

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	レドックス因子APE1/Ref-1を介した転写因子NF-kB活性化機構の解析
Title(English)	
著者(和文)	平尾聡
Author(English)	Satoshi Hirao
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第7513号, 授与年月日:2009年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:半田 宏,山口 雄輝
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第7513号, Conferred date:2009/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner;
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

平成 20 年度 学位論文

レドックス因子 APE1/Ref-1 を介した転写因子 NF- κ B 活性化機構の解析

東京工業大学大学院

生命理工学研究科 生命情報専攻

平成 18 年度入学 06D23114

平尾 聡

指導教官 半田 宏

山口雄輝

第一章 序論.....	6
1.1 緒言.....	6
1.2 レドックス制御.....	7
1.3 転写因子とレドックス制御	8
1.4 転写因子の還元システム ～APE1/REF-1 と主要な細胞内還元因子～.....	8
1.4.1 APE1/Ref-1.....	9
1.4.2 チオレドキシン (Trx).....	10
1.4.3 還元型グルタチオン (GSH)	11
1.5 転写因子 NF-κB.....	12
1.6 NF-κB のレドックス制御.....	13
1.7 本研究の目的	15
図・表	16
第二章 APE1/REF-1 による P50-DNA 結合促進機構の解析.....	26
2.1 緒言.....	26
2.2 実験材料及び方法	27
2.2.1 発現プラスミドの構築.....	27
2.2.2 大腸菌での組換えタンパク質の発現と精製.....	27
2.2.3 酸化型 p50 タンパク質の調製.....	30
2.2.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).....	30
2.2.5 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE).....	32
2.2.6 GST プルダウンアッセイ	33
2.3 結果と考察.....	35
2.3.1 p50 の DNA 結合活性に対する GSH、Trx、APE1/Ref-1 の効果	35
2.3.2 還元因子存在下での APE1/Ref-1 の p50-DNA 結合促進作用の解析.....	36

2.3.3 レドックス活性を持たない変異体 (<i>APE1/Ref-1 C/S</i> 変異体) の作成.....	36
2.3.4 <i>APE1/Ref-1 C/S</i> 変異体による <i>p50</i> -DNA 結合促進作用の解析	37
2.3.5 <i>APE1/Ref-1</i> の <i>p50</i> との結合は <i>Cys</i> 残基に依存しない	38
2.4 本章のまとめ	39
図	40
第三章 <i>APE1/REF-1</i> の <i>CYS</i> 残基非依存的な <i>P50</i> の DNA 結合促進機構の解析	46
3.1 緒言	46
3.2 実験材料及び方法	47
3.2.1 酸化型 <i>p50 C62S</i> の調製	47
3.2.2 <i>F5M</i> アッセイ	47
3.3 結果と考察	49
3.3.1 <i>APE1/Ref-1</i> と還元因子の相乗的な活性は <i>p50 Cys-62</i> 残基に作用している	49
3.3.2 <i>APE1/Ref-1</i> は <i>GSH</i> や <i>Trx</i> による <i>p50</i> の還元を促進する	49
3.4 本章のまとめ	52
図	53
第四章 <i>APE1/REF-1</i> のレドックスシャペロン活性の特徴.....	60
4.1 緒言	60
4.2 実験材料及び方法	61
4.2.1 発現プラスミドの構築	61
4.2.2 酸化型 <i>Rel</i> ファミリータンパク質および <i>AP-1</i> タンパク質の調製	61
4.2.3 <i>AP-1</i> の <i>EMSA</i> (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>).....	61
4.2.4 <i>AP</i> エンドヌクレアーゼアッセイ	62
4.3 結果と考察	63
4.3.1 <i>Rel</i> ファミリー因子と <i>APE1/Ref-1</i> の相互作用の解析.....	63

4.3.2	<i>Rel</i> ファミリー因子に対する <i>APE1/Ref-1</i> のレドックスシャペロン活性の検討.....	64
4.3.3	転写因子 <i>AP-1</i> に対する <i>APE1/Ref-1</i> のレドックスシャペロン活性の検討.....	65
4.3.4	<i>APE1/Ref-1</i> のレドックスシャペロン活性とその他の活性の関係.....	66
4.4	本章のまとめ	68
図		69
第五章 細胞内におけるレドックスシャペロン活性の解析		79
5.1	緒言	79
5.2	実験材料及び方法	80
5.2.1	細胞培養.....	80
5.2.2	<i>siRNA</i> 耐性 <i>APE1/Ref-1</i> 発現プラスミドの構築.....	80
5.2.3	ウエスタンブロッティング (<i>Western Blotting</i>).....	80
5.2.4	<i>siRNA</i> を用いたノックダウン	82
5.2.5	レポータージーンアッセイ	82
5.2.6	核抽出液の調製.....	83
5.3	結果と考察	84
5.3.1	内在性 <i>APE1/Ref-1</i> のノックダウンとその表現型	84
5.3.2	細胞内で <i>APE1/Ref-1</i> は <i>Cys</i> 残基非依存的に <i>NF-κB</i> を活性化する.....	84
5.4	本章のまとめ	86
図		87
第六章 総括.....		90
6.1	<i>APE1/REF-1</i> のレドックスシャペロン活性	90
6.2	<i>APE1/REF-1</i> のレドックスシャペロン活性の作用メカニズム	91
6.3	レドックス活性とレドックスシャペロン活性の関係.....	92
6.4	<i>APE1/REF-1</i> 各活性に対して <i>Cys</i> 残基の担う役割.....	92

6.5 APE1/REF-1 の生理学上の重要性.....	93
6.6 結言.....	95
図.....	96
参考文献.....	98
謝辞.....	107

第一章 序論

1.1 緒言

細胞外からの刺激に応じて細胞は増殖、分化、細胞死、分泌といった様々な応答を示す。サイトカインに代表される細胞外シグナル因子は細胞表面に存在する特異的な受容体に結合し、様々な細胞内シグナル伝達経路を経由して転写制御、遺伝子発現制御に至る。シグナル伝達を担うタンパク質は刺激に応じた迅速な活性調節を必要とし、その活性はタンパク質の量的制御、あるいは種々の翻訳後修飾により調節を受ける。新たなタンパク質合成を必要としない翻訳後修飾は、タンパク質の迅速な活性調節を可能にする生命の巧妙な生存戦略といえる。

タンパク質の翻訳後修飾には、リン酸化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化、糖付加などが知られ、またタンパク質の酸化還元状態の変化、すなわちレドックス (redox = reduction - oxidation) 反応もその一つである。しかし、タンパク質のレドックス状態は多くの場合迅速かつ可逆的に変化してしまうため測定が困難であり、また細胞内には一定量の還元因子が存在することなども障害となり、実際の細胞内のレドックス制御機構の詳細はほとんど解明されていない。

NF- κ B は、細胞外刺激に応答して細胞質から核へと移行する DNA 結合性の転写因子であり、主に炎症・免疫応答に重要な遺伝子群の転写を制御する。NF- κ B の活性化には、広く研究されてきたリン酸化制御に加えて、レドックス制御の重要性が明らかとなっているが、その制御機構の詳細についてはほとんど解明されていない。本研究では NF- κ B のレドックス制御過程に重要な因子である APE1/Ref-1 の作用機構を明らかにすることにより、レドックス制御による NF- κ B 活性化の分子メカニズムを解明すると共に、一連のレドックス制御における APE1/Ref-1 の制御メカニズムを解明することを目指す。

1.2 レドックス制御

タンパク質のシステイン (Cys) 残基は側鎖のチオール基 (-SH) の化学的特性から、酸化型と還元型という大きく 2 種類の状態をとる。そして Cys 残基のレドックス(酸化還元)状態変化は、構造・安定性・酵素活性といったタンパク質の持つ機能に大きな影響を与える。この特性を利用してレドックス反応によりタンパク質の機能を制御することを、タンパク質のレドックス制御と呼ぶ。Cys 残基のレドックス反応への感受性は、その周囲のアミノ酸配列等によりそれぞれ異なり、特にレドックス感受性の高い Cys 残基のレドックス制御を利用した機能制御は、シグナル伝達の一翼を担うことが知られている。迅速な機能の ON – OFF の調節が求められるシグナルとしてのレドックス制御は、可逆的反応であることが重要になる。可逆的な Cys 残基の酸化修飾には、分子内あるいは分子間でのジスルフィド結合形成 (-S-S-) のほか、ニトロソ化 (-SNO) やスルフェニル化 (-SOH) が知られている。一方、細胞内が過剰に酸化状態にある場合には、Cys 残基のスルフェニル基はさらにスルフィニル基 (-SO₂H)、スルフォニル基 (-SO₃H) へと酸化修飾を受けることも知られているが、この過剰な酸化反応は Cys 残基の不可逆的な修飾となる(図 1.1)。

レドックス制御という単語は 1970 年代に既に用いられており、レドックス制御がいくつかの酵素の活性調節に重要であることが示唆されていた。近年、酸化ストレス応答や呼吸鎖の副産物として細胞内で生じる活性酸素種が細胞の増殖・分化・細胞周期・細胞死などを調節することが明らかとなり、さらに様々なタンパク質の活性がレドックス制御により可逆的な調節されることが報告されている。これによりレドックス制御の重要性が再認識されはじめ、現在では多様なタンパク質において、レドックス制御による活性調節機構の解析が進められている (10,37)。

1.3 転写因子とレドックス制御

DNA に直接結合して遺伝子発現を調節する転写因子の活性も、レドックス制御を受けることが知られている。大腸菌でレドックス制御を受ける転写因子として SoxR や OxyR が知られ、レドックス制御はリン酸化制御等と比べて起源が古いことが伺える (28,79)。また真核生物においても、1990 年の Curran らによる AP-1 (Fos および Jun) のレドックス制御による活性調節機構の発見を端緒として (1)、NF- κ B (46,47,50,68,69)、p53 (59)、PEBP2/AML (2)、Egr-1 (33)、NF-Y (54)、Myb (24,53)、GR (44)、ER (27) など様々な転写因子でレドックス制御により活性調節を受けることが報告されている(表 1.1)。特徴としてそのほとんどの場合、レドックス制御を受ける転写因子は DNA 結合ドメイン内あるいは結合ドメイン近傍にレドックス感受性の高い Cys 残基を保持しており、酸化処理により DNA 結合能を失う点で共通している。また重要なことに、レドックス制御を受ける転写因子は現在報告があるだけでも 60 種類以上と非常に多岐にわたるが、一方ですべての因子がレドックス制御を受けるわけではなく、リン酸化や分解、核移行などの活性制御機構と組み合わせられた選択性・特異性が、レドックス制御による活性調節機構にも存在すると考えられている (37,71)。

また報告のほとんどが、酸化剤と還元剤を組み合わせた検討や、レドックス状態の違いが機能に決定的な影響を持つ Cys 残基に変異を入れた解析など、各々の因子それぞれ個別に注目した解析であり、細胞内における一連のレドックス制御機構の多くは未解明といえる。

1.4 転写因子の還元システム ～APE1/Ref-1 と主要な細胞内還元因子～

転写因子のレドックス制御を担う細胞内還元因子としては、核内レドックス因子 APE1/Ref-1 が知られている。また、チオレドキシンやグルタチオンは細胞内の一連のレドックス制御機構を理解する上で欠くことの出来ない主要な細胞内還元因子といえる。そこでここでは、APE1/Ref-1 とチオレドキシンおよびグルタチオンに関す

る研究背景についてそれぞれ記述する。

1.4.1 APE1/Ref-1

APE1/Ref-1 (AP endonuclease 1 / redox factor 1)は、大きくレドックス制御機構とDNA 修復機構に役割を担う、多機能性のタンパク質として知られる。また、APE1/Ref-1 のホモ接合型ノックアウトマウスは胎生致死であることから、APE1/Ref-1 は正常な個体の発生・成育に不可欠な因子と考えられている (76)。

APE1/Ref-1 は 1991 年に、酸化修飾やアルキル化修飾により傷害を受けた DNA の修復過程のひとつである塩基除去修復に不可欠なヒト AP エンドヌクレアーゼ "APE1" として同定された (AP = apurinic/apyrimidinic: 脱塩基部位) (11,61,62)。さらに、現在では DNA 修復過程に応じて、3',5'-エキソヌクレアーゼ活性や DNA 3'-ジエステラーゼ活性、DNA 3'-ホスファターゼ活性も示すことも知られている (42)。

一方で 1992 年に Curran らにより、APE1/Ref-1 は転写因子 AP-1 の DNA 結合を促進する核内因子として、まったく独立した研究から精製・同定された (73,74)。同グループはその以前に、AP-1 が酸化処理により DNA 結合を失い、還元剤により DNA 結合を回復することを発見していた (1)。APE1/Ref-1 は還元剤と同様に酸化型の AP-1 の DNA 結合を促進する活性を持つことから、彼らはこの因子を、AP-1 を直接還元する核内レドックス因子 "Ref-1" であると定義した。現在では AP-1 や NF- κ B の他にも、p53 (17,36)、HIF-1 α (14,32,41)、HLF (14)、Pax-5 (66)、Pax-8 (3,64,65) 等のストレス誘導性転写因子の DNA 結合が APE1/Ref-1 のレドックス活性により促進されることが報告されている。いずれも同様の作用機構により制御されていることが一般に想定されているが、一部の因子では異なる機能により制御されている可能性も示唆されている。

APE1/Ref-1 を酸化処理すると AP-1 の DNA 結合促進活性を失うことから、これまで APE1/Ref-1 のレドックス活性には APE1/Ref-1 自身が還元型にあることが必須で

あることが示唆され、そのため Cys 残基を持つレドックス活性中心が想定された (70,73)。また、欠損変異体を用いた解析からは、*in vitro* での AP-1 のレドックス制御には APE1/Ref-1 の N 末端領域 1-127 a.a.が必要十分であり、レドックス活性と DNA 修復関連活性は APE1/Ref-1 一次配列上の、2 箇所の異なった領域に保持されていることが示された (図 1.2-A) (75)。N 末端側の 61 アミノ酸は、APE1/Ref-1 の大腸菌や酵母ホモログ(レドックス活性は保持していない) では保存されておらず、その領域が APE1/Ref-1 のレドックス活性に不可欠な点は進化学的にも興味深いとされる (70)。さらに、置換変異体による解析から APE1/Ref-1 の Cys-65 残基がレドックス活性の活性中心であることが示唆されてきた (70)。しかし、後に APE1/Ref-1 の X 線結晶構造が解かれると、Cys-65 残基はタンパク質の内部に位置しており大きな立体構造変化が起こらない限り他のタンパク質との相互作用に関与するとは考えにくいことが示された (22,51)。また、全部で 7 つある APE1/Ref-1 の Cys 残基のうち Cys-138 残基が唯一タンパク質表面に露出しており、そのためレドックス活性に関与することが X 線結晶構造からは予想されるが、それを裏付けるような生化学的な実験成果は得られていない(図 1.2-B)。さらに Curran らの研究により、Cys64Ala (ヒトの Cys-65 に相当) の置換変異体を用いたホモ接合型のノックインマウスでも、その AP-1 は野生型と遜色無い DNA 結合能を示すことが報告され、*in vivo* における APE1/Ref-1 のレドックス活性に Cys-65 残基は不可欠ではないことを裏付ける結果となった (56)。したがって、多くの転写因子において活性化機構に役割を担うことが示唆されているにも関わらず、現在のところ APE1/Ref-1 がどのようなメカニズムでレドックス活性を発揮するのかについては不明であるといえる。

1.4.2 チオレドキシシン (Trx)

チオレドキシシンは、ほぼ全ての原核生物・真核生物において高度に保存されたタンパク質性の還元因子である。ヒト・チオレドキシシンは分子量約 12 kDa、125 アミノ

酸からなるタンパク質である。4 つの β -ストランドと 3 つの α -ヘリックスからなる立体構造を持ち、**-Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys-**という高度に保存されたジチオール型のレドックス活性部位を保持している。また、細胞内には NADPH 依存的なセレノフラボタンパク質であるチオレドキシン還元酵素(TrxR)が存在する。還元型のチオレドキシンは基質を還元すると、自身は活性部位の 2 つの Cys 残基間でジスルフィド結合を形成し酸化型へと変換されるが、細胞内では TrxR と NADPH によって速やかに還元され、ふたたび基質タンパク質を還元する活性を持つようになる(図 1.3-A)。このような還元サイクルが存在することで細胞内のチオレドキシンはそのほとんどが還元型に保たれており、効率よくレドックス反応を行うことが可能となっている(チオレドキシン・システム)。チオレドキシンは細胞質・核の両方に存在し、転写因子のレドックス制御の他、細胞増殖、酸化ストレスからの防御、アポトーシスの抑制など細胞内の様々な過程において重要な機能を担っている (40,71)。

1.4.3 還元型グルタチオン (GSH)

酸化ストレス応答や呼吸の副産物として細胞で生じる活性酸素($O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、 $OH^{\cdot}$ など)はその反応性の高さから細胞障害を引き起こすことが知られている。活性酸素に対する防衛のため、細胞内は常に比較的還元的な環境に保たれていると考えられており、その還元状態の維持に最も大きな役目を担っているのがグルタチオンである。グルタチオン(還元型グルタチオン: GSH)は γ -Glu-Cys-Gly から成るトリペプチドで、細胞内に 1 - 10 mM の高濃度で存在する最も主要な非タンパク質性のチオール化合物である。通常はそのほとんどが還元型で存在しているため、細胞内を還元状態に維持する上で最も主要な因子と考えられている。しかし一方で、細胞内には常に一定量の酸化型グルタチオン(GSSG)も存在しており、オルガネラ(特に小胞体)の内部や酸化ストレス応答時にはそのバランスが変化することから、あるコンパートメントでは頻繁にグルタチオンのレドックス反応が起こっていることが想定される(図 1.3-B) (12,49)。

また、GSH/GSSG のバランスの変化により転写因子をはじめとするタンパク質のレドックス状態が変化することが知られており、酸化ストレスに応答したレドックス制御等に一定の役割を果たしていると考えられている (4,57,43)。

1.5 転写因子 NF- κ B

NF- κ B (Nuclear factor for κ chain in B cell) は、1986 年に Baltimore らによって、免疫 B 細胞の免疫グロブリン κ 軽鎖の発現を調節する因子として生化学的に同定された。しかし現在では免疫 B 細胞に限らず、ほとんどの細胞でその発現が確認されている。NF- κ B が発現制御する因子には、IL-1、2、6、8 や TNF- α などのサイトカイン、E-セレクトインや VCAM-1 などの細胞接着因子、IFN- β や G-CSF などの増殖因子などがある。また、エイズウイルスやサイトメガロウイルスは、自己複製に必要な転写過程に NF- κ B を利用していることが知られる。このように NF- κ B は多岐にわたる遺伝子群の発現を制御し、炎症反応や免疫応答において中心的な役割を果たしている。またアポトーシス抑制に対しても機能することが知られており、発ガン過程への関与も示唆されている。

NF- κ B は p50 / p65 のヘテロ二量体の状態で最も多く存在し、このヘテロ二量体について非常によく研究が進められてきた経緯があるが、最近では NF- κ B は Rel Homology Domain (RHD) を N 末端側にもつ転写因子の総称であり、p50、p52、p65、c-Rel、RelB の 5 つの因子からなるとされている(図 1.4-A)。RHD は DNA 結合・サブユニット間の二量体形成・抑制因子 I κ B との結合に必要な領域や核移行シグナルを含む。1998 年に Ghosh らにより報告された p50 /p65 /DNA 複合体の X 線結晶構造解析の結果から、NF- κ B は図 1.4-B に示すように羽を広げた蝶のような構造をとることが明らかになった (5)。各サブユニットの RHD は大きく N 末端領域と C 末端領域に分けられ、その間をフレキシブルなリンカーがつかない構造をとっている。C 末端領域により各サブユニットの RHD は二量体構造を形成し、 κ B 配列を持つ DNA を

挟み込むようにして結合している。

NF- κ B の活性化機構は、そのユニークさと重要性からこれまで精力的に研究されてきた。特に 1997 年に Karin らにより I κ B を直接リン酸化する I κ B kinase(IKK) が同定されると、それを端緒に I κ B の分解を介した NF- κ B の活性化機構の解析が急速に進んだ (13)。NF- κ B の活性化機構の概略を図 1.5 に示す。細胞外からの刺激が無い状態では、NF- κ B は細胞質において I κ B と複合体を形成しており、NF- κ B の NLS が I κ B により覆い隠されることで細胞質に保持されている。一方、TNF- α や IL-1 などの炎症性サイトカインや、UV、H₂O₂ などの酸化ストレスにより刺激を受けると、細胞内シグナル伝達を介して活性化された IKK により I κ B がリン酸化を受け、それに続くユビキチン化-プロテアソーム経路により I κ B の分解が引き起こされる。これにより I κ B から遊離した NF- κ B は核へと移行し、標的遺伝子近傍の κ B 配列に結合し、転写活性化に至る。最もよく研究された機構をここでは示したが、最近ではこの他にも多様なリン酸化制御を介した活性化機構が報告されている (19,20)。

1.6 NF- κ B のレドックス制御

NF- κ B の活性化機構はリン酸化制御による経路についてよく解析されているが、同時に NF- κ B が核内において十分な DNA 結合能を発揮するためには、レドックス制御による調節も不可欠であることが知られている。1991 年に Leonard らによって、アルキル化剤や酸化剤で処理した NF- κ B は DNA 結合能を持たないが、還元剤を添加することにより DNA 結合能が回復することが示された (68)。さらに 1992 年には Hay らにより、p50 の DNA 結合には DNA 結合ループに存在する Cys-62 残基のレドックス状態が決定的であることが報告され、Cys-62 残基を Ser 残基に置換した変異体は酸化剤に対して感受性を持たないことが示されている (図 1.6) (46,47,55)。また逆に、p50 の Cys-62 残基は S-ニトロソ化(-SNO) やグルタチオン化(-S-SG) を受けると DNA 結合能を失うことも示され、レドックス制御による NF- κ B の活性抑制

機構の存在も示唆されている (39,48,57)。これらの *in vitro* の実験により、細胞内における NF- κ B の活性化にはレドックス制御も重要な役割を果たしていることが示唆されてきた。

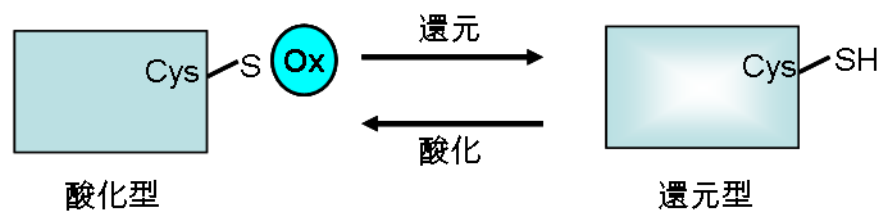
これまで当研究室では、タンパク質のレドックス状態を Cys 残基のアミノ酸単位で測定できる実験系を構築してきた(図 1.7)。さらにこの測定法を応用して細胞内環境における p50 のレドックス状態を測定したところ、p50 Cys-62 残基は細胞質にある状態では多くが酸化型であるが、刺激応答に伴い核内に移行した状態ではその多くが還元型にあることが示された(図 1.8) (55)。これにより p50 が核移行に伴い還元反応を受けることが明らかとなり、細胞レベルの NF- κ B 活性化機構においてもレドックス制御が重要な制御段階であることが示唆された。これまで *in vitro* での実験結果からは、チオレドキシンや APE1/Ref-1 による直接的な NF- κ B の還元作用が報告されてきた (22,55)。しかし現在のところ、実際に細胞内においてどのような細胞内因子が NF- κ B のレドックス制御に直接的に関わっているかについては明確になっていない。

また、当研究室では NF- κ B 選択的阻害剤である E3330 の作用機構の解析を行ってきた。E3330 は I κ B の分解や NF- κ B の核移行、p65 のリン酸化などの NF- κ B の活性化プロセスはいずれも阻害せず、一方で NF- κ B 依存的な転写および NF- κ B の DNA 結合を阻害することが示された (29)。また、次いで E3330 の標的タンパク質として APE1/Ref-1 が同定されたことから、E3330 による NF- κ B の DNA 結合の阻害は、APE1/Ref-1 を介した p50 の還元を阻害することに依ることが想定された (29,55,63)。さらに先に記した細胞レベルでの p50 のレドックス状態の測定系から、E3330 であらかじめ処理した細胞においては、その後の刺激応答に伴い核内に移行した p50 の Cys-62 残基のレドックス状態が大きく酸化型に傾いていることが示された(図 1.8) (55)。以上の E3330 を用いた一連の解析結果は、NF- κ B の効率的な活性化には APE1/Ref-1 を介した p50 のレドックス制御が不可欠であることを示唆する結果といえる。

1.7 本研究の目的

APE1/Ref-1 のレドックス制御の役割については多くの報告がなされているにも関わらず、その詳細な作用機構はほとんど明らかにされていない。一方で、NF- κ B の活性化において APE1/Ref-1 を介したレドックス制御が非常に重要な役割を担っていることが強く示唆されており、その作用機構の解明は一連の NF- κ B 活性化機構の理解に大きな意義を持つといえる。そこで本研究では NF- κ B の活性化機構における APE1/Ref-1 の作用機構を解明し、APE1/Ref-1 のレドックス制御メカニズムを明らかにすることを目的とした(図 1.9)。

具体的には、他の還元因子が共存する細胞内環境を反映した *in vitro* の実験系を構築することで、細胞内における APE1/Ref-1 の詳細な作用機構の解明を試みる。すなわち、APE1/Ref-1 と他の細胞内還元因子(グルタチオンとチオレドキシン)との相互作用に焦点を当てた生化学的な解析から着手し、NF- κ B のレドックス制御において APE1/Ref-1 がこれまでいわれるようなレドックス活性を示すのか、それとも他の因子と協調的あるいは相乗的に働くのかを検討していく。



可逆的な酸化修飾	[ジスルフィド化 (-S-S-) スルフェニル化 (-SOH) S-ニトロソ化 (-SNO)
不可逆的な酸化修飾	[スルフィニル化 (-SO₂H) スルフォニル化 (-SO₃H)

図 1.1 レドックス制御

レドックス制御のモデル図を示した。タンパク質の Cys 残基のレドックス状態は細胞内の環境に応じて変化し、タンパク質の活性に変化を与える。特にシグナル応答としてのレドックス制御は可逆的反応であることが重要である。可逆的な Cys 残基の酸化修飾にはジスルフィド結合形成、S-ニトロソ化、スルフェニル化が存在する。また、非可逆的な酸化修飾にはスルフィニル化やスルフォニル化が存在する。

表 1.1 レドックス制御により DNA 結合制御を受ける転写因子

転写因子	機能	参考文献
AP-1	細胞増殖・分化・ストレス応答	1, 73, 74 他.
NF-κB	細胞増殖・分化・ストレス応答	46, 55, 68 他.
CREB	細胞増殖・分化・ストレス応答	74
ATF	細胞増殖・分化・ストレス応答	74
p53	ストレス応答・細胞周期・アポトーシス	17, 36, 59
HIF-1α	低酸素応答	14, 32, 41
HLF	低酸素応答	14
Myb	血液細胞分化	24, 53, 74
PEBP2/AML	血液細胞分化	2
Pax5	血液細胞分化	66
Pax8	甲状腺応答	3, 64, 65
TTF-1	甲状腺応答	67
Egr-1	骨髄球様細胞分化	33
NF-Y	細胞周期	54
GR	ホルモン応答	44
ER	ホルモン応答	27
AhR	低分子化合物応答・酸化ストレス応答	34
Oct-4	胚性幹細胞の未分化状態維持	25
GABP	電子伝達経路・エネルギー産生	7

