

筑波大学

博士（医学）学位論文

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

2021

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

戒能 賢太

目次

目次	1
略語一覧	2
第一章 緒言	4
第二章 方法	8
第三章 結果	15
1) レドックスセンサー分子 CtBP2 は転写因子 NRF1 および NRF2 と結合し、転写複合体を形成する	
2) レドックスセンサー分子 CtBP2 は転写因子 NRF1 および NRF2 と核内で共局在する	
3) 内因性 CtBP2 のノックダウンにより、NRF1 および NRF2 の標的遺伝子の発現が低下する	
4) CtBP2 の過剰発現により、NRF1 および NRF2 の標的遺伝子の発現が上昇する	
5) CtBP2 の過剰発現は、ARE (抗酸化剤応答配列) を介した NRF の転写活性を高める	
6) 細胞内 NADH/NAD ⁺ 比を増加させ得る CoCl ₂ 刺激は CtBP2 と NRF の複合体形成を CtBP2 のレドックスセンサー機能依存的に促進する	
7) ARE を介した NRF の転写活性は、野生型 CtBP2 に比してレドックスセンサー機能喪失変異型 CtBP2 の過剰発現で減弱する	
第四章 考察	23
謝辞	28
出典	29
参考文献	30
表	36
図	37

略語一覽

ANOVA	Analysis of variance
ARE	Antioxidant response element
ATP	Adenosine triphosphate
CNC	Cap'n'Collar
CtBP1, 2	C-terminal binding protein 1, 2
Cul3	Cullin 3
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ER	Endoplasmic reticulum
EYFP	Enhanced yellow fluorescent protein
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GCLC	Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit
GCLM	Glutamate-cysteine ligase modifier subunit
HA	Hemagglutinin
HMOX1	Heme oxygenase 1
HRP	Horseradish peroxidase

KEAP1	Kelch-like ECH-associated protein 1
mYFP	Monomeric EYFP
NAD ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized)
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide (reduced)
NLS	Nuclear localization signal
NQO1	Quinone acceptor oxidoreductase 1
NRF1, 2, 3	Nuclear factor-erythroid 2-like 1, 2, 3
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	Polymerase chain reaction
PPIA	Peptidylprolyl isomerase A
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RIP	Regulated intramembrane proteolysis
ROS	Reactive oxygen species
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SFN	Sulforaphane
siRNA	small interfering RNA
TAD	Transactivation domain
TBS-T	Tris buffered saline with 0.1% Tween 20

第一章 緒言

酸素は最も強力な電子受容体であり，エネルギー産生に代表される多様な生物学的プロセスがこの酸素の特性に依存して成り立っている[1-4]．電子は，好気呼吸によるエネルギー産生の最終段階「電子伝達系」において，ミトコンドリア内膜に存在するミトコンドリア呼吸鎖を移動し，最終的な電子受容体である酸素に供与される．呼吸鎖における電子の移動は，ミトコンドリア内膜を通したプロトンの移動と共役することで膜の内外にプロトン勾配を作り出し，この濃度勾配こそがミトコンドリア内膜上の ATP (Adenosine triphosphate) 合成酵素において ATP 合成のプロトン駆動力となる．ATP はあらゆる生物において普遍的なエネルギー供給源として機能しているため，酸素分子による効率的な電子の需要は，様々な細胞機能の維持に極めて重要である．

電子伝達系において，電子受容体として機能する酸素のほとんどは最終的に水に還元されるが，その過程で酸素分子が部分的に還元された活性酸素種 (Reactive oxygen species : ROS) が一定の割合で生じる．これら ROS は不対電子を有するがゆえに化学的に不安定であり，脂質，タンパク質，核酸などの生体分子を攻撃するほどの高い反応性を有する[5]．ゆえに細胞における ROS の過剰な蓄積は，一般に「酸化ストレス」とよばれ，分子レベルの生体酸化損傷を増加させることで様々な細胞機能の障害をもたらす[6, 7]．生体は，酸化ストレスに対する防御機構として，ROS を消去する抗酸化機構を有する他，酸化障害を受けた分子を除去・修復し，時に細胞死を誘導する[8]．これらの制御機構の破

綻,あるいは細胞の処理能力を上回る酸化ストレスの過剰な蓄積は,加齢,神経変性疾患,代謝疾患をはじめとした多くの疾患で,病態を構成する重要なプロセスであることが示されている[5, 9-12].

転写因子 NRF1 (Nuclear factor-erythroid 2-like 1 (NFE2L1)) および, NRF2 (Nuclear factor-erythroid 2-like 2 (NFE2L2)) は,ともに酸化ストレス応答において重要な役割を担うとされる転写因子であり, Cap'n'Collar (CNC) 転写因子ファミリーに属する. これらの転写因子は分子的に相同性が高く,多くの標的遺伝子に対して重複して発現を制御するとされている[13]. いずれのアイソフォームも,抗酸化剤応答配列 (ARE: Antioxidant response element) と呼ばれる共通の DNA 結合配列 (シスエレメント) に結合し,酸化ストレス応答を担う抗酸化酵素群や解毒代謝酵素群,その他重要な一連の代謝酵素群の発現を制御する一方で,酸化ストレスによって活性化される分子メカニズムに関しては,それぞれ独立した分子機構を有している.通常ストレスが無い条件において, NRF2 はユビキチン E3 リガーゼ Cullin 3 (Cul3) のアダプター分子である Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) との結合によって細胞質に隔離され,ユビキチン化を介したプロテアソーム分解によって抑制性の制御を受けている[14]. KEAP1 は,酸化ストレス環境下において分子内のシステイン残基のチオール基が酸化修飾を受けるため,構造的な変化を介して NRF2 との結合が障害される.これによってプロテアソーム分解による NRF2 に対する抑制性の制御が減弱すると,安定化した NRF 2 が核に蓄積し,転写制御を担う[15] (図 1A). NRF1 も, NRF2 と同様に KEAP1 との相互作用を介した抑制性

の制御を受けているとされていたが、近年、NRF1 分子内の特定の領域における切断が、NRF1 の核移行制御、すなわち転写活性制御において重要であることが明らかとなってきた[16]. NRF1 は小胞体 (ER : Endoplasmic reticulum) 膜上に存在する膜タンパクであり、制御された膜内部でのタンパク質分解 (RIP : Regulated intramembrane proteolysis) によって膜貫通ドメインが切断され、転写活性化ドメイン (TAD : Transactivation domain) を含む C 末端が切り離されることで、プロテアソーム分解を受けずに核移行が促されると考えられている。しかしながら、NRF1 の切断機構は未解明な点が多く残されており、酸化ストレス環境下での活性制御は未だ明らかにされていない [16-19] (図 1B).

C-terminal binding protein (CtBP) は、NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide (reduced)) や NAD⁺ (Nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized)) と結合することで活性が調節される転写抑制因子であり、NADH および NAD⁺ に対する結合親和性がそれぞれ異なることが知られている。そのため CtBP は、NADH/NAD⁺ 比を認識するレッドクスセンサーとしての機能に注目されてきた [20]. CtBP には、CtBP1 および CtBP2 という 2 つのアイソフォームが存在し、CtBP2 のみ N 末端ドメインに核移行シグナル (NLS : Nuclear localization signal) を有しているため、その発現は核内に現局している。一方で、CtBP1 は NLS を有さないため核および細胞質に均一に分布して存在し、この違いから CtBP2 はより転写制御に特化したアイソフォームであると考えられている [21]. 遺伝的に CtBP1 および CtBP2 をマウスで欠失させると、発生異常をきたすことが知られているが、

CtBP2 の単独欠失では胎性致死となる一方で、CtBP1 の単独欠失による表現系はより軽度となる[22]. ゆえにこれら 2 つのアイソフォームは、一部の機能で重複しているものの、それぞれ独立した機能を有していると考えられ、生体において極めて重要な役割を担っていることを示唆している. CtBP は DNA 結合配列を有しておらず、転写調節因子としての機能は、特定の転写因子との結合を介して発揮されることが示されている. これまで、一連の転写因子が CtBP の結合因子として報告されてきたが[23, 24], CtBP と NRF の関連に言及した報告はまだ無い.

これまで報告されてきた CtBP のレドックスセンサーとしての機能を踏まえると、酸化ストレス環境下では生体内のレドックス状態の変化を介して CtBP の活性が変化している可能性が高い. しかしながら、酸化ストレス応答において CtBP が果たす役割は未解明であり、この分子が転写調節因子として酸化ストレス応答に寄与していることが解明されれば、多様な疾患における新たな治療標的となる可能性が高い. そこで本研究では、転写制御に特化していると考えられるアイソフォーム CtBP2 に着目し、酸化ストレス応答における本分子の役割を明らかにするため、転写因子 NRF1 および NRF2 との相互作用を介した CtBP2 の転写制御機構の解明を目的とした.

第二章 方法

1. 細胞培養

培養細胞として、HEK293 細胞、およびヒト骨肉腫細胞株 U2-OS 細胞を用いた。ヒト骨肉腫細胞株 U2-OS 細胞 (HTB-96) は、American Type Culture Collection より購入した。培養液として、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM ; Nacalai, 08458-16) に 10% ウシ胎児血清 (FBS ; Gibco, 10270-106) および 1% Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich, P4333) を添加して用いた。培養条件は、37°C, 5% CO₂ とした。

NRF の活性化には、MG132 (FUJIFILM, 135-18453), およびスルフォラファン (SFN: sulforaphane) (LKT Laboratories, S8044) を用いた。発現プラスミド, または small interfering RNA (siRNA) の培養細胞への導入から 24 時間後に, 5 μM MG132, または 5 μM スルフォラファンを添加した培養液で細胞を 6 時間培養し, 各実験に用いた。

酸化ストレスの誘導には, 過酸化水素水 (H₂O₂) (Nacalai, 1811-25) を用い, 低酸素の誘導には, 塩化コバルト (CoCl₂) (FUJIFILM, 036-03682) を用いた。発現プラスミド, または siRNA の培養細胞への導入から 24 時間後に, 0.8 mM CoCl₂, または 2 mM H₂O₂ を添加した培養液で細胞を 24 時間培養し, 各実験に用いた。

2. プラスミド

NRF1-FLAG および NRF2-FLAG の発現プラスミドは, C 末端に FLAG-tag 配列が融

合した NRF1 および NRF2 の cDNA を PCR によって増幅し, pcDNA3.1 (+) プラスミド (Thermo, V79020) に挿入して作成した. HA-CtBP2 の発現プラスミドは, N 末端に Hemagglutinin(HA)-tag が融合した CtBP2 の cDNA を PCR によって増幅し, pcDNA3.1 (+) に挿入して作成した. mYFP (monomeric EYFP) 発現プラスミドは, EYFP (Enhanced yellow fluorescent protein) 発現プラスミドにおいて, EYFP 蛋白の 207 番目の Alanine を Lysine に置換する変異を Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs, E0554S) を用いて導入し, 作成した. mYFP-CtBP2 の発現プラスミドは, CtBP2 の cDNA を PCR によって増幅し, mYFP 発現プラスミドのコード領域 C 末端に挿入して作成した.

