

## CNC-小Maf二量体による特殊なシス配列認識がつかさどる 多様な生理的機能

大槻 晃史<sup>1,2</sup>, 山本 雅之<sup>2</sup>

### 1. はじめに

我々の体を構成する細胞が正常に機能し続けるためには、環境に応じて適切な遺伝子が発現することが重要である。塩基性領域-ロイシンジッパー (bZIP) 型転写因子であるCNC (cap 'n' collar) 群転写因子とMaf (musculoaponeurotic fibrosarcoma) 群転写因子は、bZIPドメインを介して二量体を形成することで標的DNAモチーフを認識し、遺伝子発現を制御する。これまでに脊椎動物のCNC群転写因子として、NF-E2 (nuclear factor erythroid-derived 2) p45, Nrf1 (NF-E2 related factor 1), Nrf2, およびNrf3の4種類が同定されており、また、Maf群転写因子として、大Maf群因子 (MafA, MafB, c-Maf, Nrl) と小Maf群因子 (MafF, MafG, MafK) が知られている (図1)<sup>1)</sup>。CNC群転写因子は小Maf群転写因子とヘテロ二量体 (CNC-小Maf二量体) を形成することで標的DNAモチーフに結合する。一方で、Maf群転写因子は自身のホモ二量体としても標的DNA配列を認識し、標的遺伝子の発現を制御している。本稿では、Nrf2-小Maf二量体をはじめとするCNC-小Mafヘテロ二量体転写因子が作り出すさまざまな生理機能、およびその基盤となるDNAモチーフ認識について紹介する。

### 2. CNC-小Mafヘテロ二量体の生理的機能

CNC群転写因子はCNCドメインと呼ばれる相同ドメインを共通に持つ転写因子群であり、さまざまな発生的イ

ベントや恒常性維持に関わっていることが知られている (図1)。たとえば、CNC群転写因子の一つであるNrf2は、小Maf群因子と二量体 (Nrf2-小Maf二量体) を形成して機能するが、この二量体は細胞の親電子性物質・外来化学物質 (毒物) に対する防御反応の中核を担っている<sup>2)</sup>。細胞がこれらのストレスにさらされると、Nrf2-小Maf二量体はさまざまな解毒酵素群や抗酸化タンパク質、グルタチオン合成酵素、薬剤トランスポーターなどの生体防御遺伝子の発現を誘導する。実際に、Nrf2遺伝子欠失マウスは外見上明らかな異常を示さず、正常な発育および繁殖が可能であるが、さまざまな化学物質や親電子性ストレスにはきわめて脆弱である。一方、同じCNC群転写因子であるNrf1の遺伝子欠失マウスは胎生後期に貧血を呈し、死亡する。そこで、条件つき遺伝子欠失マウスの作出と解析が行われているが、肝臓特異的Nrf1欠失マウスは脂肪肝を呈する。また、神経細胞特異的Nrf1欠失マウスは、運動失調を伴う成長発育障害を呈する。すなわち、Nrf1はこれらの臓器の発生や恒常性維持に必須の転写因子であることが理解される。NF-E2 p45は血小板の形成や機能に重要な役割を果たしており、その遺伝子欠失マウスは巨核球分化障害と血小板形成不全に伴う出血によって、生後まもなく死亡する。このように、これまでの解析から、CNC-小Maf二量体はそれぞれ固有の機能を担っていること、それらの特異

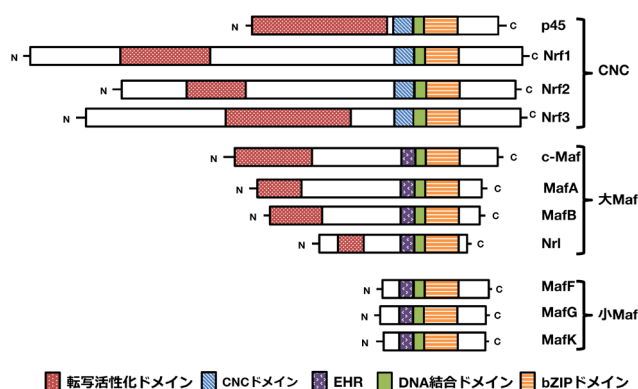


図1 CNC群転写因子とMaf群転写因子のドメイン構造  
CNC群転写因子とMaf群転写因子はbZIPドメインを介して二量体化することで標的DNA配列を認識する。CNC群転写因子はDNA結合ドメインのアミノ末端側にCNCドメインを持つ。小Maf群転写因子は転写活性化ドメインを持たない。

