

# 転写因子 NRF2 の機能ドメインの解析

太田 力

常葉大学保健医療学部理学療法学科

## 要 旨

肺癌は抗癌剤の効果が低い難治癌の一つであり、有効な抗癌剤が強く望まれている。私は肺癌の 20% 以上において、転写因子 Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (NRF2) 遺伝子の異常活性化が引き起こされ、抗癌剤の効果を減弱化している要因となっていることを見出した。さらに、NRF2 遺伝子が異常活性化している肺癌細胞株に対して small interfering RNA (siRNA) を作用させ NRF2 遺伝子の発現を抑制することにより、癌細胞増殖能を 90% 以上抑制できることを発見した。これらの発見から、転写因子 NRF2 の酵素活性を阻害できれば、肺癌治療に利用できる可能性が示唆された。転写因子 NRF2 は複数の機能的なドメインから構成されており、その一つである NRF2 ECH homology 6 (Neh6) ドメインは、NRF2 タンパク質の分解促進に関与することが知られている。本研究では、Neh6 ドメインの新たな機能として、NRF2 タンパク質の転写活性を阻害する機能をもつことを突き止めた。Neh6 ドメインによる NRF2 タンパク質の阻害メカニズムの解明は、肺癌で暴走している転写因子 NRF2 を阻害する薬剤の開発のヒントになると考えている。

キーワード：肺癌治療、転写因子 NRF2, Neh6 ドメイン、転写制御

## はじめに

日本では毎年 7 万人以上が肺癌によって死亡しており、更にその死亡率、罹患率は増加傾向にある。肺癌は手術による治療が中心であるが、進行癌あるいは術後再発に対する集学的治療の中でも化学療法に対する期待は高い。しかし、肺癌に対する抗癌剤の効果は未だ不十分である。最近、幾つかの癌で分子標的薬がその効果を発揮することが示されているが、肺癌においては上皮成長因子受容体 Epidermal Growth Factor Receptor

(EGFR) や血管内皮細胞増殖因子 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) を標的とした薬剤の効果が報告されているに過ぎない。従って、肺癌において有効な抗癌剤開発や抗癌剤の効果を増進する技術開発が強く望まれている。特に、肺癌の 8 割以上を占める非小細胞癌に対する抗癌剤の効果は非常に低いのが現状である。そこで、私は遺伝子発現解析を利用して非小細胞肺癌において抗癌剤の効果を減弱化している因子を見出すことを目的として研究を進めてきた。非小細胞癌

に属し、組織型の違いによって分類されている肺腺癌および肺扁平上皮癌の手術組織から樹立された複数の癌細胞株を、肺癌治療で使われる抗癌剤の一つであるシスプラチンに対する効果を調べたところ、低濃度のシスプラチンで細胞増殖が、抑制される細胞株（抗癌剤感受性細胞株）と抑制され難い細胞株（抗癌剤抵抗性細胞株）があることがわかった。そこで、これらシスプラチンに対する効果の異なる癌細胞株について、DNA マイクロアレイを用いた約 23,000 種類の遺伝子の mRNA の発現量解析（網羅的遺伝子発現解析）を行い、抗癌剤感受性細胞株と抗癌剤抵抗性細胞株で異なる発現をしている遺伝子の探索を行った。その結果、抗癌剤抵抗性細胞株を特徴付ける遺伝子として約 200 種類が見出され、それらの遺伝子の中には解毒酵素の遺伝子が多数含まれていた（未発表データ）。この解析から、非小細胞肺癌の抗癌剤の効果を減弱化している要因の一つに、癌細胞自体が多くの解毒酵素を過剰量発現していることが考えられた。抗癌剤抵抗性細胞株を特徴付ける遺伝子に含まれていた、多くの解毒酵素（第二相解毒酵素）は、転写活性化因子 NRF2 と転写抑制因子 KEAP1（Kelch-like ECH associated protein 1）によって転写レベルで発現が制御されていることが知られていた<sup>1)</sup>。通常、細胞内に抗癌剤（求電子試薬等）が存在しない状態では、転写因子 NRF2 は KEAP1 タンパク質によって細胞質に留め置かれ、細胞核内に入ることが出来ずに転写活性は負に制御されている（図-1A 左）。従って、抗癌剤が投与されていない状態では、細胞内では解毒酵素の遺伝子は発現が抑制されている。一方、抗癌剤が投与されると、細胞内では抗癌剤により KEAP1 タンパク質にシグナルが入り、転写因子 NRF2 は KEAP1 タンパク質から離れ、細胞核内に移行する。細胞核内に移行した NRF2 タンパク質は、small musculoaponeurotic fibrosarcoma (小 MAF)