レドックス制御を受けることが示唆されている転写因子の一部を表に示した。これらの転写因子の効率的な DNA 結合には、DNA 結合ドメインの Cys 残基が還元型にあることが必要である。それぞれの因子で個別に解析が進められているが、レドックス制御による活性化の詳細なメカニズムは明らかでない。

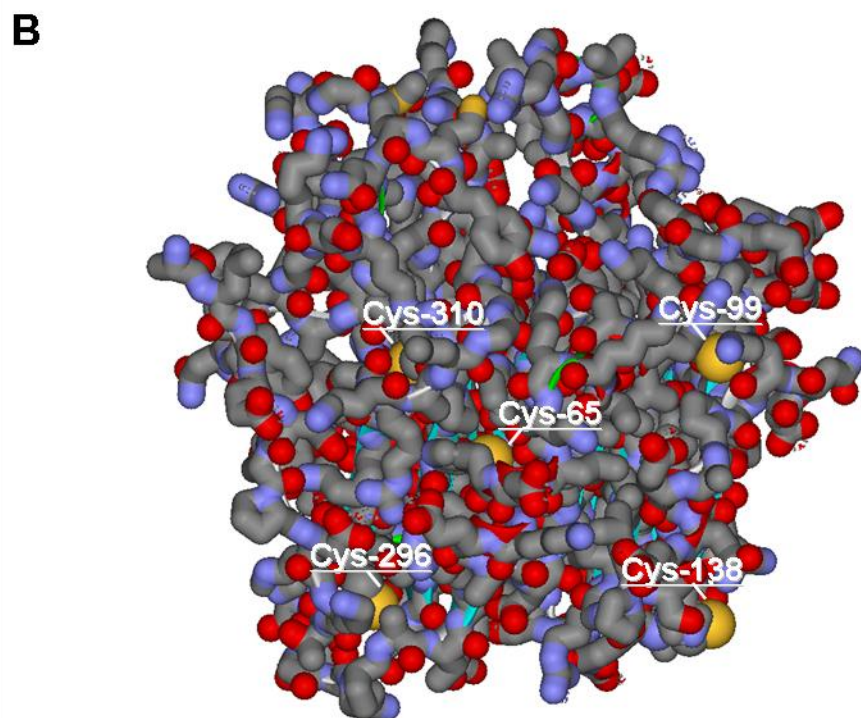
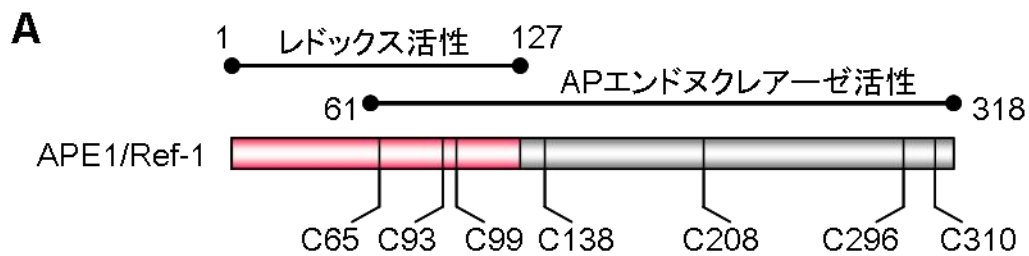
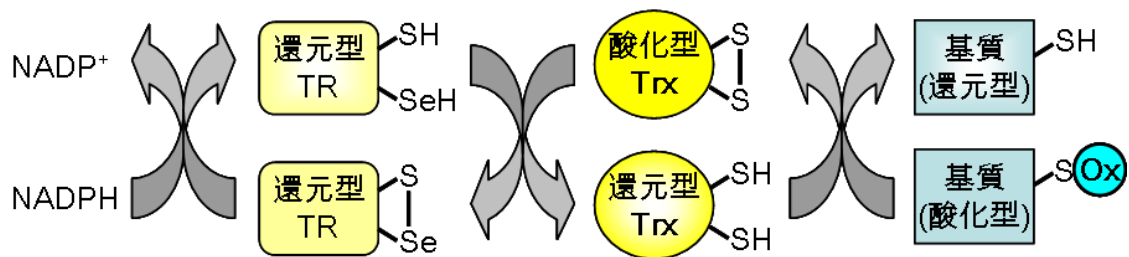


図 1.2 APE1/Ref-1 の立体構造と Cys 残基

A. APE1/Ref-1 は、N 末端領域 1-127 a.a.がレドックス活性を持ち、C 末端領域 61-318 a.a.が AP エンドヌクレアーゼ活性を持つとされている。また、全ての Cys 残基の位置を示した。7 つ全ての Cys 残基は哺乳類動物間でよく保存されている。

B. APE1/Ref-1 の X 線結晶構造。Cys 残基は全部で 7 つ存在するが、タンパク質表面に露出しているのは Cys-138 のみであり、Cys-65 を含む他の Cys 残基はタンパク質の内部に位置している。標識を付けた黄色い元素が Cys 残基の硫黄元素。水素は表示していない。また、Cys-93、Cys-208 はタンパク質の内部深くに位置している。

A チオレドキシン・システム



B グルタチオン

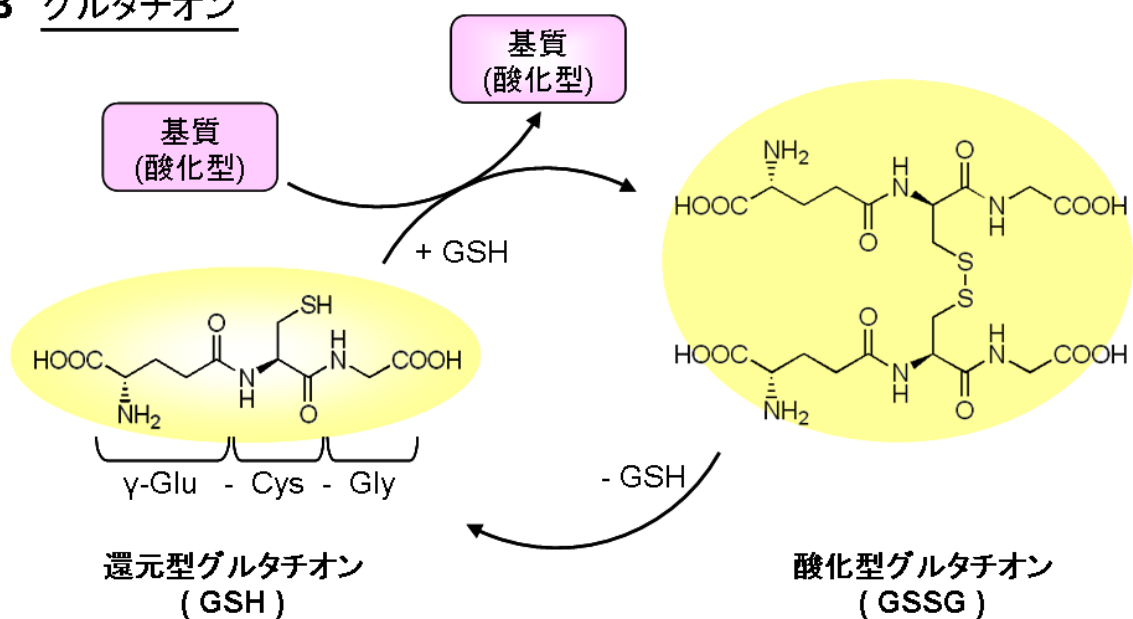
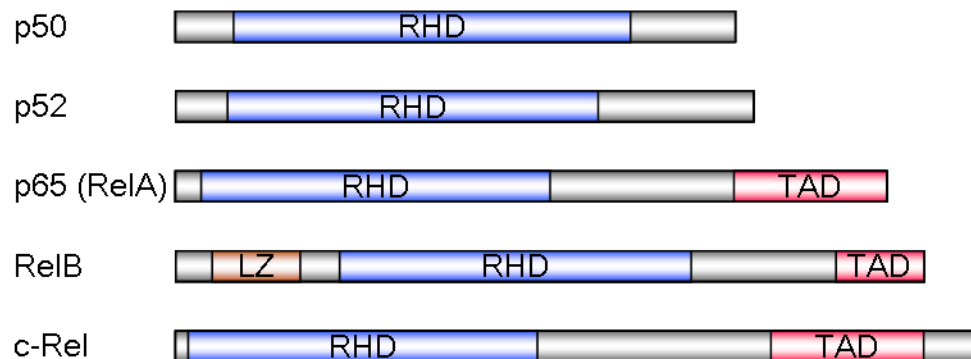


図 1.3 細胞内還元因子

細胞内には主要な還元因子としてチオレドキシンやグルタチオンが存在する。これらはそれぞれ独自のレドックスサイクルシステムを持つ。

- A. 還元型チオレドキシンは基質を還元するとチオレドキシン分子内でジスルフィド結合を形成した酸化型に移行するが、チオレドキシン還元酵素の働きにより速やかに還元され還元活性を回復する機構を細胞内に保持する。(チオレドキシンシステム)
- B. グルタチオンは γ -Glu-Cys-Gly のトリペプチドであり、細胞内に mM オーダーの高濃度で存在する。グルタチオンを介したレドックス反応の一例を図に示した。

A NF- κ B / Relファミリー



B p50 / p65 / DNA複合体のX線結晶構造

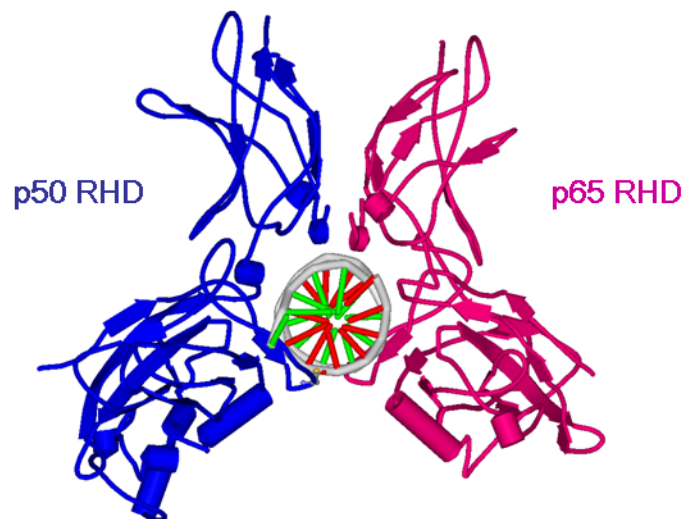


図 1.4 NF- κ B / Rel ファミリーと、p50 / p65 / DNA 複合体の構造

A. NF- κ B は Rel Homology Domain (RHD) を N 末端側にもつ、p50、p52、p65、c-Rel、RelB の 5 つの因子からなる。RHD : Rel 相同性ドメイン、TA : 転写活性化ドメイン、LZ : ロイシンジッパーモチーフ

B. p50 と p65 はの RHD はそれぞれ大きく N 末端領域と C 末端領域に分けられ、その間をフレキシブルなリンカーがつないでいる。C 末端領域により各サブユニットの RHD は二量体構造を形成し、 κ B 配列を持つ DNA を挟み込むようにして結合している (5)。

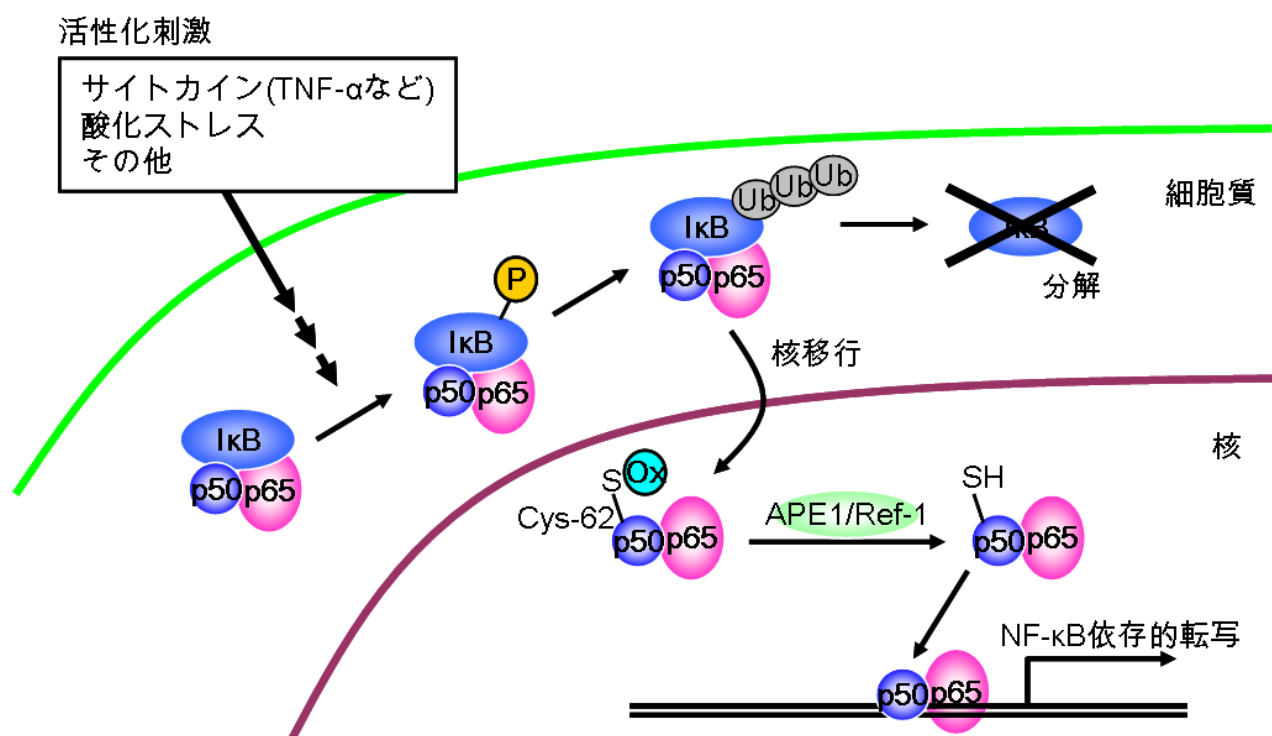


図 1.5 NF- κ B の活性化機構

細胞外からの刺激が無い状態では、NF- κ B は I κ B と結合した不活性な状態で細胞質に保持されている。各種の刺激を受けると I κ B がリン酸化を受け、それに続くユビキチン化-プロテアソーム経路により I κ B の分解が引き起こされる。これにより I κ B から遊離した NF- κ B は核へと移行し、標的遺伝子に結合し、転写を活性化する。

また、核内へ移行した NF- κ B が十分な DNA 結合活性を示すには、核内におけるレドックス制御が重要である。

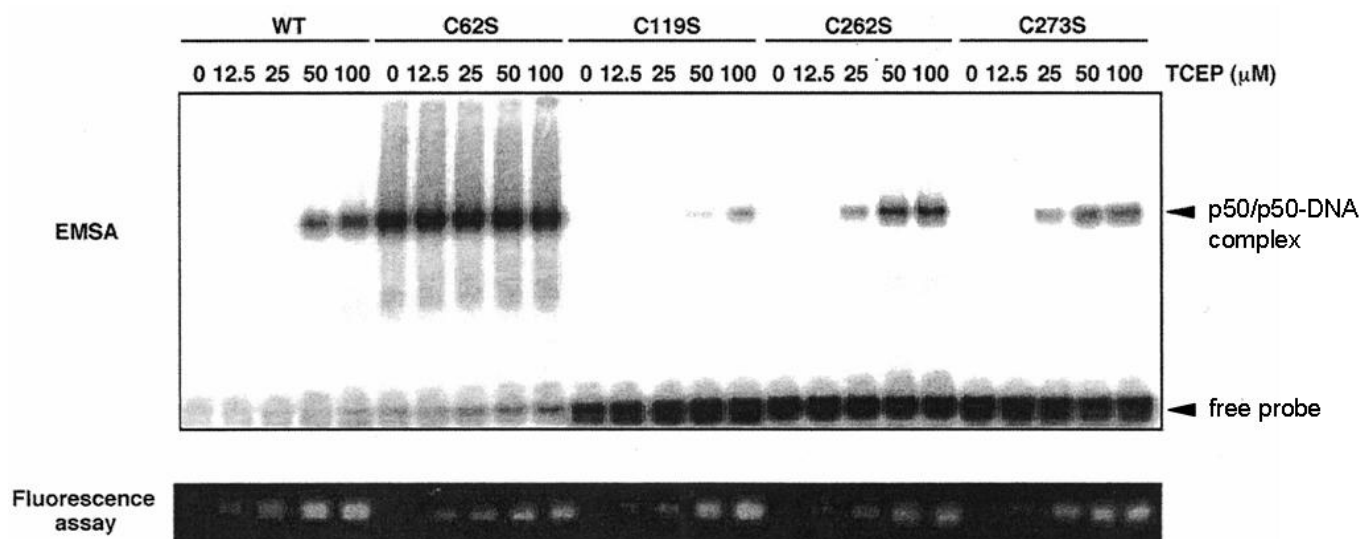


図 1.6 NF- κ B p50 サブユニットの Cys-62 残基のレドックス状態は p50 の DNA 結合能を決定する

これまでの解析から、p50 の Cys-62 残基はレドックス制御感受性が高く、かつその還元状態が NF- κ B の効率的な DNA 結合に必須であることが示されている。

酸化型 p50 野生型(WT) および Cys $\rightarrow$ Ser 置換変異体を、各濃度の還元剤 TCEP を用いて 37°C で 1 時間反応させた。その後 EMSA (2.2.4 の項を参照) によりその DNA 結合能を、また F5M アッセイ(図 3.3 を参照)によりその還元状態を定量した。この結果から、p50 C62S 変異体は酸化剤による DNA 結合能への影響を受けず、レドックス制御非依存的に DNA 結合能を保持していることが分かる。

(参考文献 55 : Nishi *et al.* (2002) J. Biol. Chem. Fig. 4 より引用)

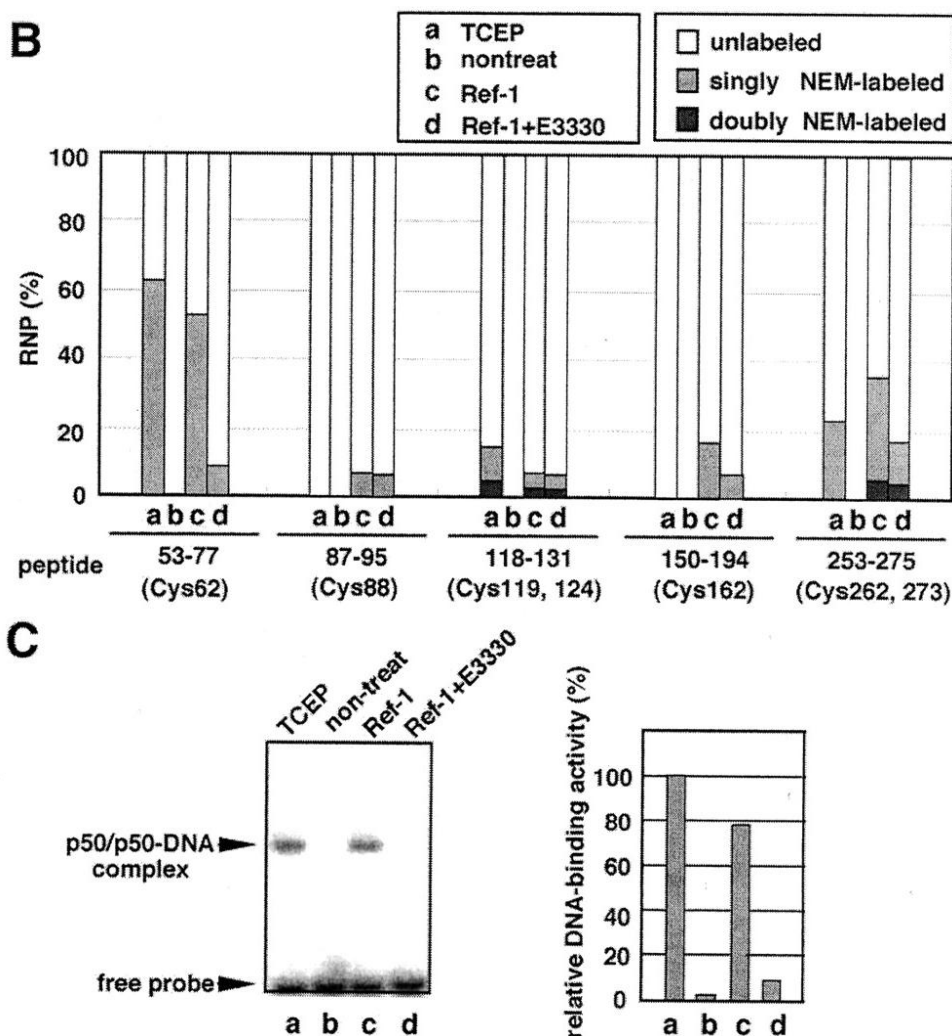


図 1.7 p50 Cys-62 残基はレドックス反応に対する感受性が高い

[パネル B] 酸化型 p50 を TCEP あるいは APE1/Ref-1 と反応させた後、N-ethyl-maleimide を用いて還元型の Cys 残基を修飾し、LysC 処理により断片化したフラグメントを質量分析器で解析することで、各フラグメントに含まれる Cys 残基のレドックス状態を個別に解析した。この結果から、p50 の Cys 残基は TCEP や APE1/Ref-1 のレドックス活性に対する感受性が非常に高いことが読み取れる。また、Cys-62 残基のレドックス状態と[パネル C]に示した p50 の DNA 結合活性のパターンが非常に似ていることから、p50 の DNA 結合に Cys-62 残基のレドックス状態が決定的な影響を持つことが想定される。

(参考文献 55 : Nishi *et al.* (2002) J. Biol. Chem. Fig. 3 より引用)

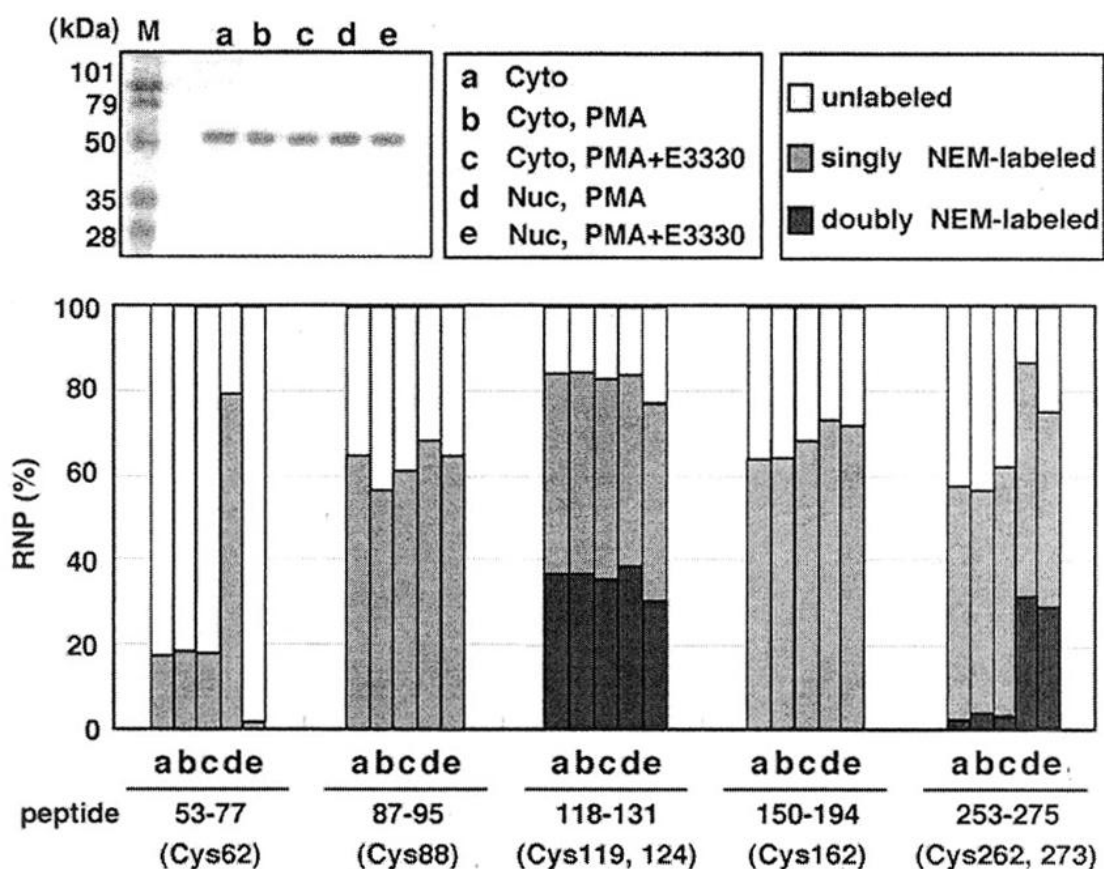


図 1.8 細胞内において NF- κ B の核移行に伴い p50 Cys-62 残基は酸化型から還元型へと移行する

Flag-p50 を安定的に発現する Jurkat 細胞を用いて、PMA 刺激前と刺激後における細胞質および核内の p50 の各 Cys 残基のレドックス状態を、図 1.7 の方法と同様に質量分析器を用いて測定した。この結果から、p50 の Cys-62 残基が細胞質から核内へ移行することで酸化型(unlabeled) から還元型(NEM-labeled) へと顕著に変化していることがわかる。また、APE1/Ref-1 のレドックス活性に対する阻害剤 E3330 により核内の Cys-62 残基のレドックス状態が顕著に酸化型へ傾いてしまうことから、NF- κ B の細胞内レドックス制御機構における APE1/Ref-1 の重要性が強く示唆される。

(参考文献 55 : Nishi *et al.* (2002) J. Biol. Chem. Fig. 6 より引用)

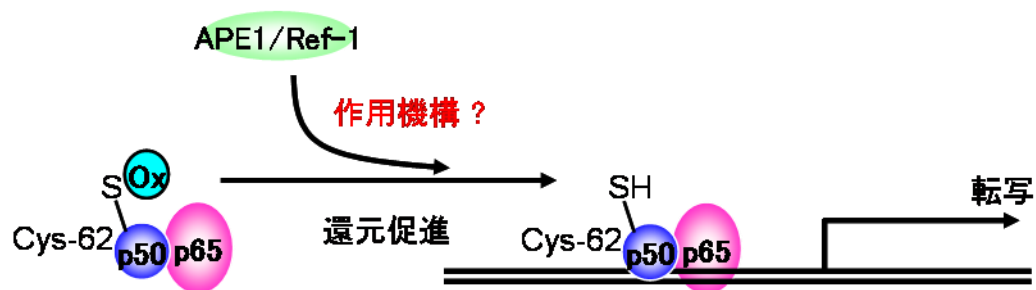


図 1.9 本研究の目的

NF-κB の酸化型から還元型への移行において、APE1/Ref-1 は何らかの作用機構を介して重要な役割を担っていることが強く示唆されている。本研究では NF-κB の活性化機構における APE1/Ref-1 の作用機構を解明し、同時に APE1/Ref-1 によるレドックス制御のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