NRF1-mCherry および NRF2-mCherry の発現プラスミドは, NRF1 および NRF2 の cDNA を PCR によって増幅し, mCherry 発現プラスミドのコード領域 N 末端に挿入して作成した. CtBP2 の結合配列に変異を有した NRF1-FLAG および NRF2-FLAG の発現プラスミドは, NRF1 蛋白のアミノ酸配列 PFDLE (Proline-Phenylalanine-Aspartic acid-Leucin-Glutamic acid) を PFASE (Proline-Phenylalanine-Alanine-Serine-Glutamic acid) に, NRF2 蛋白のアミノ酸配列 PVDLD (Proline-Valine-Aspartic acid-Leucin-Aspartic acid) を PVASD (Proline-Valine - Alanine-Serine -Aspartic acid) に置換する変異を Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit を用いて NRF1-FLAG および NRF2-FLAG 発現プラスミドにそれぞれ導入し, 作成した. Rossmann fold の機能喪失変異を有した HA-CtBP2 の発現プラスミドは, CtBP2 蛋白の 189 番目および 192 番目の Glycine をいずれも Alanine に置換する変異を, Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit を用いて HA-CtBP2 発現プラスミ

ドに導入し，作成した．これらの発現プラスミドは，いずれも Lipofectamine 3000 Transfection Reagent (Invitrogen, L3000008) を用いて培養細胞に導入した．

3. siRNA

RNA 干渉を用いた培養細胞における内因性 CtBP2 のノックダウン実験は，Sigma-Aldrich より入手した siRNA 5'-CUUUGGAUUCAGCGUCAUAdTdT-3'/3'-dTdTGAAACCUAAGUCGCAGUAU-5'を用いた．コントロール siRNA として，siRNA Universal Negative Control #1 (Sigma-Aldrich, SIC001) を用いた．これらの siRNA は，Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen, 13778075) を用いて培養細胞に導入した．

4. RNA 抽出

培養細胞より，Sepasol-RNAI Super G (Nacalai, 09379) を用いて total RNA を抽出し，PrimeScript RT Master Mix (TAKARA Bio, RR036A) を用いて逆転写をおこなった．得られた cDNA は，SYBR Green および Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara Bio) を用いて，Real-time PCR 法による遺伝子発現解析をおこなった．各遺伝子の発現量は，peptidylprolyl isomerase A (*Cyclophilin A*, *PPIA*) を内部標準として比較 Ct 定量法を用いて相対値を算出した．各プライマー配列は表 1 に示した．

5. タンパク質の抽出および Western blotting

培養細胞に、タンパク抽出バッファー (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), 10 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄) に protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich, P8340) を加え、氷上でホモジナイズすることによりタンパク質を抽出し 10% SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) で分離した。分離したタンパクは、PVDF (Polyvinylidene fluoride) メンブレン (Immobilon-P, Millipore) にトランスファーした。メンブレンを、5%スキムミルクを含む TBS-T (Tris Buffered Saline with 0.1% Tween 20) で 60 分間ブロッキングした後、anti-CtBP2 (1 : 1000, BD, 612044), anti-CtBP1 (1 : 1000, BD, 610242), anti-NRF1 (1 : 1000, Cell Signaling, 8052S), anti-NRF2 (1 : 1000, Santa Cruz, sc-13032), anti-GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) (1 : 2000, Santa Cruz, sc-32233) を 1 次抗体として 4°C, overnight でインキュベーションした。さらにメンブレンを TBS-T で 10 分、3 回洗浄後、2 次抗体として anti-Rabbit IgG, HRP-linked antibody, または anti-Mouse IgG, HRP (Horseradish peroxidase) -linked antibody (1 : 4000, Cell Signaling, 7074S または 7076S) を用いて室温で 1 時間インキュベーションした。発光試薬として、Clarity Western ECL Substrate (Bio Rad, 1705060) または SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo, 34094) を使い、ChemiDoc XRS Plus System (Bio Rad) で検出した。

6. 免疫沈降法

HEK293 細胞, または U2-OS 細胞を 6 well plate に 4.0×10^5 cells/well の細胞数で播種し, 12 時間の培養後, 実験条件に応じた発現プラスミドを Lipofectamine 3000 Transfection Reagent (Invitrogen, L3000008) を用いて培養細胞に導入した. 24 時間の培養後に, 実験条件に応じて培養液の交換, あるいは試薬の添加を行い, さらに 24 時間培養した. 前述 (第 2 章, 5. タンパク質の抽出および Western blotting) の方法を用いて培養細胞からタンパク抽出をおこない, Nonidet P-40 濃度を 0.5% としたタンパク抽出バッファー中で anti-DDDDK-tag mAb-Magnetic Beads (MBL, M185-11R) と混合した. 磁気ビーズとタンパク抽出液の混合液を 4°C で 2 時間ローテートし抗体反応をおこなった. 抗体反応後のビーズを, 0.5% Nonidet P-40 のタンパク抽出バッファーを用いて 4 回洗浄し, 0.5 mg/ml の 3 \times FLAG peptide (Sigma, F4799) 溶液を用いて溶出した. 得られた溶出液を, 前述 (第 2 章, 5. タンパク質の抽出および Western blotting) の方法を用いて解析した. Western blotting の 1 次抗体としては, anti-FLAG M2 (Sigma Aldrich, F3165) および anti-HA (Cell Signaling, 3724S) を用いた.

7. 蛍光顕微鏡

U2-OS 細胞を glass bottom dish (Matsunami, 82-4942) に 2.0×10^5 cells/dish の細胞数で播種し, 12 時間の培養後, mYFP-CtBP2 発現プラスミドおよび, NRF1-mCherry あ

るいは NRF2-mCherry 発現プラスミドを Lipofectamine 3000 Transfection Reagent (Invitrogen, L3000008) を用いて培養細胞に導入した。24 時間の培養後に、4% パラホルムアルデヒド (FUJIFILM, 163-20145) を用いて 25°C, 15 分間で細胞をインキュベーションし、固定した。細胞を、PBS を用いて 3 回洗浄した後、1 µg/ml DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Dojindo, D523) を用いて 25°C, 15 分間、暗室でインキュベーションした。画像の取得は、Eclipse Ti2-E 倒立顕微鏡 (Nikon) を用い、NIS-Elements AR 5.01 イメージングソフトウェア (Nikon) および Zyla 4.2 PLUS sCMOS カメラでおこなった。

8. ARE ルシフェラーゼレポーターアッセイ

U2-OS 細胞を 48-well plate に 0.5×10^5 cells/well の細胞数で播種し、12 時間の培養後、条件に応じた発現プラスミドに加え、ARE ルシフェラーゼレポータープラスミド、および pRL-SV40 *Renilla* ルシフェラーゼコントロールレポータープラスミド (Promega, E2231) を細胞に導入した。48 時間の培養後、ルシフェラーゼおよび *Renilla* の活性を、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, E1960) を用いて Synergy HTX Multi-Mode Reader (BioTek) で測定した。内部標準値として *Renilla* の測定値を用いて ARE ルシフェラーゼレポーターの活性値を算出した。

9. 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。統計処理は、2 群間の比較は unpaired t-test でお

こなった。3 群間の比較は, one-way ANOVA (Analysis of variance) でおこない, 多重比較検定を Tukey's test でおこなった。 $p < 0.05$ を有意とした。

第三章 結果

1. レドックスセンサー分子 CtBP2 は転写因子 NRF1 および NRF2 と結合し、転写複合体を形成する

レドックスセンサーとしての機能に注目されてきた転写調節因子 CtBP, および抗酸化制御の主要な転写因子として知られている NRF1 および NRF2 は, これまで独立したレドックス応答因子として報告されてきた. 本研究では, これらの転写制御因子がいずれも共通した細胞内のストレス環境下で機能することから, これらの分子が協調して作用し, 新しいレドックス制御機構を形成していると仮定した. まず, CtBP1 と CtBP2 の 2 つのアイソフォームのうち, 核局在シグナルを有し, より転写制御に特化しているとされる CtBP2 を解析対象とした.

in silico のアプローチでヒト NRF1, およびヒト NRF2 のアミノ酸配列を解析したところ, これら転写因子のいずれもが, Pro-x-Asp-Leu-x (PxDLx) として知られる CtBP2 の結合モチーフ配列[23]を有することがわかった (図 2A). さらに同結合モチーフ配列を生物種間で比較したところ, NRF1 は多くの種間で完全に保存されていることが明らかとなった一方で, NRF2 は PxDLx のうち 3 番目のアスパラギン酸と 4 番目のロイシンは多くの種間で保存されていたものの, 完全には保存されていなかった (図 2A). 興味深いことに, NRF1 と NRF2 の両方で, 同結合モチーフ配列はそれぞれの TAD に存在した (図 2B).

TAD は, 転写調節因子の足場となる領域であり, このことから転写調節因子として知られ

ている CtBP2 が、同結合モチーフ配列を介して転写活性を制御している可能性が示唆された。加えて、*in silico* のアプローチで NRF のもう一つのアイソフォームである NRF3 (Nuclear factor-erythroid 2-like 3 (NFE2L3)) のアミノ酸配列を解析したが、CtBP2 結合配列は存在しなかった。NRF3 は、酸化ストレスに対して防御的に転写制御を司る NRF1 や NRF2 と異なり、促進的に作用することが知られており [26]、本研究では引き続き NRF1 および NRF2 と、CtBP2 の関連を解析していくこととした。

続いて、同結合モチーフ配列を介して CtBP2 が実際に NRF1 および NRF2 と複合体を形成しているかを明らかにする目的で、免疫沈降法を用いた解析をおこなった。FLAG-tag を融合した野生型 NRF1 および野生型 NRF2 と、HA-tag を融合した野生型 CtBP2 の結合を、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降法で評価したところ、コントロール (Mock) に比較して複合体の形成が増加し、NRF1 および NRF2 のいずれもが CtBP2 と複合体を形成することが明らかとなった (図 2C, D)。さらに、NRF1 および NRF2 の CtBP2 結合モチーフ配列 Pro-x-Asp-Leu-x (PxDLx) に、Pro-x-Ala-Ser-x (PxASx) となるよう変異を導入した PxDLx 変異型 NRF1, NRF2 用いて CtBP2 との複合体形成を評価したところ、それぞれ野生型 NRF1, NRF2 で認められた複合体形成はいずれも減少し、これらの転写因子との結合が CtBP2 結合モチーフ配列を介した結合であることが明らかとなった (図 2C, D)。これらの結果から、転写調節因子 CtBP2 は、NRF1 および NRF2 の転写活性領域に存在する結合モチーフ配列を介してこれらの転写因子と相互作用し、複合体を形成することで転写活性に影響を与えている可能性が示唆された。