に属する 3 つの MAFE, MAFF, MAFG タンパク質の一つとヘテロダイマーを形成して、解毒酵素遺伝子のプロモーター領域に結合し、転写を強力に誘導する（図-1A 右）。

抗癌剤抵抗性細胞株においては、細胞内に抗癌剤が存在しない状態で、多くの解毒酵素の遺伝子が過剰発現していることから、KEAP1 遺伝子、あるいは、NRF2 遺伝子に異常が起こっていることが予想された。そこで、抗癌剤抵抗性を示した肺癌細胞株のゲノム DNA を精製し、KEAP1 遺伝子と NRF2 遺伝子の塩基配列の解読を行った。その結果、抗癌剤抵抗性を示した複数の肺癌細胞株で KEAP1 遺伝子、あるいは、NRF2 遺伝子のどちらか一方に、遺伝子変異が発見された。この解析に用いた抗癌剤抵抗性肺癌細胞株は、世界中で多くの研究者が使用している癌細胞株であり、肺癌手術組織から分離後、シャーレで何世代も継代培養 (*in vitro* 培養) されている。従って、その培養過程で KEAP1 遺伝子や NRF2 遺伝子に変異が導入された可能性も考えられた。そこで、我々は、国立がん研究センター中央病院の非小細胞肺癌の患者さんから得られた手術組織（癌組織）を用いて、*in vitro* 培養されていない癌細胞のゲノム DNA を精製し、KEAP1 遺伝子と NRF2 遺伝子の塩基配列の解読を行った。その結果、肺腺癌患者さん 30 症例中 7 症例 (23%) の癌組織で KEAP1 遺伝子に変異を同定した<sup>2)</sup>。また、扁平上皮肺癌患者さん 60 症例中 12 症例 (20%) の癌組織で NRF2 遺伝子に変異を同定した<sup>3)</sup>。これらの解析から、抗癌剤抵抗性肺癌細胞株で見つかった KEAP1 遺伝子や NRF2 遺伝子の変異は、*in vitro* 培養過程を経ずに導入されることがわかった。また、これらの解析から、肺腺癌の癌細胞においては KEAP1 遺伝子に変異が導入され易く、肺扁平上皮癌の癌細胞においては NRF2 遺伝子に変異が導入され易いことが判明した。しかし、現在においても、肺癌

の組織型（腺癌と扁平上皮癌は、癌が発生した元の細胞の種類が異なる）の違いによって KEAP1 遺伝子、あるいは、NRF2 遺伝子に変異が導入され易い理由はわかっていない。次に、抗癌剤抵抗性肺癌細胞株の KEAP1 遺伝子や NRF2 遺伝子に発見された変異が、タンパク質の機能に影響を及ぼすのか検証を行った。その結果、興味深いことに、どちらの遺伝子の変異も KEAP1 タンパク質と NRF2 タンパク質の結合活性が失われ、抗癌剤が存在しない状態においても細胞核内に NRF2 タンパク質が移行し、多くの解毒酵素が過剰量蓄積していることがわかった（図 1-右図の状態）<sup>2,3)</sup>。以上の知見から、肺癌細胞では KEAP1 遺伝子、あるいは、NRF2 遺伝子の変異による転写因子 NRF2 の恒常的な核内移行（異常活性化）が、肺癌の抗癌剤抵抗性の大きな要因になっていることが強く示唆された。そこで、転写因子 NRF2 が異常活性化している肺癌細胞株（NRF2 異常活性化肺癌細胞株）に、NRF2 特異的な siRNA を作用させ（NRF2 遺伝子の発現量を抑制した状態で）、抗癌剤シスプラチンの効果を調べたところ、シスプラチンによる癌細胞株の増殖抑制効果が高くなることが判明した<sup>2,3)</sup>。この発見によって、転写因子 NRF2 の活性阻害は抗癌剤の効果を高めることが期待された。しかし、転写因子 NRF2 によって活性化される多くの解毒酵素は、癌細胞と共に正常細胞でも抗癌剤の解毒に必要なものである。従って、抗癌剤の効果を高めるために転写因子 NRF2 の阻害を同時に行った場合、癌細胞と共に正常細胞にも抗癌剤の作用が強く働いてしまうことが考えられた。つまり、転写因子 NRF2 の阻害剤と抗癌剤の併用投与は、癌細胞の増殖能を抑制する効力が高まると同時に、正常細胞での抗癌剤による副作用も高まってしまうことが予想された。このことから、転写因子 NRF2 の阻害剤が開発されても、肺癌治療としての抗癌剤との併用投与は、個々