第二章 APE1/Ref-1 による p50-DNA 結合促進機構の解析

2.1 緒言

NF- κ B が細胞内でレドックス制御を介して活性調節を受けており、特に p50 サブユニットでは Cys-62 残基のレドックス制御が DNA 結合に大きな影響を持つことは、*in vitro* および細胞レベルでの解析結果の整合性の高さから妥当性の高い制御機構と考えられる (55)。一方で、実際に細胞内においてどのような因子が NF- κ B のレドックス制御に直接的に関与しているかについては明確になっていない。当研究室におけるこれまでの研究の経緯から、細胞内での NF- κ B の効率的な活性化には APE1/Ref-1 を介した p50 のレドックス制御が不可欠であることが示唆された。しかし APE1/Ref-1 のレドックス活性が転写因子のレドックス制御に担う役割については多くの報告が蓄積しているにも関わらず、レドックス活性がどのような作用機構を介して発揮されるのかについては明らかになっていない。混迷の原因は *in vitro* の実験系による解析結果と、個体・細胞レベルでの解析結果において、APE1/Ref-1 のレドックス活性に対する Cys 残基の重要性の認識に相違が生じていることにある。この結果の相違は、*in vitro* の実験系が実際には *in vivo* の環境を反映していないことが原因ではないかと考えられる。そこで本章では、他の細胞内還元因子と APE1/Ref-1 との相互作用に注目した *in vitro* の実験系を構築し、APE1/Ref-1 による p50 のレドックス制御機構におけるその重要性について検討する。これまでも、APE1/Ref-1 と Trx の相互作用による転写因子のレドックス制御効果については複数解析がなされている (30,72)。一方で、細胞内に豊富に存在する低分子還元因子であるグルタチオンの存在も、細胞内の一連のレドックス制御機構を理解する上で見過ごすことは出来ない。本研究では APE1/Ref-1 との相互作用を検討する細胞内還元因子として Trx と GSH の効果を並行して検討し、APE1/Ref-1 を介したレドックス制御機構の解明を目指す。

2.2 実験材料及び方法

2.2.1 発現プラスミドの構築

ヒト APE1/Ref-1、p50 の翻訳領域の cDNA を挿入した pET14b(Novagen)大腸菌発現プラスミドおよび、pGEX-APE1/Ref-1 は、既に我々の研究室で構築されていたものを使用した (55,63)。

APE1/Ref-1 C/S の大腸菌発現プラスミドは以下の通りに構築した。pET14b-APE1/Ref-1 を鋳型とし、C65S、C93S、C99S、C138S、C208S、C296S、C310S の変異を導入する合成 DNA プライマーを用いて、PCR オーバーラップ伸長法により、APE1/Ref-1 C/S の cDNA を得た。これを XhoI と BamHI で消化し、pET14b 上の XhoI-BamHI site に連結させることにより pET14b-APE1/Ref-1 C/S を構築した。さらに pET14b-APE1/Ref-1 C/S を鋳型として PCR を用いて断片を増幅し、pGEX-6P-1(GE Healthcare)に連結させることにより、pGEX-APE1/Ref-1 C/S を構築した。

野生型ヒト Trx の翻訳領域を含むプラスミド、pQE/Trx は京都大学の淀井淳司教授から分与して頂いたものである。このプラスミドを鋳型として PCR を用いて cDNA 断片を伸長し、pET14b 上の NdeI-BamHI site に連結させることにより、pET14b-Trx を構築した。

2.2.2 大腸菌での組換えタンパク質の発現と精製

材料

- ・ LB (Amp+) プレート

Tryptone peptone (DIFCO) 1 g、Yeast Extract (DIFCO) 0.5 g、塩化ナトリウム (ナカライテスク) 1 g、Bacto agar (DIFCO) 1.5 g をイオン交換水で 100 ml にし、オートクレーブにより滅菌処理した。滅菌後、終濃度 50 µg/ml になるように

Ampicirin を加えてから培養シャーレに注ぎ入れ、静置しプレートを作製した。

- LB (Amp⁺) 培地

Tryptone peptone (DIFCO) 1 g、Yeast Extract (DIFCO) 0.5 g、塩化ナトリウム (ナカライテスク) 1 g をイオン交換水で 100 ml にし、オートクレーブにより滅菌処理をした。この培地に終濃度 50 µg/ml になるように Ampicirin を加えたものを使用した。

方法

ヒト p50、p50 C62S、APE1/Ref-1、APE1/Ref-1 C/S、Trx タンパク質発現プラスミドは、前項にて示した pET14b-p50、pET14b-p50 C62S、pET14b-APE1/Ref-1、pET14b-APE1/Ref-1 C/S、pET14b-Trx を用いる。これらのプラスミドは全て、発現タンパク質の N 末端に His タグを付加する。

これらのプラスミドをそれぞれ BL21 (DE3) 株に形質転換させ、LB (Amp⁺) プレートに播くことにより、目的タンパク質の発現プラスミド保持株を選定した。得られた発現プラスミド保持株を、オートクレーブ滅菌をした爪楊枝でつつき、試験管に入れた LB (Amp⁺) 培地 5 ml に懸濁して、37°C の液相恒温振とう培養槽で 8-12 時間振とう培養した。これをバッフル付き三角フラスコに入れた LB (Amp⁺) 培地 250 ml に加え、37°C の気相恒温振とう培養槽で振とう培養した。この培養液の 660 nm における吸光度が 0.5 になったところで、200 mg/ml IPTG を 300 µl (終濃度 1 mM) 加え、さらに 4 時間振とう培養した。

以後の精製操作は全て氷上または 4°C で行った。この培養液を 500 ml 遠心管 (BECKMAN) に移し、3000 rpm で 10 分遠心することにより大腸菌を回収した。回収した大腸菌を氷冷した PBS (-) (8.10 mM Na₂HPO₄·12H₂O、1.47 mM KH₂PO₄、137 mM NaCl、2.68 mM KCl) 30 ml に懸濁し、50 ml 遠心管に移して、3000 rpm で 20 分間遠心した。この操作を 2 回繰り返して大腸菌をよく洗浄し、氷冷した 1×Binding Buffer (20 mM Tris·HCl、500 mM NaCl、5 mM imidazole、0.1% NP-40、

10% glycerol、pH 7.9) 20 ml に懸濁した。

次にソニケーターを用いて、温度が上昇しないように注意しながらこれらの懸濁液を氷中で超音波破碎し、大腸菌からタンパク質を溶出させた。この溶出液を遠心管に移し、13000 g で 30 分間遠心することにより得られた上清を粗抽出液とし、次の精製に用いた。また一部を SDS-PAGE にかけることによって、目的のタンパク質の発現を確認し、濃度を算出した。

His タグ融合タンパク質の精製には Ni-NTA agarose レジン (QIAGEN) を用いた。これにより His タグを持ったタンパク質だけを選択的に回収できる。レジンのタンパク質吸着量はおよそ 1-10 mg/ml(レジン体積) であるので、上記で得られた粗抽出液に含まれる His タグ融合タンパク質の量から必要なレジンの量を見積もった。

まず、必要なレジンの体積の 2 倍量を 50 ml の遠心管に分注した。レジンを平衡化するために、レジンの 10 倍量の 1×Binding Buffer を加え攪拌し、2500 rpm で 1 分間遠心し、上清を除いた。この操作をさらに 2 回繰り返した。次に上記で得られた粗抽出液を加え、4℃で 1 時間ローテーターを用いて回転させながら攪拌し、His タグ融合タンパク質をレジンに吸着させた。これらの混合物を再び 2500 rpm で 1 分間遠心し、上清を素通り画分として回収した。さらにレジンの 10 倍量の 1×Wash Buffer (20 mM Tris-HCl、500 mM NaCl、20 mM imidazole、0.1% NP-40、10% glycerol、pH 7.9) を用いた洗浄操作を 4 回繰り返して非特異的にレジンに吸着しているタンパク質を除いた後に、レジンと等量の 1×Elution Buffer (20 mM Tris-HCl、500 mM NaCl、1 M imidazole、0.1% NP-40、10% glycerol、pH 7.9) を加え、溶出操作を 3 回繰り返すことにより目的の His タグ融合タンパク質を得た。

得られた精製タンパク質のバッファーを置換するために透析を行った。透析は 1 L の 0.1HgKEN (20 mM HEPES、100 mM KCl、0.2 mM EDTA、0.1% NP-40、10% glycerol) に対して、4℃で 2 時間ごとに 3 回バッファーを交換することにより行った。透析後のタンパク質は-80℃で保存した。

2.2.3 酸化型 p50 タンパク質の調製

精製した組換え p50 タンパク質を酸化処理するために、酸化剤 diamide を用いた。diamide は Sigma 社より購入し、1 M の濃度で水に溶解して -20 度で保存した。あらかじめ各タンパク質を終濃度 400 ng/μl になるように調整し、そこへ 1 M diamide を終濃度 10 mM になるように加えた。この溶液を 16°C で 30 分間保持することにより、タンパク質を酸化させた。その後、酸化処理をしたタンパク質を再び His タグ精製を行うことで、過剰な diamide を除去した。精製したタンパク質は 0.1HgKEN を用いて再び透析を行い、-80°C で保存した。

2.2.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

材料

- ・ 40%/0.75% アクリルアミド水溶液
- ・ 5×TBE

Trizma-Base 54 g、Boric acid 27.5 g、0.5 M EDTA 20 ml をイオン交換水 1 L に溶解して用いた。

方法

アクリルアミドゲルを作製するにあたり、ガラス板 2 枚の間に厚さ 1.5 mm のスペーサーを挿入し、上部以外の 3 辺を絶縁テープで留めてクリップで挟み、ゲル板を組み立てた。4% アクリルアミド混合液は、40%/0.75% アクリルアミド水溶液 4 ml、5×TBE 4 ml、ミリ Q 水 32 ml を混合することにより調整した。混合液を 0.2 μm のフィルターに通してから、10% APS 300 μl、TEMED 30 μl を加え、作製したゲル板に流し込んだ。素早くコームを差し込み、重合するまで室温で静置した。

アクリルアミドモノマーや APS がゲル中に残存していると泳動が乱れるため、これらを除く目的で予め泳動を行った(プレラン)。まず板の下方を留めた絶縁テープを

はがし、泳動装置に取り付けた。泳動緩衝液である 0.5×TBE を泳動装置に満たし、4℃で 150 V、30 分間電気泳動を行った。その後、アクリルアミドゲルのウェルにサンプルを流し入れ、4℃で 200 V の定電圧で 2 時間泳動を行った。

泳動終了後にゲルをガラス板からはがして 3MM 紙(Watman)上に乗せ、ラップを被せてゲルドライヤーを用いて乾燥させた。乾燥させたゲルはオートラジオグラフィを行い検出した。

p50 と GSH の反応は 2.2.3 で調製した酸化型 p50 25 ng および APE1/Ref-1 を GSH 存在下、非存在下で 37℃、30 分間反応させることにより行った。このときキャリアタンパク質として Carbonic anhydrase (CA) (SIGMA)を 10 µg 混合した。なお、還元型グルタチオン(GSH) は SIGMA 社から購入した。

p50 と Trx の反応は酸化型 p50 25 ng と、Trx、TrxR(16 nM)、NADPH(0.2 mM) および APE1/Ref-1 を混合し、37℃、30 分間反応させることにより行った。このときキャリアタンパク質として CA (SIGMA)を 10 µg 混合した。なお、ラット肝臓由来の Thioredoxin reductase (TrxR)および NADPH は SIGMA 社より購入した。

各条件でタンパク質を反応させた後、poly(dI-dC) 1 µg および^[32P]-標識 DNA プローブを加え、4℃で 20 分間反応させて、DNA とタンパク質の複合体を形成させた。このときの反応容量は 20 µl とし、組成は 20 mM HEPES pH 7.9、100 mM KCl、0.2 mM EDTA、0.1% NP-40、10% glycerol となるように調製した。

また、NF-κB 結合配列を持つ DNA プローブは、以下の 2 本の合成オリゴヌクレオチドをアニーリングさせた後に、[α-³²P]dATP と Klenow を用いて末端に ³²P 標識を加えたものを用いた。

NF-κB sense : 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCC-3'

NF-κB antisense : 5'-GCCTGGGAAAGTCCCCTC-3'

2.2.5 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

材料

- Sol.A

Acrylamide (ナカライテスク) 146 g、N,N'-methylenebisacrylamide (ナカライテスク) 4 g をミリ Q 水 500 ml 中に溶解し、Stericap-GV 0.22 μ m Bottle Top Filter (MILLIPORE)で濾過して 4°Cで遮光保存した。

- Sol.B

Trizma-Base (SIGMA) 90.75 g を適当量のミリ Q 水に溶解し、塩酸を用いて pH 8.8 に調整した。その後ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) (ナカライテスク) 2 g を加え、ミリ Q 水で 500 ml とした。これを Stericap-GV 0.22 μ m Bottle Top Filter で濾過して用いた。

- Sol.C

Trizma-Base 30.25 g を適当量のミリ Q 水に溶解し、塩酸を用いて pH 6.8 に調整した。その後 SDS 2 g を加え、ミリ Q 水で 500 ml とした。これを Stericap-GV 0.22 μ m Bottle Top Filter で濾過して用いた。

- 泳動バッファー

Trizma-Base 2.4 g、グリシン 11.52 g、10 % SDS 8 ml を 800 ml のイオン交換水に溶解して用いた。

- 4×Sample Dye

Sol.C 20 ml、SDS 3.2 mg、Glycerol 20 g、2-メルカプトエタノール 1.6 mg、ブロモフェノールブルー (BPB) 10 mg を混合し、Millex-GP 0.22 μ m Filter Unit (MILLIPORE)で濾過し、分注して-20°Cで保存した。

方法

スペーサーが 1.0 mm のガラス板を用いて、ゲル作製装置 (BioRad)を組み立てた。アクリルアミド混合液は Sol.B 1.5 ml に Sol.A を目的のアクリルアミド濃度になるよ

うに加え、ミリ Q 水を用いて最終体積が 6 ml になるように調製した。このアクリルアミド混合液に 10% Ammonium persulfate (APS) 40 μ l と、N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) 10 μ l を加え、ゲル作製装置に組み立てたゲル板に流し入れ、その上に水を重層し分離ゲルを作製した。分離ゲルが固まったら、重層していた水を除き、Sol.A 0.45 ml、Sol.C 0.75 ml、ミリ Q 水 1.8 ml、10% APS、TEMED 8 μ l の混合液を分離ゲルの上に流し入れて、コームを挿し、濃縮ゲルを作製した。濃縮ゲルが固まったら、コームを抜いてミニプロティアン 3 泳動装置 (BioRad) に組み立て、泳動バッファーを満たした泳動槽に入れた。ウェルにサンプルを流しいれた後、濃縮ゲルは 20 mA、分離ゲルは 30 mA の定電流で泳動を行った。

サンプルは 4×Dye を終濃度 1×になるように添加し、98℃で 5 分間加熱してから泳動に用いた。

ゲルの染色にはラピッドステイン CBB Kit (ナカライテスク)を用い、方法は添付の説明書に従った。

2.2.6 GST プルダウンアッセイ

³⁵S で標識された p50 タンパク質を得るために、*in vitro* 転写翻訳システムである TNT T7 quick coupled transcription / translation system (Promega)を用い、標識タンパク質を作製した。鋳型プラスミドは pET14b-p50 を用い、方法は添付のマニュアルに従った。生成物を用いて SDS-PAGE を行い、ゲルを乾燥させた後にオートラジオグラフィーをすることにより、目的の標識タンパク質が生成されていることを確認した。

GST 融合タンパク質発現プラスミドは pGEX-APE1/Ref-1 WT および pGEX-APE1/Ref-1 C/S を用いた。GST のみを発現する pGEX 6P-1 および、pGEX-APE1/Ref-1 WT、pGEX-APE1/Ref-1 C/S を大腸菌 BL21(DE3) 株に形質転換

した。得られたコロニーを 10 ml の LB (Amp+) 培地に植菌し、37℃で振とう培養した。培養液の 660 nm における OD が 0.5 になったところで、終濃度 1 mM になるように IPTG を添加し、さらに 4 時間培養を行った。以後の操作は全て氷上または 4℃で行った。この培養液を回収し、PBS (-) で洗浄した後、800 μ l の 0.1HgKEN (20 mM HEPES pH 7.9、100 mM KCl、0.2 mM EDTA、0.1% NP-40、10% glycerol) を加え、ハンディソーニケーターを用いて氷上で超音波破碎した。その後 15000 rpm で 30 分間遠心操作を行い、上清を粗抽出液として用いた。

Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) 30 μ l (レジン体積)を 300 μ l の 0.1HgKEN で 3 回洗浄することにより、平衡化を行った。そこに 1 μ g の GST あるいは GST-APE1/Ref-1 WT、GST-APE1/Ref-1 C/S を含む大腸菌 BL21 (DE3) の粗抽出液を加え、0.1HgKEN で容量を 300 μ l とし、ローテーターを用いて 4℃で 1 時間混合した。その後、300 μ l の 0.1HgKEN で GST 融合タンパク質の結合したレジンを 4 回洗浄した。これに 2 μ l の ^{35} S 標識 p50 タンパク質を含む in vitro 転写翻訳反応液と 300 μ l の 0.1HgKEN を加え、再びローテーターを用いて 4℃で 1 時間混合した。その後 300 μ l の 0.1HgKEN で 6 回洗浄し、最後に 30 μ l の 2×Sample Dye を用いてレジんに吸着したタンパク質をすべて溶出した。溶出したサンプルは SDS-PAGE で分画後、CBB 染色およびオートラジオグラフィーにより画像化した。

2.3 結果と考察

2.3.1 p50 の DNA 結合活性に対する GSH、Trx、APE1/Ref-1 の効果

NF- κ B p50 は DNA 結合ドメインに高度に保存された Cys 残基(Cys-62)を有し、この Cys 残基の酸化還元状態の変化によって、DNA 結合活性が調節されている(46,50,55,63)。

実際に EMSA により、大腸菌で発現・精製した p50 タンパク質を diamide で酸化処理した酸化型 p50 はそれ単体では DNA に結合できないことを、確認した(図 2.1 レーン 1)。さらに、そこに DTT などの強力な還元剤を作用させることによりバンドシフトが見られ、酸化型 p50 は還元されることにより DNA 結合能を獲得することを確認した(図 2.1 レーン 7)。そこで以降は、酸化型 p50 の DNA 結合能の獲得を指標として、p50 のレドックス状態に対する APE1/Ref-1 および還元因子の効果を EMSA により解析した。

まず、p50 の DNA 結合能に対する還元因子、GSH、Trx、および APE1/Ref-1 のそれぞれ単独での作用を調べた。酸化型 p50 に GSH を最終濃度 0.1、0.3、1、3、10 mM となるように加えたところ、1 mM 以上の GSH 濃度において、GSH の濃度依存的なバンドシフトの増加が見られ、GSH による p50 の DNA 結合促進作用が確認された(図 2.1)。また、酸化型 p50 に Trx を最終濃度 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 μ M となるように加え、0.2 mM NADPH と TrxR と共に反応させたところ、0.8 μ M 以上の Trx 濃度において Trx の濃度依存的に p50 / DNA 結合バンドが増加し、Trx システム(Trx + TrxR + NADPH) による p50 の DNA 結合促進作用が確認された(図 2.2)。同様に、酸化型 p50 に大腸菌で発現させた APE1/Ref-1 を加え、反応させたところ、2.5 μ M 以上の比較的高濃度な条件 (p50 に対して 50 倍濃度以上) においてではあるが、APE1/Ref-1 の濃度依存的なバンドシフトの増加が見られ、APE1/Ref-1 のレドックス活性による p50 の DNA 結合促進作用が確認された(図 2.3 レーン 1-7)。

2.3.2 還元因子存在下での APE1/Ref-1 の p50 -DNA 結合促進作用の解析

次に、他の還元因子（GSH や Trx）が一定濃度共存する時の、p50 の DNA 結合能に対する APE1/Ref-1 の効果を検討した。

すると、1 mM の GSH が存在時には APE1/Ref-1 は 0.5 μ M という、単独での条件に比べて低濃度（p50 に対して 10 倍濃度）の条件で酸化型 p50 の DNA 結合を顕著に増加させる活性を示した(図 2.3 レーン 8-11)。また GSH 存在下の場合と同様に、0.8 μ M の Trx 存在下においても 0.5 μ M の APE1/Ref-1 により酸化型 p50 の DNA 結合が増加した(図 2.3 レーン 12-15)。

これらの結果から、他の還元因子（GSH や Trx）と一緒に存在する時には、APE1/Ref-1 は還元因子と相互作用することにより、さらに効果的に p50 の DNA 結合を促進出来ることが示唆された。

2.3.3 レドックス活性を持たない変異体（APE1/Ref-1 C/S 変異体）の作成

他の還元因子と相互作用することにより、APE1/Ref-1 がさらに効率的に p50 の DNA 結合促進作用を発揮する作用機構として、ここでは以下の 3 つの可能性が想定できる。

1. 還元因子によって APE1/Ref-1 が効率的に還元され、還元型の APE1/Ref-1 が酸化型 p50 を直接的に還元する（APE1/Ref-1 の「レドックス活性」による作用機構）
2. 還元因子が p50 を還元する作用を、APE1/Ref-1 が何らかの機構で間接的に促進する（APE1/Ref-1 の「レドックスシャペロン活性」による作用機構）
3. レドックス活性とは無関係に、別の何らかの作用機構により APE1/Ref-1 が p50 の DNA 結合を促進する

そこで、これらの可能性を検討するために、レドックス活性を持たない APE1/Ref-1 変異体の作製を試みた。APE1/Ref-1 は図 2.4 に示すように全部で 7 つの Cys 残基を有している。APE1/Ref-1 のレドックス活性は Cys 残基の酸化還元によりもたらされると考えられることから、ここでは 7 つ全ての Cys 残基を Ser 残基に置換した APE1/Ref-1 C/S 変異体を構築した。APE1/Ref-1 C/S 変異体は Cys 残基を 1 つも有さないことから、すなわちレドックス活性を持たない変異体であることが想定される。なお、APE1/Ref-1 の X 線結晶構造からは、APE1/Ref-1 の 7 つの Cys 残基にジスルフィド結合の形成は見られず、Ser 残基に置換したことによる大きな構造的変化は起こらないことが予想される。

2.3.4 APE1/Ref-1 C/S 変異体による p50 -DNA 結合促進作用の解析

APE1/Ref-1 の野生型 (以下、WT と表記) と同様に、APE1/Ref-1 C/S 変異体単体、あるいは GSH や Trx が一定濃度共存する時の、APE1/Ref-1 C/S 変異体による酸化型 p50 の DNA 結合に対する効果を EMSA により検討した。

すると、1 mM の GSH 存在下には、APE1/Ref-1 C/S 変異体においても、0.5 μ M の低濃度で酸化型 p50 の DNA 結合を増加する作用が確認された(図 2.5 レーン 8-11)。同様に、0.8 μ M の Trx 存在下においても 0.5 μ M の APE1/Ref-1 C/S 変異体による酸化型 p50 の DNA 結合の促進作用が見られた(図 2.5 レーン 12-15)。この結果から、GSH や Trx 存在下で見られる、低濃度の APE1/Ref-1 による酸化型 p50-DNA 結合促進作用は、APE1/Ref-1 自身の Cys 残基の酸化還元に依存したレドックス活性とは独立した作用機構に依ることが示唆された。

一方、GSH や Trx が存在しない APE1/Ref-1 C/S 変異体単体の条件では、高濃度(最高 20 μ M) の APE1/Ref-1 C/S 変異体を使用しても酸化型 p50 の DNA 結合を促進する作用は認められなかった(図 2.5 レーン 1-7)。この結果は、APE1/Ref-1 C/S 変異体が想定された通りにレドックス活性を保持していないことを裏付けるものといえる。

以上の結果から、p50 の DNA 結合調節に対して APE1/Ref-1 は以下の二つの異なった作用機構を持つことが示唆された。

1. APE1/Ref-1 は、自身の Cys 残基の酸化還元を介したレドックス活性により p50 の DNA 結合を直接的に促進する。(以前から報告されている機構。ただし、*in vitro* アッセイ系では高濃度の APE1/Ref-1 を必要とする)
2. 他の還元因子の存在により、APE1/Ref-1 は自身の Cys 残基には依存しない何らかの作用機構を介して p50 の DNA 結合を促進する。(未知の作用機構。低濃度の APE1/Ref-1 で活性が見られる)

2.3.5 APE1/Ref-1 の p50 との結合は Cys 残基に依存しない

他の還元因子存在下では、APE1/Ref-1 C/S 変異体にも酸化型 p50 の DNA 結合を促進する活性が確認された。一方、我々の研究室ではこれまでに APE1/Ref-1 は p50 と直接的に結合することを示し、レドックス活性を介したレドックス制御には APE1/Ref-1 と p50 の結合が重要であることを示唆してきた (63)。したがって、APE1/Ref-1 C/S 変異体において見られる p50 の DNA 結合促進作用の作用機構を理解する上で、APE1/Ref-1 C/S 変異体が p50 と直接結合するか否かは非常に有用な情報と考えられる。そこで GST プルダウンアッセイにより、APE1/Ref-1 C/S 変異体の p50 に対する結合能を検討した。

その結果、APE1/Ref-1 C/S 変異体は APE1/Ref-1 WT と同じく p50 と効率良く結合することが示された(図 2.6)。すなわち、APE1/Ref-1 と p50 の相互作用は APE1/Ref-1 の Cys 残基には依存しないと考えられる。

2.4 本章のまとめ

本章では以下の結果が得られた。

- ① GSH、Trx、APE1/Ref-1 はそれぞれ単独で酸化型 p50 の DNA 結合を促進した
- ② GSH や Trx の共存下では、APE1/Ref-1 はより効率的な p50 の DNA 結合促進活性を示した
- ③ APE1/Ref-1 C/S 変異体も野生型と同程度に、GSH や Trx の存在下での効率的な p50 の DNA 結合促進活性を示した
- ④ APE1/Ref-1 C/S 変異体も WT と同様に p50 への結合能を持つことが示された

以上の結果から、p50 の DNA 結合能調節に対して、APE1/Ref-1 は少なくとも 2 つの活性を持つことが示唆された。すなわち、APE1/Ref-1 の Cys 残基に依存したレドックス活性と、Cys 残基に依存しない活性である。次章では、後者の活性が p50 のレドックス制御を介して発揮される効果なのかについて、さらに検討する。

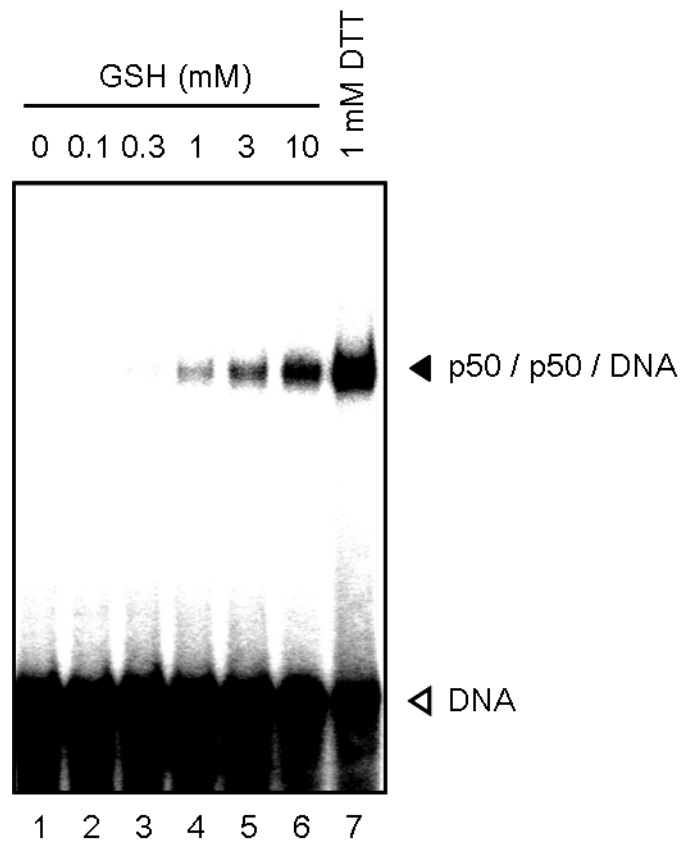


図 2.1 GSH による酸化型 p50 の DNA 結合促進作用の検討

0.05 μ M の酸化型 p50 に 0.1、0.3、1、3、10 mM の還元型グルタチオン(GSH)(レーン 2-6) 及び 1 mM DTT(レーン 7)を加え 37°C で 30 分間反応させた。その後 DNA プローブを加え 4°C で 20 分間反応させ、EMSA を行い p50 と DNA の複合体形成を確認した。

