

ZBTB2-HIF-1 経路の活性制御機構と低酸素刺激 依存的なゲノム不安定性誘導機構の解析

神邊 剛生

目次

要旨	4
略語	6
I. 序論	
1.1.低酸素誘導因子(hypoxia-inducible factor)と低酸素生物学.....	9
1.2.DNA 損傷応答の生物学	13
1.3.Zinc finger and BTB domain-containing protein 2 (ZBTB2).....	16
1.4.本研究の着想と目的.....	18
II. 材料と方法	
2.1.プラスミド	20
2.2.細胞培養・プラスミドトランスフェクション・薬剤	24
2.3.ルシフェラーゼアッセイ	25
2.4.共免疫沈降実験	25
2.5.WB(ウェスタンブロッティング).....	26
2.6.マイクロアレイ解析・定量的 real-time PCR	27
2.7.スプリットルシフェラーゼを用いたタンパク質間相互作用解析	28
2.8. <i>in silico</i> タンパク質相互作用解析	29
2.9.細胞増殖定量実験	29
2.10.TCGA 解析.....	30
2.11.レンチウイルスを用いた shRNA の導入	30
2.12.免疫細胞染色	31
2.13.統計解析	31
III. ZBTB2-HIF-1 経路の活性制御機構の解明	
3.1.ZBTB2 は HIF-1 活性化因子 PARP1 と複合体を形成する.....	33
3.2.ZBTB2 は PARP1 と協調して HIF-1 を活性化する.....	39
3.3.ZBTB2 による HIF-1 活性化経路制御因子のスクリーニング	42
3.4.ZBTB7A は ZBTB2 とヘテロ二量体を形成し ZBTB2 ホモ二量体形成を阻害して、 HIF-1 の活性化および低酸素下での細胞増殖を抑制する.....	48
3.5.ZBTB7A の低発現は患者予後不良に相関する.....	53
IV. ZBTB2 による HIF-1 活性化が低酸素環境下で果たす役割の解明	
4.1.ZBTB2 は PARP1 を HIF-1 を介した低酸素応答へ動員して、PARP1 の DDR における 活性を抑制する.....	57
4.2.PARP1 の低酸素応答と DDR での役割は競合関係にある.....	63
4.3.低酸素シグネチャーの高い臨床腫瘍組織において ZBTB2 の腫瘍内発現量とゲノム 変異蓄積量は相関する	66
V. 考察	

5.1.第三章の考察と展望.....	69
5.2.第四章の考察と展望.....	72
5.3.要約と今後の展望.....	76
VI. 補足資料	
6.1.ZBTB2 が HIF-1 を活性化して発現を誘導する HIF-1 下流遺伝子同定および ZBTB2 の HIF-1 活性化能を解析するレポーター系構築.....	77
6.2.がん抑制遺伝子 p53 と ZBTB2.....	83
6.3.ポリ ADP リボシル量を定量した免疫染色実験の代表的染色図.....	85
VII. 参考文献.....	87

要旨

悪性固形腫瘍には、酸素拡散が局所的に制限された低酸素領域が見られ、その大きさはがん患者の予後不良と相関する。酸素依存的な抑制制御を受ける転写因子の低酸素誘導因子 hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)が、低酸素下で抑制制御機構の破綻に伴って活性化し、がんの悪性形質に関連する遺伝子群の発現を誘導して腫瘍悪性化を促進していると考えられている。加えて、近年は HIF-1 を活性化する様々な因子群も報告されており、所属研究室では Zinc finger and BTB domain-containing protein 2 (ZBTB2)を HIF-1 活性化因子として同定した。しかし、ZBTB2 による HIF-1 活性化経路を制御する機構や、ZBTB2 による HIF-1 活性化が低酸素環境下で果たす役割は完全には明らかでなかった。本研究では、第一に、ZBTB2 による HIF-1 活性化経路の詳細な分子機構解明を通じて、ZBTB7A が ZBTB2 による HIF-1 活性化を抑制することを見出し、その分子機構の解明に取り組んだ。さらに、ZBTB2 による HIF-1 活性化が、ゲノム DNA 損傷時の DNA 損傷応答 (DNA damage response: DDR)を抑制し、低酸素環境下でがんの悪性形質であるゲノム不安定性を亢進させる役割を持つことを見出した。

まず本研究では、ZBTB2 による HIF-1 活性化分子機構の解明に取り組んだ。初めに、ZBTB2 と複合体形成する因子を共免疫沈降実験と質量分析 (LC-MS/MS)を組み合わせで解析し、HIF-1 活性化能を持つ Poly ADP-ribose polymerase 1 (PARP1)を同定した。そこで、ZBTB2 が PARP1 と協調して HIF-1 を活性化すると考え、共免疫沈降実験や HIF-1 活性を解析するレポーターアッセイを行った。その結果、ZBTB2 が PARP1 と HIF-1 α (HIF-1 の主要制御サブユニット)の複合体形成を促進し、PARP1 を HIF-1 活性制御に動員して HIF-1 を活性化することを見出した。次に、PARP1 の寄与を足がかりに、ZBTB2 による HIF-1 活性化を制御する内在性因子の同定を試みた。具体的には、PARP1 や ZBTB2 と複合体を形成しうる因子を探索して ZBTB7A を同定した。共免疫沈降実験を通じて ZBTB7A が ZBTB2 と複合体を形成することが、またスプリットルシフェラーゼ相補アッセイを通じて ZBTB7A が HIF-1 活性化に必要な ZBTB2 ホモ二量体形成を阻害することが分かった。さらに、ZBTB7A が HIF-1 活性に与える影響を HIF-1 活性レポーターや ZBTB2-HIF-1 経路下流遺伝子の発現量、および低酸素下での細胞増殖を元に検証した結果、ZBTB7A が ZBTB2 による HIF-1 活性化を抑制的に制御することを見出した。最後に、がんゲノム情報の公共データベース The Cancer Genome Atlas (TCGA)を用いた解析により、ZBTB7A の腫瘍内低発現と生命予後不良の相関を見出した。以上から、ZBTB2 による HIF-1 活性化の分子機構と、同機構を抑制的に制御する因子として ZBTB7A を同定した。

次に、ZBTB2 による HIF-1 活性化が低酸素環境下で果たす役割を検討した。具体的には、HIF-1 活性化において ZBTB2 と協働する PARP1 が古典的には DDR の中心的因子であることを踏まえ、ZBTB2 が PARP1 を HIF-1 活性制御へ動員した時に PARP1 の DDR への寄与が変化することではないかと考えた。そこで、ZBTB2 が低酸素下で PARP1 の DDR 活性に与える影響を、PARP1 が駆動するポリ ADP リボシル修飾や下流因子 DNA damage-binding protein 2 (DDB2)の動態を元に評価した。その結果、低酸素下で ZBTB2 が PARP1 を HIF-1 活性制御へ動員すると、PARP1 の DDR 活性が低下することを見出した。さらに、DDR の活性低下は腫瘍のゲノム不安定性を引き起

こすことから、TCGA 解析を通じて定量できる腫瘍組織内の変異数をゲノム不安定性の指標と見なし、ZBTB2 の腫瘍内発現量とゲノム不安定性の関連性を評価した。その結果、*in vitro* の解析結果と一貫して、低酸素誘導因子群の発現量が高く腫瘍内に低酸素画分が多いと考えられる腫瘍組織において、ZBTB2 発現量とゲノム不安定性が正に相関することを認めた。以上の結果は、ZBTB2 が PARP1 を HIF-1 依存的な低酸素応答機構へ動員した場合に、PARP1 の DDR 活性が減弱し、がん細胞のゲノム不安定性が亢進することを示している。

以上のように、本研究で私は、PARP1 と ZBTB7A による ZBTB2-HIF-1 経路の活性制御機構を明らかにした。また、ZBTB2-HIF-1 経路が腫瘍悪性化において果たす役割として、PARP1 の DDR 活性を低下させることによる低酸素がん細胞のゲノム不安定化現象を明らかにした。

略語表

BRCT	BRCA1 C-terminal domain
BTB	broad-complex, tramtrack, and bric-a-brac
CC	catalytic center
CDS	coding sequence
CMV	human cytomegalovirus
DBD	DNA binding domain
DDB2	DNA damage-binding protein 2
DDR	DNA damage response
DSB	double strand break
EV	empty vector
EF-1 α	elongation factor 1 α subunit
GO	gene ontology
HIF	hypoxia-inducible factor
HRE	hypoxia responsive element
IP	immuno-precipitation
IQR	interquartile range
KO	knock-out
MCS	multiple cloning site
NTD	N-terminal domain
ODD	oxygen-dependent degradation
PAR	poly-ADP ribose
PARP1	poly-ADP ribose polymerase 1
PAX8	paired box 8
PHD	prolyl-4-hydroxylase
POZ	poxvirus and zinc finger
PRKDC	protein kinase, DNA-activated, catalytic subunit
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SNP	single nucleotide polymorphism
SSB	single strand break
STC1	stanniocalcin 1
TAD	trans-activation domain
TCGA	The cancer genome atlas

