

# 論文内容の要旨

論文題目 哺乳類ミトコンドリア翻訳因子の転写制御機構に関する研究

氏名 林 立平

## 背景

ミトコンドリアは、酸化的リン酸化によって ATP を産生し、脂質合成、アポトーシスの制御などに関わる細胞内器官である。ミトコンドリアには独自の蛋白質合成系が存在し、電子伝達系の一部のサブユニットを合成する。ミトコンドリアの蛋白質合成に用いられる ribosomal RNA、transfer RNA はミトコンドリアゲノムにコードされており、翻訳因子、リボソーム蛋白質は核ゲノムにコードされている。ミトコンドリアゲノム、核ゲノムの変異によって transfer RNA、リボソームの機能異常、翻訳因子の蛋白質量の減少が見られ、ミトコンドリア脳筋症や言語習得前難聴、致死性肝障害などを引き起こす。これらの疾患の発症機構を解明し、治療につなげるためには、ミトコンドリアの蛋白質合成の分子機構や、翻訳因子の遺伝子発現制御機構を明らかにすることが重要である。本論文では、蛋白質合成に必須の遺伝子である翻訳開始因子 initiation factor 2 遺伝子に関してプロモーター解析を行ない、転写に関わる転写因子を同定することを目指した。続いて、同定した転写因子がどのようにミトコンドリア翻訳因子の転写調節を行なっているかについて調べていくことにした。

## 実験結果

1. NRF-2 は human mitochondrial translation initiation factor 2 (hIF2mt) 遺伝子の転写を促進する。

核ゲノムにコードされる hIF2mt 遺伝子の転写開始点の上流約 1.6kb を用い、hIF2mt の転写促進に必要な領域(プロモーター領域)を決定した。hIF2mt 遺伝子上流配列を段階的に削って luciferase 遺伝子上流に組み込んだプラスミドを調製し、HEK293T 細胞に導入する実験を行なった( reporter assay )。その結果、91 塩基上流から 6 塩基下流の領域(-91/+6)で hIF2mt 遺伝子の転写に十分であること、また、-91/-54、-54/-41 が転写促進に必要であることが分かった。

次に hIF2mt プロモーター中で転写促進に寄与するシスエレメントを同定することを試みた。IF2mt の転写開始点付近の塩基配列は、哺乳類で保存性が高く、転写因子 nuclear respiratory

factor 2 (NRF-2)の推定認識配列が高度に保存されていた。HEK293T 細胞の核抽出液と、competitor DNA、NRF-2 の二つのサブユニット( $\alpha$ : DNA に直接結合する、 $\beta/\gamma$ :  $\alpha$  に結合し、転写促進に必須。同一の遺伝子座から発現し、択一的スプライシングによって C 末の数十アミノ酸のみが異なる。)に対する抗体を用いた EMSA を行ない、NRF-2 が-79/-70、-52/-44 の二箇所配列特異的に結合することを明らかにした。また、reporter assay を用いて、二つの NRF-2 結合部位が hIF2mt プロモーターの転写活性に必要であること、NRF-2 が hIF2mt プロモーターの転写を促進することが分かった。

さらに、ChIP assay を行ない、NRF-2 が HEK293T 細胞内で hIF2mt 遺伝子の転写開始点近傍に特異的に結合していることを明らかにした。また、ヒト全ゲノム遺伝子の推定転写開始点近傍の塩基配列を調べた *in silico* 解析から、NRF-2 の認識配列がミトコンドリアの蛋白質合成に関わる遺伝子の転写開始点近傍に高頻度で見られることが分かった。このことから、NRF-2 はミトコンドリア翻訳因子遺伝子の転写に広く関与することが示唆された。

## 2. NRF-2 を介したミトコンドリア翻訳因子遺伝子の転写調節機構

NRF-2 が細胞又は組織のエネルギー需要に応じて、ミトコンドリア翻訳因子などの酸化的リン酸化に関わる遺伝子の転写をどのように制御しているかは殆ど理解されていない。NRF-2 $\alpha$ 、NRF-2 $\beta/\gamma$  は哺乳動物の殆どの組織で発現しているが、NRF-2 の転写促進に必須なサブユニット  $\beta/\gamma$  は、組織間で発現量比が異なり、ミトコンドリア含有量が多い組織では NRF-2 $\beta$  の割合が高く、ミトコンドリア含有量の少ない組織では NRF-2 $\gamma$  の割合が高いことが知られる。NRF-2 $\beta$  の方が NRF-2 $\gamma$  よりも転写促進活性が高く、NRF-2 $\beta/\gamma$  の使い分けによって組織間でのミトコンドリア翻訳因子の発現量が調節されていると考えられる。ところが、NRF-2 $\beta/\gamma$  で転写促進活性に差が見られる原因は分かっておらず、本論文で調べていくことにした。

### 2-1. NRF-2 $\beta$ は NRF-2 $\gamma$ よりも核内に局在する効率が高いために転写促進活性が高くなる。

NRF-2 $\beta$  と NRF-2 $\gamma$  で相互作用する転写補因子が異なるために、転写促進活性に差が見られるのではないかと仮説を立て、tandem affinity purification 法 (TAP 法)を用いて、NRF-2 $\beta/\gamma$  と相互作用する細胞内因子を探索した。NRF-2 $\beta$  の N 末に FLAG タグを C 末に protein A タグを付加した construct を作製し、HEK293T 細胞に発現させて TAP を行なったが、有意に相互作用する因子は同定できなかった。