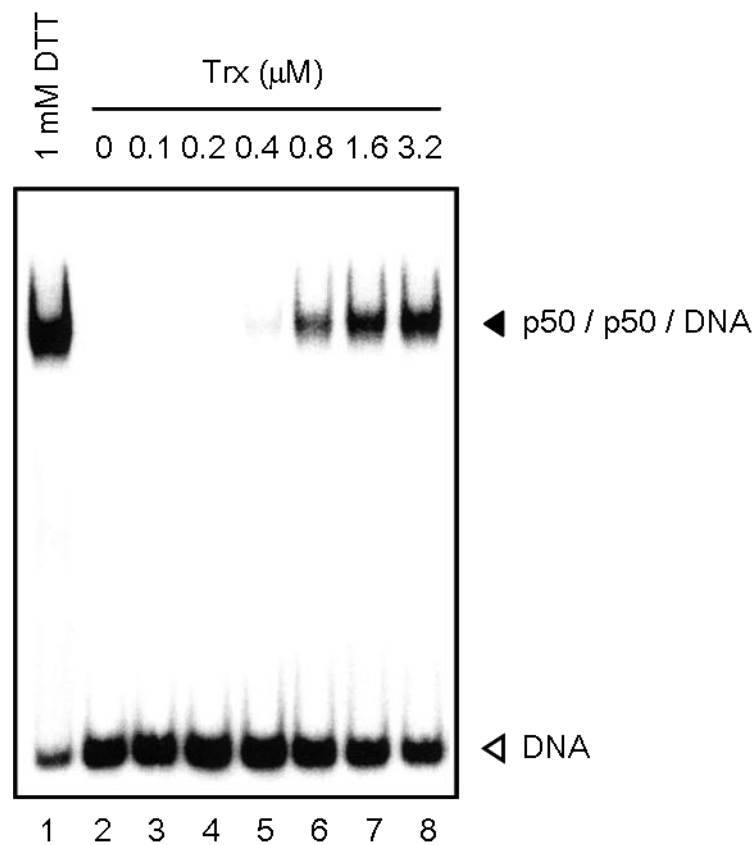


図 2.2 Trx による酸化型 p50 の DNA 結合促進作用の検討

0.05 μM の酸化型 p50 に 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 μM の Trx と TrxR 及び NADPH(レーン 2-7) 、または 1 mM DTT(レーン 8)を加え 37°C で 30 分間反応させた。その後 DNA プローブを加え 4°C で 20 分間反応させ、EMSA を行い p50 と DNA の複合体形成を確認した。

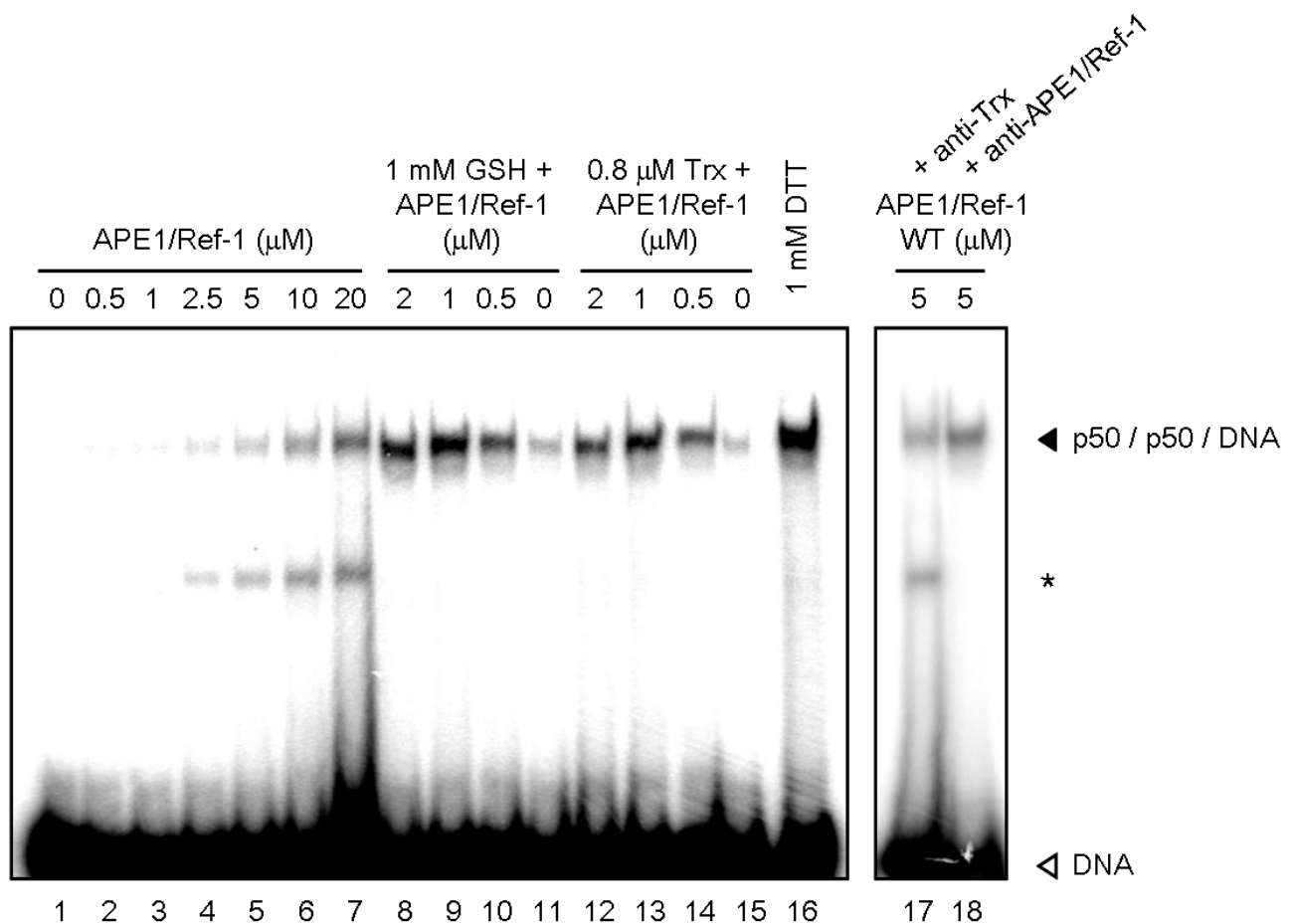


図 2.3 APE1/Ref-1 による酸化型 p50 の DNA 結合促進作用の検討

0.05 μM の酸化型 p50 に、0.5、1、2、5、10、20 μM の APE1/Ref-1(レーン 2-7) 、または 1 mM の GSH 存在下で 0、0.5、1、2 μM の APE1/Ref-1(レーン 8-11)、0.8 μM の Trx と TrxR 及び NADPH 存在下で 0、0.5、1、2 μM の APE1/Ref-1(レーン 12-15)、あるいは 1 mM DTT(レーン 16)を加え、37°Cで 30 分間反応させた。その後 DNA プローブを加え 4°Cで 20 分間反応させ、EMSA を行い p50 と DNA の複合体形成を確認した。また、反応液に抗 APE1/Ref-1 抗体あるいはコントロールとして抗 Trx 抗体を加えて反応させることで、レーン 4-7 で見られる比較的移動度の高い複合体バンド (*) が APE1/Ref-1 と DNA の複合体であることを確認した (レーン 17, 18)。

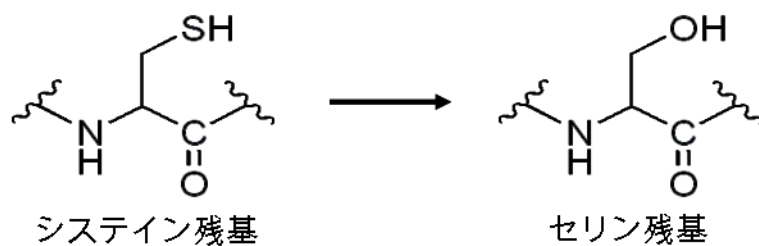
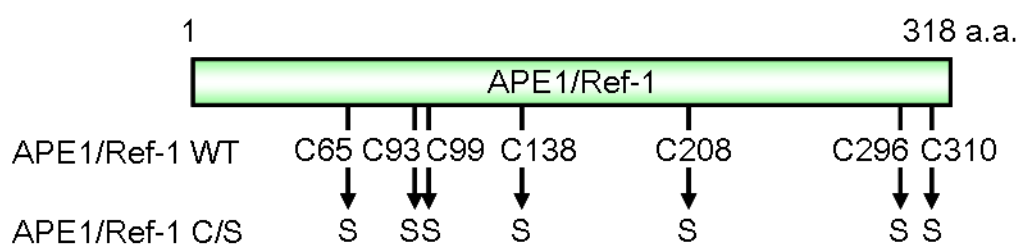


図 2.4 APE1/Ref-1 C/S 変異体の作製

APE1/Ref-1 には 7 個の Cys 残基がある。ここではそれらの全てを Ser 残基に置換した変異体(C/S 変異体)を作製した。C/S 変異体は Cys 残基を 1 つも持たないことから、レドックス活性を保持していないことが想定される。

図 1.2 も参照。

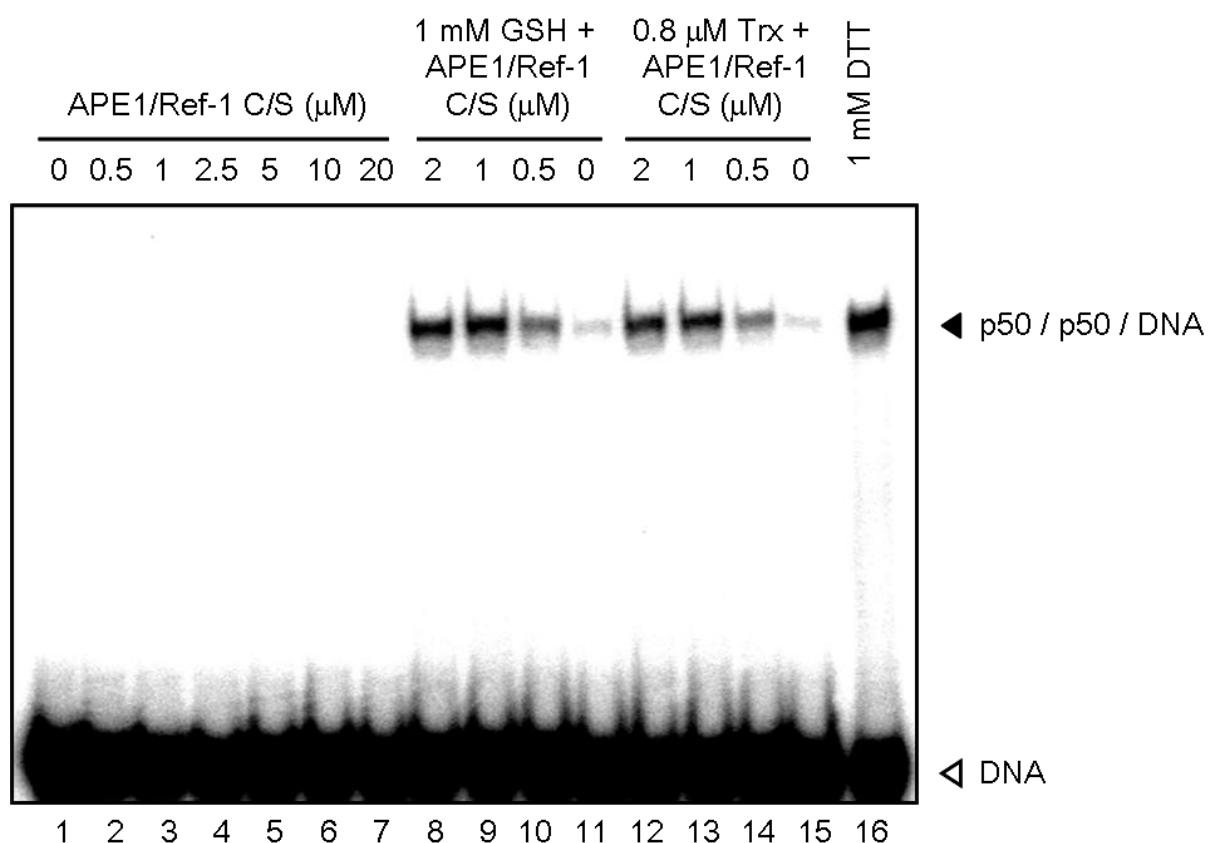


図 2.5 APE1/Ref-1 C/S 変異体による酸化型 p50 の DNA 結合促進作用の検討

0.05 μM の酸化型 p50 に、0.5、1、2、5、10、20 μM の APE1/Ref-1 C/S 変異体(レーン 2-7) 、または 1 mM の GSH 存在下で 0、0.5、1、2 μM の APE1/Ref-1C/S 変異体(レーン 8-11)、0.8 μM の Trx と TrxR 及び NADPH 存在下で 0、0.5、1、2 μM の APE1/Ref-1 C/S 変異体(レーン 12-15)、あるいは 1 mM DTT(レーン 16)を加え、37°C で 30 分間反応させた。その後プローブを加え 4°C で 20 分間反応させ、EMSA を行い p50 と DNA の複合体形成を確認した。



図 2.6 APE1/Ref-1 C/S 変異体と p50 の相互作用の検討

$[^{35}\text{S}]$ で標識した p50 を用いて、GST プルダウンアッセイにより APE1/Ref-1 WT および APE1/Ref-1 C/S 変異体と p50 との結合能を検討した。

第三章 APE1/Ref-1 の Cys 残基非依存的な p50 の DNA 結合促進機構の解析

3.1 緒言

第二章では APE1/Ref-1 が自身の Cys 残基非依存的に p50 の DNA 結合を促進する活性を持つことを示した。本章ではその作用機構についてさらに解析を進める。

APE1/Ref-1 が還元因子（ここでは GSH あるいは Trx）と相互作用しながら、APE1/Ref-1 自身の Cys 残基非依存的に p50 の DNA 結合を促進する作用機構として、現時点では以下の二つの可能性が考えられる。

1. 還元因子が p50 を還元するのを、APE1/Ref-1 が何らかの機構で間接的に促進している（APE1/Ref-1 の「レドックスシャペロン活性」による機構）
2. APE1/Ref-1 は GSH や Trx が存在することで未知の活性を獲得し、レドックス制御とは関係ない機構を介して p50 の DNA 結合を促進する

そこで本章では、APE1/Ref-1 の Cys 残基非依存的な p50 の DNA 結合促進活性が p50 のレドックス制御を介した作用であるかを検討するために、以下の 2 種類の解析を試みる。1 つめは p50 C62S 変異体を用いた解析である。p50 の Cys-62 残基はレドックス制御感受性が高く、また還元状態にあることが p50 の DNA 結合に重要であることが知られている (55)。p50 C62S はその Cys-62 残基を Ser に置換した変異体で、レドックス制御非依存的に DNA に結合する(図 1.6)。そこで、p50 C62S に対する効果と p50 WT に対する効果を比較検討することで、p50 の DNA 結合に対する APE1/Ref-1 と還元因子の相乗的な作用が p50 Cys-62 残基のレドックス制御を介した効果であるかを検討する。また 2 つめに、チオール基に対する不可逆的な蛍光修飾を利用して、p50 のレドックス状態に対する APE1/Ref-1 と還元因子による作用を直接的に解析する。

3.2 実験材料及び方法

3.2.1 酸化型 p50 C62S の調製

既に我々の研究室で構築されていた pET14b-p50 C62S (55)を用いて、2.2.2 に示した手順に従い、大腸菌を用いて His タグ融合 p52、c-Rel、p65、c-Jun bZip、c-Fos bZip を発現・精製した。

さらに 2.2.3 の手順に従って、精製した p50 C62S タンパク質を酸化処理し、-80℃で保存した。

3.2.2 F5M アッセイ

fluorescein-5-maleimide (F5M) は Molecular Probes 社より購入し、200 mM の濃度で DMF(dimethylformamide)に溶解し -80℃で保存した。

酸化型 p50 100 ng に、APE1/Ref-1 を 500 ng または 1 µg 加え、1 mM GSH 存在下または非存在下、あるいは Trx システム(0.8 µM Trx + 16 nM TrxR + 0.2 mM NADPH)の存在下または非存在下において 37℃で各時間反応させた。反応液の組成は 20 mM HEPES、100 mM KCl、0.2 mM EDTA、0.1% NP-40、10% glycerol とし、反応液の体積は 50 µl とした。

タンパク質の反応液に終濃度 0.3 mM の F5M を加え 4℃で 5 分間反応させ、還元型のシステイン残基を標識した。その後、終濃度 20 mM の L-Cysteine (ナカライテスク)を加え過剰の F5M をマスクした。キャリアとして 10 µg の CA を加え、あらかじめ -20℃で冷やしたアセトンを 800 µl 加えた。よく混合して-20℃で 1 時間静置した後、4℃の微量遠心機を用いて 15000 rpm で 30 分間遠心した。上清を除いた後、-20℃に冷した 80%アセトン 200 µl で洗浄し、5 分間の遠心後、沈殿物を乾燥させた。乾燥した沈殿物を 1×Sample Dye に溶解し、SDS-PAGE によりタンパク質を分画し

た。タンパク質の蛍光強度は蛍光イメージアナライザーFLA2000（富士フィルム）を用いて 490 nm の励起光でゲルをスキャンすることで検出した。検出フィルターは 520 nm を使用した。また得られた画像データは Image Gauge（富士フィルム）を用いることで解析を行った。

3.3 結果と考察

3.3.1 APE1/Ref-1 と還元因子の相乗的な活性は p50 Cys-62 残基に作用している

レドックス制御による p50 の DNA 結合調節は主に Cys-62 残基の酸化還元を介して起こることが知られている (46,55)。そこで、APE1/Ref-1 と GSH または Trx による相乗的な作用が実際に p50 の Cys-62 残基のレドックス制御を介した効果であるかを検討するために、Cys-62 残基を Ser 残基に置換した変異体、p50 C62S を調製した。なお、p50 C62S は還元型の Cys 残基を模倣すると考えられ、レドックス非依存的に DNA に結合する活性を持つことが知られている(図 1.6) (55,69)。

まず 1 mM GSH 存在下において、低濃度の APE1/Ref-1 が p50 C62S に対しても DNA 結合促進活性を示すか否かを検討した。その結果、第二章で得られた結果と同様に APE1/Ref-1 WT および C/S 変異体は酸化型 p50 の DNA 結合を効率よく促進した一方で、p50 C62S に対しては APE1/Ref-1 WT および C/S 変異体ともにその作用を示さなかった(図 3.1)。また、GSH 存在下の結果と同様に 0.8 μ M の Trx 存在下においても p50 C62S に対する APE1/Ref-1 WT および C/S 変異体の効率的な DNA 結合促進作用は認められなかった(図 3.2)。以上の結果から、GSH や Trx の存在時に見られる APE1/Ref-1 の効率的かつ Cys 残基非依存的な p50 の DNA 結合促進作用は、p50 の Cys-62 残基のレドックス制御を介した作用であることが示唆された。すなわちこれは、APE1/Ref-1 が他の還元因子(GSH や Trx) による p50 の Cys-62 残基の還元反応を間接的に促進する活性を有していることを示唆する結果といえる。

3.3.2 APE1/Ref-1 は GSH や Trx による p50 の還元を促進する

ここでは p50 のレドックス状態を直接測定することにより、実際に APE1/Ref-1 が GSH や Trx による p50 の還元反応を促進しているかを検討する。

迅速かつ不可逆的にチオール基と結合する化合物は、還元型の Cys 残基を安定的か

つ特異的に標識することができ、そのためタンパク質の酸化還元状態を直接的に測定するための有用なツールとなる。そこで本研究では蛍光標識チオール修飾試薬 fluorescein-5-maleimide (F5M) を用いる (55)。F5M はマレイミド基にフルオレセイン基が融合した化合物で、マレイミド基がチオール基を持つ還元型 Cys 残基と速やかに共有結合してチオエステルを形成する。したがって還元型 Cys 残基を迅速かつ不可逆的にフルオレセインで修飾することができ、フルオレセインの蛍光強度を測定することによりタンパク質の還元状態の測定が可能になる(図 3.3)。

この方法を用いて、GSH および APE1/Ref-1 存在下における p50 の還元状態の変化を経時的に測定した(図 3.4)。GSH 非存在下では p50 の酸化還元状態に変化は見られないが(図 3.4-A 左上段)、p50 の 1 mM GSH 存在下では反応時間に依存して p50 の蛍光強度の増加が見られ、p50 の還元反応が確認された(図 3.4-A 右上段)。また、GSH 非存在下では APE1/Ref-1 WT や APE1/Ref-1 C/S 変異体を加えても p50 の還元はほぼ認められなかったが(図 3.4-A 左中段、左下段)、1 mM GSH 存在下では APE1/Ref-1 WT および APE1/Ref-1 C/S 変異体を加えることで、1 mM GSH のみの条件に比べ p50 の蛍光強度のさらなる増加が見られた(図 3.4-A 右中段、右下段)。さらに、画像解析ソフトを用いて得られた蛍光標識バンドを数値化し、グラフ化した(図 3.4-B)。1 mM GSH 存在下で 30 分間反応させたときの蛍光強度を 1 とすると、さらに APE1/Ref-1 WT と APE1/Ref-1 C/S を加えたどちらの条件でも 30 分の反応後には 3 倍程度の蛍光の増加が認められた。この結果から、APE1/Ref-1 の WT および C/S 変異体が GSH による p50 の還元反応を促進することが確認された。

また、Trx による還元反応においても GSH による還元時と同様の傾向の結果が得られ、APE1/Ref-1 の WT および C/S 変異体が Trx による p50 の還元反応も促進することが確認された(図 3.5)。

さらに、この効果が Cys-62 残基のレドックス制御を介しているかを検討するために、p50 C62S を用いた解析を行った。p50 と p50 C62S の還元効率の差は Cys-62

残基の還元を反映すると考えられる。そこで GSH 存在下での APE1/Ref-1 WT および C/S 変異体の、p50 と p50 C62S に対する還元促進作用を比較した。すると、p50 C62S に対しては非常に低いレベルでしか還元促進が見られなかった(図 3.6)。p50 C62S には Cys-62 以外の 6 つの Cys 残基が含まれており、p50 C62S において見られる低レベルの還元はこの 6 つの Cys 残基の還元を反映する効果であると考えられる。すなわち p50 と p50 C62S の還元効率の差を考慮すると、F5M アッセイにおいて見られる APE1/Ref-1 の Cys 残基非依存的かつ還元因子との相乗的な p50 の還元促進活性は、主に Cys-62 残基の還元を反映した効果であることが示唆された。

3.4 本章のまとめ

本章では以下の結果が得られた。

- ① p50 C62S に対しては、還元因子存在下での APE1/Ref-1 による Cys 残基非依存的な DNA 結合促進作用は認められなかった
- ② APE1/Ref-1 および C/S 変異体が存在することで、GSH および Trx による p50 の還元がさらに促進されることが示された

以上の結果から、APE1/Ref-1 は GSH や Trx による p50 Cys-62 残基の還元を間接的に促進する活性を持つことが示唆された。この APE1/Ref-1 の活性は、APE1/Ref-1 の Cys 残基には依存せず、そのためこれまで報告されている APE1/Ref-1 の還元状態を必要とするレドックス活性とは異なる作用機構を介する活性であることが示唆される。そこで本研究では、今回明らかになった APE1/Ref-1 の新たな活性を、APE1/Ref-1 の「レドックスシャペロン活性」と定義する(図 3.7)。次章では、このレドックスシャペロン活性の作用機構について理解を深めるために、レドックスシャペロン活性が他の転写因子に対しても発揮されるかを検討するとともに、制御の標的とする転写因子の特異性・選択性について検討する。また、APE1/Ref-1 が多機能性のタンパク質であることを考慮し、レドックスシャペロン活性と APE1/Ref-1 の他の活性との関係について検討する。

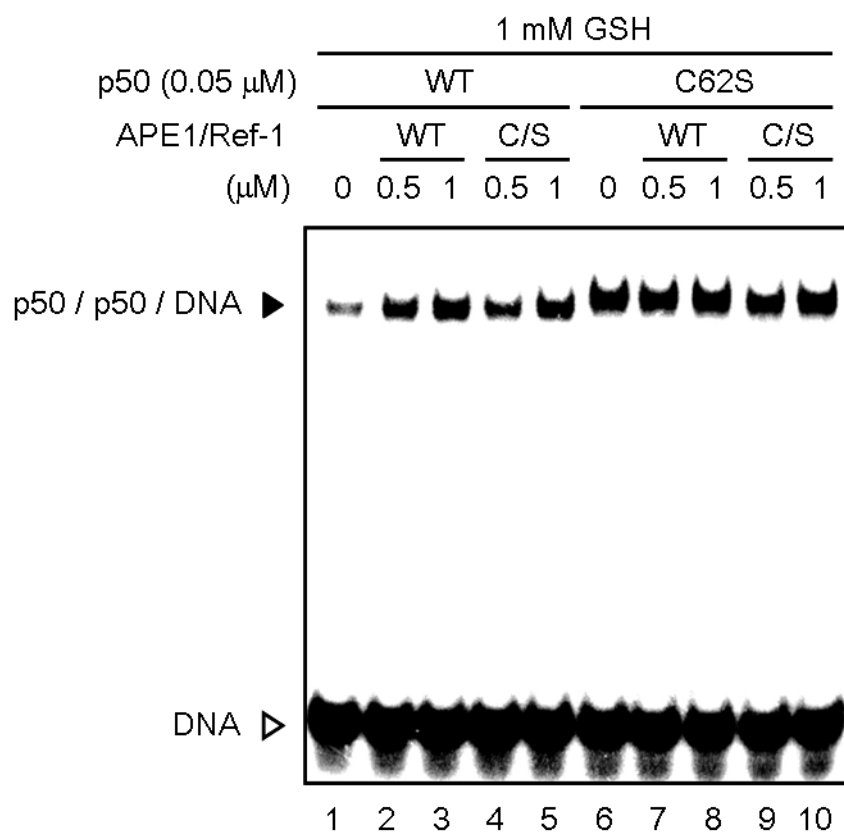


図 3.1 GSH 存在下での p50 C62S に対する APE1/Ref-1 の DNA 結合促進作用の検討

1 mM GSH 存在下で 0.05 μ M の p50(レーン 1-5)または p50 C62S(レーン 6-10)に 0.5、1 μ M の APE1/Ref-1 WT(レーン 2, 3, 7, 8)または APE1/Ref-1 C/S 変異体(レーン 4, 5, 9, 10)を加え、37°Cで 30 分間反応させた。その後 DNA プローブを加え 4°Cで 20 分間反応させ、EMSA を行い p50 WT あるいは p50 C62S と DNA の複合体形成を確認した。