TK	thymidine kinase
UAS	upstream activation sequence
UV	ultra violet
VHL	von Hippel-Lindau tumor suppressor
WB	Western blotting
WCL	whole cell lysate
WGR	tryptophan (W), glycine (G), arginine (R)
XRCC5	x-ray repair cross complementing 5
XRCC6	x-ray repair cross complementing 6
ZBTB2	zinc finger and BTB domain-containing protein 2
ZBTB7A	zinc finger and BTB domain-containing protein 7A
ZF	zinc finger

第I章

序論

1-1. 低酸素誘導因子(Hypoxia-inducible factor 1)と低酸素生物学

低酸素誘導因子 hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)の主要制御サブユニット HIF-1 α は、1992 年に G.L. Semenza 氏により低酸素依存的に Erythropoietin (EPO)の発現を誘導する転写因子として同定された¹。HIF-1 α は HIF-1 のもう一つの主要制御サブユニットである HIF-1 β とヘテロ二量体を形成し、細胞の低酸素環境への適応応答に対して中心的な役割を果たすと考えられている^{2,3}。HIF-1 α の基本構造はN末端から、HIF-1 β とのヘテロ二量体形成とDNA結合に関わる basic helix-loop-helix (bHLH)ドメイン、Per-Arnt-Sim (PAS)ドメイン、後述する翻訳後修飾に関わる Oxygen-dependent-degradation (ODD)ドメイン、転写活性化に関わる N-terminal transcriptional activation domain (NTAD)・C-terminal transcriptional activation domain (CTAD)から構成される (Fig 1.1A)。そして、二つの酸素要求性の水酸化酵素に関わる翻訳後修飾によってタンパク質安定性と転写活性化能が制御されていることが知られている (Fig 1.1B)。一つはプロリン水酸化酵素 Prolyl hydroxylase domain-containing protein 2 (PHD2)による ODDドメイン中の 402 位、564 位のプロリン残基の水酸化修飾である。この水酸化修飾はユビキチンリガーゼ von Hippel-Lindau tumor suppressor (VHL)によって HIF-1 α の分解シグナルとして認識され、HIF-1 α へのユビキチン化修飾と 26S プロテアソームでの分解に寄与する^{4,6}。もう一方の修飾は、アスパラギン水酸化酵素 Factor inhibiting HIF-1 (FIH-1)による CTAD 中の 803 位のアスパラギン残基の水酸化修飾である⁷。803 位の水酸化修飾は HIF-1 α とその活性化因子であるヒストン脱アセチル化酵素 p300/CBP との相互作用を阻害し、HIF-1 α の転写活性を抑制する。つまり、通常酸素環境下では HIF-1 α はタンパク質の安定性レベルと活性レベルの二段階で抑制的制御を受け、活性を非常に低い状態に保たれている。しかし、低酸素環境下ではこれらの酸素要求性の水酸化酵素活性が顕著に減少するため、抑制的調節機構が解除される。この状況下で、HIF-1 α は安定的に発現し、核内に移行すると恒常的に発現する HIF-1 β とヘテロ二量体を形成して⁸ 低酸素応答領域 Hypoxia responsive element (HRE)をプロモーター領域に含むさまざまな遺伝子群の発現を亢進させ、細胞の低酸素環境への適応応答に関わる^{2,3}。さらに低酸素誘導因子には上述した HIF-1 α に加えて、HIF-2 α 、HIF-3 α も存在し、いずれも細胞の低酸素適応応答へ関与することが報告されている。そして、このような HIF-1 α を介した低酸素環境への適応応答は、血中の酸素濃度低下の検知による赤血球産生の誘導や、骨髄中の幹細胞ニッチにおける造血幹細胞の形質維持など組織・個体レベルでの酸素恒常性維持に関わる。特に 2020 年に FDA により HIF-1 α 活性化による EPO 産生誘導を目的とした経口剤の PHDs 阻害薬 Roxadustat (Evrenzo®)が承認され⁹、腎性貧血患者に対して臨床応用に至った。これまで同疾患への治療は静注の EPO 製剤による赤血球産生誘導が標準療法であったため、経口剤の開発は患者の QOL 向上に寄与している。

HIF-1 活性が亢進する低酸素環境は、生理的条件のみならず病理的な悪性固形腫瘍にも生じる^{10,11}。これは、腫瘍成長過程において腫瘍細胞増殖が血管新生を上回るため、酸素供給と酸素消費の間に不均衡が生じるためである。およそ腫瘍血管から 70 μ m 程度離れた領域が低酸素環境となる¹² (Fig 1.2A)。そして、これまでの臨床研究から腫瘍内低酸素はがんの悪性形質や患者予後

不良に相関することが報告されている^{13,14}。腫瘍内低酸素環境で安定化、そして活性化した HIF-1 α が、血管新生の亢進や代謝リプログラミング、がん細胞の転移・浸潤能の獲得、腫瘍免疫の抑制的調節、がん幹細胞性の獲得、薬剤耐性の獲得等の悪性腫瘍のホールマークに関わるような下流遺伝子群の発現を亢進させることが要因と考えられている¹⁵⁻¹⁷。

加えて近年では、酸素依存的な古典的 HIF-1 α の活性制御機構に加え、多くの因子が HIF-1 活性化因子として働いて腫瘍悪性化に関わることも報告されている。所属研究室で同定された HIF-1 活性化因子を例に挙げると、Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UHL1)は、HIF-1 α と複合体形成すると HIF-1 α を脱ユビキチン化して HIF-1 α を安定化させて、がん細胞の転移・浸潤能を亢進させる機能を有する¹⁸。UHL1 の腫瘍組織における高発現ががん患者の予後不良と正に相関することが明らかとなっている¹⁸。また、Period circadian clock 2 (PER2)は HIF-1 α と複合体形成すると、HIF-1 α のプロモーター領域への結合能を増強させて HIF-1 活性化因子として働く¹⁹。その他にも、同様の作用機序を持つ因子や HIF-1 α と物理的に相互作用して HIF-1 α 結合プロモーター領域のヒストンメチル化修飾²⁰、HIF-1 α と RNA polymerase II 複合体の RNA ポリメラーゼ伸長反応を増強させる^{21,22} HIF-1 活性化因子がこれまでに多く報告されている (Fig 1.2B)。

このように、HIF-1 α について、酸素要求性の古典的 HIF-1 α の抑制的制御機構を代表にその制御機構が解明されているが、腫瘍内低酸素における HIF-1 α の役割や非古典的 HIF-1 α 制御機構は未だ研究段階で解明されていない点も多い。さらに HIF-1 α を標的としたがん治療²³も未だ開発段階であり、腫瘍内低酸素を介した腫瘍悪性化の理解や治療開発に向けて更なる HIF-1 α 研究が求められている。

