

論文審査の結果の要旨

氏名 林 立平

本論文は 2 章からなり、第 1 章はヒトミトコンドリア翻訳開始因子 IF2 (hIF2mt) の転写促進に必要な因子 NRF-2 を同定した内容について、第 2 章は NRF-2 の転写促進に必要な β/γ サブユニットが、核に局在する効率が異なるために転写促進活性に差が生じることを示し、そのメカニズムを明らかにすべく、NRF-2 の核内輸送機構の解析を行なった内容について述べられている。

第 1 章では、まず、哺乳類ミトコンドリア翻訳因子の一つ、hIF2mt 遺伝子について、レポーターアッセイによって転写促進に必要なゲノム領域（プロモーター領域）を決定した。ゲルシフトアッセイとクロマチン免疫沈降の実験を行ない、*in vitro* 及び *in vivo* で NRF-2 がプロモーター領域に特異的に結合することを示した。また、レポーターアッセイによって NRF-2 結合部位が hIF2mt 遺伝子の転写促進に必要であることを明らかにした。これまで、hIF2mt を含むいくつかのミトコンドリア翻訳因子で転写開始点近傍に NRF-2 の推定認識部位が存在することが知られていたが、本論文で、それが転写促進に必要であり、*in vivo* で NRF-2 が転写に関与していることを初めて実証した。また、*in silico* 解析によって、NRF-2 の認識配列がミトコンドリア翻訳因子遺伝子の転写開始点近傍に高頻度で出現することを明らかにした。この結果は、NRF-2 がミトコンドリア翻訳因子の転写に広く関与することを意味している。

NRF-2 は、DNA に結合する α サブユニットと転写促進に必要な β/γ サブユニットで構成される。 β/γ サブユニットは、ミトコンドリア含量の異なる組織で存在量比が異なることが知られ、 β/γ の発現量比の調節は、ミトコンドリア蛋白質の発現量を調節するメカニズムの一つであると考えられている。第 2 章では、NRF-2 によるミトコンドリア翻訳因子の転写調節機構の一例として、 β/γ サブユニットの差異に着目して解析を行なっている。Reporter plasmid と β/γ サブユニットを培養細胞に co-transfection する実験から、 β サブユニットの方が γ サブユニットよりも転写を促進する活性が高いことが示されているが、そのメカニズムは明らかにされていない。本論文では、 β サブユニットの方が γ サブユニットよりも核に局在する効率が低いことを見出した。また、 γ サブユニットに既知の核移行シグナルを付加して核局在の効率を高くすると β サブユニットと同程度の転写促進活性を持つことを示した。これまで、 β/γ サブユニットは共通の領域に核移行シグナルが存在することが示唆されており、転写促進活性の差は β/γ の核内での違いに起因すると考えられてきたが、本論文ではそれを否定し、 β/γ の核局在効率の違いを反映していることを明らかにした。

β/γ サブユニットの核局在効率の違いを明らかにするために、第 2 章ではさらに、NRF-2 α 、

NRF-2 β/γ の核内輸送の分子機構について解析を行なっている。それぞれのサブユニット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と、*in vitro* 核移行の実験から、 α サブユニットと β/γ サブユニットは単独でも核に運ばれるが、 α サブユニットと β/γ サブユニットが複合体を形成した場合、 $\alpha\beta/\alpha\gamma$ の核内輸送は β/γ サブユニットに依存することを示した。NRF-2 α は Ets domain と呼ばれる DNA 結合ドメインを持つ転写因子ファミリーに属している。多くの場合、核内輸送は Ets protein 自身に委ねられるが、NRF-2 の場合は Ets protein とは異なるサブユニットに委ねられるという特異なメカニズムが明らかにされた。このことの生理的意義は、転写促進活性を持つ $\alpha\beta/\alpha\gamma$ 複合体のみが核に運ばれることを保証することと、 β/γ サブユニットの核局在効率の違いを生み出すことができることにありと考えられる。本論文では、 β/γ サブユニットは共通の核移行シグナルを持ち、共に importin- α :importin- β によって核に運ばれることを示した。細胞内で β/γ サブユニットの核局在効率の差を生み出す仕組みを明らかにすることが今後の課題である。

本論文は、哺乳類ミトコンドリア翻訳因子の転写に NRF-2 が関与していることを明確にしたことと、NRF-2 がサブユニット間での細胞内局在の違いを利用して転写調節を行なっていることを初めて示し、NRF-2 による転写調節機構に新しい側面を付け加えたことが評価される。

なお、本論文第 1 章は、米国東カロライナ大学、Mary Farwell 博士との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行なったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。