2. レドックスセンサー分子 CtBP2 は転写因子 NRF1 および NRF2 と核内で共局在する

免疫沈降法による検討で、CtBP2 と NRF1 および NRF2 がそれぞれ相互作用し、複合体を形成することを示した。そこで、これらの複合体が実際に細胞内で形成されていることを確認する目的で、蛍光観察法を用いてこれらのタンパクの細胞内局在を解析した。CtBP2 の局在を観察する目的で、mYFP を N 末端に融合した mYFP-CtBP2 を作成した。NRF1 は、その活性が RIP によって制御され、TAD (Transactivation domain) を含んだ C 末端領域が核移行することで転写制御を担うとされており[16]、NLS を有する CtBP2 との共局在を評価する目的に合わせて C 末端に蛍光タンパク mCherry を融合した NRF1-mCherry を作成した。NRF2 は、NRF1 と同様に C 末端に mCherry を融合し、NRF2-mCherry とした。これらのタンパクを、それぞれ mYFP-CtBP2 と NRF1-mCherry, mYFP-CtBP2 と NRF2-mCherry の組み合わせで U2-OS 細胞に過剰発現させ、蛍光観察によって局在を確認した。いずれの条件においても CtBP2 は核内に限局して存在し、NRF1 および NRF2 はその発現の大半が核内に限局し、かつ CtBP2 と共局在した (図 3A)。これらのことから、免疫沈降法で示された CtBP2 と NRF1 または NRF2 の複合体は、細胞においては核内で形成されている可能性が強く示唆され、これらの結合が転写複合体として機能している可能性に矛盾しない結果だった。

3. 内因性 CtBP2 のノックダウンにより、NRF1 および NRF2 の標的遺伝子の発現が低

下する

これまでの結果より CtBP2 が核内で NRF1 および NRF2 とそれぞれ転写複合体を形成する可能性が示唆されたことから、転写因子 NRF1 および NRF2 の標的遺伝子の発現量に CtBP2 の発現量が影響しうるかを検討した。まず U2-OS 細胞において、siRNA を用いた RNA 干渉によって内因性 CtBP2 のノックダウンを試みた。NRF の転写活性を誘導する刺激としては、以下の 4 つを用いた。酸化ストレスを誘導する刺激として過酸化水素 (H_2O_2) [27]、低酸素を誘導する刺激として塩化コバルト (CoCl_2)、NRF1 および NRF2 の活性化を誘導するプロテアソーム阻害剤として MG132[29]、そして NRF2 と KEAP1 の結合を阻害する NRF2 選択的活性化剤としてスルフォラファン(SFN)[30]を用いた。Western blotting による評価では、CtBP2 のタンパク量は siRNA を用いたノックダウンによりコントロールと比較して減少し、また NRF1 および NRF2 の発現は CoCl_2 の添加によって増加したことから (図 4A)、この条件で標的遺伝子の発現量を解析した。

NRF1 および NRF2 の標的遺伝子として酸化ストレス応答に重要な、heme oxygenase 1 (*HMOX1*)、quinone acceptor oxidoreductase 1 (*NQO1*)、glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (*GCLC*)、glutamate-cysteine ligase modifier subunit (*GCLM*) の発現量を解析したところ、非刺激の条件で CtBP2 のノックダウンによって標的遺伝子の発現はいずれも有意に低下した (図 4B, C)。この傾向は、細胞に H_2O_2 、 CoCl_2 を添加し酸化ストレス応答を誘導した条件下でも同様に有意差をもって認められ (図 4B)、NRF の活性化剤である MG132, SFN を添加した条件下でも同様に有意差をもって認められた (図 4C)。

これらの結果から、CtBP2 の存在が、転写因子 NRF によって誘導される標的遺伝子の十分な発現に必要であると考えられた。

4. CtBP2 の過剰発現により、NRF1 および NRF2 の標的遺伝子の発現が上昇する

CtBP2 の発現が、NRF によって誘導される酸化ストレス応答遺伝子群の十分な発現に必要であることが明らかとなったため、次に外因性の CtBP2 の過剰発現がこれらの遺伝子群の発現を誘導させ得るかを検討した。ノックダウン実験と同様に、NRF の転写活性を誘導する刺激として、H₂O₂、CoCl₂、MG132、SFN を用いた。Western blotting による評価では、CtBP2 のタンパク量は過剰発現によりコントロールと比較して増加し、また NRF1 および NRF2 の発現は CoCl₂ の添加によって増加したことから (図 5A)、この条件で標的遺伝子の発現量を解析した。

ノックダウン実験の結果から想定されたとおり、CtBP2 の過剰発現によって NRF1 および NRF2 の標的遺伝子の発現は誘導される傾向にあった (図 5B, C, 図 6A)。解析した標的遺伝子は、非刺激下あるいは酸化ストレス誘導下で、有意差をもって CtBP2 の過剰発現によりその発現が誘導されたが、その程度は遺伝子によってはわずかだった (図 5B, C)。またこの傾向は、NRF 活性化剤の存在下でも同様で、CtBP2 の過剰発現によって有意に誘導された遺伝子は、非刺激下、および SFN 存在下の *HMOX1* および *GCLM* に限られた (図 6A)。

5. CtBP2 の過剰発現は、ARE (抗酸化剤応答配列) を介した NRF の転写活性を高める

CtBP2 の過剰発現が NRF の転写活性に与える影響について、標的遺伝子の発現量の解析ではその影響は一方方向性ではあったものの変化はわずかだったことから (図 5, 6), 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 ARE ルシフェラーゼレポーターを用いて解析した (図 7A). NRF1 および NRF2 の標的遺伝子の発現量の変化から示唆されたとおり, CtBP2 の過剰発現によって ARE ルシフェラーゼレポーターの活性は有意に上昇し, NRF1 あるいは NRF2 の過剰発現を伴うか否かに関わらず, その傾向は一貫していた (図 7B). これまで多くの報告で CtBP2 は転写抑制因子としてその機能が確立されてきたが [21, 31], 状況によっては転写共因子として機能することが知られている [32, 33]. これらの結果から, NRF1 あるいは NRF2 と複合体を形成する CtBP2 は, これらの転写因子に対しては転写共因子として機能し, 酸化ストレス応答を誘導することが示唆された.

6. 細胞内 NADH/NAD⁺比を増加させ得る CoCl₂ 刺激は CtBP2 と NRF の複合体形成を

CtBP2 のレドックスセンサー機能依存的に促進する

すでに報告されているレドックスセンサーとしての CtBP2 の機能を踏まえると [20], CtBP2 は NADH/NAD⁺比を認識し, その比に応じて NRF1 および NRF2 と転写複合体を形成している可能性が示唆される. そこで, レドックス状態の変化を伴う代謝環境の変化が, CtBP2 と NRF1 または NRF2 の複合体形成に影響するかを検討した. 塩化コバルト

は細胞内代謝を解糖系優位に変化させることで[28], 細胞内 NADH/NAD⁺比の増大をもたらすことが知られており[34], レドックス状態を変化させる刺激として用いた.

HA-tag を N 末端に融合した野生型 CtBP2 と, FLAG-tag を C 末端に融合した NRF1 または NRF2 の発現プラスミドを用いて U2-OS 細胞内でこれらのタンパクを過剰発現させ, CoCl₂ の刺激の有無で複合体形成が変化し得るかを, 抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降法で解析した. まず, NRF1 あるいは NRF2 と, 野生型 CtBP2 の複合体形成を CoCl₂ の刺激の有無で比較したところ, NRF1 および NRF2 のいずれにおいても CoCl₂ の刺激によって野生型 CtBP2 との複合体形成が増加した (図 8A, B). さらに, これらの増加が CtBP2 のレドックスセンサー機能に依存的であることを確認するため, 代謝産物を認識する Rossmann fold と呼ばれる CtBP2 のポケット構造内に位置する, 189 番目および 192 番目の Glycine をいずれも Alanine に置換する変異を導入し, レドックスセンサー機能を喪失した変異型 CtBP2 の発現プラスミドを作成した[25]. NRF1 あるいは NRF2 との複合体形成を, 変異型と野生型 CtBP2 で比較すると, NRF1 と NRF2 のいずれとの複合体形成においても, CoCl₂ の刺激によって野生型 CtBP2 で増加していた複合体形成が, 消失, あるいは減弱した (図 8A, B).

免疫沈降法を用いたこれらの結果より, 細胞内 NADH/NAD⁺が増大する環境で, CtBP2 と NRF1 あるいは NRF2 の複合体形成は促進され, これらの変化は CtBP2 のレドックスセンサー機能依存的であることが示唆された.

7. ARE を介した NRF の転写活性は、野生型 CtBP2 に比してレドックスセンサー機能喪失変異型 CtBP2 の過剰発現で減弱する

CoCl₂ 刺激によって促進される CtBP2 と NRF との複合体形成は、CtBP2 のレドックスセンサー機能依存的であることが示唆されたが、これらの複合体形成の変化が、実際に NRF の転写活性にどの程度影響しうるのかを検討する目的で、ARE ルシフェラーゼレポーターを用いたプロモーター活性の評価をおこなった。

野生型 CtBP2 の過剰発現によって、ARE ルシフェラーゼの活性はコントロール(Mock) に比して有意に上昇し、この傾向は NRF1 あるいは NRF2 の共発現の有無に依らずに一貫していた。これに対し、レドックスセンサー機能喪失型変異を導入した変異型 CtBP2 の過剰発現では、コントロール (Mock) に比して ARE ルシフェラーゼの活性は有意に上昇したものの、その程度は NRF1 あるいは NRF2 を共発現した条件で、野生型 CtBP2 に比して有意に低かった (図 9A)。このことは、CtBP2 のレドックスセンサー機能が NRF との複合体形成に重要であることに加え、実際に NRF の転写活性に対しても重要であることを示唆した。これらの結果より、CtBP2 は細胞のレドックス状態を Rossmann fold を介して感知し、転写因子 NRF との複合体形成を変化させることで、酸化ストレス応答を促進させる作用を有すると考えられた (図 10A, B)。

第四章 考察

本研究では、細胞が酸化ストレス応答を有効に誘導するために、レドックスセンサー分子 CtBP2 と NRF1 あるいは NRF2 によって形成される転写複合体が重要な役割を担っていることを明らかにした。

これまで CtBP2 は、レドックス状態に応じてその活性が制御される特徴的な分子であったことから、とりわけ解糖系の亢進がレドックス状態と強く結びついている癌細胞において、増殖能への影響に注目されることが多かった[35]。レドックスセンサーとしての機能を考慮すれば、CtBP2 が酸化ストレス応答においても同様に重要な役割を担っている可能性は容易に想像されるものの、これまで酸化ストレス環境下での CtBP2 の機能解析はほとんどおこなわれていない。本研究では、これまで注目されてこなかった CtBP2 の酸化ストレス応答における機能を明らかにする目的で、これらの制御機構における主要な制御因子である転写因子 NRF1 および NRF2 に注目し、癌細胞 (U2-OS 細胞) を用いた検討で、CtBP2 との相互作用による転写複合体の形成が酸化ストレス応答を誘導することを明らかにした。

過剰な酸化ストレスに応答することは、癌細胞が増殖能を維持するうえで必要とされる機能だが[36, 37]、癌細胞のみならず、酸化ストレス自体は多くの代謝性疾患や慢性疾患においてその病態を形成する重要な要素と考えられており[5, 9-12]、例えば NRF2 の活性化によって慢性腎臓病が軽快することが報告されている[38]。CtBP2 の活性化は酸化ス