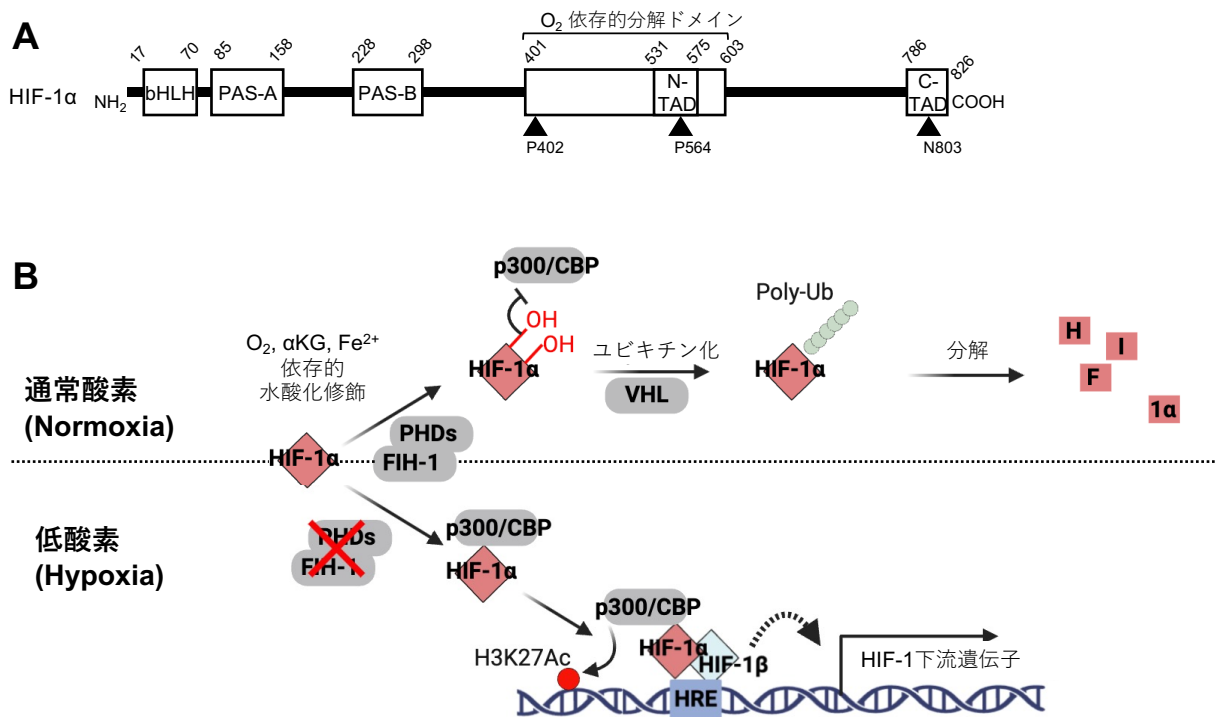


Fig 1.1. HIF-1α 古典的制御機構

A) HIF-1α の基本構造図。B) 通常酸素下および低酸素下における酸素依存的な古典的 HIF-1α 制御機構。通常酸素下での PHDs による HIF-1α 水酸化修飾は HIF-1α タンパク質の分解を促進し、FIH-1 による HIF-1α 水酸化修飾は HIF-1α と転写活性化因子 p300/CBP 間の相互作用を阻害し、HIF-1 活性を低レベルに保つ。低酸素下ではこれらの抑制的調節機構が解除され、HIF-1α は HIF-1β とヘテロ二量体を形成したのちに、低酸素応答領域をプロモーター領域に持つ HIF-1 下流遺伝子群の発現を誘導する。

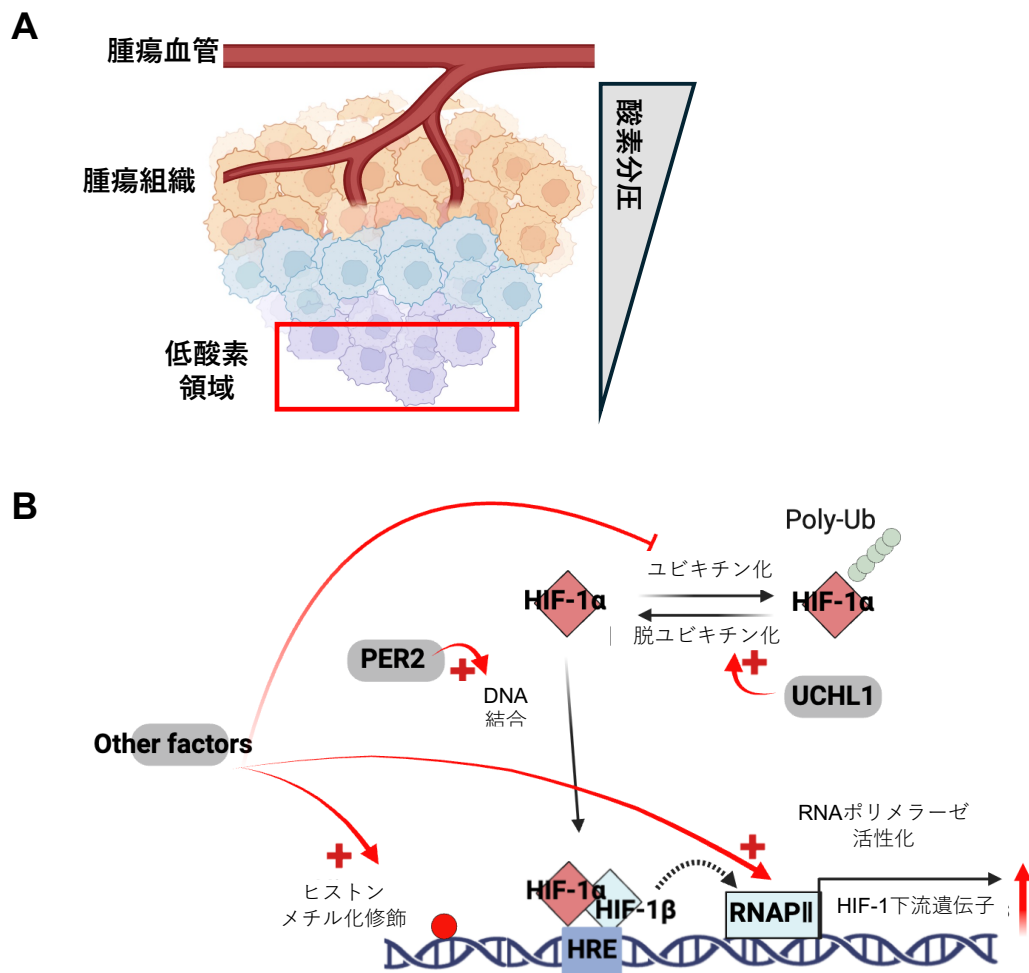


Fig 1.2. 腫瘍内低酸素および HIF-1 α 非古典的制御機構

A) 腫瘍血管から離れた領域に生じる低酸素環境。B) 非古典的 HIF-1 α 制御機構の概念図。HIF-1 α の脱ユビキチン化による HIF-1 α タンパク質安定性亢進や HIF-1 α の DNA 結合能の亢進、低酸素応答領域周辺のヒストン修飾、RNA ポリメラーゼの伸長反応を正に制御する因子が HIF-1 活性化因子として働くことが報告されている。

1-2. DNA 損傷応答の生物学

DNA 損傷応答 (DNA damage response: DDR)とは、活性酸素や複製エラーなどの内因性ストレス、放射線や紫外線・化学物質などの外因性のストレスによって細胞のゲノム DNA が損傷を受けた際に、ゲノム恒常性を維持するための応答である。DNA 損傷の検知から細胞周期の停止、損傷修復などが DDR に含まれる。DNA の二本鎖切断や一本鎖切断、紫外線により生じるピリミジン二量体等の核酸付加体などに代表されるそれぞれの DNA 損傷に応じて様々な因子が損傷の検知や修復反応に寄与する²⁴。

DDR の重要性は、多くのがんにおいて DDR の活性を低下させる DDR 関連遺伝子への変異が観察されることから明らかである²⁵。例えば、相同組み換え修復で働く **Breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1)**や **BRCA2** の機能喪失変異は、乳癌や卵巣癌・前立腺癌・膵臓癌で高頻度に観察され、BRCA1 に変異を有する女性の 72%が 80 歳までに乳癌を発症すると報告されている²⁶。さらに、ミスマッチ修復で働く **MutL homolog 1 (MLH1)**・**MutS homolog 2 (MSH2)**・**MSH6** の機能喪失変異や同遺伝子プロモーター領域の高メチル化は、主に大腸癌患者で観察され、リンチ症候群として認識されている²⁵。このように、DDR によるゲノム恒常性の維持は生体恒常性維持に重要であり、DDR 活性の低下は、ゲノム不安定性としてがんのホールマークの一つとして追加された²⁷。そして、これまではがん細胞における DDR 活性の低下は、放射線治療や細胞障害性抗がん剤へのがん細胞の高感受性につながるものと考えられてきたが、近年では、DDR 活性の低下はゲノム不安定性の亢進を伴って、腫瘍組織の細胞集団の不均一性を亢進させて環境への適応能や治療抵抗性の高い細胞を生じさせるために腫瘍悪性化に繋がるとも考えられている²⁷。がんのゲノム不安定性を促進する分子基盤の理解やゲノム不安定性が亢進したがんの克服が求められている。