<sup>1</sup> 東北医科薬科大学医学部医化学教室 (〒981-8558 宮城県仙台市青葉区小松島4丁目4-1)

<sup>2</sup> 東北大学大学院医学系研究科医化学分野 (〒980-8575 宮城県仙台市青葉区星陵町2-1)

#### CNC-small Maf heterodimer: Unique cis-element recognition and biological functions

Akihito Otsuki<sup>1,2</sup> and Masayuki Yamamoto<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Division of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Tohoku Medical and Pharmaceutical University, 4-4-1, Komatsushima, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 981-8558, Japan, <sup>2</sup>Department of Medical Biochemistry, Tohoku University Graduate School of Medicine, 2-1 Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8575, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890278

© 2017 公益社団法人日本生化学会

性が主としてCNC因子群の特異的な発現様式により規定されていることが明らかにされている。

さらに、複数のCNC-小Maf二量体が協調して同じ標的遺伝子の発現を制御する局面も報告されている。たとえば巨核球では、p45が血小板関連遺伝子の制御領域の他に、Nrf2の標的である抗酸化関連遺伝子群の制御領域にも結合する。これにより、p45はNrf2による抗酸化遺伝子群の発現を競合的に阻害し、巨核球分化に必要なROSシグナルを積極的に細胞内で誘導するものと考えられる<sup>3)</sup>。また、肝臓ではNrf1とNrf2が協調してシスチン輸送体遺伝子を制御している。非ストレス環境下では、シスチン輸送体遺伝子の制御領域にはNrf1が結合し発現を抑制しているが、ストレス環境下では細胞内に蓄積したNrf2が強力にその遺伝子発現を誘導すると考えられている<sup>4)</sup>。しかし、このようなCNC因子群間の競合やそれに対する小Maf因子の関与などは、まだほとんど手つかずの領域であり、今後に残された課題が多く残されている。

### 3. Maf群転写因子ホモ二量体の生理機能

Maf群転写因子は、転写活性化ドメインを持つ大Maf群因子と、転写活性化ドメインを持たない小Maf群因子に大別される<sup>5)</sup>。どちらもbZIPドメインを介してホモ二量体を形成して標的DNA配列を認識し結合する。大Maf群因子と小Maf群因子は共通して、DNA認識を担う塩基性領域と二量体形成を担うbZIP領域に加えて、EHR (extended homology region) を持つ (図1)。大Maf群因子は、水晶体発生や脾臓のβ細胞におけるインスリン遺伝子発現などさまざまな組織の形成やその恒常性維持に重要な役割を担っている。一方、小Maf群因子は転写活性化ドメインを持たないので、小Mafホモ二量体は標的遺伝子の転写を競合的に抑制する<sup>5)</sup>。

### 4. CNC-小Maf二量体とMafホモ二量体の認識DNAモチーフ

線虫のCNC群転写因子であるSKN-1は単独でDNA標的に配列に結合するが、脊椎動物のCNC群転写因子は単独でDNAに結合できず、また、自身によるホモ二量体もしくはヘテロ二量体を作ることもできない。したがって、標的モチーフの認識との結合には小Maf群因子とのヘテロ二量体形成が必須である。NF-E2 p45と小Maf群因子の二量体 (NF-E2) の認識配列は、NF-E2結合配列 (5'-TGA(G/C)TCAGCA-3') と呼ばれる<sup>6,7)</sup>。一方、Nrf1やNrf2と小Maf因子のヘテロ二量体の標的モチーフは抗酸化剤応答配列または親電子性物質応答性配列 (ARE/EpRE: 5'-(A/G)TGA(G/C)NNNGC-3') と呼ばれる<sup>8-10)</sup>。このように、NF-E2結合配列とARE/EpRE

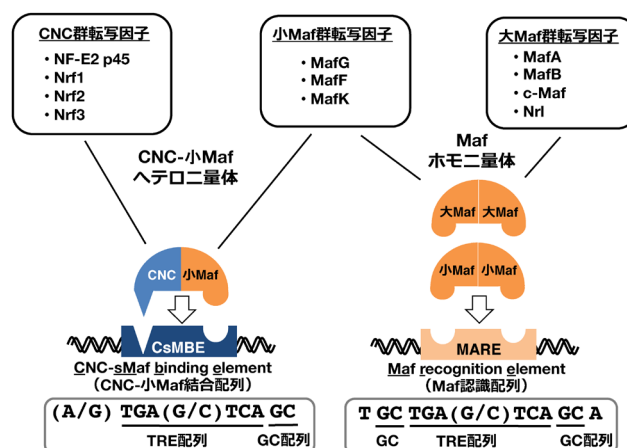


図2 CNC転写因子およびMaf転写因子が認識するDNAモチーフ

CNC-小Maf二量体はGC配列をモチーフの一端に持つCsMBE配列に対して親和性が高い。一方、Mafホモ二量体はモチーフ両端にGC配列を持つモチーフであるMAREを認識する。