トレス応答の誘導を介して癌細胞にとって防御的に作用し、このことが CtBP2 の活性と癌細胞の増殖能の関連性を部分的に説明し得る可能性はあるが、CtBP2 の活性化は非腫瘍性疾患の治療標的になり得ると考えられる。

NRF1 および NRF2 の活性化制御機構は、これまでに多くの報告がなされている。NRF2 は KEAP1 による抑制性の制御を受けているが、親電子性物質や酸化ストレスによって KEAP1 のシステイン残基のチオール基が酸化修飾されると、KEAP1 と NRF2 の結合が障害されて NRF2 が核内へ移行し、標的遺伝子の転写を活性化する[14]。一方で NRF1 は ER 膜上に存在し、RIP による制御を受けており、RIP により切断された NRF1 の C 末端ドメインが核内へ移行し、標的遺伝子の転写を活性化するとされている[16-19]。これまで報告されてきた NRF1 および NRF2 の活性化制御機構は、ER 膜上あるいは細胞質から、核内への移行が主要なプロセスとされてきたが、本研究で明らかにした CtBP2 によるこれら転写因子の活性制御機構は、核内移行制御とは独立した新しい制御機構を提案するものである。酸化ストレス応答の主要な転写因子である NRF1 および NRF2 両方の核内移行を同時に治療標的とすることは、抗酸化作用を有する治療戦略として有望ではあるものの、これらの制御機構が大きく異なり、独立しているがゆえに現実的には困難である。しかしながら CtBP2 の活性化は、NRF1 および NRF2 の核内移行制御と独立し、核内で両方のアイソフォームに対して有効に転写活性を促進するため、有望な治療標的となる可能性がある。

CtBP2 の結合モチーフ配列は、NRF1 では異なる生物種間で広く保存されていたが、

NRF2 では生物種間で完全には保存されていなかった。しかしながら本研究では、NRF1 だけでなく、生物種間で結合モチーフ配列が異なっている NRF2 も CtBP2 と相互作用した。このことは、CtBP2 がより多くの転写因子、転写調節因子と転写複合体を形成する中で、直接的または間接的に NRF1 や NRF2 と相互作用し、転写制御を担っている可能性を示唆し、さらに酸化ストレス応答における機能も、生物種間で保存されている可能性を示唆した。これまでも CtBP2 はレドックスセンサー機能を有する転写調節因子として認識されてきたが[20]、本研究で得られた結果より、CtBP2 は細胞内のレドックス状態を感知し、NRF1 および NRF2 との相互作用を介した酸化ストレス応答の制御によってレドックス状態のホメオスタシス維持に関与している可能性が示唆された。

本研究では、CtBP の 2 つのアイソフォームのうち、核移行シグナルを有し、その役割が転写制御に特化していると考えられている CtBP2 に注目した。しかしながら、核移行シグナルを有さないものの、CtBP1 は CtBP2 と相同性が高く、その機能に関しても重複している可能性がある。すなわち、本研究で明らかにした CtBP2 と NRF1 や NRF2 の相互作用を介した酸化ストレス応答制御についても、CtBP1 が同様の制御機構で関与している可能性が考えられる。ゆえに、本研究で明らかにした CtBP2 の機能についても、その一部を CtBP1 が担っている可能性があり、また CtBP2 のノックダウンや過剰発現により得られた標的遺伝子の発現変化についても、CtBP1 の転写制御機能が関与していることは否定できない。これらは本研究の限界として、今後 CtBP1 にも言及した詳細な解析が必要である。

本研究では、転写因子 NRF の転写活性を促進する転写共因子として CtBP2 の役割を明らかにしたが、これまでの報告は、CtBP2 を転写抑制因子とするものが多く、広く受け入れられている CtBP2 の機能とは異なる。しかしながら、異なる状況においては転写共因子として機能する報告もある[32, 33]。このように、相互作用する転写因子あるいは転写調節因子によって転写抑制因子としても転写共因子としても機能する CtBP2 のメカニズムに関して、転写複合体に含まれるより多くの調節因子との相互作用も考慮した広い視点が必要であり、標的遺伝子の発現変動や、レポーターアッセイによる転写活性評価においてのみ検討している点は本研究の限界である。CtBP2 が酸化ストレス応答において、転写抑制因子ではなく転写共因子として機能するメカニズムについて、クロマチン免疫沈降法を用いるなどの方法で、クロマチン高次構造やヒストン修飾酵素にまで言及した詳細な解析が必要である。

本研究では、酸化ストレス応答における CtBP2 の機能を明らかにする目的で、ヒト骨肉腫細胞株 U2-OS 細胞を用いて解析を行った。本研究で用いた、NRF1 または NRF2 の活性化刺激として既に報告されている各刺激 (H_2O_2 , CoCl_2 , MG132, SFN) は、いずれも標的遺伝子の発現上昇をきたし、NRF1, 2 の活性化制御機構が U2-OS 細胞においても保持されていることが確認された。しかしながら、酸化ストレス応答は癌細胞に限らず人体を構成するあらゆる細胞で生理的に保持された機能であり、本研究で明らかにした CtBP2 を介した酸化ストレス応答機能が全身性、あるいは多様な病態で重要であると言及するためには、単一の細胞株における検討のみでは限界がある。ゆえに、U2-OS 細胞のみ

で機能解析を行っている点は本研究の限界であり、普遍性に言及するためには、より多くの細胞種や病態モデルを用いた詳細な解析が必要である。

本研究の結果から、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ことが明らかとなった。さらに **CtBP2** はレドックス状態に応じて **NRF1** あるいは **NRF2** との結合状態を変化させることで転写活性を制御していた。本研究で明らかにした **NRF** を介したこれらの新しい **CtBP2** の転写制御機構は、これまで核移行制御が主要なメカニズムと考えられてきた **NRF** の活性制御と異なるもので、さらに **NRF1** と **NRF2** に共通していた。すなわち、過剰な酸化ストレスが病態の悪化につながる多くの疾患で新たな治療標的となる可能性があり、新規治療法の開発に役立つと期待される。

謝辞

本稿を終えるにあたり，研究の機会を与えて頂き，終始御懇篤なる御指導，御鞭撻を賜りました筑波大学医学医療系 内分泌代謝・糖尿病内科 島野 仁 教授に深厚なる誠意を表します．

直接の担当教官である筑波大学医学医療系 内分泌代謝・糖尿病内科 関谷 元博 准教授には，実験操作の基礎から，結果の解釈，方向性の決定など，多岐にわたりきめ細かい御指導，御指摘を頂きました．本論文は先生の御助力なしにはまとまりませんでした．心より感謝申し上げます．

実験を遂行するにあたり，暖かい御指導，御支援を頂いた筑波大学大学院人間総合科学研究科 内分泌代謝・糖尿病内科研究室の方々に心より感謝申し上げます．

最後になりましたが，私生活ならびに研究室外活動を支えて頂いた親族，先輩，友人，後輩の方々に心より厚く御礼申し上げます．

出典

本学位論文は、Biochemical and Biophysical Research Communication. 562:146-153, 2021 (doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.05.069) に掲載された論文の内容を、Elsevier 社の規定にしたがって再利用している。

参考文献

- [1] D. Stuehr, S. Pou, G.M. Rosen, Oxygen reduction by nitric-oxide synthases, *Journal of biological chemistry*, 276 (2001) 14533-14536.
- [2] C.R. Giordano, S.R. Terlecky, Peroxisomes, cell senescence, and rates of aging, *Biochimica et biophysica acta*, 1822 (2012) 1358-1362.
- [3] R.J. Mailloux, Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species, *Redox biology*, 4 (2015) 381-398.
- [4] G.S. Shadel, T.L. Horvath, Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis, *Cell*, 163 (2015) 560-569.
- [5] M. Schieber, N.S. Chandel, ROS function in redox signaling and oxidative stress, *Current biology*, 24 (2014) R453-462.
- [6] B. Halliwell, J.M. Gutteridge, Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochemical journal*, 219 (1984) 1-14.
- [7] V. Adam-Vizi, C. Chinopoulos, Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species, *Trends in pharmacological sciences*, 27 (2006) 639-645.
- [8] K.J. Davies, Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal,

- repair, and replacement systems, *IUBMB life*, 50 (2000) 279-289.
- [9] T. Finkel, N.J. Holbrook, Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing, *Nature*, 408 (2000) 239-247.
- [10] K.J. Barnham, C.L. Masters, A.I. Bush, Neurodegenerative diseases and oxidative stress, *Nature reviews drug discovery*, 3 (2004) 205-214.
- [11] P. Poprac, K. Jomova, M. Simunkova, V. Kollar, C.J. Rhodes, M. Valko, Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases, *Trends in pharmacological sciences*, 38 (2017) 592-607.
- [12] L. Rochette, M. Zeller, Y. Cottin, C. Vergely, Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies, *Biochimica et biophysica acta*, 1840 (2014) 2709-2729.
- [13] G.P. Sykiotis, D. Bohmann, Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease, *Science signaling*, 3 (2010) re3.
- [14] I. Bellezza, I. Giambanco, A. Minelli, R. Donato, Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress, *Biochimica et biophysica acta-Molecular cell research*, 1865 (2018) 721-733.
- [15] L. Baird, M. Yamamoto, The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway, *Molecular and cellular biology*, 40 (2020) e00099-20.
- [16] S. Koizumi, T. Irie, S. Hirayama, Y. Sakurai, H. Yashiroda, I. Naguro, H. Ichijo, J. Hamazaki, S. Murata, The aspartyl protease DDI2 activates Nrf1 to

- compensate for proteasome dysfunction, *eLife*, 5 (2016) e18357.
- [17] J. Steffen, M. Seeger, A. Koch, E. Krüger, Proteasomal degradation is transcriptionally controlled by TCF11 via an ERAD-dependent feedback loop, *Molecular cell*, 40 (2010) 147-158.
- [18] S.K. Radhakrishnan, W. den Besten, R.J. Deshaies, p97-dependent retrotranslocation and proteolytic processing govern formation of active Nrf1 upon proteasome inhibition, *eLife*, 3 (2014) e01856.
- [19] Z. Sha, A.L. Goldberg, Proteasome-mediated processing of Nrf1 is essential for coordinate induction of all proteasome subunits and p97, *Current biology : CB*, 24 (2014) 1573-1583.
- [20] Q. Zhang, D.W. Piston, R.H. Goodman, Regulation of corepressor function by nuclear NADH, *Science*, 295 (2002) 1895-1897.
- [21] G. Chinnadurai, Transcriptional regulation by C-terminal binding proteins, *International journal of biochemistry and cell biology*, 39 (2007) 1593-1607.
- [22] J.D. Hildebrand, P. Soriano, Overlapping and unique roles for C-terminal binding protein 1 (CtBP1) and CtBP2 during mouse development, *Molecular and cellular biology*, 22 (2002) 5296-5307.
- [23] J. Turner, M. Crossley, The CtBP family: enigmatic and enzymatic transcriptional co-repressors, *BioEssays*, 23 (2001) 683-690.