の患者さんに合わせて抗癌剤の使用量を適切に調節する（減少させる）などの対策が必要となり、困難が予想された。

そこで、私は転写因子 NRF2 の異常活性化が、肺癌細胞に与えている他のアドバンテージ（抗癌剤効果の減弱化以外の利点）を探索した。まず、siRNA を用いて NRF2 遺伝子の発現量を抑制した NRF2 異常活性化肺癌細胞株の増殖能を調べてみた。その結果、抗癌剤を作用させていない状態で、NRF2 異常活性化肺癌細胞株の増殖能が顕著に減少することがわかった<sup>2)</sup>。つまり、転写因子 NRF2 の異常活性化は抗癌剤抵抗性の主要な原因であることに加え、肺癌細胞の増殖を強力に亢進していることが判明した。この発見によって、転写因子 NRF2 の阻害は単独で（単剤で）、肺癌に対する効果的な治療薬になる可能性が出てきた。また、NRF2 遺伝子を破壊したマウス（knockout mouse）は胚発生に影響が出ず、解毒活性が低下する以外に目立った異常は現れないことが報告されている<sup>4,5)</sup>。これらの報告から、転写因子 NRF2 の酵素活性を阻害しても、重篤な副作用が現れる可能性が低いことが予想された。以上のことから、NRF2 遺伝子や KEAP1 遺伝子に変異が導入された肺癌では、転写因子 NRF2 の酵素活性を阻害することは、癌治療の有効な手段となる可能性が出て来た。

転写因子 NRF2 の酵素活性を阻害する薬剤を開発するには、NRF2 タンパク質が細胞核内でどのように働いているのか、その分子メカニズムを解明することが重要と思われる。しかし、細胞核内での転写因子 NRF2 の作用機序に関しては、その詳細はよくわかっていない。転写因子 NRF2 は複数の機能的なドメインから構成されている。N 末端領域に KEAP1 タンパク質結合（KEAP1 binding）ドメイン、100～200 番面のアミノ酸部分に転写活性（TA）化ドメイン、300～400 番面のアミノ酸部分に他のホモログタンパク質と相

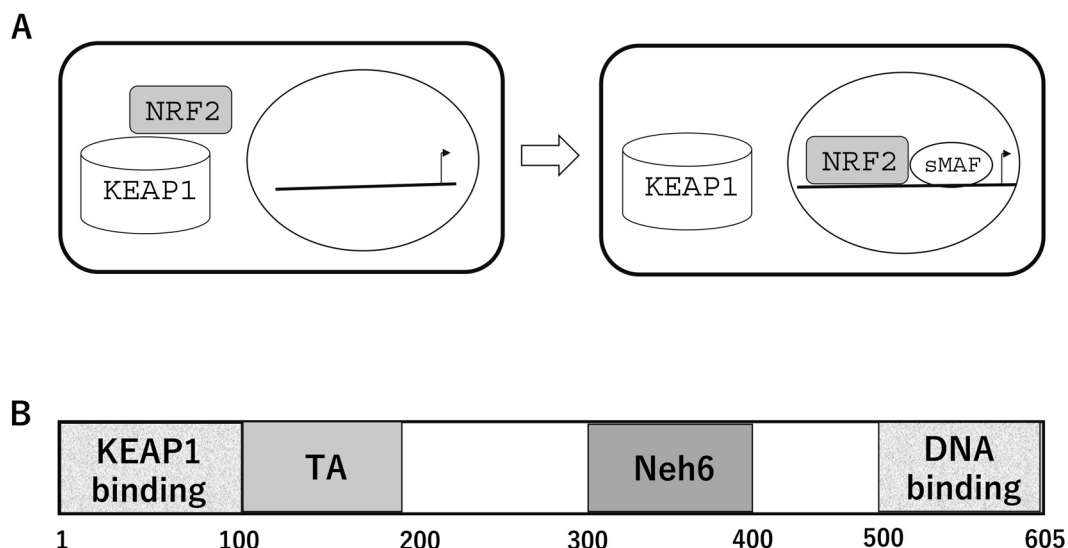


図1.NRF2 タンパク質の核内移行メカニズムと NRF2 タンパク質の一次構造図 (ドメイン図)

