

氏名	戒能 賢太		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 10127 号		
学位授与年月	令和 3 年 9 月 24 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	酸化ストレス応答におけるレドックスセンサー分子 CtBP2 の転写調節機能の解明		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	竹越 一博
副査	筑波大学教授	医学博士	正田 純一
副査	筑波大学教授	博士（医学）	福田 邦明
副査	筑波大学講師	博士（理学）	小林 麻己人

## 論文の内容の要旨

戒能賢太氏の博士學位論文は、酸化ストレス応答におけるレドックスセンサー分子 CtBP2 の転写調節機能を、培養細胞実験を用いて検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

第 1 章では、著者は本論文の研究背景として、先行研究に基づいて酸化ストレスが生体に与える影響についてまとめている。その中で著者は、生体は酸化ストレスに対する防御機構を備えているものの、処理能力を超えた酸化ストレスの蓄積は細胞機能を傷害し、様々な疾患の発症に関わっていることに言及し、酸化ストレス応答機序の解明が多くの疾患に対する新規治療の開発に重要であることを述べている。さらに著者は、酸化ストレス応答における転写制御において重要であることが知られている転写因子として NRF1 および NRF2 を挙げている。また著者は、酸化ストレスが細胞内のレドックス状態を変化させることから、先行研究において NADH、NAD<sup>+</sup>と結合することでそれらの比によって活性が調節されることが知られている転写調節因子 CtBP2 に注目し、この分子が酸化ストレス応答において重要な機能を果たしている可能性を指摘している。そしてこれらの背景を踏まえ、本論文全体の目的は、酸化ストレス応答におけるレドックスセンサー分子 CtBP2 の転写調節機能を明らかにすることであると述べている。

第 2 章では、第 1 章で述べられた目的に基づいて行った実験の方法について、著者は先行研究に基づき詳細に述べている。

第 3 章では、著者が行なった実験 1 から実験 7 の研究結果について述べている。

まず実験 1 では、著者は *in silico* の解析で NRF1 および NRF2 のいずれもが CtBP2 の結合配列を有していることを明らかにし、さらに免疫沈降法を用いた検討でそれらの結合配列を介して NRF1 と NRF2 がそれぞれ CtBP2 と結合し複合体を形成することを明らかにしている。

さらに著者は蛍光観察を用いた実験 2 で、これらの分子が実験培養細胞として用いた U2-OS 細胞の核内において共局在することを明らかにし、実験 1 および 2 の結果から、これらの分子の結合が転写複合体として核内で機能している可能性について言及している。

続いて実験 3 および実験 4 では、著者は酸化ストレス応答において転写因子 NRF1 および NRF2 の標的遺伝子の発現に CtBP2 の発現量が影響することを明らかにし、CtBP2 が転写共因子として NRF1 および NRF2 の転写活性を促進することを述べている。実験 3 では、著者は U2-OS 細胞において CtBP2 をノックダウンし、非刺激下と酸化ストレス誘導下のいずれの環境においても NRF1 および NRF2 の標的遺伝子の発現が低下することを明らかにし、NRF1 および NRF2 の十分な転写活性には CtBP2 が必要であると述べている。実験 4 では、著者は NRF1 および NRF2 の標的遺伝子の発現が CtBP2 の過剰発現によって上昇することを示しているが、標的遺伝子によってその程度は異なり、一貫したものではないことを指摘している。

実験 5 では、著者は NRF1 および NRF2 の選択的なシスエレメント配列である ARE (抗酸化剤応答配列) を介したプロモーター活性を評価可能なルシフェラーゼレポーターを用いて、CtBP2 の過剰発現が NRF1 および NRF2 の転写活性に促進的に作用することを明らかにしている。これらの結果から、著者は NRF1 および NRF2 と複合体を形成する CtBP2 は、これらの転写因子に対して転写共因子として機能し、酸化ストレス応答において重要な標的遺伝子の発現制御を担っていると述べている。

実験 6 および実験 7 では、著者は CtBP2 のレドックスセンサー機能が NRF1 および NRF2 との複合体形成、転写制御機能において重要であると述べている。その根拠として著者は、実験 6 で細胞内 NADH/NAD<sup>+</sup>比を増大させる塩化コバルトの培養細胞への添加が、野生型 CtBP2 と NRF1 および NRF2 との複合体形成を促進させる一方で、レドックスセンサー機能を喪失した変異型 CtBP2 ではその傾向が減少することを免疫沈降法で示している。さらに実験 7 では、著者は実験 5 で明らかにしている CtBP2 の ARE を介したプロモーター活性の促進作用が、レドックスセンサー機能を喪失した変異型 CtBP2 では減弱することを示し、実験 6 で言及したレドックスセンサー機能の複合体形成に与える影響が、転写制御機能においても重要であることを示している。

第 4 章では、著者は本論文の実験結果から先行研究に基づいておこなった考察について述べている。この中でまず著者は、レドックスセンサー分子 CtBP2 が酸化ストレス応答において NRF1、NRF2 との複合体形成を介してこれらの転写因子の活性を促進することを明らかにしたことを述べている。加えて著者は、本論文で明らかにした核内におけるこれらの転写制御機構は、NRF1 と NRF2 に共通する新しいものであり、ゆえに CtBP2 が多くの疾患で新しい治療標的になる可能性を指摘している。さらに著者は、第 4 章の中で本研究の限界点についても述べており、CtBP2 と相同性の高いアイソフォーム CtBP1 について言及していないこと、先行研究の多くで CtBP2 は転写抑制因子として機能することが示されており、本論文で明らかにした転写共因子としての作用メカニズムを明らかにするためにはエピゲノム修飾などに言及したより詳細な検証が必要であること、生体において本論文で明らかにした CtBP2 の転写制御機構がより普遍的なものであることを示すにはより多くの細胞種や病態モデルを用いた検証が必要であることを述べている。

本章の最後では、著者は本論文の結論として、レドックスセンサー分子 CtBP2 が酸化ストレス応答における主要な転写因子である NRF1 および NRF2 と転写複合体を形成し、標的遺伝子の転写を促進すると述べている。

## 審査の結果の要旨

### (批評)

本論文は、細胞内のレドックス状態によってその活性が制御される転写調節因子 CtBP2 に注目し、これまで明らかにされてこなかった酸化ストレス応答における機能を検討したものであり、酸化ストレス応答における主要な転写因子 NRF1、NRF2 との転写複合体形成の重要性を明らかにした点で学術的・臨床的意義は大きく、博士論文の研究として非常に優れている。これまでの先行研究では主に核外での制御に注目されてきた NRF1、NRF2 に関して、これらの転写因子に共通した核内での新規転写活性制御機構を見出したという点においても優れていると評価できる。

令和 3 年 8 月 3 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。