- [24] L.J. Zhao, T. Subramanian, S. Vijayalingam, G. Chinnadurai, CtBP2 proteome: Role of CtBP in E2F7-mediated repression and cell proliferation, *Genes and cancer*, 5 (2014) 31-40.
- [25] L.J. Zhao, M. Kuppuswamy, S. Vijayalingam, G. Chinnadurai, Interaction of ZEB and histone deacetylase with the PLDLS-binding cleft region of monomeric C-terminal binding protein 2, *BMC molecular biology*, 10 (2009) 89.
- [26] K. Sankaranarayanan, A.K. Jaiswal, Nrf3 negatively regulates antioxidant-response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene, *Journal of biological chemistry*, 279 (2004) 50810-50817.
- [27] E.A. Veal, A.M. Day, B.A. Morgan, Hydrogen peroxide sensing and signaling, *Molecular cell*, 26 (2007) 1-14.
- [28] G.L. Semenza, P.H. Roth, H.M. Fang, G.L. Wang, Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1, *Journal of biological chemistry*, 269 (1994) 23757-23763.
- [29] N.L. Chepelev, J.D. Bennett, T. Huang, S. McBride, W.G. Willmore, The Nrf1 CNC-bZIP protein is regulated by the proteasome and activated by hypoxia, *PloS one*, 6 (2011) e29167.
- [30] A.T. Dinkova-Kostova, J.W. Fahey, R.V. Kostov, T.W. Kensler, KEAP1 and

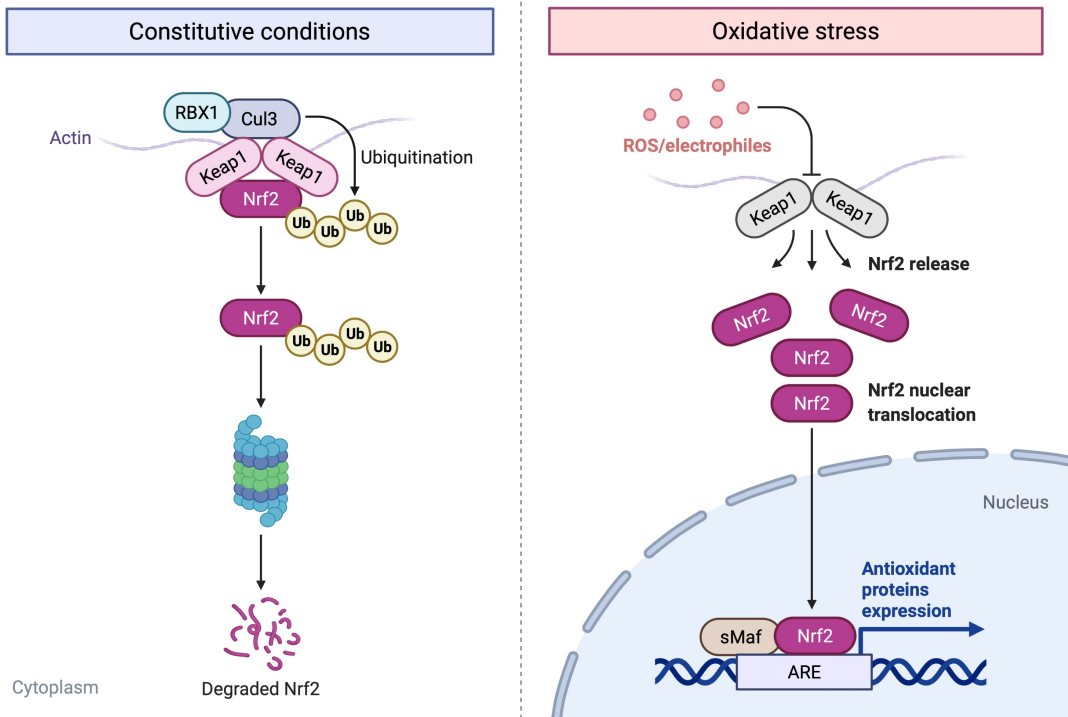
- Done? Targeting the NRF2 Pathway with Sulforaphane, *Trends in food science and technology*, 69 (2017) 257-269.
- [31] T.R. Stankiewicz, J.J. Gray, A.N. Winter, D.A. Linseman, C-terminal binding proteins: central players in development and disease, *Biomolecular concepts*, 5 (2014) 489-511.
- [32] S.K. Ray, H.J. Li, E. Metzger, R. Schüle, A.B. Leiter, CtBP and associated LSD1 are required for transcriptional activation by NeuroD1 in gastrointestinal endocrine cells, *Molecular and cellular biology*, 34 (2014) 2308-2317.
- [33] M. Fang, J. Li, T. Blauwkamp, C. Bhambhani, N. Campbell, K.M. Cadigan, C-terminal-binding protein directly activates and represses Wnt transcriptional targets in *Drosophila*, *EMBO journal*, 25 (2006) 2735-2745.
- [34] S. Srivastava, Emerging therapeutic roles for NAD(+) metabolism in mitochondrial and age-related disorders, *Clinical and translational medicine*, 5 (2016) 25.
- [35] J.H. Kim, E.J. Cho, S.T. Kim, H.D. Youn, CtBP represses p300-mediated transcriptional activation by direct association with its bromodomain, *Nature structural and molecular biology*, 12 (2005) 423-428.
- [36] C. Gorrini, I.S. Harris, T.W. Mak, Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy, *Nature reviews drug discovery*, 12 (2013) 931-947.

- [37] J.D. Hayes, A.T. Dinkova-Kostova, K.D. Tew, Oxidative stress in cancer, *Cancer cell*, 38 (2020) 167-197.
- [38] S. Ruiz, P.E. Pergola, R.A. Zager, N.D. Vaziri, Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease, *Kidney international*, 83 (2013) 1029-1041.

表1. リアルタイムPCRに用いたprimer配列

	Forward	Reverse
<i>PPIA</i>	AGTCCATCTATGGGGAGAAATTTG	GCCTCCACAATATTCATGCCTTC
<i>HMOX1</i>	CCAGCAACAAAGTGCAAGATTC	GTGTAAGGACCCATCGGAGAAG
<i>NQO1</i>	CGCAGACCTTGTGATATTCCAG	ATGGCAGCGTAAGTGTAAGCAA
<i>GCLC</i>	CATTTCCCAGATTAGGCTGTCC	TCTGGAAAGAAGAGGGACTTGG
<i>GCLM</i>	GACAAAACACAGTTGGAACAGC	CAGTCAAATCTGGTGGCATC

A



B

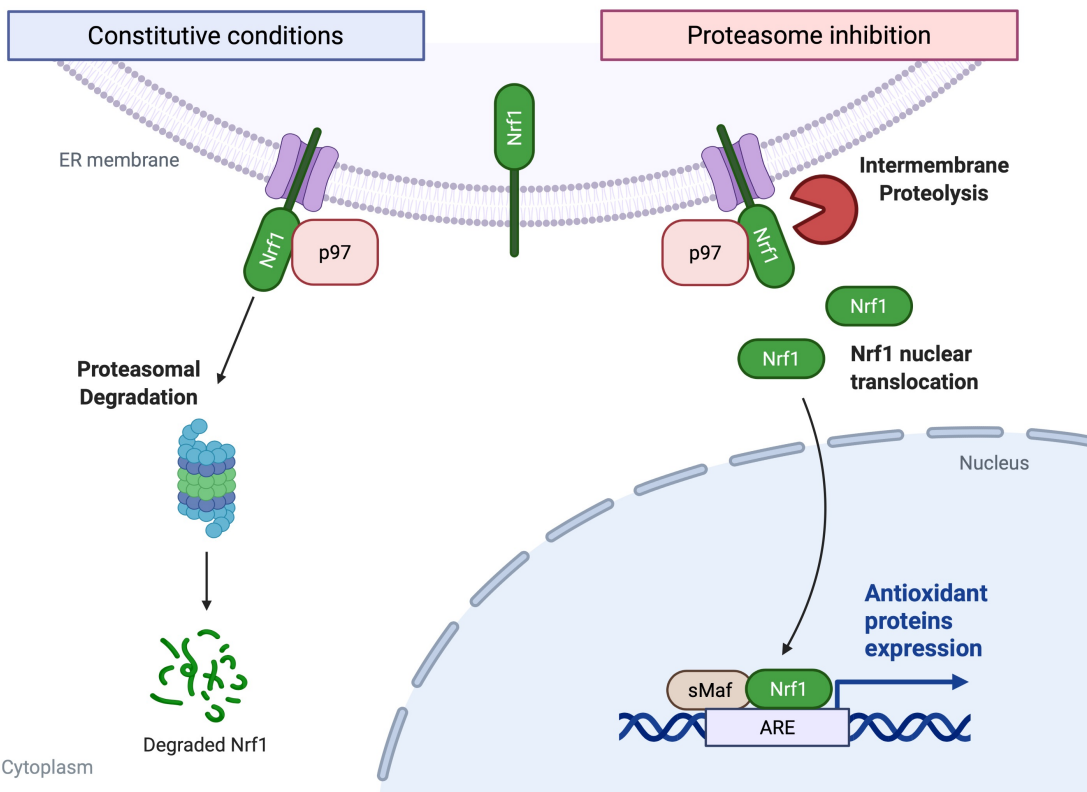


図1. NRF1およびNRF2の転写活性制御機構

(A) NRF2は、KEAP1との結合によって細胞質に隔離され、プロテアソーム分解によって抑制的に制御を受けているが、酸化ストレス環境下でKEAP1との結合が障害されると安定化したNRF2が核内へ移行し、転写制御を担う。

(B) NRF1は、ER膜上に存在する膜タンパクであり、NRF2と同様にプロテアソーム分解によって抑制的に制御を受けているが、RIPによって膜貫通ドメインが切断されると、転写活性化ドメインを含むC末端が核内へ移行し、転写制御を担う。

