

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-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、5mM 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 濃度には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 濃度の高感受性であった。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。