

# レドックスセンサーBach1による細胞増殖の新規制御法

小川 和宏 [東北大学大学院医学系研究科／助手]

## 背景・目的

Maf recognition element(MARE)に結合するbasic leucine zipper(bZip)型転写活性化因子のDNA結合活性は、レドックスにより調節されることが知られている。この中には、増殖への関与が示されている転写活性化因子AP-1も含まれる。一方bZip型の転写抑制因子であるBach1は、小Mafタンパク質とヘテロダイマーを形成して、MAREに結合する。今回我々は、レドックスによる転写調節のメカニズムの一端を明らかにするため、MAREに結合する転写抑制因子が還元剤や内因性ラジカルである一酸化窒素(NO)により、機能調節されるかを検討した。

## 内容・方法

Glutathione S-transferase(GST)融合Bach1(GST-Bach1)や、その一部のシステイン残基をアラニンに置換した誘導体、FLAG-Tagを付したMafK(MafK-FLAG)を大腸菌で発現させ、Glutathione Sepharoseビーズ(Pharmacia)などを用いて精製した。これらのタンパク質を透析した後、Microcon YM-100, Microcon YM-50, Centricon Plus-20(Millipore)などを用いて濃縮した。

ジゴキシゲニンでラベルしたMAREを含むオリゴDNAをプローブにして、調製したBach1誘導体とMafK-FLAGを用いてゲルシフトアッセイを行った。この実験系で、還元剤であるdithiothreitol(DTT)や、種々のNO供与体によって、Bach1/MafKヘテロダイマーのDNA結合が変化するかを調べた。

## 結果・成果

まずDTTを0.1mM, 0.5mM, 1.0mM, 5.0mMの最終濃度になるよう加えたところ、いずれの濃度でもBach1/MafKヘテロダイマーはDNAに結合したが、DTTを添加しない条件では結合が見られなかった。したがってこの結合には還元力が必要と考えられた。

Bach1にはヘムが直接結合して、DNA結合を阻害すること、またBach1とヘムの結合にはシステインープロリンの2アミノ酸から成るCPモチーフが必要であることを、既に我々は報告している。そこでヘム結合に必要な、CPモチーフのシステインをアラニンに置換した変異体を用いて、同様にDTT濃度を変えて還元力の影響を調べた。すると、変異型のDNA結合は天然型と同じくDTT依存性であったため、CPモチーフのシ

ステイン残基は、DTTによるBach1/MafKのDNA結合調節には関与していないと考えられた。

次に、5 mM DTT存在下において、Sodium nitroprusside(SNP)、S-Nitroso-N-acetyl-DL penicillamine(SNAP)、1-Hydroxy-2-oxo-3-(N-ethyl-3-aminoethyl)-3-ethyl-1-triazene(NOC12)などのNO供与体によって、結合が変化するかを調べた。その結果、SNPとSNAPは濃度依存的にBach1/MafKのDNA結合を阻害したが、NOC12は1mMまでの濃度でほとんど阻害しなかった。Bach1/MafKのDNA結合を阻害したSNPとSNAPについて、その阻害作用が反応液中のDTT濃度により影響を受けるかを、0~5mMの範囲で調べた。すると、DNA結合阻害に必要なSNAP濃度は、反応液中のDTT濃度にほぼ比例して高くなったが、阻害に必要なSNP濃度に対するDTT濃度の影響は弱かった。したがってBach1/MafKのDNA結合は、NOC12では阻害されず、SNPとSNAPでは阻害されるが、その阻害作用はSNAPのみがDTT濃度に高感受性であった。これらの結果より、Bach1/MafKヘテロダイマーのDNA結合は一部のNO供与体により阻害されるが、その阻害様式はNO誘導体の種類によって異なる可能性が示唆された。

今回の転写抑制因子Bach1の解析で、還元剤、NO供与体、CPモチーフのシステイン残基による、DNA結合の調節の有無などが明らかになった。

## 今後の展望

これまでのbZip型転写因子の機能調節に関する研究は、AP-1やNrf2、NF-E2など転写活性化因子が中心であった。これらの転写活性化因子は、MAREなどのDNA配列に結合して機能を発揮するが、そのDNA結合においてBach1などの転写抑制因子により競合され、両者のバランスによって標的遺伝子の転写レベルが調節される。今回の転写抑制因子の解析結果を基に、MAREやMARE結合性転写因子による転写調節機構をさらに詳しく解析し、細胞増殖や酸化的ストレス応答、さらには疾患との関連を明らかにして、応用に向けた基礎的技術を構築したい。