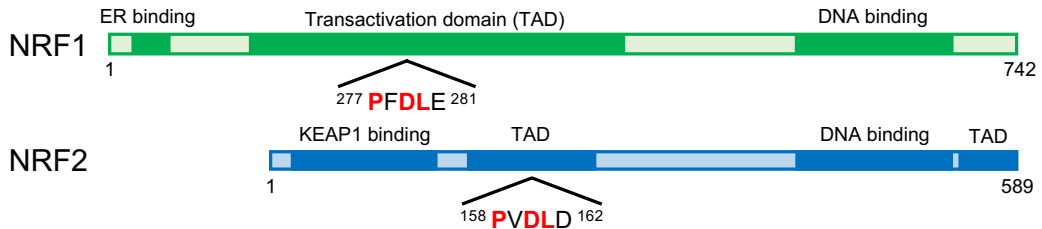
図は、BioRender.comで作成した。

A

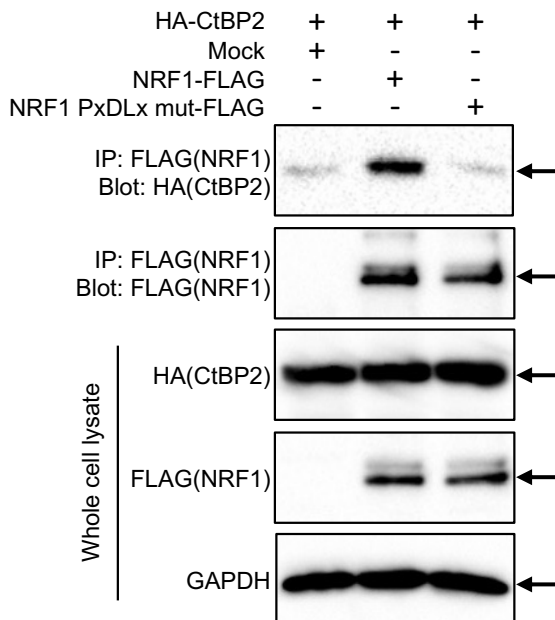
Human NRF1	265	NLLSPLLGTES	PFDLE QQWQDLMSIMEM	293
Mouse NRF1	266	SLLSPLLGTES	PFDLE QQWQDLMSIMEM	294
Rat NRF1	266	SLLSPLLGTES	PFDLE QQWQDLMSIMEM	294
Human NRF2	146	AQSPETSVAQVA	PVDLD GMQQDIEQVWEE	174
Mouse NRF2	155	AQSLNSSL-EAAMT	DLSS IEQDMEQVWQE	182
Rat NRF2	162	AQSLDSSL-ETAMT	DLSS IQDMEQVWQE	189

CtBP2 binding

B



C



D

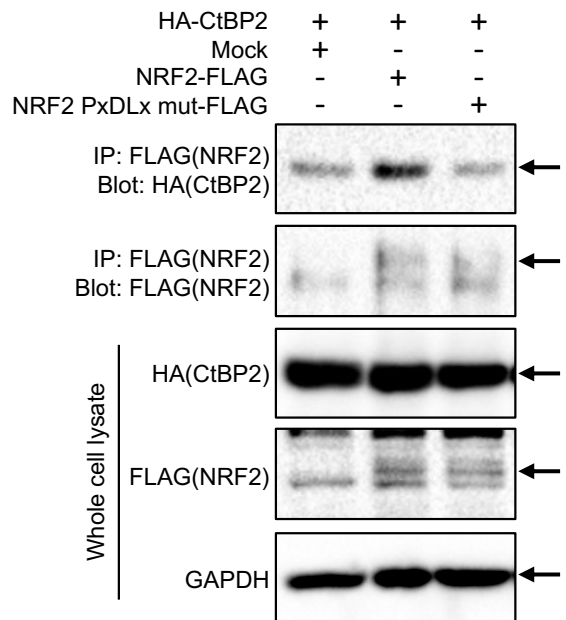


図2. CtBP2は、NRF1およびNRF2と結合モチーフ配列を介して複合体を形成する

- (A) NRF1およびNRF2のアミノ酸配列における、CtBP2結合モチーフ配列(PxDLx)の位置、および同配列の生物種間(ヒト、マウス、ラット)の比較。
- (B) CtBP2結合モチーフ配列の位置を示したNRF1およびNRF2のドメイン構造のシェーマ。NRF1、NRF2いずれにおいても結合配列はTAD内に存在する。TAD: Transactivation domain。
- (C) 野生型NRF1-FLAGまたは変異型NRF1-FLAG (PxDLx>PxASx)を、HA-CtBP2と共にHEK293細胞に共発現し、抗FLAG抗体を用いた免疫沈降法によって複合体形成を評価したウエスタンブロットニング。
- (D) 野生型NRF2-FLAGまたは変異型NRF2-FLAG (PxDLx>PxASx)を、HA-CtBP2と共にHEK293細胞に共発現し、抗FLAG抗体を用いた免疫沈降法によって複合体形成を評価したウエスタンブロットニング。

A

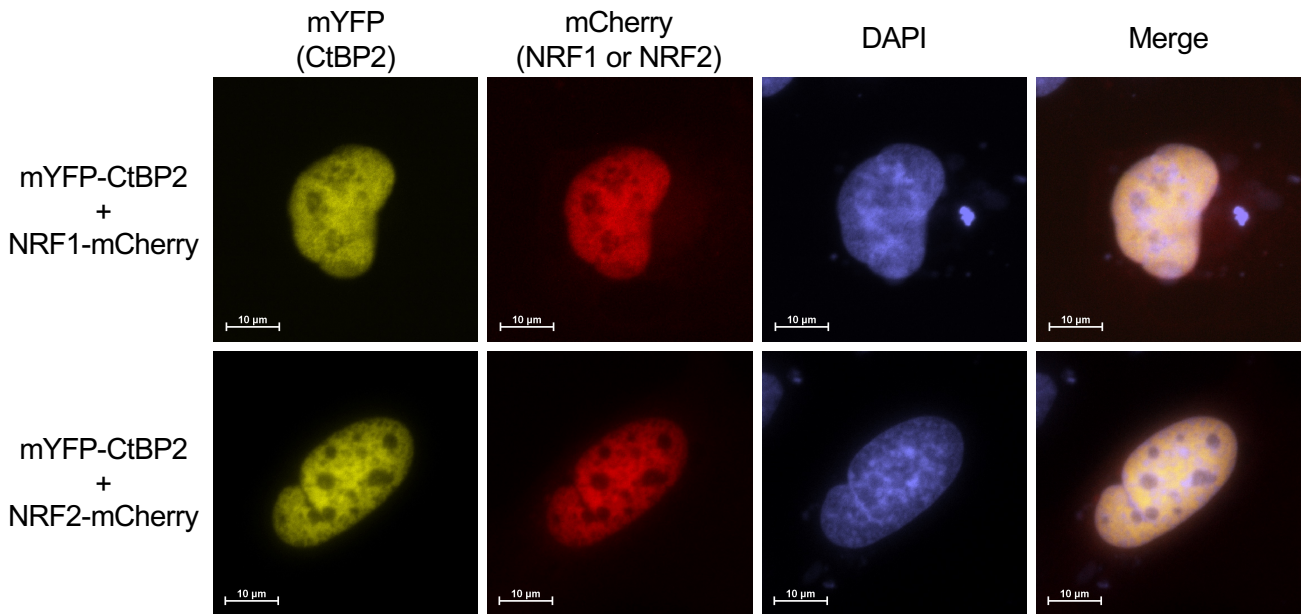


図3. CtBP2は核内でNRF1またはNRF2と共局在する

(A) NRF1-mCherryまたはNRF2-mCherryと、mYFP-CtBP2を共発現し、固定後にDAPIで染色したU2-OS細胞の蛍光観察画像。(スケールバー: 10 μ m)

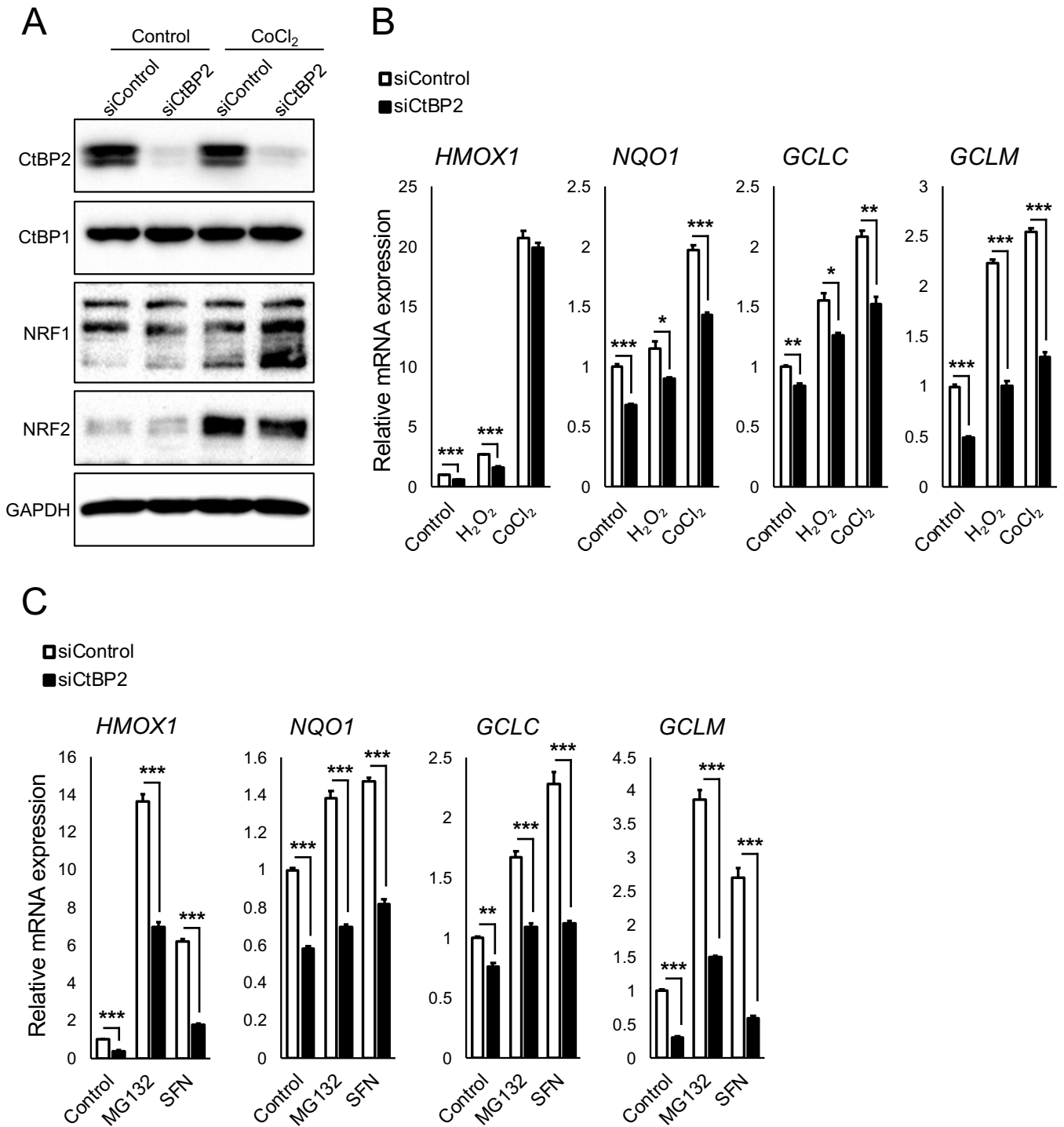


図4. CtBP2のノックダウンにより, NRF1およびNRF2の標的遺伝子の発現が低下する

U2-OS細胞にsiControlあるいはsiCtBP2を導入し, 2 mM H₂O₂, 0.8 mM CoCl₂を含む培養液で24時間刺激, あるいは5 μM MG132, 5 μM SFN(Sulforaphane)を含む培養液で6時間刺激した。

(A) CoCl₂刺激下でのsiControlに対するsiCtBP2の影響を比較したウエスタンブロットティング。

(B) H₂O₂またはCoCl₂刺激下でのsiControlに対するsiCtBP2の影響を比較した遺伝子発現解析. (n=3)