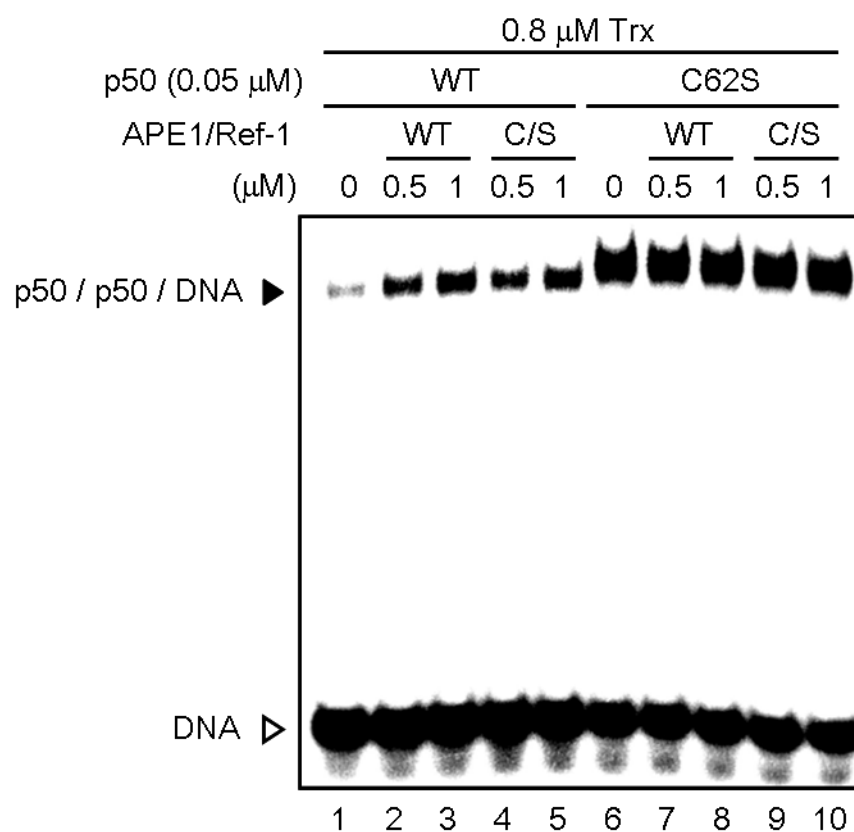


図 3.2 Trx 存在下での p50 C62S に対する APE1/Ref-1 の DNA 結合促進作用の検討

0.8 μ M Trx および 16 nM TrxR、0.2 mM NADPH の存在下で、0.05 μ M の p50(レーン 1-5)または p50 C62S(レーン 6-10)に、0.5、1 μ M の APE1/Ref-1 WT(レーン 2, 3, 7, 8)または APE1/Ref-1 C/S 変異体(レーン 4, 5, 9, 10)を加え、37°Cで 30 分間反応させた。その後 DNA プローブを加え 4°Cで 20 分間反応させ、EMSA を行い p50 WT あるいは p50 C62S と DNA の複合体形成を確認した。

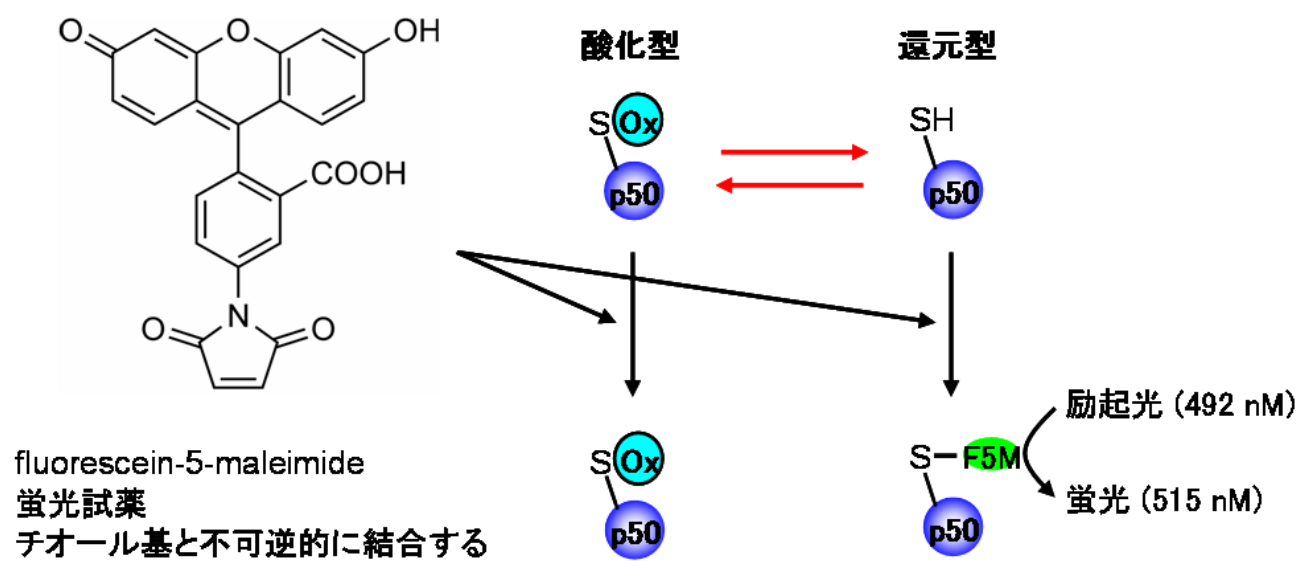
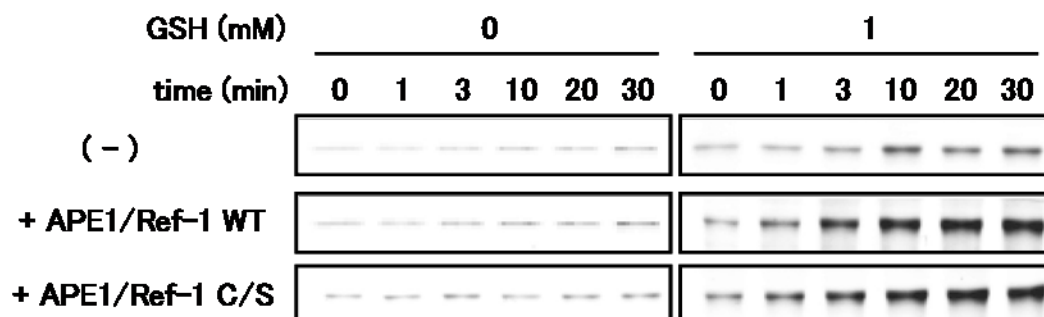


図 3.3 F5M を用いたタンパク質レドックス状態測定法

fluorescein-5-maleimide (F5M) の化学式および、タンパク質の F5M 反応スキームを示した。F5M はマレイミド基の化学的特性を生かしてタンパク質の還元型 Cys 残基(-SH 型)と特異的に共有結合することで、還元型タンパク質を迅速かつ不可逆的に蛍光標識する。

A



B

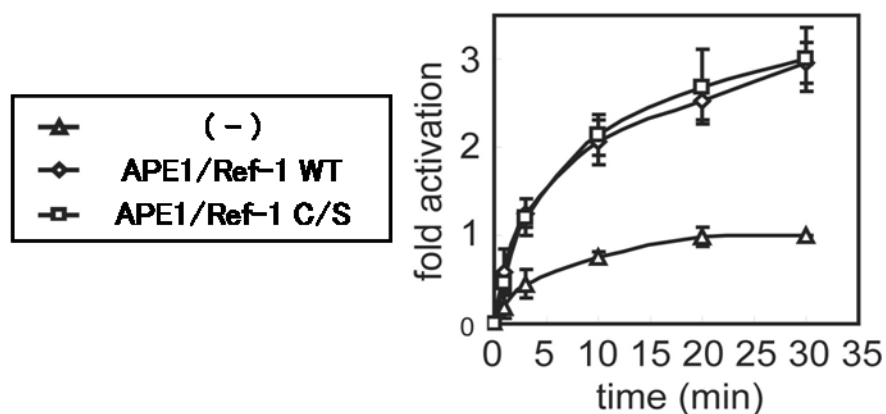


図 3.4 GSH 存在下での p50 に対する APE1/Ref-1 WT および APE1/Ref-1 C/S 変異体の還元促進作用の検討

A. p50 の還元状態を F5M アッセイにより測定した。0.05 μ M の p50 と 0.5 μ M の APE1/Ref-1 WT または APE1/Ref-1 C/S 変異体を 37°C で各時間反応させ、F5M で還元型 Cys 残基を蛍光標識した後、SDS-PAGE で分画した。その後蛍光イメージアナライザーを用いてゲルの蛍光を読み取り、画像化した。

B. p50 の蛍光強度を、画像解析ソフトを用いて数値化し、p50 と 1 mM GSH とで 30 分間反応させたときの蛍光強度を 1 としてグラフ化した。(n = 3)

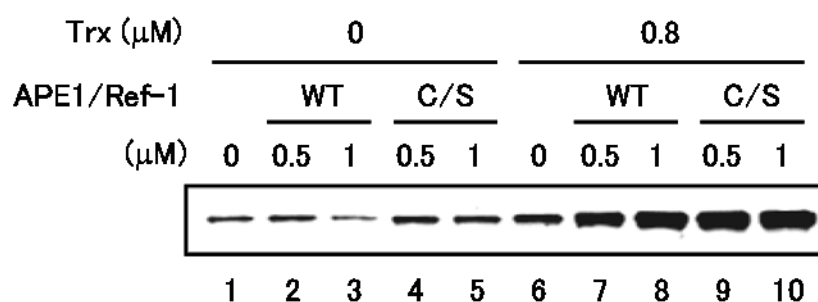


図 3.5 Trx 存在下での p50 に対する APE1/Ref-1 WT および APE1/Ref-1 C/S 変異体の還元促進作用の検討

0.8 μM Trx の存在下(レーン 6-10)または非存在下(レーン 1-5)で 0.05 μM の p50 と 0.5、1 μM の APE1/Ref-1 WT(レーン 2, 3, 7, 8)または APE1/Ref-1 C/S 変異体(レーン 4, 5, 9, 10)を加え、37°C で 30 分間反応させた後、F5M で還元型 Cys 残基を蛍光標識した。その後 SDS-PAGE で分画し、蛍光イメージアナライザーを用いてゲルの蛍光を読み取り画像化した。

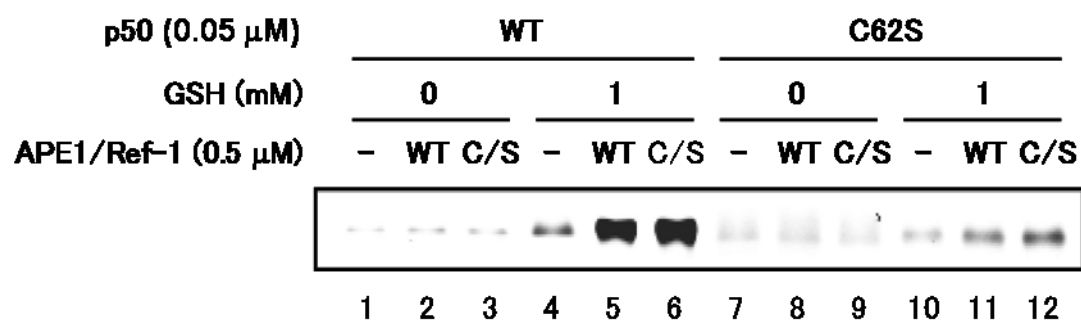
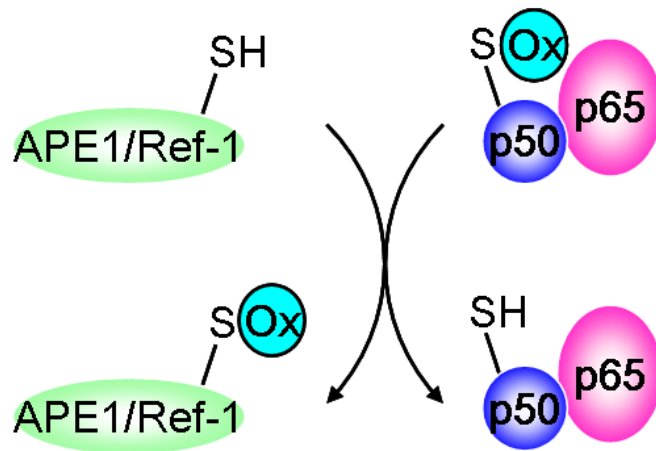


図 3.6 GSH 存在下での p50 C62S に対する APE1/Ref-1 WT および APE1/Ref-1 C/S 変異体の還元促進作用の検討

1 mM GSH の存在下(レーン 4-6, 10-12)または非存在下(レーン 1-3, 7-9)で、0.05 μ M の p50(レーン 1-6)または p50 C62S 変異体(レーン 7-12)と、0.5 μ M の APE1/Ref-1 WT(レーン 2, 5, 8, 11)または APE1/Ref-1 C/S 変異体(レーン 3, 6, 9, 12)を加え、37°C で 30 分間反応させた後、F5M で還元型 Cys 残基を蛍光標識した。その後 SDS-PAGE で分画し、蛍光イメージアナライザーを用いてゲルの蛍光を読み取り画像化した。

A レドックス活性



B レドックスシャペロン活性

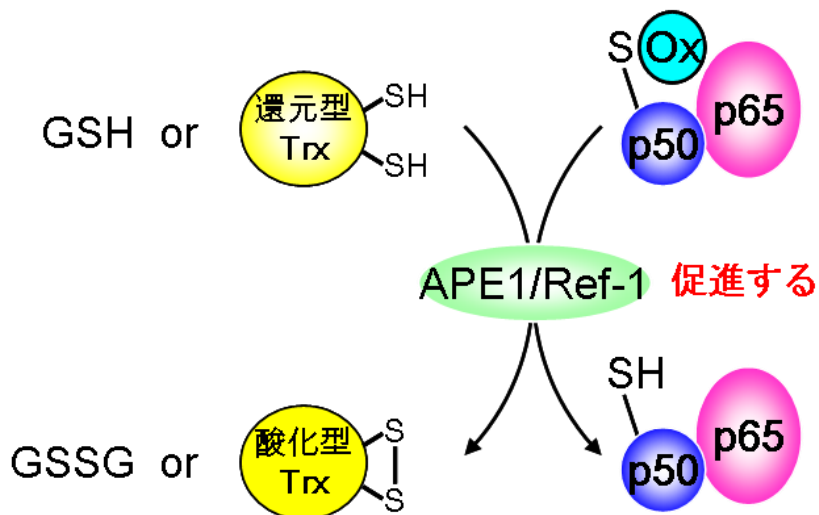


図 3.7 APE1/Ref-1 のレドックス活性とレドックスシャペロン活性の比較

- A. APE1/Ref-1 のレドックス活性。APE1/Ref-1 が還元型にあることが活性に必要。
- B. APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性。この活性は APE1/Ref-1 のレドックス状態には影響されない (Cys 残基非依存的な活性)。APE1/Ref-1 は、他の還元因子による標的タンパク質の還元を促進する。

ここではレドックス制御標的の転写因子の一例として、p50 / p65 を図示した。

第四章 APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性の特徴

4.1 緒言

第三章では APE1/Ref-1 が他の還元因子(GSH や Trx) による p50 の還元を促進する活性を持つことを明らかとし、この活性は APE1/Ref-1 の Cys 残基には依存しないことから従来考えられてきたレドックス活性とは異なる新規の活性、すなわち「レドックスシャペロン活性」であると定義した。

本章ではこの APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性についての知見を広げるために、大きく以下の 2 点について解析する。

1. 他の転写因子に対しても APE1/Ref-1 はレドックスシャペロン活性によるレドックス制御を担うか、また選択性・特異性はあるか

NF- κ B は Rel ファミリーを形成する因子から成り、さらにレドックス感受性を示す Cys 残基は全ての因子で保存されていることに注目し、p50 以外の Rel ファミリー因子も、p50 と同様に APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性による DNA 結合能の調節を受けるかを検討する。

また、APE1/Ref-1 によりレドックス制御を受けることが知られる転写因子の代表例である AP-1 に対しても、レドックスシャペロン活性を介したレドックス制御の可能性を検討する。

2. APE1/Ref-1 の他の活性とレドックスシャペロン活性の関係

APE1/Ref-1 は多機能性のタンパク質であり、最も主要な活性としてレドックス活性と AP エンドヌクレアーゼ活性を保持する。特に AP エンドヌクレアーゼ活性は Cys 残基依存的であるという報告は無いことから、APE1/Ref-1 C/S 変異体が AP エンドヌクレアーゼ活性を保持しているかを解析し、活性に対する Cys 残基の重要性の観点からレドックスシャペロン活性との関係について検討する。

4.2 実験材料及び方法

4.2.1 発現プラスミドの構築

Jurkat 細胞から抽出した total RNA を用いて RT-PCR を行い p52 および c-Rel の cDNA を得た。これを NdeI と BamHI で消化し、pET14b 上の NdeI-BamHI site に連結させることにより pET14b-p52 および pET14b- c-Rel を得た。さらに pET14b-p52、pET14b- c-Rel と、当研究室にて構築済みであった pET14b-p65 を鋳型として、PCR により RHD 領域の DNA 断片を伸長し、NdeI と BamHI で消化した断片を pET14b 上の NdeI-BamHI site に連結させることにより、pET14b-p52 RHD、pET14b- c-Rel RHD および pET14b-p65 RHD を構築した。

c-Jun bZip および c-Fos bZip の大腸菌発現プラスミドは以下の通りに構築した。すでに当研究室で構築されていた pET14b- c-Jun および pET14b- c-Fos を鋳型として PCR を行い c-Jun bZip 領域(222-331)および c-Fos bZip 領域(118-221)の cDNA 断片を得た。この断片を NdeI と BamHI で消化し、pET14b 上の NdeI-BamHI site に連結させることにより、pET14b- c-Jun bZip および pET14b- c-Fos bZip を構築した。

4.2.2 酸化型 Rel ファミリータンパク質および AP-1 タンパク質の調製

2.2.2 に示した手順に従って、大腸菌を用いて His タグ融合 p52、c-Rel、p65、c-Jun bZip、c-Fos bZip を発現・精製した。

さらに 2.2.3 の手順に従って、各タンパク質を酸化処理し、最終的に -80℃で保存した。

4.2.3 AP-1 の EMSA(Electrophoretic Mobility Shift Assay)

EMSA の手法は 2.2.4 に示した手順に従った。

AP-1 結合配列を持つ DNA プローブは、以下の 2 本の合成オリゴヌクレオチドを

アニーリングさせた後に、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ と Klenow を用いて末端に ^{32}P 標識を加えたものを用いた。

AP-1 sense : 5'-GAGCCGCAAGTGACTCAGCGCGGGGCGTGTG-3'

AP-1 antisense : 5'-GGCGTTCAGTCTGCGCCCCGCACACGTCC-3'

4.2.4 AP エンドヌクレアーゼアッセイ

APE1/Ref-1 の AP エンドヌクレアーゼ活性は、スーパーコイル型の脱プリン化した pBluescript II SK(+) からニック型への変換を検出することにより測定した。

DNA の脱プリン化は 3 倍量の 50 mM クエン酸ナトリウム pH 3.5 を加えて 60°C で 15 分間反応させることで行った (74)。脱プリン化を施した DNA は氷上で冷やし、50 mM Tris-HCl pH 7.4 に透析した。

200 ng の脱プリン化した DNA に APE1/Ref-1 を加え、37°C で 15 分間反応させた。反応液の組成は 10 mM Tris-HCl pH 8.0、5 mM MgCl_2 、1 mM EDTA、0.01% NP-40 とし、反応液の体積は 20 μl とした。その後、反応液を 0.8% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色により可視化した。

4.3 結果と考察

4.3.1 Rel ファミリー因子と APE1/Ref-1 の相互作用の解析

哺乳類における NF- κ B / Rel ファミリーは、p50、p52、p65、c-Rel、RelB の 5 つの因子により構成される(図 1.4)。これらの因子はいずれも N 末側に Rel 相同性ドメイン(Rel homology domain : RHD)と呼ばれる高度に保存された領域を持つ。RHD は DNA 結合、サブユニット間の二量体形成、抑制因子 I κ B との結合に必要な領域や核移行シグナルを含む。互いにホモ二量体を形成し、また全ての因子は種々の組み合わせでヘテロ二量体を形成する。p50、p52、p65、c-Rel において、ホモ二量体 / DNA 複合体での X 線結晶構造解析が行われているが、それらは全て互いによく似た構造をしており、N 末端領域と C 末端領域がフレキシブルなリンカーでつながれている(図 4.1-B) (6,8,18,31,52)。また、DNA 結合ループに位置する Cys 残基も、全ての因子で保存されている(図 4.1-A) (39,69)。このことから、p50 以外の因子もレドックス制御を受けている可能性が示唆されている。

そこで p50 以外の Rel ファミリー因子に対しても、APE1/Ref-1 がレドックスシャペロン活性を示すか否かを検討する。APE1/Ref-1 は p50 と直接的かつ APE1/Ref-1 の Cys 残基非依存的に結合することがこれまでに示されている。そこでまず、RHD を共有する Rel ファミリーの他の因子である p52、c-Rel、p65 に対しても、APE1/Ref-1 との直接的な相互作用が見られるかを GST プルダウンアッセイにより検討した。なお p52、c-Rel、p65 は、それぞれ RHD 領域のみを発現・精製したものを実験に用いた。その結果、p52 RHD、c-Rel RHD においては APE1/Ref-1 WT および APE1/Ref-1 C/S 変異体の両方に対して効率的な結合が見られた。一方、p65 RHD ではほとんど結合が見られなかった。この結果から、同じ Rel ファミリーの因子であっても、APE1/Ref-1 との相互作用には何らかの特異性があることが明らかとなった。ここで見られる APE1/Ref-1 との相互作用の差異は、それぞれの RHD 間でのアミノ酸配列や構造の若干の違いから生じるのものであると考えられる。

4.3.2 Rel ファミリー因子に対する APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性の検討

APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性が、APE1/Ref-1 との結合が p50 と同様に認められた p52 に対しても発揮されるかを、EMSA を行い検討した。すると、GSH 存在下において低濃度の APE1/Ref-1 WT および C/S 変異体(0.5 μ M) により、p52 の DNA 結合が促進された(図 4.3 レーン 5 と 6, 7 および、レーン 9 と 10, 11 をそれぞれ比較)。この結果から、APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性は p52 に対しても発揮されることが考えられ、同時にレドックスシャペロン活性には標的タンパク質と APE1/Ref-1 間の結合が重要であることが示唆された。

なお、ここでは APE1/Ref-1 の代わりに同じ濃度の BSA (0.5 μ M) を加えても p52 の DNA 結合の促進は見られないことから、APE1/Ref-1 の GSH との相乗的な p52-DNA 結合促進効果は、APE1/Ref-1 に特異的な活性であるといえる(図 4.3 レーン 8, 12)。

次に、c-Rel、p65 に対しても APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性による効果が見られるかを、p52 と同様に EMSA により検討した。その結果、APE1/Ref-1 との結合が見られた c-Rel に対しては、APE1/Ref-1 WT および C/S 変異体による効率的な DNA 結合促進作用が認められた(図 4.4 レーン 5 と 6, 7 および、レーン 9 と 10, 11 をそれぞれ比較)。一方で、APE1/Ref-1 との結合が見られなかった p65 に対しては、APE1/Ref-1 WT および C/S 変異体いずれにも GSH との相乗的な作用は認められなかった(図 4.5)。

以上の結果から、APE1/Ref-1 がレドックスシャペロン活性を発揮する上では、APE1/Ref-1 と標的タンパク質との選択的な結合が重要な鍵となることが示唆された。

4.3.3 転写因子 AP-1 に対する APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性の検討

AP-1 はレドックス感受性を示す転写因子としてよく解析が進められている。最も一般的な AP-1 は c-Jun と c-Fos のヘテロ二量体で形成されるもので、basic leucine zipper (bZip) 型の DNA 結合ドメインに含まれる、高度に保存された Cys 残基（ヒトではそれぞれ Cys-269 残基、Cys-154 残基）のレドックス制御を介して DNA 結合能が制御されることが明らかになっている(図 4.6) (1)。また、これまでに様々な解析から AP-1 に対する直接のレドックス制御因子は APE1/Ref-1 であり、APE1/Ref-1 の Cys-65 残基の酸化還元がそのレドックス活性に必要とされてきた (70,72,73)。しかし近年トランスジェニックマウスを用いた解析から、*in vivo* での AP-1 のレドックス制御に Cys-65 残基は必須ではないことが判明し、AP-1 に対する APE1/Ref-1 のレドックス活性の作用機構についても明確になっていないといえる (56)。

そこでここでは AP-1 のヘテロ二量体に対する APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性による効果を検討する。c-Fos および c-Jun は共に完全長のタンパク質を大腸菌で発現させることが出来ないため、それぞれのレドックス感受性を示す Cys 残基を含む bZip 領域のみを大腸菌で発現、精製し各実験に用いた。

まず c-Jun および c-Fos と APE1/Ref-1 との相互作用の有無を、GST プルダウンアッセイにより検討した。すると、c-Jun bZip は APE1/Ref-1 WT および C/S 変異体のいずれに対しても効率よく結合した。一方、c-Fos bZip は APE1/Ref-1 WT および C/S 変異体のいずれに対しても結合が認められなかった(図 4.7)。

c-Jun と APE1/Ref-1 C/S 変異体との直接の結合が確認されたことから、次に APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性が、AP-1 (ここでは c-Jun bZip / c-Fos bZip のヘテロ二量体) の DNA 結合能の調節に対しても機能するかを、EMSA により検討した。すると 1 mM GSH の存在下で、APE1/Ref-1 WT および C/S 変異体のいずれによっても、c-Jun bZip と c-Fos bZip のヘテロ二量体の DNA 結合は効率良く促進された(図 4.8 レーン 5 と 6, 7 を比較)。この結果から AP-1 のレドックス制御には、

NF- κ B と同様に、従来考えられていた APE1/Ref-1 の還元状態を必要とするレドックス活性による機構だけではなく、レドックスシャペロン活性による制御機構も存在することが示唆された。

さらに、この作用が c-Jun bZip および c-Fos bZip の還元促進による効果であることを直接的に確認するために、F5M アッセイを行った(図 4.9)。すると GSH 非存在下では c-Jun、c-Fos の蛍光はほとんど見られなかったが、1 mM GSH 存在下では蛍光が認められた。さらにそこに APE1/Ref-1 WT または C/S 変異体を加えると、c-Jun bZip だけでなく c-Fos bZip の蛍光も増加した。なお、ここで用いた濃度では、APE1/Ref-1 単体による c-Jun あるいは c-Fos の還元活性は認められなかった。

以上の結果から、APE1/Ref-1 は c-Jun bZip と直接的に結合し、さらに APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性により c-Jun bZip および c-Fos bZip 両方の還元を促進し、その結果 c-Jun bZip / c-Fos bZip から成るヘテロ二量体の DNA 結合を促進するという一連の作用機構の存在が示唆された。

4.3.4 APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性とその他の活性の関係

APE1/Ref-1 は多機能性のタンパク質である。そこでここでは APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性が、APE1/Ref-1 が持つその他の活性に依存した活性か、あるいは独立した活性であるかについて、C/S 変異体の特徴を参考に検討する。

APE1/Ref-1 は GSH や Trx が存在しない条件下でも、酸化型 p50 の DNA 結合を直接的に活性化するレドックス活性を持つことを示した(図 2.3 レーン 1-7) (50,55)。しかし、APE1/Ref-1 C/S 変異体には同様の条件下で酸化型 p50 の DNA 結合を促進する活性は認められなかった(図 2.5 レーン 1-7)。このことから、APE1/Ref-1 C/S 変異体はレドックス活性を保持していないと考えられる。

また、APE1/Ref-1 は二本鎖 DNA 結合活性を持つことが報告されている (42)。本研究でも、EMSA において高濃度の APE1/Ref-1 を加えた時には、比較的移動度の早

い複合体バンドが頻繁に検出されている。この複合体が APE1/Ref-1 と DNA の複合体であることを確認するために、抗 APE1/Ref-1 抗体を加えたときの複合体バンドへの影響を検討した(図 2.3 レーン 5, 17-18)。すると抗 APE1/Ref-1 抗体添加時に特異的にこの複合体バンドは消失した(図 2.3 レーン 18)。したがってこの複合体は APE1/Ref-1 と DNA の複合体であると考えられる。またこの複合体バンドは NF- κ B と AP-1 のいずれのプローブでも見られることから、DNA の配列には依存しない結合によるものと考えられる。一方で、APE1/Ref-1 C/S 変異体ではこの複合体バンドは検出されないことから、APE1/Ref-1 C/S 変異体は DNA 結合活性を欠損していることが示唆される。