このような状況下、近年ではゲノム不安定性が亢進したいくつかのがんに対して特定の治療が奏功することが報告されている。例えば、上述した **BRCA** 遺伝子を欠損するがんは、**PARP1** の酵素活性阻害剤に高感受性となり、**PARP** 阻害剤は現在までに乳癌や卵巣癌・前立腺癌・膵臓癌の治療薬として承認されている^{25,28}。**PARP** 阻害下での一本鎖 DNA 切断損傷修復不全が二本鎖 DNA 切断損傷へと発展すると、**BRCA** 欠損細胞は二本鎖切断損傷を修復できないため、**PARP** 阻害剤に高感受性となると報告されている。さらに、ミスマッチ修復不全のがんの場合、免疫チェックポイント阻害剤が劇的に奏功する可能性が見出され、同治療がミスマッチ修復不全をきたす進行性大腸癌に承認されている^{25,29}。ミスマッチ修復不全が引き起こすがん変異の増大に伴ってネオ抗原が増加し、免疫チェックポイント阻害剤下で腫瘍免疫応答が増強することが治療奏功につながっていると考えられている。このように、DDR の理解は、新規がん治療法確立につながっており、さらなる DDR の分子基盤解明が求められている。

さらに、DDR と本研究で扱う低酸素応答の関わりも報告されている。近年の報告では例えば、DDR 関連因子が **HIF-1** 活性化因子として働くことが報告され、DDR 関連因子 **PARP1** や **X-ray**

repair cross complementing 5 (XRCC5) (別名:Ku80)や XRCC6 (別名:Ku70)、Protein kinase, DNA-activated, catalytic subunit (PRKDC) (別名:DNA-PKcs) が注目されている³⁰⁻³³。PARP1 は、一本鎖切断をはじめとする DNA 損傷時に DNA 損傷部位へ集積すると、同様に損傷部位に集積する様々な損傷修復エフェクター因子をポリ ADP リボシル化修飾して損傷修復を促進させる因子である³⁴。この様な DDR における機能に加えて、PARP1 は HIF-1 α と複合体を形成すると HIF-1 α の下流遺伝子プロモーター領域への結合を促進し、HIF-1 活性化因子として特定の遺伝子発現を増強する機能を有することも明らかにされている^{30,31} (Fig 1.3A)。また、XRCC5・XRCC6・PRKDC も、二本鎖 DNA 損傷時に DNA 損傷部位へ集積する因子であり、その機能として DNA 切断損傷末端の保護や切断損傷末端の平滑化を担う Artemisヌクレアーゼの活性化を介して非相同末端結合修復 Non-homologous end joining (NHEJ)を促進することが報告されている³⁵。PARP1と同様に XRCC5・XRCC6・PRKDC の三者の複合体も HIF-1 α と複合体を形成し、その結果として RNA ポリメラーゼの伸長反応を促進させて HIF-1 α の転写活性化能を活性化することが報告されている^{32,33} (Fig 1.3B)。さらにこの様な DDR 関連因子が低酸素応答に及ぼす影響とは逆に、低酸素刺激が DDR 活性に及ぼす影響に関して、低酸素刺激によってゲノム不安定性が誘導され、ゲノム DNA に変異が蓄積する現象が古くから報告されてきた³⁶。その機序として、低酸素下で起こる複製ストレスや再酸素化による活性酸素産生を通じた DNA 損傷ストレスの増加や、相同組み換え修復経路を代表とした DDR 関連因子群の発現低下による DDR 活性の低下が指摘されている³⁷⁻³⁸。しかし、DDR と低酸素応答の関わりは未だ研究段階である。例えば、低酸素下におけるゲノム不安定性亢進に関して、未だその分子機序の全容や、低酸素環境への適応応答を担う HIF-1 がゲノム不安定性亢進へどのように関わるかは未だ完全には明らかではない。

このように、DDR 研究においては DDR に関わる因子群の機能研究から、発がんや腫瘍悪性化への関連性に着目した様々な研究が行われている。そして近年は、DDR 研究を活用したがん治療への応用も進み、さらなる DDR の理解が求められている。

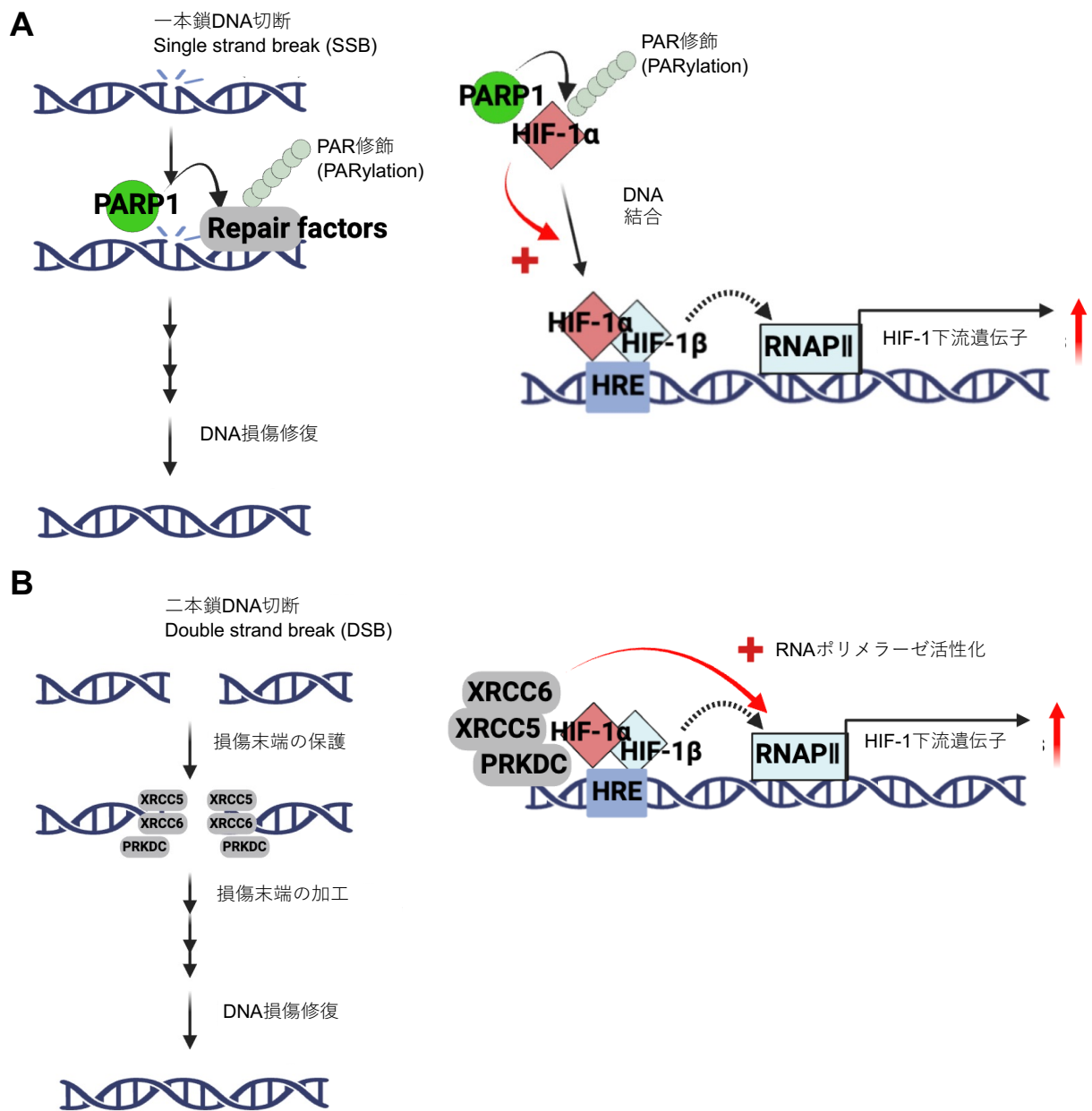


Fig 1.3. DDR と低酸素応答のクロストーク

A) DDR 関連因子 PARP1 は一本鎖 DNA 損傷修復に働くと共に HIF-1 α の転写活性を制御する。B) DDR 関連因子 XRCC5・XRCC6・PRKDC は二本鎖 DNA 損傷修復に働くと共に HIF-1 α の転写活性を制御する。

1-3. Zinc finger and BTB domain-containing protein 2 (ZBTB2)

ZBTB2 は、N 末端側にタンパク質間相互作用を担う BTB/POZ ドメインと C 末端側に 4 つの C2H2 型 Zinc finger (ZF)ドメインを有し、49 の因子から構成される BTB-Zinc finger (BTB-ZF)ファミリーに属するタンパク質である (Fig 1.4A)。一般に BTB-ZF ファミリーは、BTBドメインを介して転写抑制因子や活性化因子と相互作用し、転写を調節する働きを有する⁴¹。ZBTB2 は、これまでに p53 経路の抑制的調節⁴²に加え、DNA 非メチル化領域やクロマチンリモデリング因子・ヒストンシヤペロン因子との結合能を以て多能性幹細胞の分化に関わる⁴³⁻⁴⁵ことが報告されていた。さらに、ZBTB2 は HIV-1 ウィルス複製を抑制的に制御すると共に、HIV-1 ウィルスの Vpr によって DDR 関連キナーゼ ATR が活性化すると ZBTB2 局在が核から細胞質へ変化することが報告されている⁴⁶。このように、ZBTB2 が持つ転写制御での役割や、幹細胞分化での役割、DDR との関わりがこれまでに示されていた。