(C) MG132またはSFN刺激下でのsiControlに対するsiCtBP2の影響を比較した遺伝子発現解析. (n=3)

データは平均値±標準誤差で示した. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (unpaired t-test)

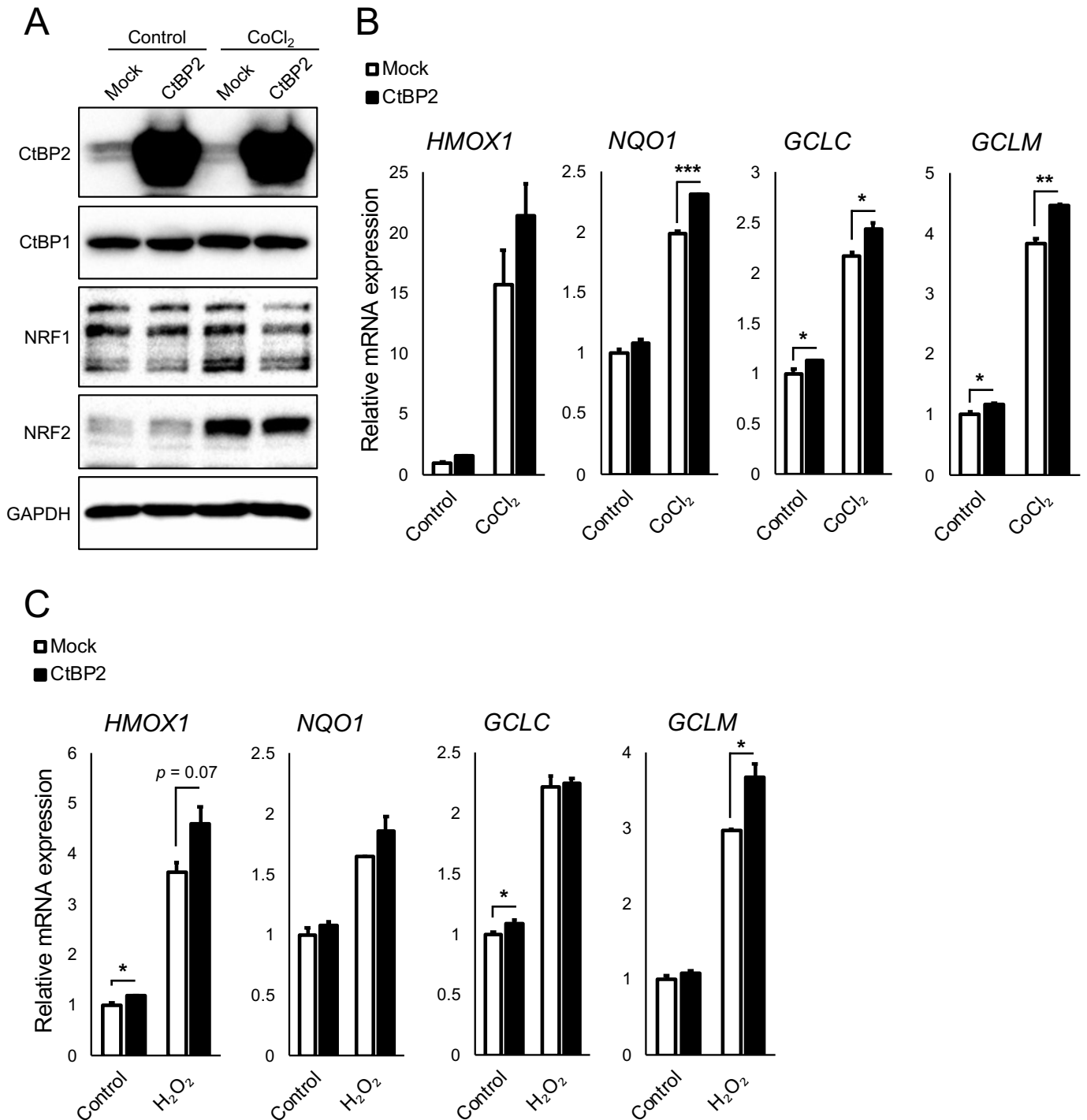


図5. CtBP2の過剰発現により, NRF1およびNRF2の標的遺伝子の発現が上昇する

U2-OS細胞にMockまたはCtBP2発現プラスミドを導入し, 2 mM H₂O₂または, 0.8 mM CoCl₂を含む培養液で24時間刺激した。

(A) CoCl₂刺激下でのMockに対するCtBP2過剰発現の影響を比較したウエスタンブロッティング。

(B) CoCl₂刺激下でのMockに対するCtBP2過剰発現の影響を比較した遺伝子発現解析. (n=3)

(C) H₂O₂刺激下でのMockに対するCtBP2過剰発現の影響を比較した遺伝子発現解析. (n=3)

データは平均値±標準誤差で示した. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (unpaired t-test)

A

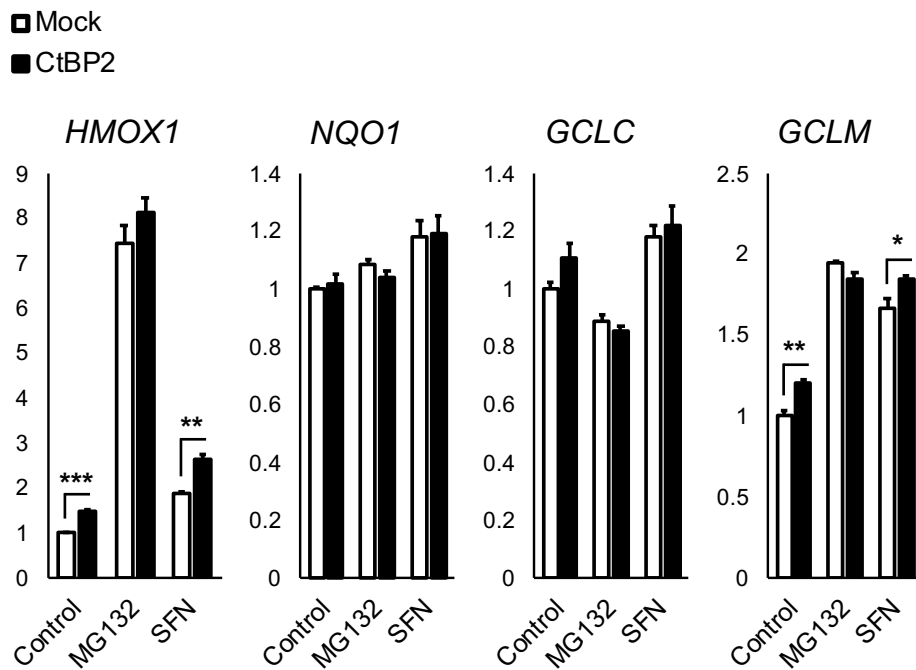


図6. CtBP2の過剰発現により, NRF1およびNRF2の標的遺伝子の発現が上昇する

U2-OS細胞にMockまたはCtBP2発現プラスミドを導入し, 5 μ M MG132または5 μ M SFN(Sulforaphane)を含む培養液で6時間刺激した。

(A) MG132またはSFN刺激下でのMockに対するCtBP2過剰発現の影響を比較した遺伝子発現解析. (n=3) データは平均値±標準誤差で示した. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (unpaired t-test)

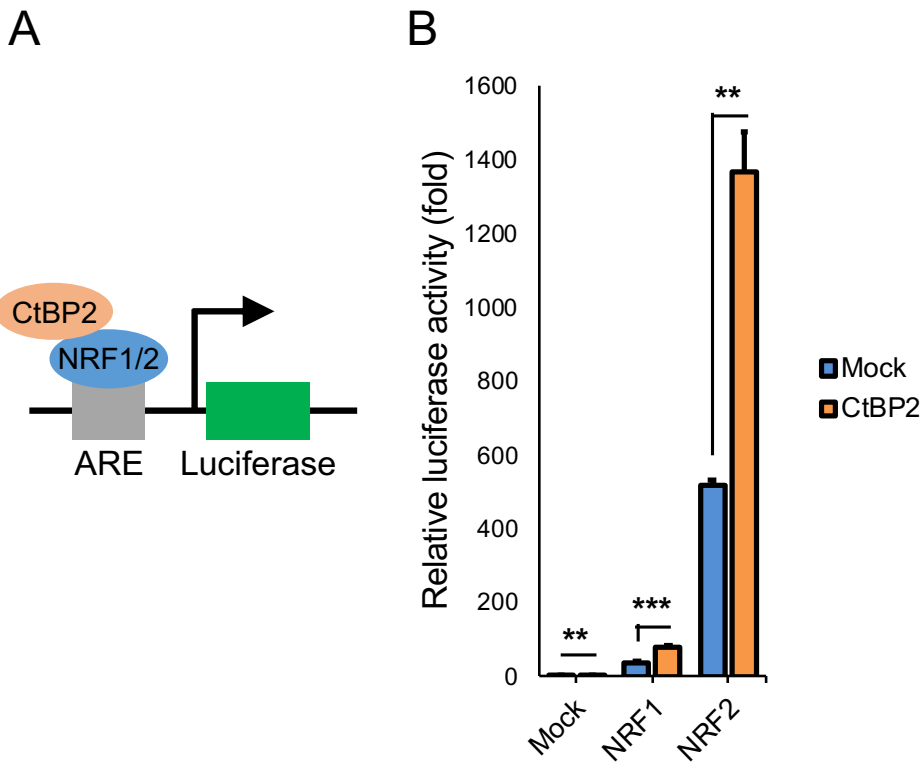


図7. CtBP2の過剰発現は、ARE (抗酸化剤応答配列)を介したNRFの転写活性を高める

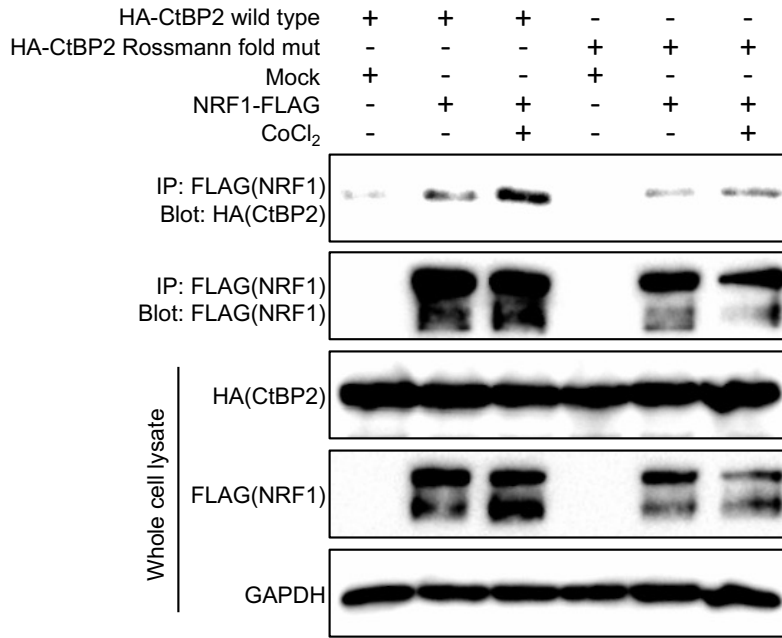
U2-OS細胞にAREルシフェラーゼレポーターおよび*Renilla*ルシフェラーゼコントロールレポーターを導入したうえで、MockまたはCtBP2発現プラスミドを導入し、ルシフェラーゼおよび*Renilla*の活性を評価した。

(A) AREルシフェラーゼレポーター、NRF1または2、CtBP2との関連性を示したシェーマ。

(B) NRF1または2の存在下または非存在下でMockに対するCtBP2過剰発現の影響を比較したAREルシフェラーゼ活性値(n=3. *Renilla*の活性値で標準化. NRF非存在下のMockの活性値を1とした比で示した.)