**A** : NRF2 タンパク質の核内移行メカニズムの模式図を示す. 抗癌剤を含め解毒物質 (求電子試薬等) が細胞内に存在しない状態では, 転写因子 NRF2 は KEAP1 タンパク質によって細胞質に留め置かれ, 転写活性は負に制御されている. 抗癌剤が細胞内に入ってくると, 細胞内では KEAP1 タンパク質に化学変化が起き, 転写因子 NRF2 は KEAP1 タンパク質から離れ, 細胞核内に移行する. 細胞核内に移行した NRF2 タンパク質は, MAFE, MAFF, あるいは, MAFG タンパク質 (小 MAF) の一つとヘテロダイマーを形成して, 解毒酵素遺伝子のプロモーター領域に結合し, 転写を強力に誘導する. つまり, 転写因子 NRF2 と転写抑制因子 KEAP1 による転写制御システムは, 抗癌剤が細胞内に侵入していない場合は細胞内の解毒酵素の存在量を少なくし, 抗癌剤が細胞内に侵入してきた場合は細胞内の解毒酵素の存在量を増加させることに働いている.

**B** : NRF2 タンパク質の 1 次構造の模式図を示す. 転写因子 NRF2 は複数の機能的なドメイン (domain) から構成されている. N 末端領域 (1~99 番目のアミノ酸部分) に KEAP1 binding domain, 100~200 番目のアミノ酸部分に Transcriptional Activation (TA) domain, 300~400 番目のアミノ酸部分に他の種の NRF2 タンパク質 (ホモログタンパク質) と相同な配列が多く存在する Neh6 domain, C 末端 (500~605 番目のアミノ酸部分) に DNA を認識する DNA binding domain がある.

同様な配列が多く存在する Neh6 ドメイン, C 末端領域に小 MAF タンパク質と結合し, DNA を認識する DNA 結合 (DNA binding) ドメインがある (図-1B). これらの機能ドメインの役割を詳細に解析することで, 肺癌で暴走している転写因子 NRF2 の阻害剤の作用点を絞り込むヒントが得られると考えた.

#### 解析方法

##### 1. タンパク質複合体精製用および酵素測定用の NRF2 遺伝子の構築 :

転写因子 NRF2 の N 末端領域 (KEAP1 タンパク質との結合ドメイン ; 1-99 番目のアミノ酸をコードする 297bp) を欠失させた

$\Delta$ N-NRF2 遺伝子を, PCR 法 (Polymerase Chain Reaction 法) を用いて合成した. 合成した遺伝子は塩基配列を解読し, 変異がないことを確認した.  $\Delta$ N-NRF2 タンパク質の精製を容易にするため,  $\Delta$ N-NRF2 遺伝子の N 末端領域に Halo タグ (Sigma 社 ; 35kd のタンパク質で HaloLink レジンと結合する) と His6 タグ (ヒスチジンが 6 個タンデムに並んだもので Nickel レジンと結合する) の遺伝子を付加し, Halo-His6- $\Delta$ N-NRF2 遺伝子を作成した. 次に, 哺乳類細胞で発現できる pCMV-Tag2B ベクター (Strata gene 社) に挿入した.同様に, PCR 法を用いて Neh6 ドメイン(300-400 番目のアミノ酸をコードす

る 300bp)を欠失した Halo-His6- $\Delta$ N- $\Delta$ Nhe6-NRF2 遺伝子を合成し、変異がないことを確認した後、pCMV-Tag2B ベクターに挿入した。また、転写活性化能を測定するために、Halo タグと His6 タグの遺伝子を付加していない $\Delta$ N-NRF2 遺伝子および $\Delta$ N- $\Delta$ Neh6-NRF2 遺伝子を pCMV-Tag2B ベクターに挿入した。