配列はコンセンサス配列にすると同一の配列であることから、筆者らはこれらを総称して、CsMBE (CNC-sMaf binding element) と呼ぶことを提唱している (図2左)<sup>11)</sup>。

特徴的なことは、いずれの配列の場合も、モチーフ中央に転写因子AP-1 (Jun-Fos二量体) の結合配列として知られているTRE配列 (TPA-responsive element: TGA(G/C)TCA) が存在することである。CsMBE (ARE/EpRE) は、さらにその一方の隣接領域にGC配列を持つ。GC配列の反対側の隣接領域の塩基はAまたはGである。この隣接領域のわずかな違いは、結合する転写因子の違いを生み出し、それを基盤とした遺伝子発現制御の特異性を形成している点で、シストロームと呼称されるDNA配列側が積極的に作り出す遺伝子発現制御の見事な典型例となっている。

Maf群因子ホモ二量体が認識するDNAモチーフ解析から、さらに重要なシストローム制御の例が浮かび上がってくる。Maf群因子ホモ二量体は、Maf認識配列 (MARE; Maf recognition element) と呼ばれる回文状のコンセンサス配列 (5'-TGCTGA(G/C)TCAGCA-3') に結合する (図2右)<sup>12,13)</sup>。この配列は、モチーフ中央のTRE配列 (下線) と、その両端のGC配列 (イタリック) からなる。配列両端のGC配列はMafホモ二量体が強く結合するために重要である。これまで、CsMBEとMAREへの転写因子結合における配列特異性は比較的低いと考えられていたが、筆者らは最近、網羅的クロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-Seq) 解析と網羅的RNA-Seq解析を組み合わせた解析を実施し、CsMBEとMAREを認識する転写因子二量体には明らかな差異があり、CNC-小Maf二量体は前者を、Mafホモ二量体は後者を認識することを明らかにした。そのようすを図2にまとめて示す。なお、CNC-小Maf二量体でも、標的遺伝

子制御領域のコンテキストに応じてMAREを認識する場合や、逆にMafホモ二量体でもCsMBEを認識する場合が存在するが、筆者らの解析からはそれらは例外的であった。

ところで、小Maf群因子であるMafGホモ二量体のタンパク質結晶構造解析によって、DNA結合ドメインのアルギニン残基 (Arg57) とアスパラギン残基 (Asn61) がMARE両端のGC塩基と相互作用していることが示されている<sup>14)</sup>。MAREはCsMBEときわめてよく似た配列であるが、前者はTREコア配列の両端にGCを持つのに対し、後者のGC配列はモチーフの片側のみに存在するという点が異なっていることに留意されたい。

## 5. CNC群およびMaf群転写因子によるDNAモチーフ認識の分子基盤

Nrf2-小Maf二量体とMafホモ二量体のDNA配列指向性の違いを生み出す分子基盤として最も重要なのは、CNC群転写因子とMaf群転写因子のDNA結合ドメインにおけるアミノ酸配列の違いである。筆者らは、CNC群転写因子とMaf群転写因子のDNA結合ドメインの比較から、それぞれの群内ではよく保存されているが、両群間では大きく異なるアミノ酸残基が存在することに気がついた。図3Aに示すように、マウスNrf2の502番目のアミノ酸残基はアラニン(A)であり、これは多くの動物種のCNC群転写因子間で強く保存されていた。一方、Maf群転写因子ではこの位置のアミノ酸残基はチロシン(Y)であり、こちらも多くの動物種のMaf群因子間で強く保存されていた。

重要な知見は、MafGでこのチロシン残基に相当するTyr64が前述の直接DNAに結合するArg57やAsn61との間で分子内相互作用することであり、この相互作用を通してこれらのアミノ酸残基がGC塩基を認識することができるようになったものと考えられる<sup>14)</sup>。すなわち、Maf因子群にCNC因子群と決定的に異なる特徴的なDNA結合能を与えたのは、このチロシン残基の存在であると推察される。