データは平均値±標準誤差で示した. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (one-way ANOVA followed by Tukey's test)

A



B

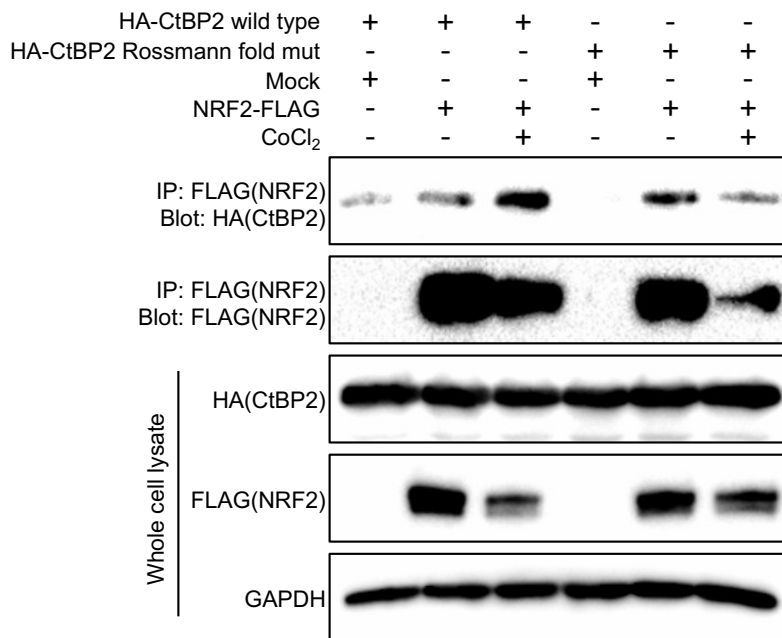


図8. 細胞内NADH/NAD⁺比を増加させ得るCoCl₂刺激はCtBP2とNRFの複合体形成を、CtBP2のレドックスセンサー機能依存的に促進する

U2-OS細胞に、野生型HA-CtBP2またはレドックスセンサー機能喪失変異型(Rossmann fold mut)HA-CtBP2(G189A, G192A)を、NRF1-FLAGまたはNRF2-FLAGと共発現した。0.8 mM CoCl₂を含む培養液で24時間刺激した。抗FLAG抗体を用いた免疫沈降法によって複合体形成を評価した。

- (A) 野生型HA-CtBP2あるいは変異型HA-CtBP2と、CoCl₂刺激下でのNRF1-FLAGとの複合体形成を評価したウエスタンブロットティング。
- (B) 野生型HA-CtBP2あるいは変異型HA-CtBP2と、CoCl₂刺激下でのNRF2-FLAGとの複合体形成を評価したウエスタンブロットティング。

A

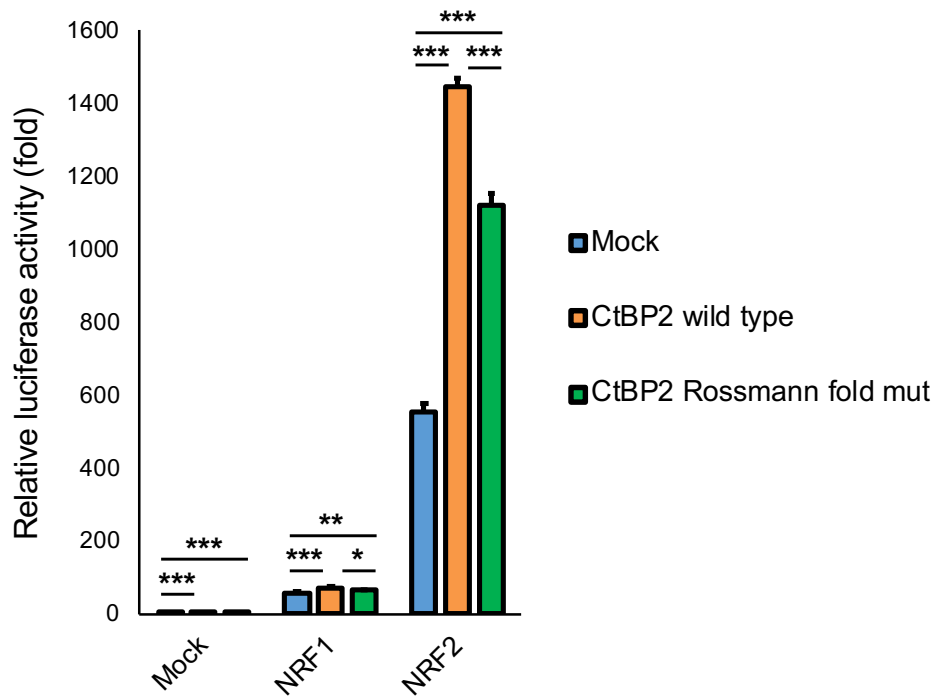


図9. AREを介したNRFの転写活性は、野生型CtBP2に比してレドックスセンサー機能喪失変異型CtBP2の過剰発現で減弱する

U2-OS細胞にAREルシフェラーゼレポーターおよび*Renilla*ルシフェラーゼコントロールレポーターを導入たうえで、Mock、CtBP2またはレドックスセンサー機能喪失変異型(Rossmann fold mut)CtBP2(G189A, G192A)発現プラスミドを導入し、ルシフェラーゼおよび*Renilla*の活性を評価した。

(A) NRF1または2の存在下または非存在下でMock、CtBP2、CtBP2 Rossmann fold mutのそれぞれの過剰発現の影響を比較したAREルシフェラーゼ活性値(n=4、*Renilla*の活性値で標準化、NRF非存在下のMockの活性値を1とした比で示した。)

データは平均値±標準誤差で示した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (one-way ANOVA followed by Tukey's test)

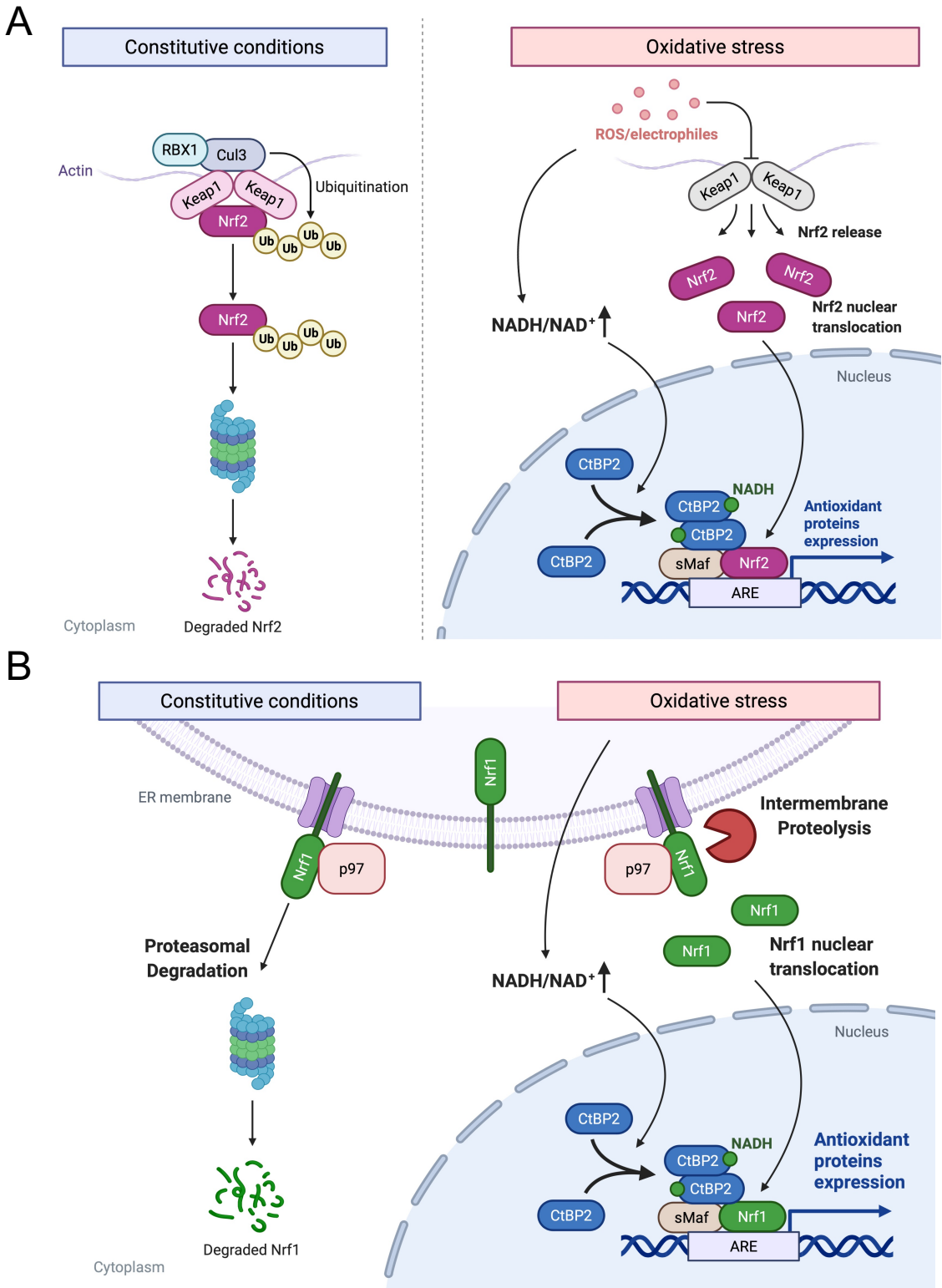


図10. 核内における、レドックスセンサー分子CtBP2を介した新しいNRF1およびNRF2の転写活性制御機構

酸化ストレス環境下で細胞内のレドックス状態が変化すると、核内のCtBP2の活性がレドックスセンサー機能依存的に変化し、転写因子NRFとの複合体形成が促進される。CtBP2とNRFの複合体形成はNRFの転写活性を促進し、標的遺伝子の発現上昇を介して酸化ストレス応答を誘導する。

(A) NRF2とCtBP2の新しい転写活性制御機構。

(B) NRF1とCtBP2の新しい転写活性制御機構。

図は、BioRender.comで作成した。