この現状のなか、所属研究室では上述した非古典的 HIF-1 制御機構解明研究の中で ZBTB2 を HIF-1 活性化因子として同定した。具体的には、HIF-1 の制御下に薬剤耐性遺伝子 (Blasticidin resistant gene)を発現するスクリーニング系を樹立し、通常酸素環境下で抑制制御を受ける HIF-1 が、cDNA ライブラリの導入によって HIF-1 活性化因子が発現したときに初めて活性化して、細胞が薬剤耐性となって生存するようなスクリーニング系を用いて ZBTB2 を見出した。当研究室に所属した子安氏と Chow 氏が行った *in vitro*、*in vivo* 解析及びヒト腫瘍組織を用いた臨床研究によって以下のことが明らかになっている^{47,48}。

これまでに明らかになっている知見

- ZBTB2 は HIF-1 α の転写活性化能を活性化する⁴⁷ (Fig 1.4B)。
- ZBTB2 による HIF-1 活性化はがん抑制遺伝子 p53 により抑制制御を受ける⁴⁷。
- ZBTB2 は *in vitro* 低酸素環境下での細胞増殖や、*in vivo* マウスモデルにおけるの腫瘍増殖および腫瘍転移を促進する⁴⁷ (Fig 1.4B)。
- 患者腫瘍組織における ZBTB2 高発現は患者の生命予後不良に相関する⁴⁷。
- ZBTB2 は N 末端 (特に 8 位-11 位、51 位-54 位の疎水性残基)を介してホモ二量体を形成し、8 位から 11 位の疎水性残基をアラニンへ置換した変異型 ZBTB2 (4A)はホモ二量体形成能を持たない⁴⁷ (Fig 1.4A,B)。
- ホモ二量体を形成しない ZBTB2 は HIF-1 転写活性化能および *in vivo* マウスモデルにおける腫瘍増殖促進能を持たない⁴⁷ (Fig 1.4C)。
- ZBTB2 の N 末端ポリペプチド (1 位 ~ 113 位)発現プラスミドを一過性に導入することで、当該ポリペプチドをデコイとして、ZBTB2 ホモ二量体形成を抑制し HIF-1 活性化を抑制できる⁴⁷ (Fig 1.4C)。
- ZBTB2 は HIF-1 を活性化すると、特定のサブセットの HIF-1 下流遺伝子群の発現を誘導する⁴⁸ (Fig 1.4B)。

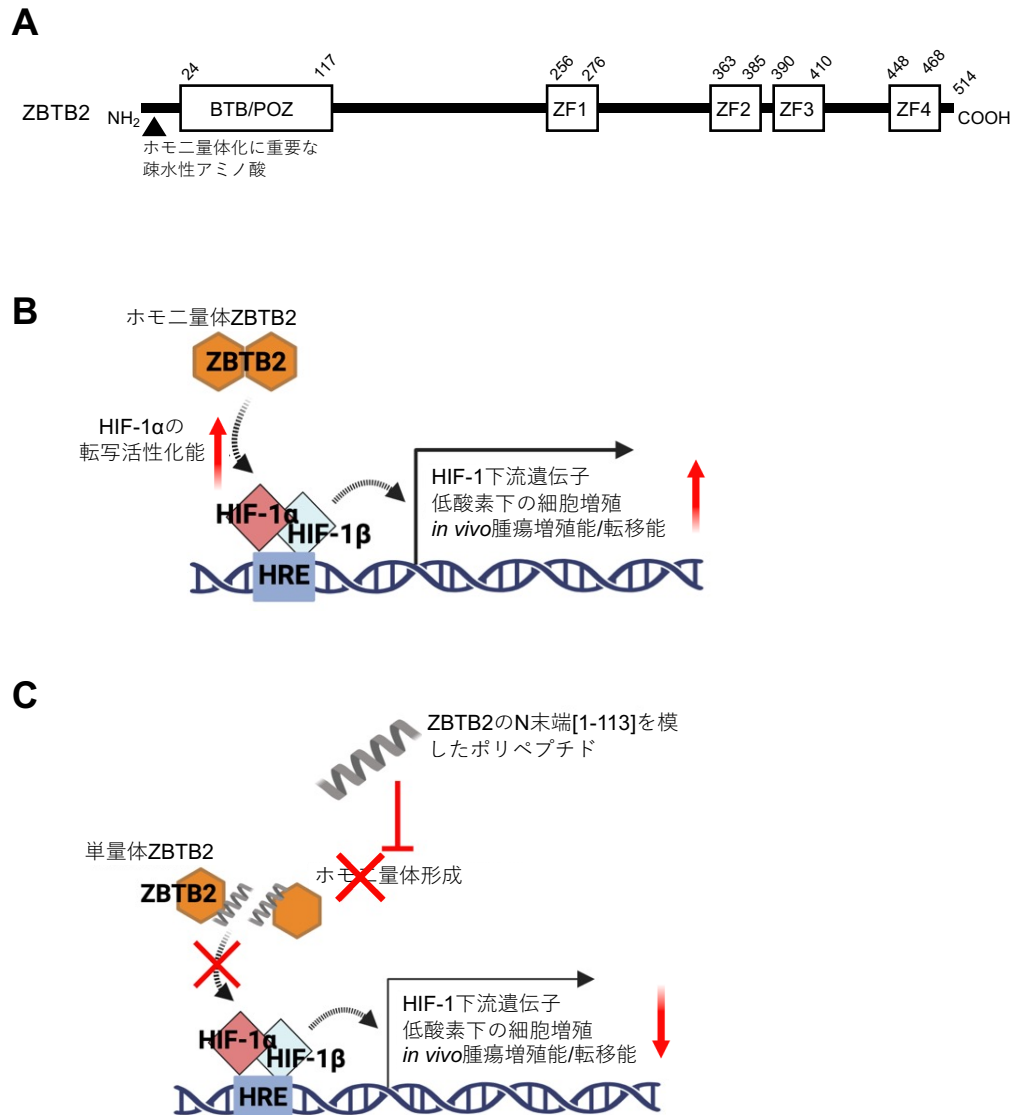


Fig 1.4. ZBTB2 は HIF-1 活性化因子として働く

A) ZBTB2 の基本構造図。B) ZBTB2 はホモ二量体を形成して HIF-1α の転写活性化能を増強し、特定のサブセットの HIF-1 下流遺伝子発現や低酸素環境下での細胞増殖、*in vivo* マウスモデルでの腫瘍増殖能や転移能を亢進させる。C) ZBTB2 の N 末端 [1 aa ~ 113 aa] を模したポリペプチドは、ZBTB2 のホモ二量体形成を阻害して HIF-1 活性化以降の経路を阻害する。

1-4. 本研究の目的と要約

上述の通り、これまでの研究によって ZBTB2 が HIF-1 を活性化して腫瘍の悪性進展を促進することが明らかとなっていたが、ZBTB2 による HIF-1 活性化を制御する機構や、低酸素環境下において ZBTB2 による HIF-1 活性化がどのような役割を果たして腫瘍の悪性進展を促進しているかは完全には明らかでない。そこで、本研究では改めて ZBTB2 の相互作用タンパク質の探索を行い、これを足がかりに上述の課題の解決を試みた。

第三章に、ZBTB2 による HIF-1 活性化機構と同機構を抑制的に制御する因子に関して、私が本研究で新たに発見した知見を示す。この章では、初めに共免疫沈降実験と質量分析 (LC-MS/MS) を組み合わせて ZBTB2 と HIF-1 活性化能を持つ PARP1 の複合体形成を見出し、ZBTB2 が PARP1 と協調して HIF-1 を活性化することを見出した。次に、共免疫沈降実験と質量分析 (LC-MS/MS) を組み合わせた解析から得た ZBTB2 が PARP1・Ku70・Ku80 と複合体を形成するという結果や、N 末端に相同性を有する BTB-ZF ファミリーの因子が ZBTB2 とヘテロ二量体を形成して ZBTB2 ホモ二量体形成を抑制する阻害因子となりうるという着想から、ZBTB2 と機能的・構造的に類似する因子を ZBTB2 阻害因子の候補として網羅的に探索した。その結果、ZBTB7A を同定し、ZBTB7A が ZBTB2 とヘテロ二量体を形成して ZBTB2 ホモ二量体形成を阻害し、ZBTB2 による HIF-1 活性化を抑制的に制御することを見出した。さらに、低酸素環境下での細胞増殖定量実験と TCGA データベースを用いたがん患者の予後解析によってがん抑制的に ZBTB7A が寄与することまでを示した。この様に、ZBTB2 による HIF-1 活性化機構と同機構を抑制する制御因子を同定した。