そこで、筆者らはCNC群転写因子Nrf2においてMafG<sup>Y64</sup>の相同アミノ酸であるNrf2<sup>A502</sup>をチロシンに置換して、DNA結合ドメインのアミノ酸残基をCNC群因子のものからMaf群因子のものに変換した変異体分子(Nrf2<sup>A502Y</sup>)を作製した。本分子のDNA配列指向性を解析したところ、Nrf2<sup>A502Y</sup>-MafG二量体はMafGホモ二量体と同様に、MAREに対して高い親和性を示した<sup>15)</sup>。すなわち、CNC群因子とMaf群因子のDNA結合ドメインにおけるアラニン残基とチロシン残基の違いが、それらの間のDNA配列指向性の違いを作り出しているものと結論される。

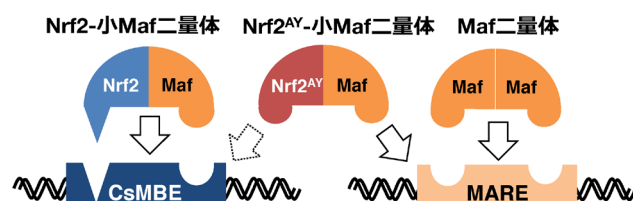
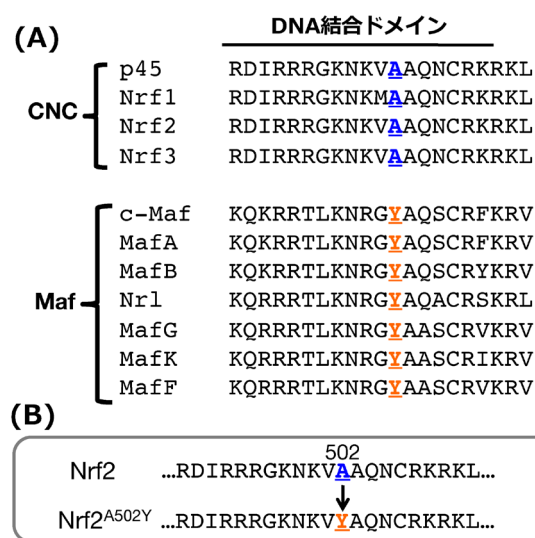


図3 CsMBEおよびMARE認識の分子基盤  
 (A) CNC群およびMaf群転写因子のDNA結合ドメインのアミノ酸配列。DNA結合ドメインにおけるアラニン(A)とチロシン(Y)の違いが、CNC群転写因子とMaf群転写因子におけるDNA配列指向性の違いを作り出している。(B) Nrf2のアラニンをチロシンに置換した変異体(Nrf2<sup>A502Y</sup>)はCsMBE指向性を失い、MAREに対しての親和性を獲得する。

## 6. 酸化ストレス応答におけるCsMBE認識の特異性

筆者らは次いで、このような特異的なCsMBE認識とMARE認識がCNC-小Maf二量体やMafホモ二量体に与えた機能の実態と、それらが動物の発生や恒常性維持においてどれほど重要であるかを明らかにするために、Nrf2の代わりにNrf2<sup>A502Y</sup>を発現する遺伝子改変(ノックイン)マウスを樹立し、解析した<sup>11)</sup>。

まず、Nrf2<sup>A502Y</sup>分子が個体レベルでも認識配列が変化していることを確認するために、樹立したNrf2<sup>A502Y</sup>ノックインマウスの腹腔マクロファージを用いて、親電子性ストレス条件下でChIP-Seq解析を行った。その結果、ゲノム上でのNrf2<sup>A502Y</sup>結合部位は野生型Nrf2の結合部位とは大きく異なっており、Nrf2<sup>A502Y</sup>結合領域で高頻度に観察されるコンセンサス配列は、Mafホモ二量体の標的コンセンサス配列であるMARE様の配列であった(図3B)。

次に、Nrf2-小Maf二量体のCsMBE指向性の喪失に伴って、どのような遺伝子発現の変化が生じるかを網羅的に解析するために、網羅的なRNA-Seq解析を行った。野生型マクロファージでは親電子性物質に応答して、グルタチオ



ン合成や過酸化水素の消去に関わるさまざまな生体防御遺伝子群の発現が誘導されるが、Nrf2<sup>A502Y</sup>マクロファージではこれらの遺伝子発現は著しく減弱していた。

そこで筆者らは、CsMBE認識喪失に伴う生体防御遺伝子発現誘導の低下が、マウス個体が持つ外来化学物質応答能に及ぼす影響を調べるため、アセトアミノフェン急性肝障害モデルを用いた検討を行った。アセトアミノフェンの中間代謝産物は強力な親電子性物質であり、野生型マウスにも顕著な酸化ストレスと肝毒性を引き起こすが、Nrf2<sup>A502Y</sup>マウスは野生型マウスよりもさらに著しい肝障害マーカーの上昇を示し、肝壊死の増悪も認められた。これらのことから、Nrf2-小Maf二量体はCsMBEとMAREとの間のわずかなDNA配列上の違いを認識して第II相解毒酵素や抗酸化酵素を選択的に発現誘導する機能を獲得したこと、すなわち、生体は転写因子認識のコンセンサス配列のわずかな違いを利用して、遺伝子発現の多様性を創造し、生体の機能維持を実現してきたことが理解される。