さらに、APE1/Ref-1 C/S 変異体の AP エンドヌクレアーゼ活性を、脱塩基部位 (AP サイト) を導入した環状 DNA を基質として用いることによりを検討した。APE1/Ref-1 は AP サイトの 5' 側にあるホスホジエステル結合を切断し、傷害のある DNA にニックを挿入することが知られている。報告にある通り本研究でも APE1/Ref-1 WT はスーパーコイル型の DNA を、ニックの入った環状 DNA へと変換する活性を持つことが確認された (74)。しかし、APE1/Ref-1 WT は 0.05 μ M 以上の濃度条件ではほぼ全てのスーパーコイル型の DNA にニックを入れたのに対し、APE1/Ref-1 C/S 変異体では最高で 50 μ M の濃度条件においても APE1/Ref-1 WT 0.005 μ M 使用時の効果に満たない活性しか示さず、APE1/Ref-1 C/S 変異体は APE1/Ref-1 WT と比べて 10,000 分の 1 未満の活性しか保持していないことが明らかになった(図 4.10)。

以上の結果から、APE1/Ref-1 C/S 変異体はレドックス活性、DNA 結合活性、AP エンドヌクレアーゼ活性のいずれもを欠損しており、したがって APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性は APE1/Ref-1 のその他の活性とは独立した活性であることが示唆された。

4.4 本章のまとめ

本章では大きく 2 種類のアプローチから APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性の特徴に関する解析を行った。

1. p50 以外の転写因子に対する APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性によるレドックス制御の解析に関して、以下の結果が得られた。

- ① APE1/Ref-1 C/S 変異体は WT と同じく p50 以外の Rel ファミリー因子である p52 および c-Rel とは結合するが、p65 とは結合しないことが示された
- ② APE1/Ref-1 はレドックスシャペロン活性により p52 および c-Rel の DNA 結合は促進するが、p65 に対してはその効果は認められなかった
- ③ APE1/Ref-1 WT および C/S 変異体は AP-1 の構成因子である c-Jun と結合した
- ④ APE1/Ref-1 はレドックスシャペロン活性により c-Jun / c-Fos から成る AP-1 ヘテロ二量体の DNA 結合および還元を促進した。

以上の結果から、p50 以外の転写因子に対しても、APE1/Ref-1 はレドックスシャペロン活性によるレドックス制御を担う可能性が示された。また、APE1/Ref-1 がレドックスシャペロン活性を発揮する上では、APE1/Ref-1 と制御標的の転写因子との選択的な結合が鍵となることが示唆された。

2. APE1/Ref-1 C/S 変異体が APE1/Ref-1 の主要な機能を保持しているか否かを検討し、以下の結果が得られた。

- ⑤ APE1/Ref-1 C/S 変異体はレドックス活性を保持していない
- ⑥ APE1/Ref-1 C/S 変異体は AP エンドヌクレアーゼ活性を保持していない

以上の結果から、APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性は、APE1/Ref-1 が持つその他の活性とは独立した活性であることが示唆された。

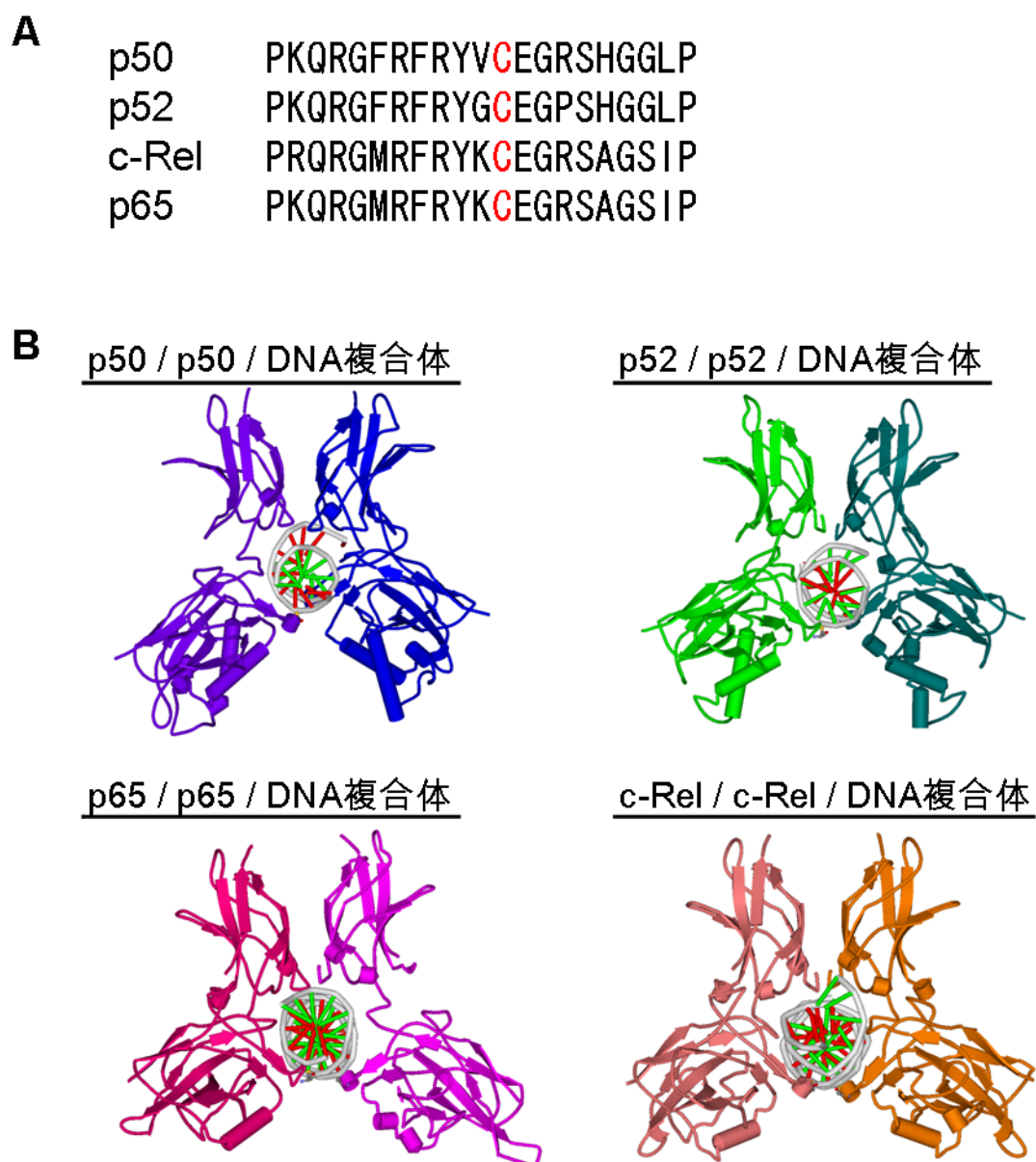


図 4.1 NF- κ B / Rel ファミリー

- A. RHD の DNA 結合ループに存在する Cys 残基は、ファミリー間でよく保存されている。ここではレドックス感受性を示す Cys 残基(p50 Cys-62 残基に対応) とその前後のアミノ酸配列を示す。
- B. Rel ファミリー各因子の、ホモ二量体 / DNA 複合体の立体構造 (6,8,18,31,52)。

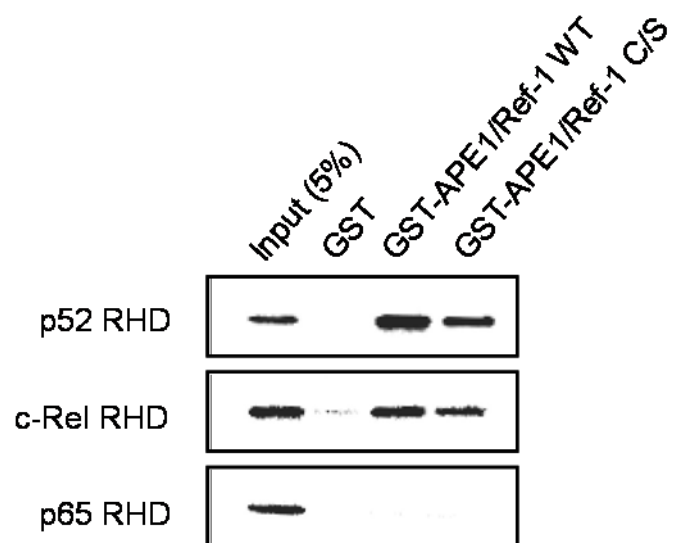


図 4.2 APE1/Ref-1 と p52、c-Rel、p65 との相互作用の検討

$[^{35}\text{S}]$ で標識した p52 RHD、c-Rel RHD、p65 RHD を用いて、GST プルダウンアッセイにより APE1/Ref-1 WT および APE1/Ref-1 C/S 変異体と p52、c-Rel、p65 との結合を検討した。

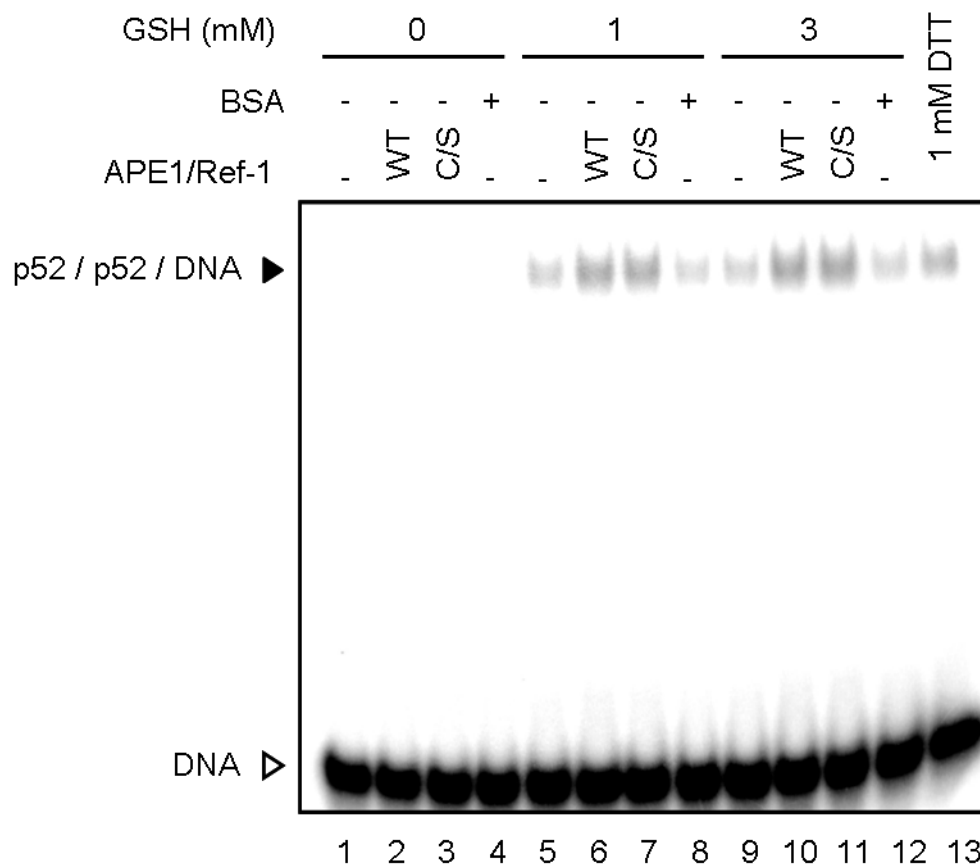


図 4.3 p52 の DNA 結合に対する APE1/Ref-1 の作用の検討

0.05 μ M の酸化型 p52 RHD を、1 mM(レーン 5-8)または 3 mM(レーン 9-12)の GSH 存在下で、0.5 μ M の APE1/Ref-1 WT(レーン 2, 6, 10)、APE1/Ref-1 C/S 変異体(レーン 3, 7, 11)、または BSA(レーン 4, 8, 12)と 37°C で 30 分間反応させた。その後 DNA プローブを加え 4°C で 20 分間反応させ、EMSA を行い p52 RHD と DNA の複合体形成を確認した。

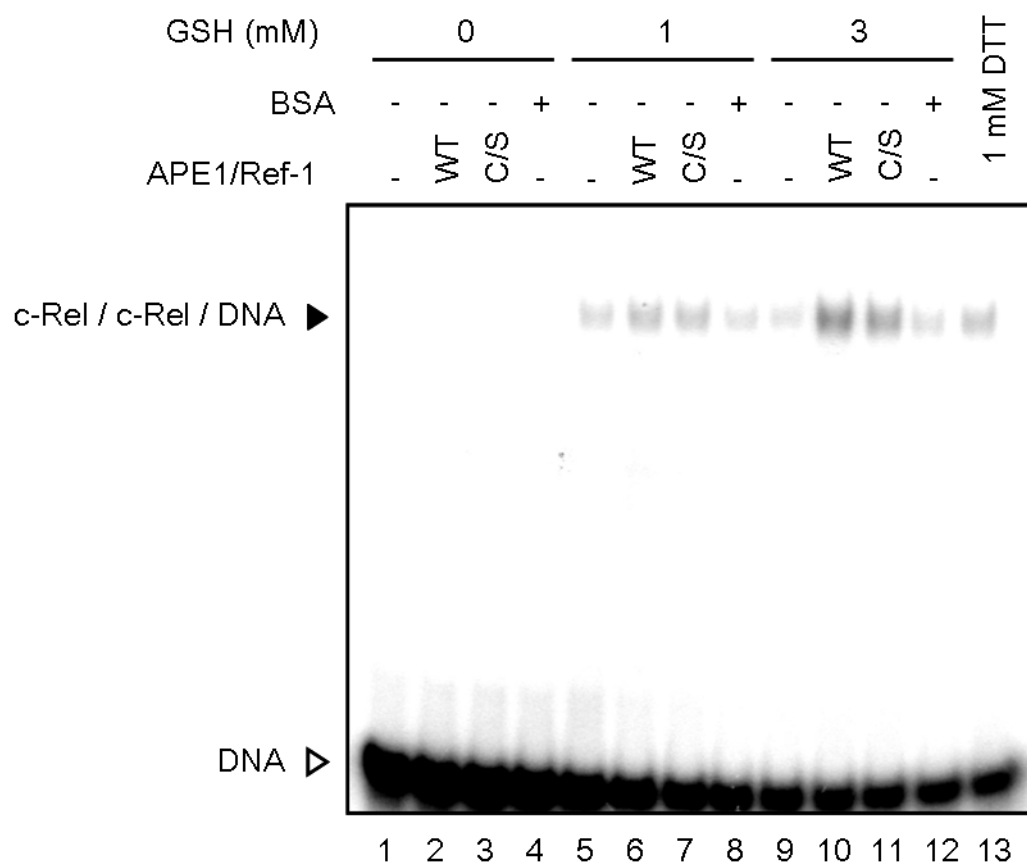


図 4.4 c-Rel の DNA 結合に対する APE1/Ref-1 の作用の検討

0.05 μ M の酸化型 c-Rel RHD を、1 mM(レーン 5-8)または 3 mM(レーン 9-12)の GSH 存在下で、0.5 μ M の APE1/Ref-1 WT(レーン 2, 6, 10)、APE1/Ref-1 C/S 変異体(レーン 3, 7, 11)、または BSA(レーン 4, 8, 12)と 37°C で 30 分間反応させた。その後 DNA プローブを加え 4°C で 20 分間反応させ、EMSA を行い c-Rel RHD と DNA の複合体形成を確認した。

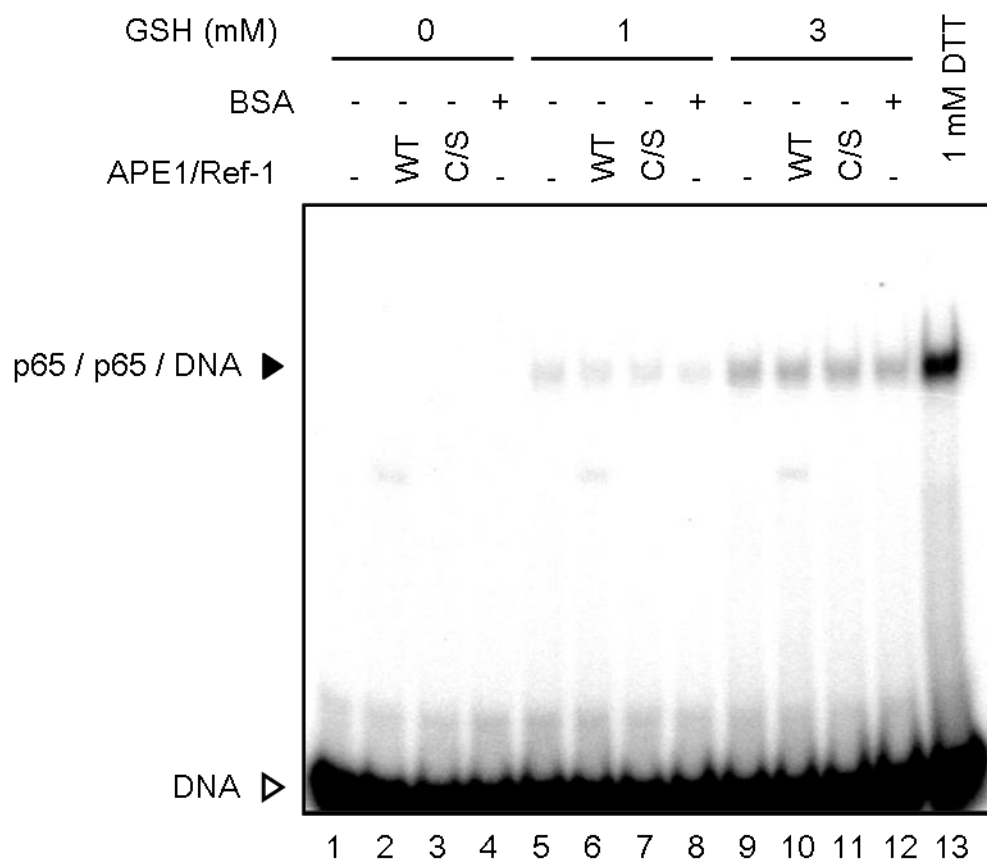


図 4.5 p65 の DNA 結合に対する APE1/Ref-1 の作用の検討

0.05 μ M の酸化型 p65 RHD を、1 mM(レーン 5-8)または 3 mM(レーン 9-12)の GSH 存在下で、0.5 μ M の APE1/Ref-1 WT(レーン 2, 6, 10)、APE1/Ref-1 C/S 変異体(レーン 3, 7, 11)、または BSA(レーン 4, 8, 12)と 37°C で 30 分間反応させた。その後 DNA プローブを加え 4°C で 20 分間反応させ、EMSA を行い p65 RHD と DNA の複合体形成を確認した。

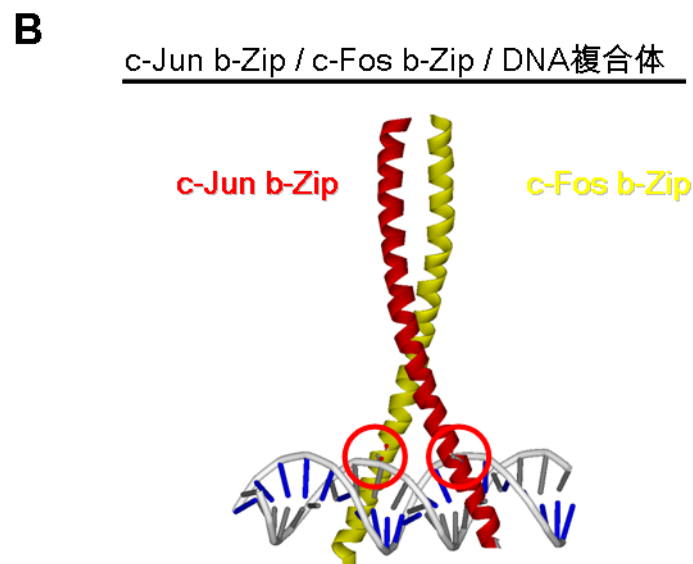
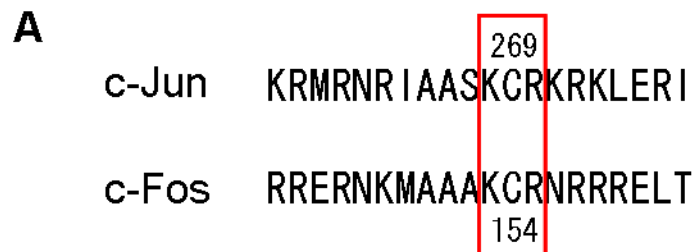


図 4.6 AP-1 の構造とレドックス制御を受ける Cys 残基

- A. c-Jun および c-Fos の bZip モチーフ内の塩基性領域のアミノ酸配列を示した。塩基性アミノ酸残基が隣接することにより Cys 残基のレドックス感受性が高まることが知られている。
- B. c-Jun b-Zip / c-Fos b-Zip / DNA 複合体の立体構造 (21)。レドックス制御を受ける Cys 残基を丸で囲った。

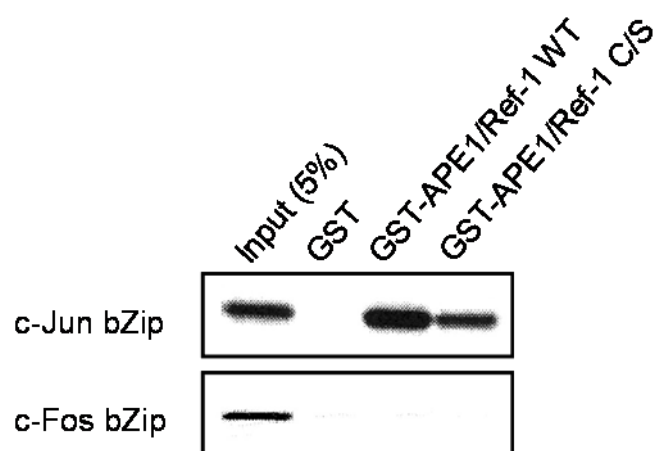


図 4.7 APE1/Ref-1 と c-Jun および c-Fos との相互作用の検討

$[^{35}\text{S}]$ で標識した c-Jun b-Zip および c-Fos b-Zip を用いて、GST プルダウンアッセイにより APE1/Ref-1 WT および APE1/Ref-1 C/S 変異体と c-Jun b-Zip、c-Fos b-Zip との結合を検討した。

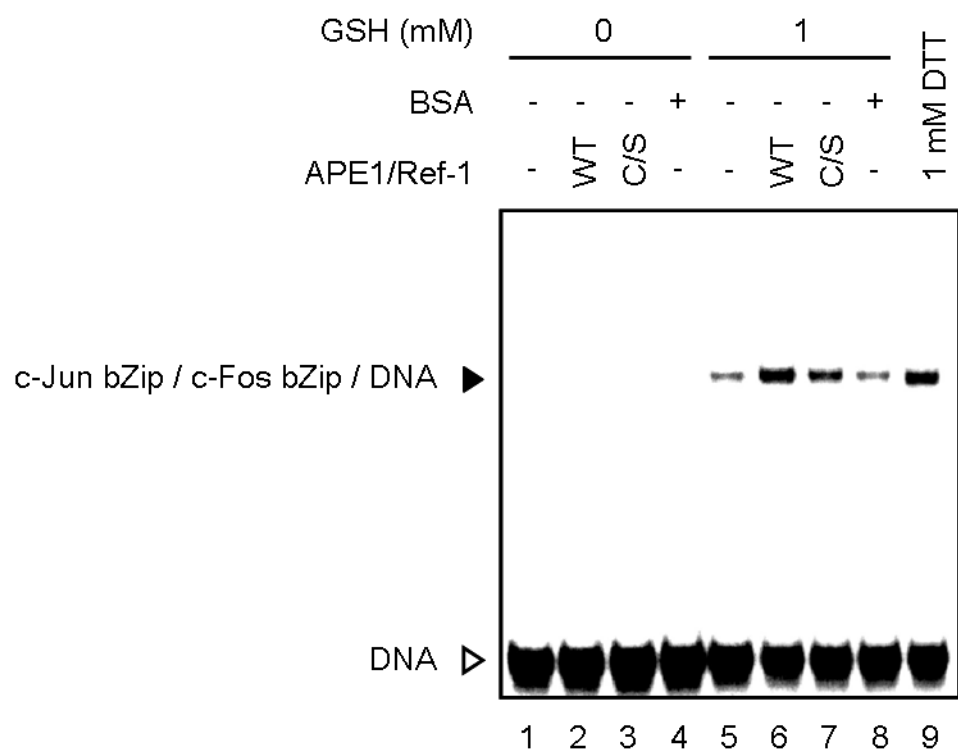


図 4.8 AP-1 の DNA 結合に対する APE1/Ref-1 の作用の検討

1 mM GSH の存在下または非存在下で、0.1 μ M の c-Jun b-Zip と c-Fos b-Zip を、0.5 μ M の APE1/Ref-1 WT、APE1/Ref-1 C/S 変異体、または BSA と 37°C で 30 分間反応させた。その後 AP-1 結合部位を含む DNA プローブを加え 4°C で 20 分間反応させ、EMSA を行い p65 RHD と DNA の複合体形成を確認した。

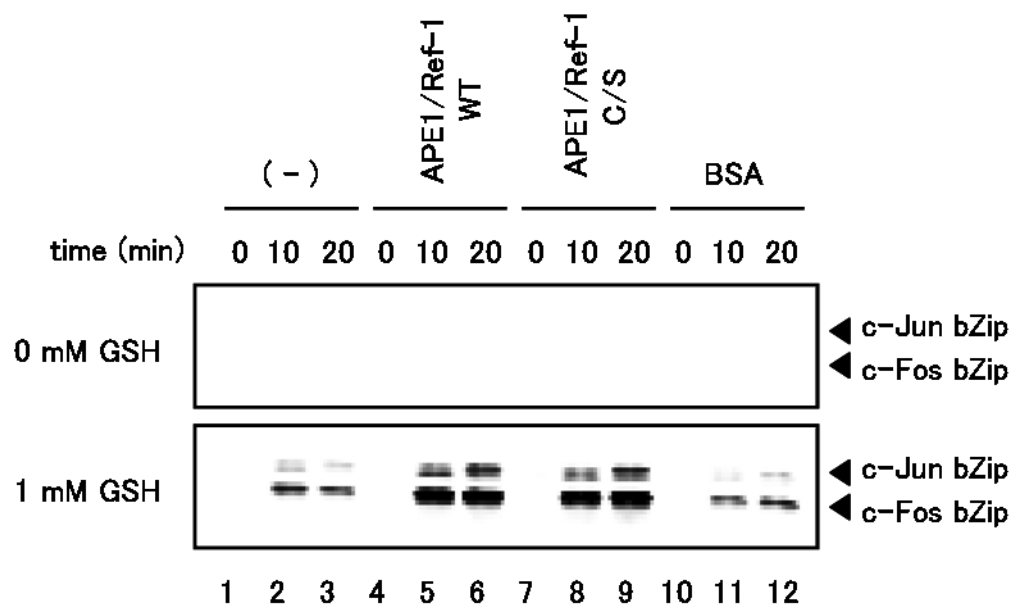


図 4.9 AP-1 の還元状態に対する、GSH 存在下での APE1/Ref-1 WT および C/S 変異体の効果の検討

1 mM GSH 存在下(下段のパネル)または非存在下(上段のパネル)で、0.1 μ M の c-Jun b-Zip と c-Fos b-Zip を、0.5 μ M の APE1/Ref-1 WT(レーン 4, 5, 6)、APE1/Ref-1 C/S 変異体(レーン 7, 8, 9)、または BSA(レーン 10, 11, 12)と反応させた後、F5M で還元型 Cys 残基を蛍光標識した。その後 SDS-PAGE で分画し、蛍光イメージアナライザーを用いてゲルの蛍光を読み取り画像化した。