第四章からは、PARP1 が古典的には DNA 損傷時に DDR で働くことを踏まえて行った検討から見出した、ZBTB2 による HIF-1 活性化が DDR 活性の抑制を通じて低酸素環境下で果たす役割に関して、私が本研究で新たに発見した知見を示す。この章では初めに、低酸素下で ZBTB2 が PARP1 を HIF-1 活性化へ動員すると PARP1 の DDR における活性が変化するのではないか、そしてこれが ZBTB2 の役割なのではないかと考えて本仮説を検証した。PARP1 の DDR における活性評価実験を行い、その結果、ZBTB2 が PARP1 を HIF-1 活性化へ動員すると PARP1 の DDR における活性が減弱することを見出した。さらに、DNA 損傷後の HIF-1 活性を HIF-1 レポーターを用いて検証した結果から、DNA 損傷後に PARP1 が DDR で機能すると ZBTB2 による HIF-1 の活性化が減弱することを見出した。以上の結果から、PARP1 は HIF-1 活性化と DDR の双方に寄与するが、どちらかの応答に参加するときにはもう一方の応答への寄与が低下するモデルを見出した。そして最後に、DDR 活性の低下が引き起こすゲノム不安定性を検証した。TCGA 解析を用いて、腫瘍組織で蓄積した変異量を定量し、ZBTB2 が引き起こす PARP1 の DDR における活性低下と腫瘍のゲノム不安定性亢進の関連を見出した。ZBTB2 による HIF-1 活性化が低酸素環境下でゲノム不安定性を亢進させる役割を果たすことを見出した。

第II章

材料と方法

2-1. プラスミド

2-1-1. 当研究室子安氏より譲渡を受けた ZBTB2 発現プラスミドリスト

本論文では子安氏が構築した以下の ZBTB2 野生型・変異型発現プラスミドを使用した。本プラスミドにより期待される効果については、実験結果の項で後述する。

リスト:pEF6B_ZBTB2 (stop)・pEF6B_ZBTB2-myc-6His・pEF6B_ZBTB2 (4A)-myc-6His・
pEF6B_ZBTB2 [1-113]-myc-6His, pEF6B_ZBTB2 [118-514]-myc-6His・
pcDNA4B_LgBit・pcDNA4B_SmBit・pcDNA4B_ZBTB2-LgBit・pcDNA4B_ZBTB2-SmBit

2-1-2. HIF-1 α の転写活性化能の評価へ用いたプラスミドリストと実験原理

リスト:pG5E1bluc・pcDNA6B_Gal4DBD-HIF1 α TAD (P564A)・pTK-Rluc

原理:HIF-1 α の活性評価には上記のプラスミドを用いて、HIF-1 α の転写活性化能の測定を目的とした HIF-1 α TAD ルシフェラーゼアッセイを行なった。本実験では 5 つの連続した Gal4 結合領域 upstream activation sequence (UAS)を E1b プロモーター及び luc2 構造遺伝子の上流に含む pG5E1bluc プラスミドと、HIF-1 α の Trans-activation domain (TAD) (531 aa ~ 826 aa)と Gal4 DNA binding domain (DBD)の融合タンパク質を発現する pcDNA6B_Gal4DBD-HIF-1 α TAD (P564A)プラスミドを細胞に導入する。Gal4 の DNA 結合領域を介して HIF-1 α TAD 融合タンパク質が pG5E1bluc プラスミド上へ結合すると、HIF-1 α の転写活性化能依存的に E1b プロモーターが駆動する luc2 構造遺伝子の転写が活性化され、以て HIF-1 α の転写活性化能の測定を可能にしている。また本実験では、HIF-1 α TAD 融合タンパク質中に存在する PHD1-3 から水酸化を受けるプロリン残基をアラニンに置換しており、酸素依存的 HIF-1 α 分解機構からの影響を排除した上での HIF-1 α 転写活性化能の測定を可能にしている⁴⁹。アッセイの原理について以下の Fig 2.1 に示す。

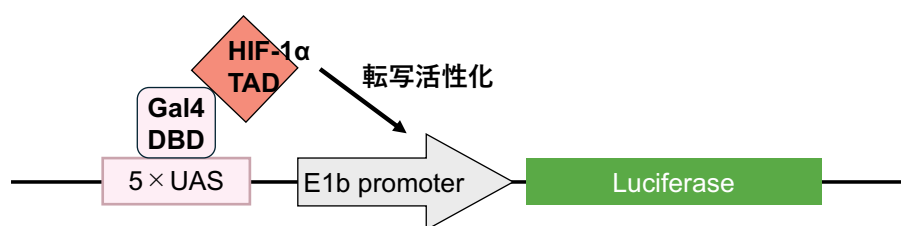


Fig 2.1. HIF-1 α TAD ルシフェラーゼアッセイの基本原理

2-1-3. STC1 プロモーターの活性評価に際して構築したプラスミド

STC1 プロモーター活性の評価実験実施に際しては、pGL4.23 [luc2 minP] vector (Promega, Cat#E841A)をバックボーンとして用いて、独自のレポータープラスミドを構築した。HCT116 p53^{-/-}細胞から MagExtractorTM-Genome- (TOYOBO, Cat#NPK-101)を用いて抽出した gDNA から以下 Table 2.1 の 1・2 のプライマーを用いて STC1 プロモーター領域を PCR 増幅し、制限酵素 SacI 及び BglIIを用いてプロモーター領域 (+ 560 ~ + 1645)を切り出し (転写開始点を+ 1 とする)、同制限酵素で処理した空プラスミドベクターへ挿入した (Fig 2.2)。当該プロモーター領域内の低酸素

応答領域 Hypoxia responsible element (HRE)へ変異導入する際は、以下 Table 2.1 の 3・4 のプライマーを用いて site-directed mutagenesis 法で変異導入 (HRE:ACGT→AAAA)を行なった。

Table 2.1. プラスミド構築に用いたプライマー配列

名称	配列(5'-3')
STC1_+543_fwd	AATAGCCTTAGGCAGTGGAGC
STC1_+1698_rev	AGACTGGAAGAAAACCGCAA
HRE_del_fwd	GATTGCCTGAAATCTGGCAAAAACCTC
HRE_del_rev	CTCCCCCTCCAAGAGGGTTTTTGCCAGA