ところが、TAP の条件検討を行なう過程で、HEK293T 細胞の細胞分画を行なうと、NRF-2 $\beta$  に比べて NRF-2 $\gamma$  では核画分に含まれる割合が低いことを見出した。そこで、NRF-2 $\beta/\gamma$  の転写促進活性の違いは核に局在する効率の違いを反映しているのではないかと考え、NRF-2 $\beta$  と NRF-2 $\gamma$  に SV40 T-antigen 由来の核移行シグナル (NLS) を付加して核内局在を促進させる construct を作製し、reporter assay を行なって転写促進活性を比較したところ、NRF-2 $\beta/\gamma$  で差が見られなくなることが分かった。また、これまでの報告からも、GAL4-DNA binding domain (GAL4-DBD)融合蛋白質の転写促進活性を調べた場合、NRF-2 $\beta/\gamma$  に差が見られないことが示さ

れている。GAL4-DBD 融合蛋白質は顕著に核に局在する。SV40 T-antigen 由来 NLS または GAL4-DBD で核内局在を促進すると、NRF-2 $\beta/\gamma$  の転写促進活性に差が見られなくなることから、NRF-2 $\beta/\gamma$  の転写促進活性の差は核に局在する効率が異なることを反映しており、核内での NRF-2 $\beta/\gamma$  の転写促進活性はほぼ同じであることが示唆された。

2-2. NRF-2 $\alpha\beta/\alpha\gamma$  は importin- $\alpha$ :importin- $\beta$  によって核に運ばれる。

NRF-2 $\beta/\gamma$  の核内局在に違いを生じさせる原因は何であるか？また NRF-2 は、神経細胞を活性化させる刺激を与えると細胞質から核内に蓄積し、cytochrome *c* oxidase subunit 遺伝子の転写を促進することが知られる。このことから、NRF-2 の核内輸送制御は細胞のエネルギー需要の変化に応答する手段の一つであると考えられる。これらの背景から、NRF-2 $\alpha\beta/\alpha\gamma$  の核内輸送機構を明らかにしたいと考えた。

NRF-2 $\alpha$ 、NRF-2 $\beta/\gamma$  の欠損変異体と部位特異的変異体の細胞内局在を調べる実験から、NRF-2 $\alpha$ 、NRF-2 $\beta/\gamma$  それぞれの核移行シグナルを同定した(NRF-2 $\alpha$ : Ets domain、320/454、NRF-2 $\beta/\gamma$ : 311/321)。界面活性剤で細胞膜を破碎して、外から加える GFP 融合蛋白質の核内局在を調べる実験(*in vitro* nuclear import assay)から、NRF-2 $\alpha$  単独での核内輸送は NRF-2 $\beta$  を加えると阻害されること、NRF-2 $\alpha\beta$  は蛋白質の核内輸送因子の一つである importin- $\alpha$ :importin- $\beta$  複合体によって核に運ばれることが分かった。また、NRF-2 $\beta$  の核移行シグナルに変異を導入した変異体を細胞内で発現させると NRF-2 $\alpha$  の核内輸送が阻害されることから、NRF-2 $\alpha\beta$  の核内輸送は NRF-2 $\beta$  の核移行シグナルに依存することが分かった。一方で、NRF-2 $\alpha\gamma$  も NRF-2 $\alpha\beta$  と同様に importin- $\alpha$ :importin- $\beta$  と結合すること、*in vitro* nuclear import assay で GFP-NRF-2 $\gamma$  と GFP-NRF-2 $\beta$  はほぼ同程度の効率で核に運ばれたことから、少なくとも *in vitro* では、NRF-2 $\alpha\beta/\alpha\gamma$  の核内輸送効率に差は見られないことが分かった。

## 結語

hIF2mt 遺伝子のプロモーター解析を行ない、転写因子 NRF-2 が hIF2mt 遺伝子の転写を促進することを明らかにした。NRF-2 は転写促進活性の異なる  $\beta/\gamma$  サブユニットの発現量比を変えることでミトコンドリア翻訳因子遺伝子の転写量を調節することが知られる。細胞内局在を調べる実験から NRF-2 $\beta$  は NRF-2 $\gamma$  よりも核に局在する効率が高いこと、そのために転写を促進する活性が高くなることが分かった。これにより、NRF-2 を介したミトコンドリア翻訳因子遺伝子の転写調節メカニズムの一端が明らかになった。

また、NRF-2 $\beta/\gamma$  の核局在効率の違いを明らかにするために NRF-2 $\alpha\beta/\alpha\gamma$  の核内輸送経路を調べた。NRF-2 $\alpha\beta/\alpha\gamma$  の核内輸送は NRF-2 $\beta/\gamma$  の NLS に依存し、NRF-2 $\alpha\beta/\alpha\gamma$  は importin- $\alpha$ :importin- $\beta$  によって核に運ばれることを明らかにした。しかし、*in vitro* では NRF-2 $\alpha\beta/\alpha\gamma$  の輸送効率に差が見られていない。今後の研究で、細胞内で NRF-2 $\beta/\gamma$  の核内局在効率の違いを生じさせる原因を解明し、NRF-2 を介したミトコンドリア翻訳因子遺伝子の転写調節機構が更に詳細に明らかにされることが期待される。