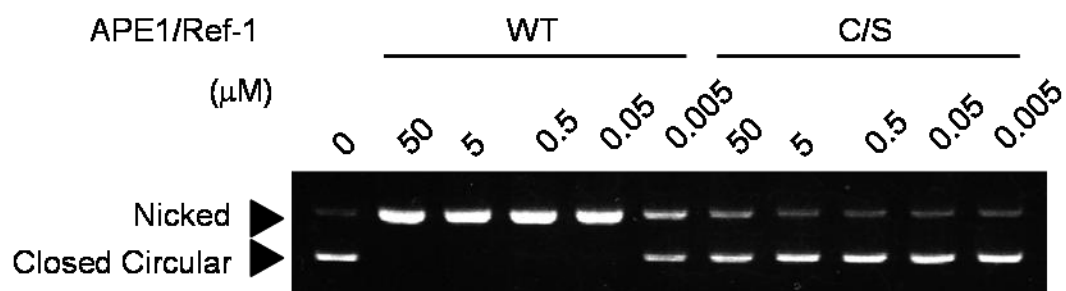


図 4.10 APE1/Ref-1 WT および C/S 変異体における AP エンドヌクレアーゼ活性の検討

APE1/Ref-1 WT および C/S 変異体の AP エンドヌクレアーゼ活性を、脱塩基部位 (AP 部位)を含む環状 DNA のスーパーコイル型からニック型への変化を指標として検討した。脱プリン化した DNA に APE1/Ref-1 WT または APE1/Ref-1 C/S 変異体を加え 37°C で 15 分間反応後、0.8% のアガロースゲルで分画し、エチジウムブロマイド染色を行った。

第五章 細胞内におけるレドックスシャペロン活性の解析

5.1 緒言

これまでの章では、より *in vivo* の環境に近い実験系を構築するという視点から他の細胞内還元因子と APE1/Ref-1 との相互作用に注目し、APE1/Ref-1 が Cys 残基非依存的に p50 や他の転写因子の DNA 結合を促進する活性を有することを、*in vitro* の実験系から明らかにしてきた。

そこで本章では培養細胞を用いて、実際に APE1/Ref-1 が細胞内環境においてもレドックスシャペロン活性を介して NF- κ B の活性化機構に機能していることを検討する。

5.2 実験材料及び方法

5.2.1 細胞培養

本研究では、ヒト胎児腎臓上皮由来の細胞株である 293T 細胞を使用した。

293T 細胞は、10%仔牛血清、100 µg/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen)を用い、37℃、5%CO₂に設定した CO₂ 恒温培養槽の中で静置培養した。

5.2.2 siRNA 耐性 APE1/Ref-1 発現プラスミドの構築

PCR を用いたオーバーラップ伸長法により、APE1/Ref-1 の siRNA 標的配列に 2 カ所の変異(ただしアミノ酸配列は変化しない)を導入し、siRNA 抵抗性の塩基配列を持つ APE1/Ref-1 WT および C/S 変異体の cDNA を得た (5'-GTCTGGTAAGGCTGGAGTACC-3')。さらにこの cDNA を pHyg-EF-2 に Flag タグと共に挿入することで、Flag タグ融合型で siRNA に耐性を持つ哺乳類細胞発現プラスミド、pHygEF2-Flag-APE1/Ref-1 WT anti-siRNA および pHygEF2-Flag-APE1/Ref-1 C/S anti-siRNA を構築した。

5.2.3 ウェスタンブロッティング (Western Blotting)

材料

- Transfer Buffer

Trizma-Base 3 g、グリシン 14.4 g、メタノール 200 ml に脱イオン水を加えて 1 L としたものを用いた。

- 20×TBS

Trizma-Base 3 g、Trizma-HCl (SIGMA) 63.5 g、NaCl 87 g にミリ Q 水 500 ml を加え、溶解した。

- **Blocking Buffer**

スキムミルク（森永乳業）50 g、20×TBS 50 ml、10% NaN₃ 2 ml をミリ Q 水 1 L に溶解した。

- **TBS-T**

20×TBS 150 ml、Tween-20（ナカライテスク）3 g をミリ Q 水 3 L で溶解した。

方法

サンプルを SDS-PAGE 後、ミニトランスブロットセル(BioRad)を用いてゲルから PVDF メンブレンへとタンパク質を転写した。まず、セルと同じ大きさの 3MM 紙と Immobilon transfer membrane (MILLIPORE)を用意し、メンブレンはあらかじめメタノールでウエッティングした後、Transfer Buffer に浸し、平衡化した。メンブレンとゲルを Transfer Buffer 中で、ゲルホルダーの陽極側から 3MM 紙、メンブレン、ゲル、3MM 紙の順番にセットし、ゲルホルダーを装置にセットして、Transfer Buffer を注ぎ入れた。4℃において 100 V で 1 時間通電し転写を行った後、メンブレンを装置から取り出し、Blocking Buffer に浸して室温で 1 時間振とうした。次に Blocking Buffer で 1000 倍希釈した抗 APE1/Ref-1 ポリクロナール抗体あるいは、10000 倍希釈した抗 Actin モノクロナール抗体(CHEMICON) および抗 Trx 抗血清と共にハイブリバック中に封入し、室温で 1 時間静置した。さらにメンブレンを TBS-T に浸して洗浄した後、TBS-T で 1000 倍希釈した horseradish peroxidase-conjugated 二次抗体 (GE Healthcare)に浸し、室温で 30 分間浸透した。再度メンブレンを洗浄した後、Chemi-Lumi One (ナカライテスク)を用い、添付のマニュアルに従って目的タンパク質を可視化した。また、各ステップのメンブレンの洗浄は TBS-T 中で 5 分間振とう、これを 3 回繰り返すことで行った。

なお、抗 APE1/Ref-1 抗体は大腸菌で発現した全長のヒト APE1/Ref-1 組換えタンパク質を抗原に用いて作製した。

5.2.4 siRNA を用いたノックダウン

Ref-1 の二本鎖 siRNA は合成した二つのオリゴヌクレオチドをアニーリングすることによって作製した。

siRNA for APE1/Ref-1 sense : 5'-GUCUGGUACGACUGGAGUAdTdT-3'、

siRNA for APE1/Ref-1 antisense : 5'-UACUCCAGUCGUACCAGACdTdT-3'

また、Green fluorescent protein (GFP)の二本鎖 siRNA は Dharmacon 社より購入した。293T 細胞を用いて内在性の APE1/Ref-1 をノックダウンするために、トランスフェクションをする 1 日前に 293T 細胞を 6-well プレートに播き、125 pmol の siRNA を Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いてトランスフェクションした。24 時間後に適当な希釈濃度で 12-well プレートに播き直し 2~4 日培養した。細胞は RIPA バッファー (10 mM Tris-HCl pH 8.0、140 mM NaCl、0.1% SDS、1% Triton-X-100、0.1% sodium deoxycholate、1 mM EDTA) で溶解し氷上で 10 分静置後、遠心分離して細胞抽出液を回収した。抽出液を Sample Dye に混合し、SDS-PAGE 後、ウエスタンブロッティングを行いノックダウンの成否を確認した。

5.2.5 レポータージーンアッセイ

トランスフェクションをする 1 日前に 293T 細胞を 6-well プレートに播いた。293T 細胞に Lipofectamine2000 を用いて 125 pmol の siRNA と 0.125 µg の pNFkBHL (29)、0.05 µg の pEF-Rluc (38) をトランスフェクションした。24 時間後に pHygEF2-Flag-APE1/Ref-1 WT anti-siRNA あるいは pHygEF2-Flag-APE1/Ref-1 C/S anti-siRNA を再度トランスフェクションした。2 度目のトランスフェクションの 6 時間後に細胞を 8 倍希釈し、24-well プレートに播き直した。さらに 2 度目のトランスフェクションの 24 時間後に終濃度 10 ng/ml の TNF-α (Pepro Tech) で細胞を処理し、さらに 24 時間の培養の後、細胞を回収した。Firefly と Renilla ルシフェラーゼの活性は Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて Lumat

LB9501 (Berthold Technologies)で測定した。

5.2.6 核抽出液の調製

EMSA に用いるための 293T 細胞の核抽出液は以下の手順に従って調製した。

操作は Dignam の方法を用い、全て氷上で行った。また、全ての遠心も 4℃で行った。まず細胞を PBS で洗浄し 190×g、5 分間遠心した。遠心後の細胞の体積(以後 PCV と表記)を測り、4PCV の Buffer A (10 mM HEPES[pH 7.9]、10 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、0.5mM DTT)に懸濁した。氷上で 20 分間静置した後 Dounce homogenizer (loose-fit)で 20 ストローク、ホモジナイズした。この細胞破碎液を 4300 ×g、6 分間遠心することで核を細胞質画分から分離した。沈殿(=分離した核)を 5PCV の Buffer A で一度洗浄した。洗浄した核に 1PCV の Buffer C (20 mM HEPES[pH 7.9]、25% glycerol、0.42 M NaCl、1.5 mM MgCl₂、0.2 mM EDTA、0.5 mM DTT、0.5 mM PMSF)を加え、Dounce homogenizer (loose-fit)で 10 ストローク、ホモジナイズした。その懸濁液を 30 分間穏やかに攪拌した後、15000×g、30 分間遠心した。上清を Buffer D (20 mM HEPES [pH 7.9]、20% glycerol、0.1 M KCl、0.2 mM EDTA、0.5 mM DTT、0.5 mM PMSF)で 2.5 時間の透析を 2 回行った後、15000×g で 30 分間遠心した。この上清は 293T 細胞各抽出液として即座に実験に用いるか、すぐに用いない場合は液体窒素で凍結させた後、-80℃で保存した。

5.3 結果と考察

5.3.1 内在性 APE1/Ref-1 のノックダウンとその表現型

これまで多くの研究により、細胞内で APE1/Ref-1 が NF- κ B 制御下の転写を活性化することが報告されている (23,26,63)。

本研究では細胞内で APE1/Ref-1 が実際にレドックスシャペロン活性を介して NF- κ B 制御下の転写を活性化するかを検討できる実験系を構築するために、まず RNAi による内在性の APE1/Ref-1 のノックダウンを試みた。細胞は 293T 細胞を用い、二本鎖 siRNA をトランスフェクションした。APE1/Ref-1 を標的とする siRNA をトランスフェクションし、1 から 4 日間培養を行った後、細胞抽出液を作製しウェスタンブロッティングにより APE1/Ref-1 のタンパク質量を検討したところ、トランスフェクション 2 日目以降で内在性の APE1/Ref-1 のタンパク質量が 90% 以上の効率で減少していた(図 5.1)。一方、Actin のタンパク質量には目立った変化は認められなかったことから、siRNA による効果が APE1/Ref-1 に特異的に作用していることが示された。また、APE1/Ref-1 をノックダウンした細胞について、トランスフェクション後 4 日目までの時点では細胞の形態や細胞増殖速度に目立った差異は見られなかった。

5.3.2 細胞内で APE1/Ref-1 は Cys 残基非依存的に NF- κ B を活性化する

次に 5.3.1 で示した RNAi と、外来性の APE1/Ref-1 をトランスフェクションにより導入することで細胞内の APE1/Ref-1 の発現量を変化させる手法とを組み合わせ、細胞内の APE1/Ref-1 を変化させた。なお、ここで用いた Flag-APE1/Ref-1 の発現プラスミドは siRNA の標的配列に変異を挿入することで siRNA に対する抵抗性を付加したものであり、これにより siRNA を用いて内在性の APE1/Ref-1 をノックダウンした細胞に、外来性の APE1/Ref-1 C/S 変異体を発現させることが可能となる。この

実験系を用いて、それぞれの APE1/Ref-1 の発現状況に応じた NF- κ B 制御下の転写活性を検討することにした。なお、NF- κ B 制御下の転写活性は、4 個の NF- κ B の結合配列を含むプロモーターをルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポーター遺伝子を用いて、レポータージーンアッセイにより検討した(図 4.2)。このレポーター遺伝子は、TNF- α 刺激に応答した内在性の NF- κ B の活性化を反映した転写活性化が認められる。そこでまず、Flag-APE1/Ref-1 WT の発現プラスミドをトランスフェクションしたところ、内在性の APE1/Ref-1 と同等のタンパク質量で外来性 Flag-APE1/Ref-1 WT の発現が見られ、また TNF- α 刺激に応答した NF- κ B 由来の転写も 2 倍程度まで活性化した。同様に Flag-APE1/Ref-1 C/S 変異体の発現プラスミドをトランスフェクションしたところ、内在性の APE1/Ref-1 と同等のタンパク質量の外来性 Flag-APE1/Ref-1 C/S 変異体の発現が見られ、また TNF- α 刺激に応答した NF- κ B 由来の転写も Flag-APE1/Ref-1 WT と同程度に活性化した。また、siRNA により内在性の APE1/Ref-1 をノックダウンすると TNF- α 刺激に応答した NF- κ B の転写活性は弱まったが、そこに Flag-APE1/Ref-1 WT または C/S 変異体の発現プラスミドをトランスフェクションしたところ、弱まった転写を回復することができた。そして重要なことに、WT と C/S 変異体の間でその効率に差は見られなかった。この結果から、細胞内において APE1/Ref-1 C/S 変異体は APE1/Ref-1 WT と同等に NF- κ B 制御下の転写を活性化する機能を有していることが明らかとなり、すなわち細胞内で APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性による NF- κ B のレドックス制御が実際に機能していることが示唆された。

さらに、同様の組み合わせでトランスフェクションした 293T 細胞の核抽出液を調製しそれを EMSA に用いることで、TNF- α に応答した NF- κ B の DNA 結合の活性化を直接的に解析した(図 4.3)。すると核内の NF- κ B の DNA 結合能も、レポータージーンアッセイにより得られた結果と傾向がよく相関する結果が得られた。すなわち、Flag-APE1/Ref-1 WT または Flag-APE1/Ref-1 C/S 変異体を発現させたところ

TNF- α に応答した NF- κ B の DNA 結合はさらに増強され、逆に内在性の APE1/Ref-1 をノックダウンした場合には、TNF- α に応答した NF- κ B の DNA 結合は抑制された。さらにそこへ Flag-APE1/Ref-1 WT または Flag-APE1/Ref-1 C/S 変異体を発現させたところ、NF- κ B の DNA 結合が回復した。そして重要なことに、APE1/Ref-1 WT と APE1/Ref-1 C/S 変異体の間でその効果に目立った差異は見られなかった。

以上の結果から、APE1/Ref-1 は細胞内でその Cys 残基非依存的に、おそらくレドックスシャペロン活性を介して、NF- κ B の転写活性および DNA 結合を正に制御する機能を持つことが示唆された。

5.4 本章のまとめ

本章では以下の結果が得られた。

- ① 293T 細胞を用いて、siRNA により内在性の APE1/Ref-1 をノックダウンし、さらにそこへ外来性の APE1/Ref-1 C/S 変異体を発現させる実験系を構築した
- ② 細胞内で APE1/Ref-1 C/S 変異体は刺激に応答した NF- κ B 制御下の転写を促進する活性を有することが示された
- ③ 細胞内で APE1/Ref-1 C/S 変異体は刺激に応答した NF- κ B の DNA 結合を促進する活性を有することが示された

以上の結果から、細胞内でも APE1/Ref-1 C/S 変異体は NF- κ B の転写活性および DNA 結合を正に制御する活性を有することが示され、実際に APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性は細胞内でも機能していることが示唆された。

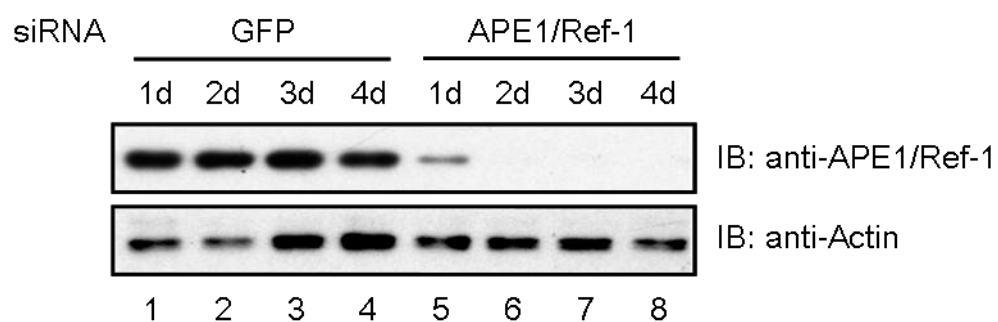


図 5.1 細胞内在性 APE1/Ref-1 のノックダウン

siRNA を用いて 293T 細胞の内在性の APE1/Ref-1 をノックダウンした。

293T 細胞に siRNA をトランスフェクションし、1～4 日間培養後、細胞を回収して細胞抽出液を作製した。APE1/Ref-1 がノックダウンされていることをウエスタンブロッティングにより確認した。

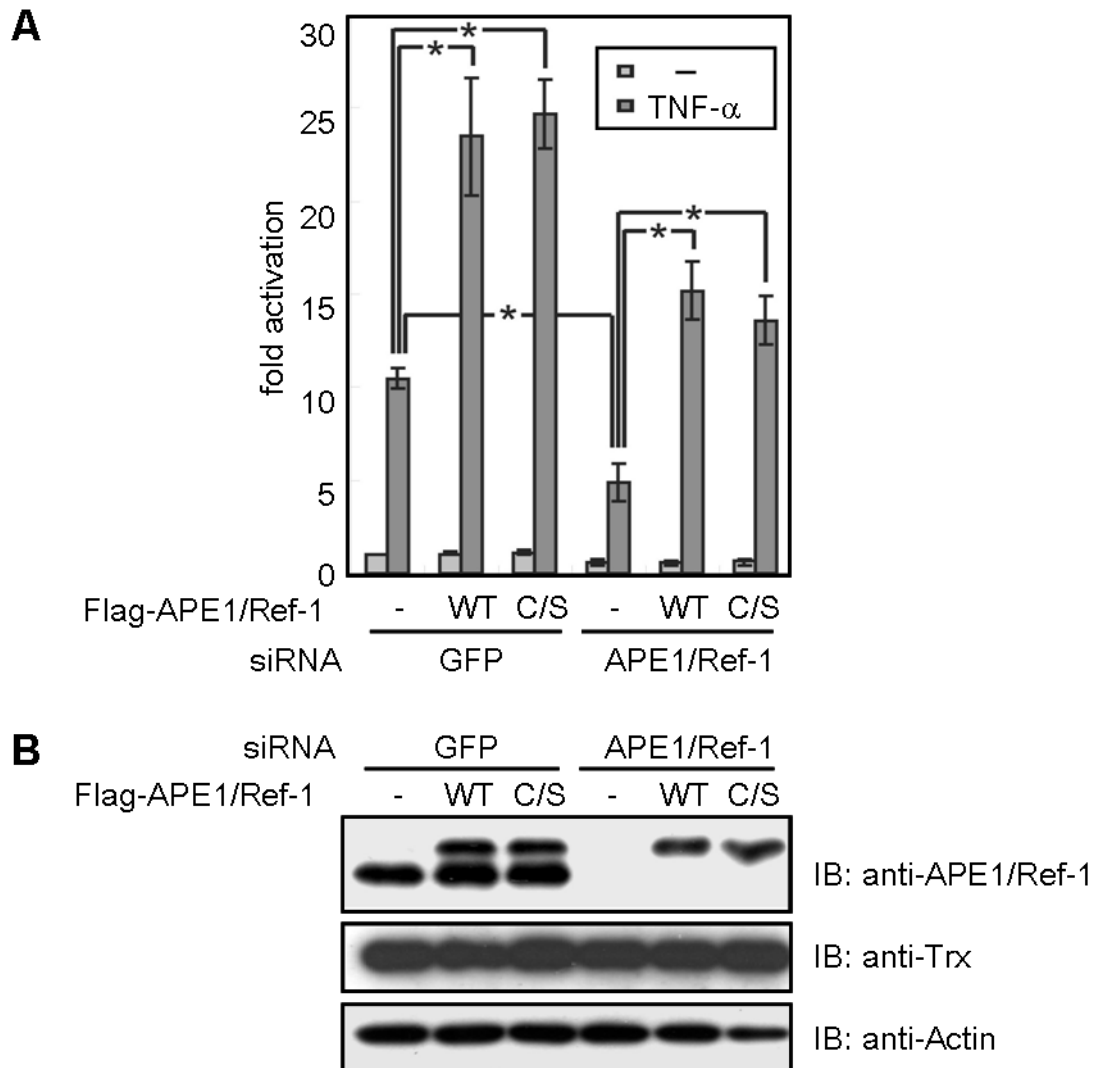


図 5.2 APE1/Ref-1 は Cys 残基非依存的に NF-κB 制御下の転写を誘導する

A. NF-κB の結合配列を 4 個含むプロモーター配列をルシフェラーゼ遺伝子上流に連結したプラスミドと共に、APE1/Ref-1 または GFP(コントロール)を標的とする siRNA を 293T 細胞にトランスフェクションした。また、その後 siRNA に耐性の Flag-APE1/Ref-1 WT または Flag-APE1/Ref-1 C/S 変異体の発現プラスミドも同様に導入した。回収の 24 時間前に 10 ng/ml の TNF-α で細胞を刺激し、細胞回収後は細胞抽出液を用いてルシフェラーゼの活性を測定した。(n = 3, * P < 0.01)

B. 同様の組み合わせでトランスフェクションした細胞の細胞抽出液を用いてウェスタンブロッティングを行い、APE1/Ref-1 の発現量を確認した。

第六章 総括

6.1 APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性

これまでの様々な報告から、APE1/Ref-1 は自身の還元状態を利用して、標的のレドックス感受性を示す転写因子の Cys 残基を直接的に還元し、その DNA 結合を調節することが示唆されてきた (55,73)。この従来考えられてきたレドックス活性とは区別して、本研究ではレドックスシャペロン活性と定義した APE1/Ref-1 の新規の活性を発見した。すなわちここでの APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性とは、他の還元因子による、転写因子の DNA 結合に重要な Cys 残基の還元反応を促進することで、その転写因子の DNA 結合を促進する活性である。Cys 残基を全て Ser に置換した変異体でもこの活性を有することから、レドックスシャペロン活性には APE1/Ref-1 自身の酸化還元状態は影響しないと考えられる。(図 3.7)

レドックスシャペロン活性は APE1/Ref-1 と標的転写因子との直接的な結合を介して発揮され、*in vitro* でレドックス活性を示すのに必要な条件と比べてより低濃度の APE1/Ref-1 で活性が見られる。細胞の核抽出液を用いて定量的にウエスタンブロッティングを行うと、細胞の核内には APE1/Ref-1 が 1 μ M 以上の濃度で存在していると見積もられる (55)。この濃度はレドックスシャペロン活性が検出された *in vitro* の実験系で用いた APE1/Ref-1 の濃度とほぼ一致する。また、細胞内での GSH や Trx の濃度はそれぞれ約 1 mM、1 μ M 程度と見積もられており、今回 *in vitro* の実験系で用いた GSH や Trx 濃度は細胞内濃度を反映しているといえる (71)。このように本研究で用いた生化学的な実験系は細胞内での環境に近い条件であったことを考慮すると、実際に *in vivo* でもレドックスシャペロン活性を介して APE1/Ref-1 が転写因子のレドックス制御を担っていることが予想される。

6.2 APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性の作用メカニズム

レドックスシャペロンという概念はこれまでに報告は無く、したがって APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性の発見は、細胞内の一連のレドックス制御機構を理解する上で新たな視点を加えるものといえる。ここでは考えられる APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性による作用機構として、以下の3つのモデルを提案する(図 6.1)。

1. リクルートモデル

APE1/Ref-1 がレドックス制御標的の転写因子と、還元因子の両方に結合し、足場として機能することで両者の配向を制御し相互作用を起し易くする

2. 構造変換モデル

APE1/Ref-1 がレドックス制御標的の転写因子と直接結合することで転写因子の立体構造の変化を誘導し、それにより還元因子の、転写因子のレドックス感受性を示す Cys 残基への接近を容易にする

3. 酸化抑制モデル

APE1/Ref-1 が結合することで転写因子 Cys 残基の還元状態を安定化し（例えばチオール基と水素結合を形成するなど）、酸化修飾に対する抵抗性を獲得する
また、実際には複数の機構が互いに混ざり合って作用している可能性も考えられる。
APE1/Ref-1 と Trx は物理的に相互作用をすることがこれまでに報告されており(30,58,72)、これは1つめのリクルートモデルを支持するといえる。しかし、立体構造的には全く似ていない GSH と Trx という2つの還元因子による還元反応を APE1/Ref-1 が促進するという結果は、レドックス制御の標的選択性 APE1/Ref-1 のみで規定されており、還元因子の種類には依らないことを示唆している。すなわちこれは2つめの構造変換モデルや3つめの酸化抑制モデルを支持する。

6.3 レドックス活性とレドックスシャペロン活性の関係

APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性は、自身の Cys 残基の還元状態を必要とするレドックス活性とは独立した活性であることを示してきた。しかし両者とも標的タンパク質と特異的に結合することで Cys 残基の還元を促すという点においては共通しており、機能的には似た活性といえる。したがって現時点では、細胞内で APE1/Ref-1 は特定の標的因子に対してレドックス活性あるいはレドックスシャペロン活性の常により一方の作用機構を介して作用すると考えるよりは、転写因子はあらかじめ両方の作用機構により制御される可能性があり、細胞内の環境によって柔軟に使い分けられる可能性を想定するのが妥当であると考えられる。すなわち以下のようなシナリオが考えられる。「APE1/Ref-1 は標的タンパク質と結合することにより標的タンパク質が還元されやすい環境を作り出す。周囲に還元因子が存在するときにはレドックスシャペロンとして働き還元因子による作用を促進する。一方で還元因子が存在しないときには APE1/Ref-1 がレドックス活性を発揮し、標的タンパク質を直接的に還元する。」(図 6.2) また、*in vitro* において APE1/Ref-1 がレドックス活性を示すには高濃度の APE1/Ref-1 が存在することが必要だったことを考慮すると、細胞内における APE1/Ref-1 の濃度も作用機構を規定する重要な要因であることが予想される。

6.4 APE1/Ref-1 各活性に対して Cys 残基の担う役割

本研究では APE1/Ref-1 C/S 変異体はレドックスシャペロン活性を有する一方で、レドックス活性や AP エンドヌクレアーゼ活性、DNA 結合活性を保持していないことを示してきた。ここでは APE1/Ref-1 の構造と各々の活性との相関関係について考察を加える。X 線結晶解析で得られた立体構造からは、APE1/Ref-1 に含まれる 7 つの Cys 残基は互いにジスルフィド結合を形成してはおらず、Cys 残基が APE1/Ref-1 自身の立体構造の維持に大きく影響しているとは考えにくい (22,51)。このことから、

APE1/Ref-1 C/S 変異体でも WT の立体構造と大差は無いことが予想される。また、p53をはじめとする各転写因子との結合能も WT と C/S 変異体で差が見られなかったことも、この予想を支持するものといえる。

APE1/Ref-1 の還元状態依存的なレドックス活性には APE1/Ref-1 の N 末端領域 1-127 a.a.が必要かつ十分であることが、酸化型 AP-1 の DNA 結合促進を指標とした *in vitro* の解析から示されていた (75)。本研究では APE1/Ref-1 の 7 つ全ての Cys 残基を置換すると APE1/Ref-1 はレドックス活性を失うことを示した。このことから、レドックス活性ドメインとされる領域に含まれる Cys-65、Cys-93、Cys-99 残基の 3 つの Cys 残基がレドックス活性に重要な役割を担っていることが予想される。