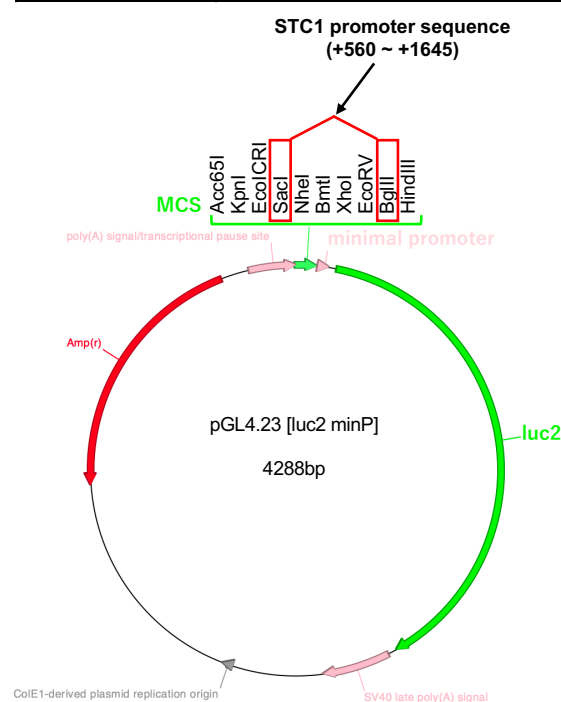


Fig 2.2. pGL4.23 [luc2 minP]空ベクターへの STC1 プロモーター配列の挿入図
構築したプラスミド

pGL4.23_STC1promoter-luc・pGL4.23_STC1promoter (HREmut)-luc

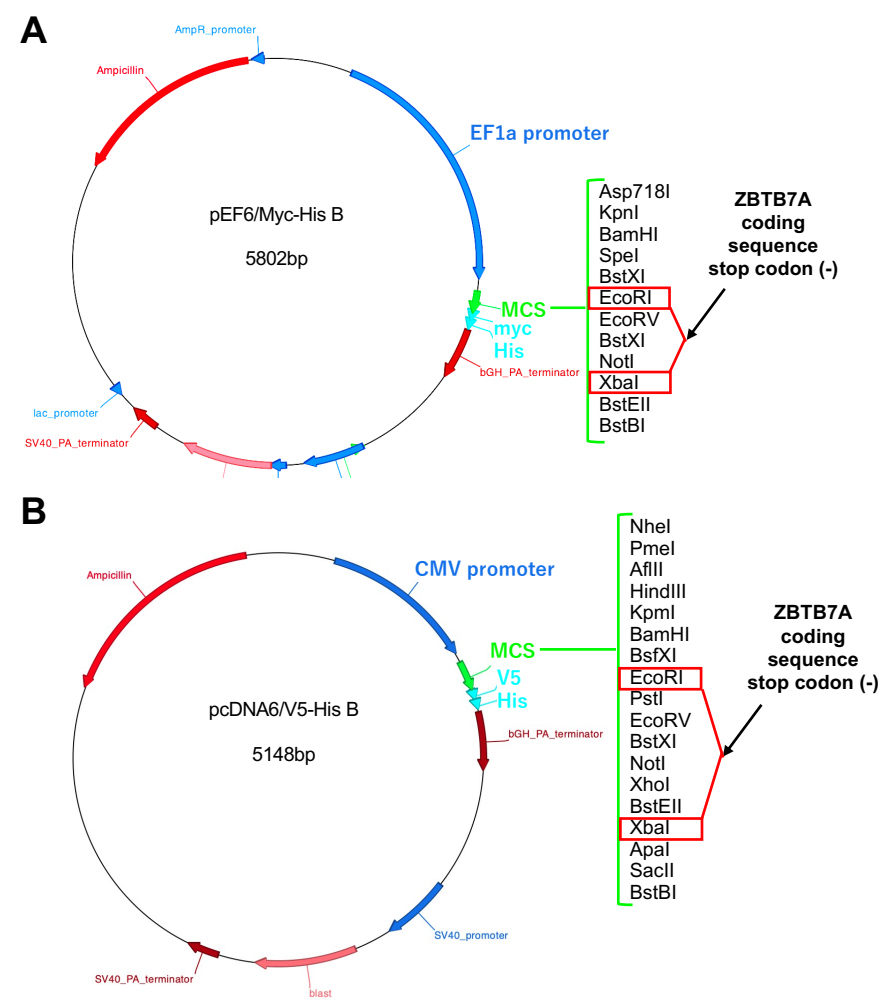
2-1-4. 本論文で新たに構築したタンパク質発現プラスミド

本論文で新たに CMV プロモーターもしくは EF-1 α プロモーターの下流で ZBTB7A、PARP1 (野生型および以下に示す変異体)、および DDB2 を発現する発現プラスミドを構築した。バックボーンに、pcDNA6/V5-His B (Thermo Fisher)または pEF6/myc-His B (Thermo Fisher)を用いた。構築に際しては、まず HCT116 p53^{-/-}細胞から抽出した total RNA を元に Takara RNA LA PCR Kit (AMV) Ver1.1 (Takara, Cat#RR012A)を用いて cDNA への逆転写反応を行なった。次に同 cDNA を用いて以下 Table 2.2 に示すプライマーを用いて、各遺伝子 CDS の 5'側にコザック配列を付与

すると共に CDS を増幅した。最後に、プライマー名に記載の制限酵素で PCR 産物を処理し、同制限酵素で処理した空プラスミドベクターへの挿入を行なった。なお、ZBTB7A 発現プラスミドについては、ZBTB7A の CDS 中の終止コドンを除き、それぞれのプラスミドで C 末端に V5-His タグもしくは myc-His タグを付加させた融合タンパク質として構築した。さらに、PARP1 および DDB2 発現プラスミドについては、N 末端に 3×FLAG タグ (DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK)を直接付加させた融合タンパク質として pcDNA6/V5-His B プラスミドに構築した (Fig 2.3)。

Table 2.2. プラスミド構築に用いたプライマー配列

名称	配列(5'-3')
ZBTB7A_fwd_EcoRI	TATGAATTCGCCACCATGGCCGGCGGCGTGGACGG
ZBTB7A_rev_XbaI	TATTCTAGACTGGCGAGTCCGGCTGTGAAGTTACC
PARP1_fwd_NheI	TATGCTAGCGGGAGGATGGCGGAGTCTTCGGATAA
PARP1_rev_XhoI	TATCTCGAGTTACCACAGGGAGGTCTTAAA
DDB2_fwd_BamHI	TATGGATCCGACGCGATGGCTCCCAAGAAA
DDB2_rev_XhoI	TATCTCGAGCGCTTCCGTGCTCTGGCTTCC



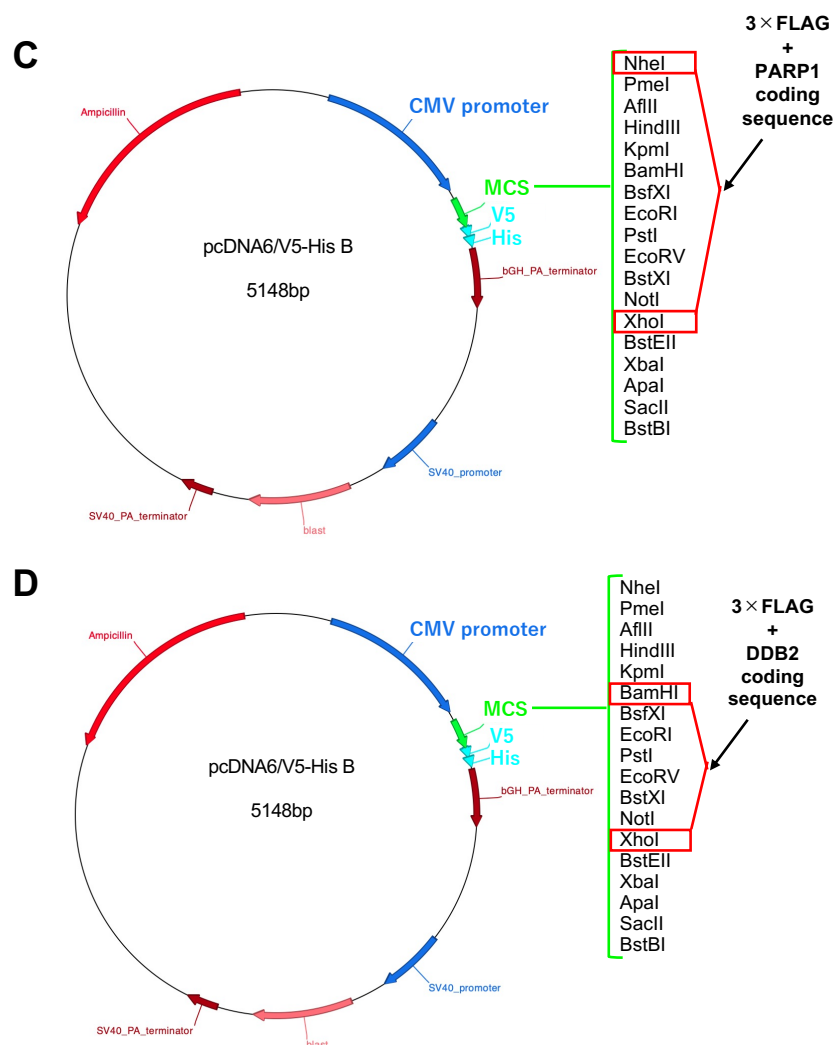


Fig 2.3. pEF6/Myc-His B および pcDNA6/V5-His B 空ベクターへの各遺伝子 CDS の挿入図

また、構築した PARP1 発現プラスミドについて、PARP1 変異体の構築に際しては、以下 Table 2.3 のプライマーを用いて site-directed mutagenesis 法で変異導入した。酵素活性中心の 988 位のグルタミン酸残基⁵⁰ (コドン:GAG)をリジン残基 (コドン:AAG)へ置換した。