## 2. NRF2 タンパク質複合体精製：

Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて、10  $\mu$ g の Halo-His6- $\Delta$ N-NRF2 を直径 10 cm シャーレ (4 枚) に約 30% コンフルエント状態に増殖した HEK293T 細胞に導入した。37°C で 48 時間培養後、細胞を 400  $\mu$ L の抽出液 (10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10% Glycerol) に懸濁した。超音波破碎器 (BRANSON 社) を用いて細胞を壊し、細胞抽出液を作成した。細胞抽出液に 10  $\mu$ L の HaloLink レジン (Promega 社) を加え、4°C で 4 時間混合した。3000 rpm で 1 分間遠心後、上清を捨て、1 mL の抽出液で 5 回洗った。その後、400  $\mu$ L の抽出液と 10 units の TEV プロテアーゼ (Promega 社) を添加し、4°C で 12 時間混合した。3000 rpm で 1 分間遠心後、上清に 10  $\mu$ L の Nickel レジン (Sigma 社) を加え、4°C で 4 時間混合した。3000 rpm で 1 分間遠心後、上清を捨て、1 mL の抽出液で 5 回洗った。沈殿している Nickel レジンに 20  $\mu$ L のサンプルバッファー (30 mM Tris-HCl, 1% SDS, 15% Glycerol, 0.005% Bromophenol Blue) を加え、95°C で 5 分間保温した。3000 rpm で 1 分間遠心後、上清を取り出した (NRF2 タンパク質複合体)。得られた NRF2 タンパク質複合体を 10% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動を行った後、銀染色を行った。さらに、染色されたタンパク質をゲルから回収し、トリプシンで切断後、質量分析器 LC-MS/MS (Thermo Fisher

Scientific 社) を用いて解析した。

## 3. NRF2 タンパク質の発現量の解析：

Lipofectamine 3000 を用いて、10  $\mu$ g の Halo-His6- $\Delta$ N-NRF2, あるいは, Halo-His6- $\Delta$ N- $\Delta$ Nhe6-NRF2 を、直径 10 cm シャーレに約 30% コンフルエント状態に増殖した HEK293T 細胞に導入した。37°C で 48 時間培養後、細胞を 400  $\mu$ L の抽出液に懸濁した。超音波破碎器を用いて細胞を壊し、細胞抽出液を作成した。3  $\mu$ g の細胞抽出液を 10% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて分子量の違いによって分離後、Halo タグ抗体 (Promega 社) を用いた western blot 法を行った。コントロールとして、アクチン抗体 (Funakoshi 社) を用いた。

## 4. NRF2 タンパク質の酵素測定：

Lipofectamine 3000 を用いて、100 ng の pRBGP2 (ARE-luciferase; NRF2 タンパク質結合配列を蛍光タンパク質であるルシフェラーゼ遺伝子のプロモーター上流に挿入した DNA; 東北大学の山本雅之教授から分与頂いた), 5 ng の pRL/TK, 100 ng の pCMV-Tag2B (control DNA), Halo-His6- $\Delta$ N-NRF2, あるいは, Halo-His6- $\Delta$ N- $\Delta$ Nhe6-NRF2 を、24 穴シャーレに約 30% コンフルエント状態に増殖した HEK293T 細胞に導入した。37°C で 48 時間培養後、細胞を回収し、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega 社) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

## 結 果

### 1. NRF2 タンパク質相互作用因子の探索：

多くの転写因子は細胞核内で複数の転写制御因子と相互作用して、転写を活性化、あるいは、阻害することが知られている。そこで、NRF2 タンパク質と相互作用して転写活性を制御 (活性化、あるいは、阻害) する因子や、

