

2-3-3. 考察

NRF-2 γ は NRF-2 β と比べて核内に局在する効率が低い。

以下の実験結果から、NRF-2 γ は NRF-2 β と比べて核内に局在する効率が低いと考えられる。第一に、HEK293T 細胞に NRF-2 β / γ を NRF-2 α とともに過剰発現し、Dignam らの方法を用いて核画分と細胞質画分を分画して存在量比を調べると、NRF-2 β の方が NRF-2 γ よりも約 4 倍、核画分に含まれる割合が高かった(図 2-3-1、4-3-3)。第二に、DNA を transfection していない HeLa 細胞を核画分と細胞質画分とに分けて、内在性の NRF-2 β と NRF-2 γ の存在量比を調べると、NRF-2 β の方が NRF-2 γ よりも約 2.3 倍、核画分に含まれる割合が高かった(図 2-3-8)。第三に、HeLa 細胞に FLAG-NRF-2 β と FLAG-NRF-2 γ を過剰発現させて、anti-FLAG 抗体を用いて免疫染色を行なったところ、FLAG-NRF-2 β の方が FLAG-NRF-2 γ よりも細胞全体に対して核が染色される割合が高かった(図 2-3-9)。NRF-2 β と NRF-2 γ は、共通する領域の 242/330 を削ると核に運ばれなくなることから⁴⁹、核局在に必要とされるドメインは共通して持っていると考えられている。このため、NRF-2 β と NRF-2 γ が核に局在する効率が異なる原因は不明である。NRF-2 β と NRF-2 γ の共通する領域(1/333)は、NRF-2 γ とほぼ同じ割合で核画分に含まれることから、NRF-2 γ が核に局在する効率が低いのは NRF-2 γ に特異的な領域が核局在に抑制的に働いているのではなく、NRF-2 β に特異的

な領域が核局在を促進する作用を持つと考えられる。

NRF-2 β に SV40 T-antigen 由来の NLS を付加した場合、もしくは GAL4-DBD を付加すると核画分に含まれる割合が増加することから、NRF-2 β 自身では核に局在する効率が低いと考えられる。一方、HeLa 細胞に FLAG-NRF-2 β を発現させて免疫染色によって細胞内局在を調べると、細胞全体に対して約 76%核が染色された(図 2-3-9)。HEK293T 細胞の場合、細胞分画によって得られる細胞質画分と核破砕液中の蛋白質量はほぼ同じである。図 2-3-3 から、HEK293T 細胞に NRF-2 α を共発現させた場合、細胞全体の約 40%の FLAG-NRF-2 β が核破砕液中に含まれると見積もることができ、免疫染色を行なった場合よりも核に局在する割合が低いことになる。これは、顕微鏡観察の場合、細胞に対して核の面積が最大になる平面の共焦点画像を撮っているため、細胞分画よりも核に局在する割合を多く見積もる結果になったためと考えられる。

NRF-2 γ と NRF-2 β の核内局在の効率を同程度にすると、転写を促進する活性が変わらなくなる。組織間で NRF-2 β/γ の発現量比の違いによって核に局在する NRF-2 β/γ の割合が異なることで、NRF-2 の標的遺伝子の転写量に差が生じると考えられる(図 2-3-11)。

NRF-2 の認識配列を含むプロモーターを組み込んだ reporter plasmid と、NRF-2 の各サブユニットを過剰発現させる plasmid を培養細胞に co-transfection する実験から、NRF-2 β の方が NRF-2 γ よりも転写促進活性が高いことが明らかにされた⁴⁹。また、NRF-2 β と NRF-2 γ の共通する領域(1/333)では殆ど転写を促進する活性がないこと、また NRF-2 β -1/333 を細胞内で発現させると、dominant negative として働いて NRF-2 の標的遺伝子の転写を阻害することが知られている⁶⁹。これらの知見から、NRF-2 β に特異的な C 末の 50 アミノ酸が転写促進に寄与しており、NRF-2 γ にはそのドメインがないために転写を促進する活性が低いと考えられてきた。しかし、NRF-2 β に特異的な C 末のドメインがどのように転写促進に寄与しているかは謎であった。一方 Gugneja らは、GAL4-DBD 融合蛋白質を用いる実験で、NRF-2 β 、NRF-2 γ には転写活性に殆ど差が見られないと指摘したが⁹⁶、GAL4-DBD を融合したこと、もしくは natural なプロモーターを用いていないことによる artifact を見ていると批判されている⁹⁸。本研究で、NRF-2 β に比べて NRF-2 γ 、NRF-2 β -1/333の方が核に局在する効率が低いことを見出し、そのことにより、NRF-2 γ 、NRF-2 β -1/333 が NRF-2 β に比べて転写促進活性が低くなるのではないかと考えた。SV40 T-antigen 由来 NLS を NRF-2 β /NRF-2 γ /NRF-2 β -1/333 の N 末側に付加すると、核局在が促進され、NRF-2 β /NRF-2 γ /NRF-2 β -1/333 間で転写促進活性に差が見られなくなった(図 2-3-4)。Transfection に用いる pcDNA-NRF-2b/g の量を少なくして NRF-2b/g の転写促進活性を調べた場合、核に局在する割合に比例した転写促進活性が見られた(図 2-3-6)。この結果は、NRF-2 β /NRF-2 γ は核に存在する量が等しい場合は転写促進活性に差はないことを意味している。