## 7. おわりに

本稿で紹介した一連の研究により、Nrf2-小Maf二量体は標的DNA配列のわずかな違いを正確に認識して、Maf二量体やAP-1転写因子との機能的差異を獲得してきたことが明らかとなった。このようなシストローム制御の分子基盤には、CNC群因子とMaf群因子との間のたった一つのアミノ酸残基の違いが関わっていると考えられる。シストローム制御に加えて、複数のCNC-小Maf二量体による遺伝子発現制御にはさらに複雑な標的遺伝子選択機構が関わっているとも考えられ、この点でもCNC-小Maf二量体の研究領域は今後の非常に興味深い研究課題を提供している。

## 文 献

- 1) Motohashi, H., O'Connor, T., Katsuoka, F., Engel, J.D., & Yamamoto, M. (2002) *Gene*, **294**, 1–12.
- 2) Itoh, K., Igarashi, K., Hayashi, N., Nishizawa, M., & Yamamoto, M. (1995) *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 4184–4193.
- 3) Motohashi, H., Kimura, M., Fujita, R., Inoue, A., Pan, X., Takayama, M., Katsuoka, F., Aburatani, H., Bresnick, E.H., & Yamamoto, M. (2010) *Blood*, **115**, 677–686.
- 4) Tsujita, T., Peirce, V., Baird, L., Matsuyama, Y., Takaku, M., Walsh, S.V., Griffin, J.L., Urano, A., Yamamoto, M., & Hayes, J.D. (2014) *Mol. Cell. Biol.*, **34**, 3800–3816.
- 5) Katsuoka, F. & Yamamoto, M. (2016) *Gene*, **586**, 197–205.
- 6) Mignotte, V., Eleouet, J.F., Raich, N., & Romeo, P.H. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6548–6552.
- 7) Fujita, R., Takayama-Tsujimoto, M., Satoh, H., Gutiérrez, L., Aburatani, H., Fujii, S., Sarai, A., Bresnick, E.H., Yamamoto, M., & Motohashi, H. (2013) *Mol. Cell. Biol.*, **33**, 2659–2670.
- 8) Friling, R.S., Bensimon, A., Tichauer, Y., & Daniel, V. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 6258–6262.
- 9) Rushmore, T.H., Morton, M.R., & Pickett, C.B. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 11632–11639.
- 10) Hirotsu, Y., Katsuoka, F., Funayama, R., Nagashima, T., Nishida, Y., Nakayama, K., Engel, J.D., & Yamamoto, M. (2012) *Nucleic Acids Res.*, **40**, 10228–10239.
- 11) Otsuki, A., Suzuki, M., Katsuoka, F., Tsuchida, K., Suda, H., Morita, M., Shimizu, R., & Yamamoto, M. (2016) *Free Radic. Biol. Med.*, **91**, 45–57.
- 12) Kataoka, K., Noda, M., & Nishizawa, M. (1994) *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 700–712.
- 13) Kerppola, T.K. & Curran, T. (1994) *Oncogene*, **9**, 3149–3158.
- 14) Kurokawa, H., Motohashi, H., Sueno, S., Kimura, M., Takagawa, H., Kanno, Y., Yamamoto, M., & Tanaka, T. (2009) *Mol. Cell. Biol.*, **29**, 6232–6244.
- 15) Kimura, M., Yamamoto, T., Zhang, J., Itoh, K., Kyo, M., Kamiya, T., Aburatani, H., Katsuoka, F., Kurokawa, H., Tanaka, T., Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 33681–33690.

## 著者寸描

### ●大槻 晃史 (おおつき あきひと)



東北医科薬科大学医学部医化学教室助教。博士 (医学)。

■略歴 2011年東北大学歯学部卒業。15～16年日本学術振興会特別研究員。16年東北大学大学院医学系研究科博士課程修了。同年4月より現職。

■研究テーマと抱負 CNC-Maf群転写因子による遺伝子発現制御機構。特にNrf2による環境ストレス応答機構の分子メカ

ニズムを理解することで、がんや炎症などの疾患の分子基盤を理解したいと考えています。

■ウェブサイト <http://www.tohoku-mpu.ac.jp>

■趣味 季節に応じたスポーツ全般。