その相互作用ドメインを見出すことで、転写因子 NRF2 の酵素活性を阻害する作用点の探索を行った。まず、転写因子 NRF2 を恒常的に核内に移行するため、PCR 法を用いて N 末端領域の KEAP1 タンパク質結合領域を欠失させた  $\Delta$ N-NRF2 遺伝子を合成した。その後、アフィニティ精製を行うため、Halo タグと His6 タグの 2 種類のタグを N 末端に付加した Halo-His6- $\Delta$ N-NRF2 遺伝子を作成した。この遺伝子を HEK293T 細胞に導入し、Halo-His6- $\Delta$ N-NRF2 タンパク質を一過的に発現させた。この細胞の抽出液を出発材料として、HaloLink レジンと Nickel レジンを用いたアフィニティ精製を行い、NRF2 タンパク質複合体の精製を行った。精製した NRF2 タンパク質複合体を 10% SDS ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動で分離後、銀染色を行った。その結果、NRF2 タンパク質に加え、他のタンパク質が精製されていることがわかった(図 2)。NRF2 タンパク質複合体は、細胞核内の塩濃度 (150 mM NaCl 程度) の約 2 倍の塩濃度 (300 mM NaCl) を含む抽出液を用いて精製されたものであることから、NRF2 タンパク質と共に精製されてきたタンパク質は、強固に NRF2 タンパクと結合 (直接的な相互作用, あるいは、間接的な相互作用) していることが予想される。

これらのタンパク質は、ゲル内でトリプシン分解後、質量分析器を用いてタンパク質の同定を行った。その結果、 $\beta$ -Transducin repeat Containing Protein ( $\beta$ -TCRP) に属する  $\beta$ -TCRP1 タンパク質と  $\beta$ -TCRP2 タンパク質が含まれていることが判明した。これまでの研究から、 $\beta$ -TCRP1 タンパク質と  $\beta$ -TCRP2 タンパク質は NRF2 タンパク質の Neh6 ドメイン (図 1B) に結合し、NRF2 タンパク質の分解を促進することが既に示されているものであった<sup>6)</sup>。そこで、 $\beta$ -TCRP1 タンパク質と  $\beta$ -TCRP2 タンパク質が結合する Neh6 ドメインを欠損させた  $\Delta$ N- $\Delta$ Neh

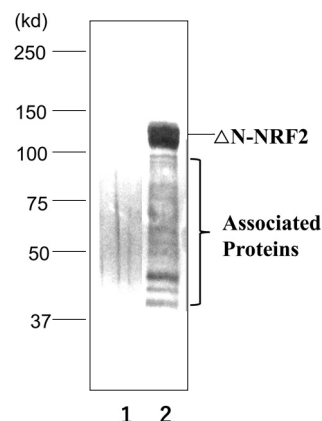


図 2. 精製された  $\Delta$ N-NRF2 タンパク質複合体

HEK293T 細胞に Halo-His6- $\Delta$ N-NRF2 タンパク質を一過的に発現させ、HaloLink レジンと Nickel レジンを用いたアフィニティ精製を行い、NRF2 タンパク質複合体の精製を行った。得られた NRF2 タンパク質複合体 (10  $\mu$ L) を 10% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動を行った後、銀染色を行った (レーン 2)。コントロールとして、HEK293T 細胞のみを用いて HaloLink レジンと Nickel レジンを用いたアフィニティ精製を行った。得られたもの (10  $\mu$ L) を 10% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動を行った後、銀染色を行った (レーン 1)。レーン 2 の波カッコの部分 (Associated Proteins) は、NRF2 タンパク質に相互作用している可能性があるタンパク質である。分子量はマーカータンパク質を参考にした。

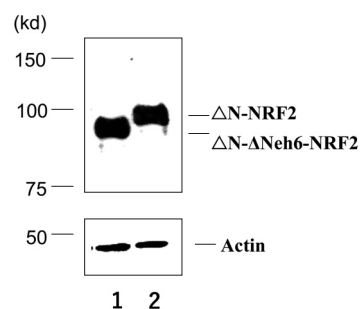


図 3.  $\Delta$ N- $\Delta$ Neh6-NRF2 タンパク質の発現量

HEK293T 細胞に、100 ng の Neh6 ドメインを欠損させた  $\Delta$ N- $\Delta$ Neh6-NRF2 遺伝子 (レーン 1)、あるいは、正常型  $\Delta$ N-NRF2 遺伝子 (レーン 2) を導入した。37°C で 48 時間培養後、細胞を回収し、抽出液を作成した。細胞抽出液 (3  $\mu$ g) を 10% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動後、Halo タグ抗体を用いて western blot を行った。コントロールとして、Actin 抗体を用いて western blot を行った。