また Gugneja らの報告と同様、NRF-2 β /NRF-2 γ /NRF-2 β -1/333 の N 末側に GAL4-DBD を融合させると、転写促進活性は殆ど変わらなかった(図 2-3-8)。細胞分画を行なった結果、GAL4-DBD 融合蛋白質は殆どが核画分に含まれていた。したがって、GAL4-DBD 融合蛋白質で NRF-2 β /NRF-2 γ /NRF-2 β -1/333 の転写促進活性に差が見られないのは、核に局在する蛋白質量がほぼ変わらないためと考えられ、natural なプロモーターを使って、SV40 T-antigen 由来 NLS を付加した construct の転写促進活性を調べた結果と一致する。さらに、NRF-2 α -320/454-GAL4-DBD と NRF-2 β /NRF-2 γ /NRF-2 β -1/333 を co-transfection する実験でも、NRF-2 β /NRF-2 γ /NRF-2 β -1/333 の転写促進活性に差は見られなかった(図 2-3-8)。NRF-2 α -320/454-GAL4-DBD は自身には転写促進活性は殆ど見られず、NRF-2 β /NRF-2 γ /NRF-2 β -1/333 を核内に運び、GAL4 DNA binding site を持つ reporter 遺伝子の上流に連れてくる役割を持つ。また NRF-2 β /NRF-2 γ /NRF-2 β -1/333 は NRF-2 α -320/454 を介して DNA と結合するため、natural なプロモーターを用いた場合と類似の状況にあると考えられる。これらの結果から、GAL4-DBD 融合蛋白質で NRF-2 β /NRF-2 γ /NRF-2 β -1/333 の転写促進活性に差が見られなくなるのは、GAL4-DBD を付加したこと、もしくは natural なプロモーターを付加したことによる artifact ではなく、GAL4-DBD によって NRF-2 β /NRF-2 γ /NRF-2 β -1/333 の核内局在が促進され、核内の蛋白質量が変わらなくなったためだと考えられる。一方で、HeLa 細胞の核抽出液と recombinant protein を用いた in vitro 転写の実験から、Sawada らは NRF-2 β は NRF-2 γ に対して約 10 倍の転写促進活性を持つことを示している⁹⁹。Sawada らの実験では、修飾されていない DNA を用いており、ヒストン蛋白質も結合していないことや、NRF-2 に対する抗体を用いて核抽出液に含まれる内在性の NRF-2 を除いているため、核内で NRF-2 と相互作用して転写促進に寄与する蛋白質も除かれる危険があることなど、細胞内で行なわれている、NRF-2 を介した転写を再現できていない可能性がある。しかし、本研究の実験も、外から導入した DNA の転写活性を調べているため、ゲノム上での NRF-2 β と NRF-2 γ を介した転写が非等価であることは否定できない。

NRF-2 は組織間で β/γ サブユニットの発現量比を調節することで、ミトコンドリア翻訳因子や電子伝達系サブユニットなどの酸化的リン酸化に関わる遺伝子の転写量を調節している。本研究で、NRF-2 β は NRF-2 γ と比べて核に局在する効率が高いこと、核内での NRF-2 $\alpha\beta$ と NRF-2 $\alpha\gamma$ の転写促進活性はほぼ同じであることが分かった。これらの結果から、 β/γ サブユニットの使い分けによる NRF-2 の転写調節は次のように行なわれると考えられる。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 $\alpha\beta/\alpha\gamma$ の割合が高いために NRF-2 を介した転写は活発になる。一方で、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 $\alpha\beta/\alpha\gamma$ の割合が少なくなり、NRF-2 を介した転写は活発には行なわれないと考えられる。