一方、AP エンドヌクレアーゼ活性と Cys 残基の関係についても考察する。最近 Mitra らにより、7 つある Cys 残基をそれぞれひとつずつ Ser に置換していった変異体ではいずれも AP エンドヌクレアーゼ活性を保持していることが報告された (45)。その報告と本研究の結果を考慮すると、AP エンドヌクレアーゼ活性の喪失には少なくとも 2 箇所以上の Cys 残基の置換が組み合わさることが必要だと考えられる。しかし、APE1/Ref-1 と AP 部位を含む DNA との複合体の X 線結晶構造からは、DNA 結合領域の近傍には APE1/Ref-1 の Cys 残基は露出していないことが分かる (51)。そのため Cys 残基の置換による AP エンドヌクレアーゼ活性の喪失は、立体構造に生じる微妙な歪みに依るものであることなどが予想される。いずれにせよ、この点を解明するには 2 つ以上の Cys 残基の置換を組み合わせた生化学的な検討をさらに積む必要がある。

6.5 APE1/Ref-1 の生理学上の重要性

APE1/Ref-1 のホモ接合型ノックアウトマウスは胎生致死であったことから、APE1/Ref-1 は個体の発生・成育に不可欠な役割を担っていると考えられる (76)。また、ヒトの細胞においてアンチセンス cDNA を用いて APE1/Ref-1 の発現を抑制した

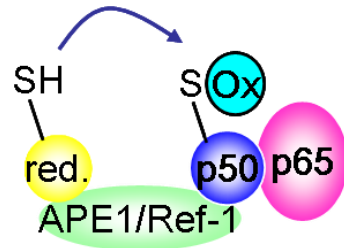
ところ、酸化ストレスに対する感受性が上昇するとともに NF- κ B の活性が抑制されることが示された (9)。さらに、いくつかの細胞を用いて siRNA により APE1/Ref-1 のノックダウンしたところ、細胞増殖の停止や脱塩基 DNA 傷害の蓄積を伴うアポトーシスが引き起こされることが報告されている (16)。一方、APE1/Ref-1 の発現量は活性酸素($O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、 $OH^{\cdot}$)に応答して mRNA レベル・タンパク質レベルで誘導されることが示されている (15,60,77,78)。以上の個体・細胞レベルの解析から、APE1/Ref-1 は酸化ストレスに対する防御・生存に非常に重要な役割を果たしていると考えられ、ストレス応答性の転写因子の活性調節が重要な意味を持っていることが予想される。

しかし実際のところ、APE1/Ref-1 が細胞内でどのような機構により生存に必須な機能を発揮しているのかについては解明の余地が大きく残されている。本研究では APE1/Ref-1 のノックダウンによって引き起こされる NF- κ B の抑制が、APE1/Ref-1 C/S 変異体を発現させることにより回復することを示した。APE1/Ref-1 C/S 変異体は、レドックスシャペロン活性以外の活性を保持していない。一方、Dempfle らは APE1/Ref-1 の発現抑制によって引き起こされる DNA 傷害とアポトーシスによる細胞死の大部分が、酵母の Apn1 を発現させることにより回復することを示した (16)。Apn1 は酵母の AP エンドヌクレアーゼであるが、APE1/Ref-1 と立体構造的な相同性は低く、AP エンドヌクレアーゼ以外の活性は保持していない。また、Mittra らも、APE1/Ref-1 ノルのマウス胚繊維芽細胞(MEF) を構築し、細胞の生存を APE1/Ref-1 WT により回復させることが出来るが H309N 変異体(AP エンドヌクレアーゼ活性を欠損している) では回復させることが出来ないことを示した (35)。この報告も、細胞の生存には APE1/Ref-1 の AP エンドヌクレアーゼの活性が必須の役割を果たしていることを示唆している。したがって以上の一連の結果を考慮すると、APE1/Ref-1 は酸化ストレス応答において、細胞内ではその異なった機能を介して様々な形で役割を担っていることが想定される。

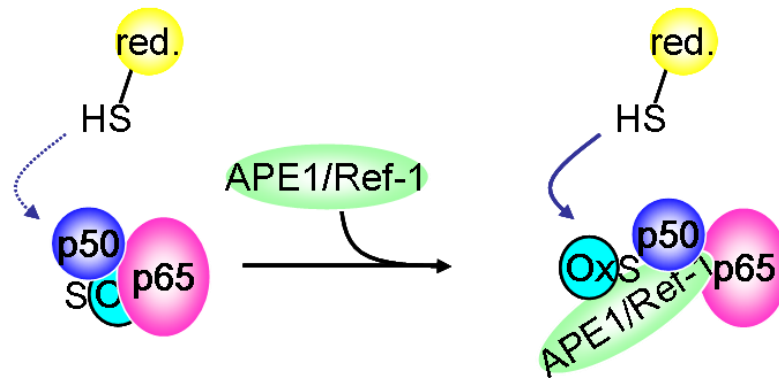
6.6 結言

本研究では、APE1/Ref-1 を介した NF- κ B 活性化機構の解析を通して、レドックスシャペロン活性と定義した APE1/Ref-1 の新たな活性を発見した。レドックスシャペロン活性とは、他の還元因子による還元反応を促進することを介してその転写因子の DNA 結合を促進する活性である。APE1/Ref-1 のレドックスシャペロン活性の発見は細胞内の一連のレドックス制御に関する研究に新たな視点を加えるものであり、またその生理学的な重要性を含めて、今後のさらなる解析が期待される。

A リクルートモデル



B 構造変換モデル



C 酸化抑制モデル

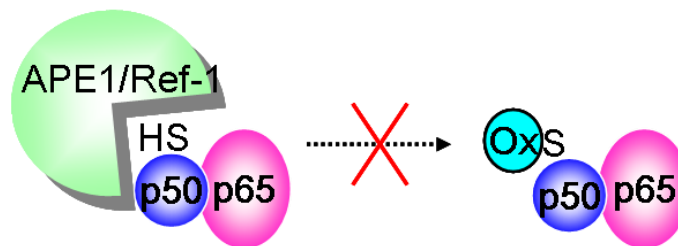


図 6.1 考えられるレドックスシャペロン活性による作用機構のモデル図

A. リクルートモデル 還元因子を標的タンパク質の近傍に誘導する

B. 構造変換モデル 標的タンパク質の Cys 残基を露出させ、還元因子が作用しやすい環境を作り出す

C. 酸化抑制モデル 標的タンパク質の還元状態を安定化する

標的タンパク質の一例として p50/p65 を図示した。red. : 還元因子 (GSH、Trx など)

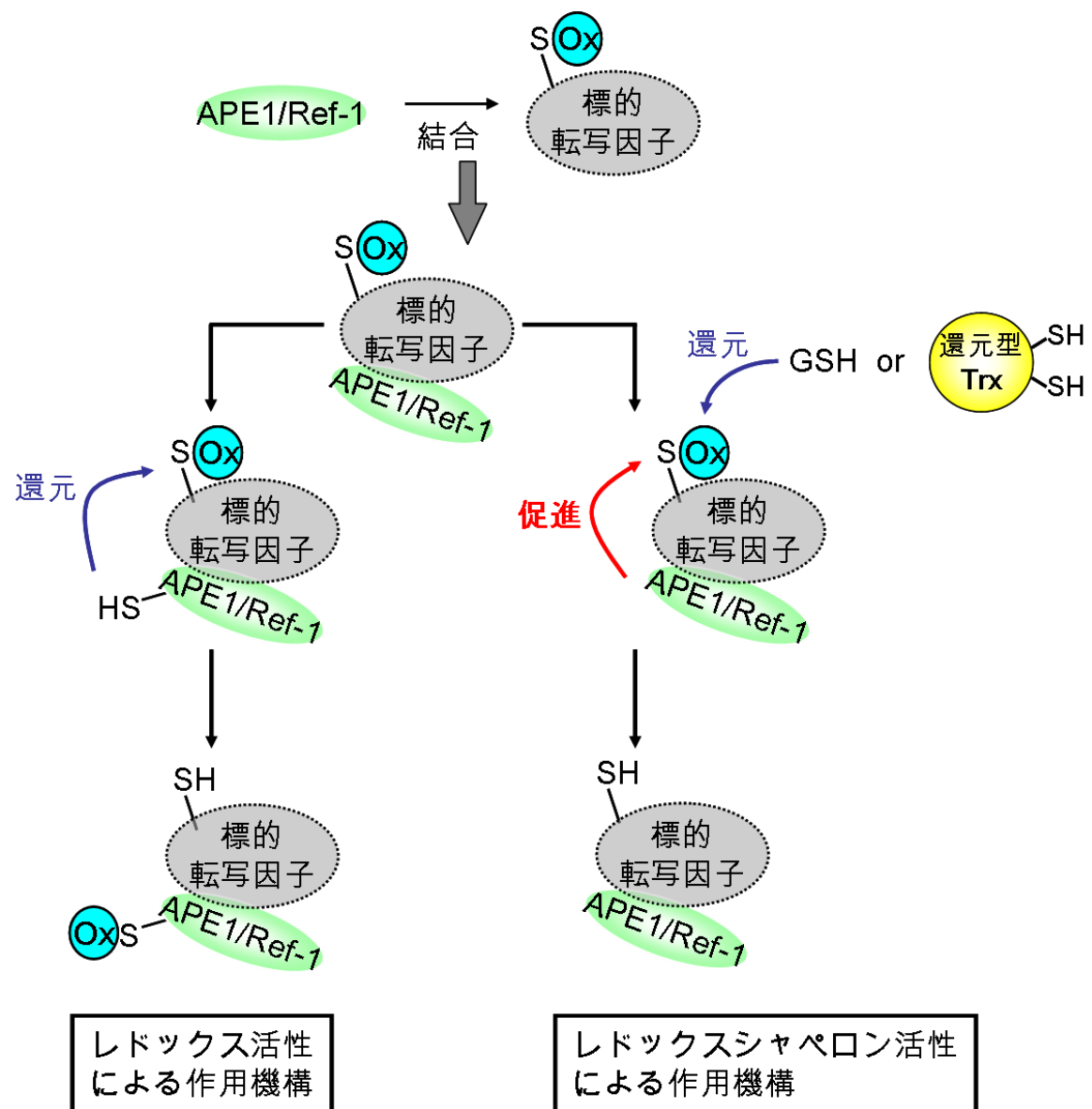


図 6.2 APE1/Ref-1 を介した転写因子のレドックス制御機構

APE1/Ref-1 はレドックス活性とレドックスシャペロン活性という機能的には類似した 2 種類の独立した活性を持っている。APE1/Ref-1 はレドックス制御に際して、まず標的となるタンパク質と結合することにより標的タンパク質が還元されやすい環境を作り出す。そして、APE1/Ref-1 自身の濃度あるいは近傍に存在する他の還元因子の状態といった細胞内の環境に応じて、2 種類の活性を柔軟に使い分けながら標的タンパク質を効率的に還元する役割を担うと考えられる。

参考文献

1. Abate C, Patel L, Rauscher F.J. III, Curran T. Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science* (1990) 249:1157–1161.
2. Akamatsu Y, Ohno T, Hirota K, Kagoshima H, Yodoi J, Shigesada K. Redox regulation of the DNA binding activity in transcription factor PEBP2. The roles of two conserved cysteine residues. *J Biol Chem.* (1997) 272:14497-500.
3. Cao X, Kambe F, Ohmori S, Seo H. Oxidoreductive modification of two cysteine residues in paired domain by Ref-1 regulates DNA-binding activity of Pax-8. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2002) 297:288–293.
4. Cao X, Kambe F, Lu X, Kobayashi N, Ohmori S, Seo H. Glutathionylation of two cysteine residues in paired domain regulates DNA binding activity of Pax-8. *J. Biol. Chem.* (2005) 280:25901-25906.
5. Chen FE, Huang DB, Chen YQ, Ghosh G. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF- κ B bound to DNA. *Nature* (1998) 391:410–413.
6. Chen YQ, Ghosh S, Ghosh G. A novel DNA recognition mode by the NF- κ B p65 homodimer. *Nat. Struct. Biol.* (1998) 5:67–73.
7. Chinenov Y, Schmidt T, Yang XY, Martin ME. Identification of redox-sensitive cysteines in GA-binding protein- α that regulate DNA binding and heterodimerization. *J. Biol. Chem.* (1998) 273:6203-6209.
8. Cramer P, Larson CJ, Verdine GL, Müller CW. Structure of the human NF- κ B p52 homodimer-DNA complex at 2.1 Å resolution. *EMBO J.* (1997) 16:7078-90.
9. Daily D, Vlamis-Gardikas A, Offen D, Mittelman L, Melamed E, Holmgren A, Barzilai A. Glutaredoxin protects cerebellar granule neurons from dopamine-induced apoptosis by activating NF- κ B via Ref-1. *J. Biol. Chem.* (2001) 276:1335–1344.

10. D'Autreaux B, Toledano MB. ROS as signaling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2007) 8:813-824.
11. Demple B, Herman T, Chen DS. Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (1991) 88:11450–11454.
12. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem. Pharmacol.* (2002) 64:1019–1026.
13. DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E Karin M. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature* (1997) 388:548–554.
14. Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, Poellinger L, Fujii-Kuriyama Y. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1 α in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J.* (1999) 18:1905–1914.
15. Flaherty DM, Monick MM, Carter AB, Peterson MW, Hunninghake GW. Oxidant-mediated increases in redox factor-1 nuclear protein and activator protein-1 DNA binding in asbestos-treated macrophages. *J. Immunol.* (2002) 168:5675–5681.
16. Fung H, Demple B. A vital role for Ape1/Ref1 protein in repairing spontaneous DNA damage in human cells. *Mol. Cell.* (2005) 17:463–470.
17. Gaiddon C, Moorthy NC, Prives C. Ref-1 regulates the transactivation and pro-apoptotic functions of p53 in vivo. *EMBO J.* (1999) 18:5609–5621.
18. Ghosh G, van Duyne G, Ghosh S, Sigler PB. Structure of NF- κ B p50 homodimer bound to a κ B site. *Nature* (1995) 373:303–310.
19. Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF- κ B in inflammation. *Nat. rev. immunol.* (2008) 8:837-848.
20. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* (2002) 109:S81-S96.

21. Glover JN, Harrison SC. Crystal structure of the heterodimeric bZip transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* (1995) 373:257-261.
22. Gorman MA, Morera S, Rothwell DG, de La Fortelle E, Mol CD, Tainer JA, Hickson ID, Freemont PS. The crystal structure of the human DNA repair endonuclease HAP1 suggests the recognition of extra-helical deoxyribose at DNA abasic sites. *EMBO J.* (1997) 16:6548–6558.
23. Guan Z, Basi D, Li Q, Mariash A, Xia YF, Geng JG, Kao E, Hall JL. Loss of redox factor 1 decreases NF- κ B activity and increases susceptibility of endothelial cells to apoptosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2005) 25:96–101.
24. Guehmann S, Vorbrueggen G, Kalkbrenner F, Moelling K. Reduction of a conserved Cys is essential for Myb DNA-binding. (1992) 20:2279-2286.
25. Guo Y, Einhorn L, Kelley M, Hirota K, Yodoi J, Reinbold R, Scholer H, Ramsey H, Hromas R. Redox regulation of the embryonic stem cell transcription factor Oct-4 by thioredoxin. *Stem Cells* (2004) 22:259-264.
26. Hall JL, Wang X, Van A, Zhao Y, Gibbons GH. Overexpression of Ref-1 inhibits hypoxia and tumor necrosis factor-induced endothelial cell apoptosis through NF- κ B-independent and -dependent pathways. *Circ. Res.* (2001) 88:1247–1253.
27. Hayashi S, Hajiro-Nakanishi K, Makino Y, Eguchi H, Yodoi J, Tanaka H. Functional modulation of estrogen receptor by redox state with reference to thioredoxin as a mediator. *Nucleic Acids Res.* (1997) 25:4035-40.
28. Hidalgo, E., Ding, H., and Dimple, B. Redox Signal Transduction: Mutations Shifting $^{62}\text{Fe-}^{2}\text{S}_9$ Centers of the SoxR Sensor-Regulator to the Oxidized Form. *Cell* (1997) 88: 121-129.

29. Hiramoto M, Shimizu N, Sugimoto K, Tang J, Kawakami Y, Ito M, Aizawa S, Tanaka H, Makino I, Handa H. Nuclear targeted suppression of NF- κ B activity by the novel quinone derivative E3330. *J. Immunol.* (1998) 160:810–819.
30. Hirota K, Matsui M, Iwata S, Nishiyama A, Mori K, Yodoi J. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (1997) 94:3633–3638.
31. Huang DB, Chen YQ, Ruetsche M, Phelps CB, Ghosh G. X-ray crystal structure of proto-oncogene product c-Rel bound to the CD28 response element of IL-2. *Structure* (2001) 9:669–678.
32. Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J. Biol. Chem.* (1996) 271:32253–32259.
33. Huang RP, Adamson ED. Characterization of the DNA-binding properties of the early growth response-1 (Egr-1) transcription factor: evidence for modulation by a redox mechanism. *DNA Cell Biol.* (1993) 12:265–273.
34. Ireland RC, Li SY, Dougherty JJ. The DNA binding of purified Ah receptor heterodimer is regulated by redox conditions. *Arch. Biochem. Biophys.* (1995) 319:470-480.
35. Izumi T, Brown DB, Naidu CV, Bhakat KK, MacInnes MA, Saito H, Chen DJ, Mitra S. Two essential but distinct function of the mammalian abasic endonuclease. *Proc. Natl Acad. Sci.* (2005) 102:5739-5743.
36. Jayaraman L, Murthy KG, Zhu C, Curran T, Xanthoudakis S, Prives C. Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53. *Genes Dev.* (1997) 11:558–570.
37. Kamata H, Hirata H. Redox Regulation of Cellular Signalling. *Cell. Signal.* (1999) 11:1-14

38. Kataoka K, Yoshitomo-Nakagawa K, Shioda S, Nishizawa M. A set of Hox proteins interact with the Maf oncoprotein to inhibit its DNA binding, transactivation, and transforming activities. *J. Biol. Chem.* (2001) 276:819–826.
39. Kelleher ZT, Matsumoto A, Stamler JS, Marshall HE. NOS2 regulation of NF- κ B by S-nitrosylation of p65. *J. Biol. Chem.* (2007) 282:30667-30672.
40. Kobayashi-Miura M, Shioji K, Hoshino Y, Masutani H, Nakamura H, Yodoi J. Oxygen sensing and redox signaling: the role of thioredoxin in embryonic development and cardiac diseases. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* (2007) 292:H2040–H2050.
41. Lando D, Pongratz I, Poellinger L, Whitelaw ML. A redox mechanism controls differential DNA binding activities of hypoxia-inducible factor (HIF) 1 α and the HIF-like factor. *J. Biol. Chem.* (2000) 275:4618–4627.
42. Liu Y, Prasad R, Beard WA, Kedar PS, Hou EW, Shock DD, Wilson SH. Coordination of steps in single-nucleotide base excision repair mediated by apurinic/aprimidinic endonuclease 1 and DNA polymerase β . *J. Biol. Chem.* (2007) 282:13532–13541.
43. Lou H, Kaplowitz N. Glutathione depletion down-regulate tumor necrosis factor α -induced NF- κ B activity via I κ B kinase-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* (2007) 282:29470-29481.
44. Makino Y, Yoshikawa N, Okamoto K, Hirota K, Yodoi J, Makino I, Tanaka H. Direct association with thioredoxin allows redox regulation of glucocorticoid receptor function. *J Biol Chem* (1999) 274:3182-8.
45. Mantha AK, Oezguen N, Bhakat KK, Izumi T, Braun W, Mitra S. Unusual role of a cysteine residue in substrate binding and activity of human AP-endonuclease 1. *J. Mol. Biol.* (2008) 379:28–37.

46. Matthews JR, Wakasugi N, Virelizier JL, Yodoi J, Hay RT. Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF- κ B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Res.* (1992) 20:3821–3830.
47. Matthews JR, Kaszubska W, Turcatti G, Wells TN, Hay RT. Role of cysteine62 in DNA recognition by the P50 subunit of NF- κ B. *Nucleic Acids Res.* (1993) 21:1727–1734.
48. Matthews JR, Botting CH, Panico M, Morris HR, Hay RT. Inhibition of NF- κ B DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids. Res.* (1996) 24:2236-2242.
49. Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* (1988) 263:17205–17208.
50. Mitomo K, Nakayama K, Fujimoto K, Sun X, Seki S, Yamamoto K. Two different cellular redox systems regulate the DNA-binding activity of the p50 subunit of NF- κ B in vitro. *Gene* (1994) 145:197–203.
51. Mol CD, Izumi T, Mitra S, Tainer JA. DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 and DNA repair coordination [corrected]. *Nature* (2000) 403:451-456.
52. Muller CW, Rey FA, Sodeoka M, Verdine GL, Harrison SC. Structure of the NF- κ B p50 homodimer bound to DNA. *Nature* (1995) 373:311–317.
53. Myrset AH, Bostad A, Jamin N, Lirsac P, Toma F, Gabrielsen OS. DNA and redox state induced conformational changes in the DNA-binding domain of the Myb oncoprotein. (1993) 12:4625-4633.
54. Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Currie RA. Subunit association and DNA binding activity of the heterotrimeric transcription factor NF-Y is regulated by cellular redox. *J Biol Chem* (1996) 271:28784-91.

55. Nishi T, Shimizu N, Hiramoto M, Sato I, Yamaguchi Y, Hasegawa M, Aizawa S, Tanaka H, Kataoka K, Watanabe H, et al. Spatial redox regulation of a critical cysteine residue of NF- κ B in vivo. *J. Biol. Chem.* (2002) 277:44548–44556.
56. Ordway JM, Eberhart D, Curran T. Cysteine 64 of Ref-1 is not essential for redox regulation of AP-1 DNA binding. *Mol. Cell Biol.* (2003) 23:4257–4266.
57. Pineda-Molina E, Klatt P, Vazquez J, Marina A, Garcia de Lacoba M, Perez-Sala D, Lamas S. Glutathionylation of the p50 Subunit of NF- κ B: a Mechanism for Redox-Induced Inhibition of DNA binding. *Biochemistry* (2001) 40:14134-14142.
58. Qin J, Clore GM, Kennedy WP, Kuszewski J, Gronenborn AM. The solution structure of human thioredoxin complexed with its target from Ref-1 reveals peptide chain reversal. *Structure* (1996) 4:613–620.
59. Rainwater R, Parks D, Anderson ME, Tegtmeyer P, Mann K. Role of cystein residues in regulation of p53 function. *Mol. Cell Biol.* (1995) 15:3892-3903
60. Ramana CV, Boldogh I, Izumi T, Mitra S. Activation of apurinic/apyrimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (1998) 95:5061–5066.
61. Robson CN, Hickson ID. Isolation of cDNA clones encoding a human apurinic/apyrimidinic endonuclease that corrects DNA repair and mutagenesis defects in *E. coli* xth (exonuclease III) mutants. *Nucleic Acids Res.* (1991) 19:5519–5523.
62. Robson CN, Milne AM, Pappin DJ, Hickson ID. Isolation of cDNA clones encoding an enzyme from bovine cells that repairs oxidative DNA damage in vitro: homology with bacterial repair enzymes. *Nucleic Acids Res.* (1991) 19:1087–1092.

63. Shimizu N, Sugimoto K, Tang J, Nishi T, Sato I, Hiramoto M, Aizawa S, Hatakeyama M, Ohba R, Hatori H, et al. High-performance affinity beads for identifying drug receptors. *Nat. Biotechnol.* (2000) 18:877–881.
64. Tell G, Pellizzari L, Cimarosti D, Pucillo C, Damante G. Ref-1 controls pax-8 DNA-binding activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1998) 252:178–183.
65. Tell G, Scaloni A, Pellizzari L, Formisano S, Pucillo C, Damante G. Redox potential controls the structure and DNA binding activity of the paired domain. *J. Biol. Chem.* (1998) 273:25062–25072.
66. Tell G, Zecca A, Pellizzari L, Spessotto P, Colombatti A, Kelley MR, Damante G, Pucillo C. An ‘environment to nucleus’ signaling system operates in B lymphocytes: redox status modulates BSAP/Pax-5 activation through Ref-1 nuclear translocation. *Nucleic Acids Res.* (2000) 28:1099–1105.
67. Tell G, Pines A, Paron I, D’Elia A, Bisca A, Kelley MR, Manzini G, Damante G. Redox effector factor-1 regulates the activity of thyroid transcription factor-1 by controlling the redox state of the N transcriptional activation domain. *J. Biol. Chem.* (2002) 276:14564–14574.
68. Toledano M B, Leonhard WJ. Modulation of transcription factor NF- κ B binding activity by oxidation-reduction in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) 88:4328–4332.
69. Toledano MB, Ghosh D, Trinh F, Leonard WJ. N-terminal DNA-binding domains contribute to differential DNA-binding specificities of NF- κ B p50 and p65. *Mol. Cell Biol.* (1993) 13:852–860.
70. Walker LJ, Robson CN, Black E, Gillespie D, Hickson ID. Identification of residues in the human DNA repair enzyme HAP1 (Ref-1) that are essential for redox regulation of Jun DNA binding. *Mol. Cell Biol.* (1993) 13:5370–5376.

71. Watson WH, Yang X, Choi YE, Jones DP, Kehrer JP. Thioredoxin and its role in toxicology. *Toxicol. Sci.* (2004) 78:3–14.
72. Wei SJ, Botero A, Hirota K, Bradbury CM, Markovina S, Laszlo A, Spitz DR, Goswami PC, Yodoi J, Gius D. Thioredoxin nuclear translocation and interaction with redox factor-1 activates the activator protein-1 transcription factor in response to ionizing radiation. *Cancer Res.* (2000) 60:6688–6695.
73. Xanthoudakis S, Curran T. Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. *EMBO J.* (1992) 11:653–665.
74. Xanthoudakis S, Miao G, Wang F, Pan YC, Curran T. Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO J.* (1992) 11:3323–3335.
75. Xanthoudakis S, Miao GG, Curran T. The redox and DNA-repair activities of Ref-1 are encoded by nonoverlapping domains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (1994) 91:23–27.
76. Xanthoudakis S, Smeyne RJ, Wallace JD, Curran T. The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (1996) 93:8919–8923.
77. Yang S, Misner B, Chiu R, Meyskens F.L. Jr. Redox effector factor-1, combined with reactive oxygen species, plays an important role in the transformation of JB6 cells. *Carcinogenesis* (2007) 28:2382–2390.
78. Yao KS, Xanthoudakis S, Curran T, O'Dwyer PJ. Activation of AP-1 and of a nuclear redox factor, Ref-1, in the response of HT29 colon cancer cells to hypoxia. *Mol. Cell Biol.* (1994) 14:5997–6003.
79. Zheng, M., Aslund, F., and Storz, G. Activation of the OxyR Transcription Factor by Reversible Disulfide Bond Formation. *Science* (1998) 279: 1718-1721.

謝辞

本研究を行うにあたり様々な局面でご指導を賜りました東京工業大学大学院半田宏教授に篤くお礼申し上げます。有益なご指導、ご助言を頂きました東京工業大学大学院和田忠士准教授ならびに山口雄輝准教授、畠山士講師、坂本聡助教、また終始多大なるご指導を頂戴した慶應義塾大学大学院加部泰明講師に深く感謝いたします。

本研究の共同研究者である安藤梢博士、小倉裕次博士に深く感謝致します。また日々の研究生活の中で、有意義な討論、指導を頂いた半田研究室の皆さまに感謝いたします。

最後に、終始暖かく支えてくれた父、母、妹に心から感謝いたします。