6-NRF2 遺伝子を作成し、HEK293T 細胞内でのタンパク質分解への影響を調べた。正常型 $\Delta$ N-NRF2 タンパク質、あるいは、Neh6 ドメインを欠損させた $\Delta$ N- $\Delta$ Neh6-NRF2 タンパク質を一過的に発現させた細胞から抽出液を作成し、western blot 法を用いてタンパク質量を比較した (図 3)。

## 2. NRF2 タンパク質の Neh6 ドメインの機能解析：

正常型 $\Delta$ N-NRF2 タンパク質と Neh6 ドメインを欠損させた $\Delta$ N- $\Delta$ Neh6-NRF2 タンパク質の発現量に差異がなかったため、これら 2 つのタンパク質の酵素活性 (転写活性化能) の比較を行った。蛍光タンパク質であるルシフェラーゼ遺伝子のプロモーターの上流に NRF2 タンパク質-小 MAF タンパク質のヘテロダイマーの結合配列を付加したレポーター遺伝子 (pRBGP2) と Neh6 ドメインを欠損させた $\Delta$ N- $\Delta$ Neh6-NRF2 遺伝子、あるいは、正常型 $\Delta$ N-NRF2 遺伝子を HEK293T 細胞に導入した。48 時間後に細胞から抽出液を作成し、ルシフェラーゼ活性を測定した (図 4)。

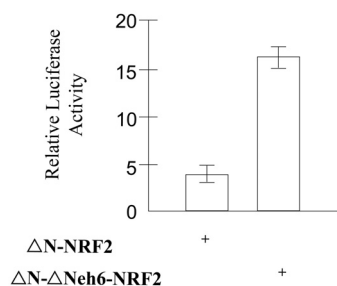


図 4.  $\Delta$ N- $\Delta$ Neh6-NRF2 タンパク質の転写活性

HEK293T 細胞に、100 ng の pRBGP2, 5ng の pRL/TK, 100 ng の pCMV-Tag2B (control DNA), 正常型 $\Delta$ N-NRF2 遺伝子 (+), あるいは、Neh6 ドメインを欠損させた $\Delta$ N- $\Delta$ Neh6-NRF2 遺伝子 (+) を導入した。37°C で 48 時間培養後、細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。pCMV-Tag2B のルシフェラーゼ活性を 1.0 として、相対ルシフェラーゼ活性 (Relative Luciferase Activity) を示した。エラーバーは標準誤差 (n=3) を示した。

その結果、Neh6 ドメインを欠損させた $\Delta$ N- $\Delta$ Neh6-NRF2 タンパク質は正常型 $\Delta$ N-NRF2 タンパク質の約 4 倍の転写活性化能があることが判明した。

## 考 察

本研究では、まず、転写因子 NRF2 複合体タンパク質の精製、および、その構成タンパク質の解析を行った。その結果、転写因子 NRF2 と相互作用する因子として、 $\beta$ -TCRP1 タンパク質と  $\beta$ -TCRP2 タンパク質の 2 つを発見した。これら 2 つのタンパク質は、SCF 型 E3 ユビキチン化酵素の基質認識サブユニット F-BOX タンパク質として作用し、基質のリン酸化を認識して結合することが知られている<sup>7)</sup>。さらに、F-BOX タンパク質 ( $\beta$ -TCRP1 タンパク質と  $\beta$ -TCRP2 タンパク質) によってトラップされた基質タンパク質は、E3 ユビキチン化酵素によってユビキチン化されプロテオソームで分解を受けることが知られている<sup>7)</sup>。これまでの研究から、 $\beta$ -TCRP1 タンパク質と  $\beta$ -TCRP2 タンパク質は、リン酸化酵素である Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) に属する GSK3 $\alpha$  タンパク質、あるいは、GSK3 $\beta$  タンパク質によってリン酸化された NRF2 タンパク質の Neh6 ドメインに結合し、NRF2 タンパク質の分解を促進することが報告されている<sup>6)</sup>。そこで、質量分析器を用いて、Neh6 ドメインを欠損させた Halo-His6- $\Delta$ Neh6-NRF2 タンパク質複合体を解析したところ、 $\Delta$ Neh6-NRF2 タンパク質複合体には  $\beta$ -TCRP1 タンパク質と  $\beta$ -TCRP2 タンパク質は含まれないことが判明した (未発表データ)。この結果は、これまでの報告<sup>6)</sup> と一致しており、NRF2 タンパク質の Neh6 ドメインは  $\beta$ -TCRP1 タンパク質と  $\beta$ -TCRP2 タンパク質の結合に必要なドメインであることが再現できた。Neh6 ドメインによる NRF2 タンパク質分解の促進は肺癌細胞株を用いた解析から示されている<sup>6)</sup>。今回

使用した HEK293T 細胞は、ヒト胎児腎細胞をアデノウィルスの E1 遺伝子によりトランスフォーマーとして樹立された細胞株である。使用している細胞株が異なることが原因で、Neh6 ドメインの機能が異なる可能性も予想され、今後の詳細な解析が必要と思われる。

今回の HEK293T 細胞を用いた解析では、 $\Delta N$ - $\Delta$ Neh6-NRF2 タンパク質の酵素活性（転写活性化能）は正常型  $\Delta N$ -NRF2 タンパク質の約 4 倍も亢進していることが判明した。この解析から、Neh6 ドメインの機能の一つは、NRF2 タンパク質の転写抑制（転写活性の阻害）であることがわかった。Neh6 ドメインによる転写活性の阻害には 2 つの分子メカニズムが考えられる。一つは、NRF2 タンパク質の転写活性化（TA）ドメインの機能を Neh6 ドメインが立体構造的に阻害していることである（図 5A）。もう一つは、Neh6 ドメインに転写抑制因子が結合することで NRF2 タンパク質の転写活性化能を阻害することである（図 5B）。

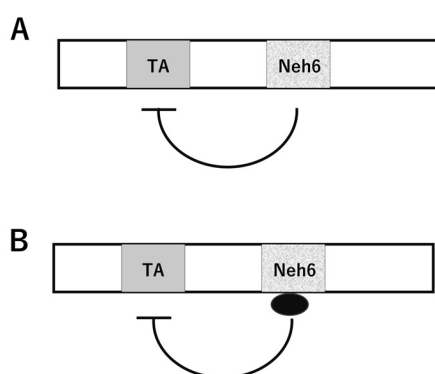


図 5. Neh6 ドメインの転写抑制モデル

**A** : Neh6 ドメイン領域の全体、あるいは、一部分の構造的が転写活性化（TA）ドメインの構造に作用し、NRF2 タンパク質の転写機能を阻害しているモデル。

**B** : Neh6 ドメイン領域に、転写抑制因子（タンパク質；黒い丸）が結合し、転写活性化（TA）ドメインの構造に作用し、NRF2 タンパク質の転写機能を阻害しているモデル。

$\beta$ -TCRP1 タンパク質や  $\beta$ -TCRP2 タンパク質が転写抑制因子として働くという報告はこれまでないが、HEK293T 細胞では、Neh6 ドメインに結合する転写抑制因子として、 $\beta$ -TCRP1 タンパク質や  $\beta$ -TCRP2 タンパク質が働いている可能性も考えられる。今後、Neh6 ドメインによる NRF2 タンパク質の転写阻害の分子メカニズムの解明ができれば、肺癌で暴走している転写因子 NRF2 を阻害する薬剤の開発に応用できると考えられる。

## 謝 辞

国立がん研究センター研究所の近藤格分野長には、NRF2 タンパク質と相互作用していた因子（タンパク質）の質量分析を手助けして頂き感謝致します。また、レポーター解析は疾病ゲノムセンターのスタッフの皆様を手助けして頂き感謝致します。

## 文 献

- 1) Itoh K, Wakabayashi N, et al: Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Gene Dev* 13:76-86, 1999.
- 2) Ohta T, Iijima K, et al: Loss of Keap1 Function Activates Nrf2 and Provides Advantages for Lung Cancer Cell Growth. *Cancer Res* 68: 1303-1309, 2008.
- 3) Shibata T, Ohta T, et al: Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 13568-13573, 2008.
- 4) Chan K, Lu R, et al: NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13943-13948, 1996.
- 5) Itoh K, Chiba T, et al: An Nrf2/ Small



Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements. *Bioch Biophys Res Comm* 236, 313-322, 1997.

- 6) Chowdhry S, Zang Y, et al: Nrf2 is controlled by two distinct  $\beta$ -TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity. *Oncogene* 32, 3765-3781, 2013.
- 7) Zheng N, Schulman AB, et al: Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* 416, 703-709, 2002.