Table 2.3. プラスミド構築に用いたプライマー配列

名称	配列(5'-3')
PARP1_E988K_fwd	CTACTATATAACAAGTACATTGTCTATGAT
PARP1_E988K_rev	ATAGACAATGTACTTGTATATAGTAGAGA

さらに、PARP1 の部分欠損体発現プラスミドの構築に際しては、それぞれ以下 Fig 2.4 に示す通り NTD (1-213)・p89 (214-1014)・ΔNTD/Catalytic (214-660)・Catalytic (661-1014)・ΔZF1-3 (366-1014) の 5 種の欠損体に相当する CDS 領域を PCR で増幅した後に、N 末端に FLAG タグを融合して、

pcDNA6/V5-His B プラスミドに構築した。

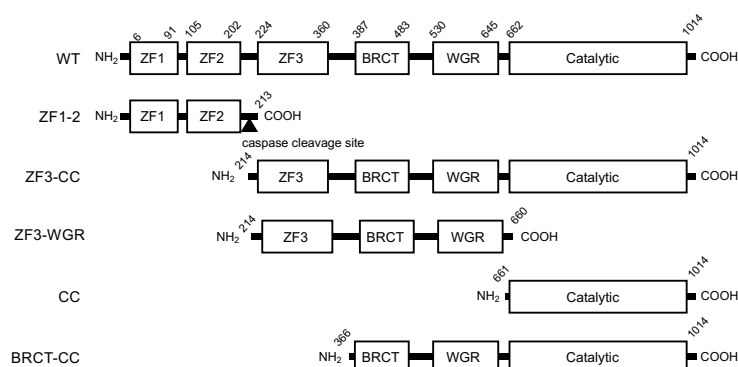


Fig 2.4. 本論文で新たに構築した PARP1 部分欠損体発現プラスミド

構築したプラスミド

pcDNA6B_ZBTB7A-V5・pEF6B_ZBTB7A-myc・pcDNA6B_3×FLAG-PARP1・pcDNA6B_3×FLAG-PARP1 (E988K)・pcDNA6B_3×FLAG-PARP1 (ZF1-2)・pcDNA6B_3×FLAG-PARP1 (ZF3-CC)・pcDNA6B_3×FLAG-PARP1(ZF3-WGR)・pcDNA6B_3×FLAG-PARP1 (CC)・pcDNA6B_3×FLAG-PARP1 (BRCT-CC)・pcDNA6B_3×FLAG-DDB2

2-2. 細胞培養・トランスフェクション・薬剤

本論文では HCT116 p53 (-/-)・293TN・HeLa・HeLa HIF-1 β (-/-)・U2OS の培養細胞を用いた。HCT116 細胞は Bert Vogelstein 教授 (Johns Hopkins 大学)からの譲渡、293TN・HeLa・U2OS 細胞は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)からの購入、HeLa HIF-1 β (-/-)細胞は当研究室・城地氏により樹立されたものである⁴⁸。培養に際しては DMEM high glucose (ナカライテスク, Cat#08458-16)に補体不活性化した FBS (EQUITECH-BIO, Cat#268-1)を 10%、penicillin-streptomycin (ナカライテスク, Cat#26253-84)を 1%添加して使用した。通常酸素培養は 37 °C、5%CO₂、95%Air の CO₂ インキュベーターを、低酸素培養 (<0.1% O₂)は 37 °C、5%CO₂、<0.1%O₂、4%H₂、91%N₂の低酸素チャンバー (RUSKINN INVIVO2 500)を、低酸素培養 (1% O₂)は 37 °C、5%CO₂、1%O₂、94%N₂の低酸素チャンバー (RUSKINN INVIVO2 400)を使用した。

培養細胞へのプラスミド導入に際しては、FBS 及び抗生物質不含の DMEM に DNA 溶液を加え、DNA1 μ g に対し 3 μ l の PEI-MAX 溶液 (Polysciences, Cat#24765-100) (1 mg/ml)を加えて激しく攪拌後 15 分間室温で静置したものを細胞に加えることで行なった。

培養細胞への siRNA 導入に際しては、FBS 及び抗生物質不含の DMEM に siRNA (20 μ M)を混合したものと、FBS 及び抗生物質不含の DMEM に Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo, Cat#13778-030)を混合したものを用意した。siRNA (20 μ M)2 μ L に対し 2 μ l の RNAiMAX 溶液の比となるように DMEM 溶液を穏やかに混合した。混合後、10 分間室温で静置した溶液を細胞へトランスフェクトした。以下の siRNA を用いた。HIF-1 α (HSS104775, HSS179231

(前者を#1、後者を#2 として使用)), PARP1 (HSS100245, HSS100244 (前者を#1、後者を#2 として使用)), Stealth™ RNAi Negative Control Medium GC Duplexes (Invitrogen, Cat#452001)

本論文では以下の、Nutlin-3a (Sigma, Cat#SML0580-5MG)、PARG inhibitor PDD00017273 (Selleck, Cat#S8862)、PARP inhibitor Olaparib (AZD2281) (Selleck, Cat#S1060)をそれぞれ DMSO に融解させて、各実験結果に記載の濃度で用いた。

2-3. ルシフェラーゼアッセイ

一過性過剰発現のみを行う場合は、24-well 細胞培養ディッシュに 1 well あたり 2.0×10^4 個の細胞を播種し、終夜培養後にプラスミドトランスフェクションを行った。siRNA と一過性過剰発現を併用する場合は、10 cm 細胞培養ディッシュに 1 well あたり 1.0×10^6 個の細胞を 8 μ L の siRNA (20 μ M)を用いた siRNA トランスフェクション溶液と共に播種し、終夜培養後に 24-well 細胞培養ディッシュに 1 well あたり 2.0×10^4 個の細胞を再播種した後、さらに終夜培養してプラスミドトランスフェクションを行った。HIF-1 α TAD ルシフェラーゼアッセイにおいては、1 well あたり pG5E1bluc 150 ng・pcDNA6B_Gal4DBD-HIF-1 α TAD (P564A) 150 ng・pTK-Rluc 20 ng および一過性過剰発現プラスミドまたはそのコントロールを各 150 ng を用いた。STC1 プロモータールシフェラーゼアッセイにおいては、1 well あたり pGL4.23_STC1promoter-luc 200 ng・pTK-Rluc 20 ng・および一過性過剰発現プラスミドまたはそのコントロールを各 150 ng 用いた。その後 24 時間後に低酸素処理を行う場合は低酸素培養を開始し、さらに 24 時間培養した。細胞はまず PBS (-)で 1 回洗浄後、Passive Lysis buffer 100 μ L を以て溶出させた。その後凍結融解を経て、Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega, Cat#E1980)を用いて、ルシフェラーゼ発光測定を行った。具体的には、10 μ L 細胞抽出液と 20 μ L の Luciferase Assay Buffer II を混合しホタルルシフェラーゼからの化学発光を測定、続いて Stop & Glo® Reagent を 20 μ L 加えホタルルシフェラーゼからの発光を消光させ、内部標準であるウミシイタケルシフェラーゼからの化学発光を測定した。

2-4. 共免疫沈降実験

6 cm 細胞培養ディッシュに 1 well あたり 7.0×10^5 個 (HCT116 p53^{-/-}細胞)、 4.0×10^5 個 (U2OS 細胞)の細胞を播種し、終夜培養後にプラスミドトランスフェクションした。1 well あたり一過性過剰発現プラスミドまたはそのコントロールを全量 3 μ g、実験に資するプラスミド数に応じて均等分配して加えた。その後 24 時間後に低酸素処理を行う場合は低酸素培養を開始し、さらに 24 時間培養した。細胞を PBS (-)で 2 回洗浄し、1 $\times$ ProteoGuard™ EDTA-Free Protease Inhibitor cocktail (Takara, Cat#635673)及び MG132 50 μ M (Merck, Cat#474791-1MG)を加えた 500 μ L の Cell lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH = 7.5, 250 mM NaCl, 0.5% NP-40)で細胞を溶解させた。PAR 修飾量の定量実験においては、Cell lysis buffer にさらに PARG 阻害剤を 10 μ M 加えた。その後 Bioruptor UCW-310 で出力 5、15 サイクル (1 サイクルは 30 秒 on→30 秒 off)で超音波破碎処理し、16,000 g で 5 分間遠心分離して不溶性画分を除いた上清をタンパク質サンプルとした。この段階で、サンプルの 10%を全細胞溶液 (Whole-cell-lysate (WCL))として SDS sample buffer と混合して回収し

た。免疫沈降は、Dynabeads Immunoprecipitation kit Protein G (Thermo Fisher, Cat#10007D)を用いた。室温で 1 μ g の抗体と 25 μ L のビーズを 1 時間穏やかに攪拌して抗体とビーズの架橋を行った後、タンパク質サンプルを加え 4°C で終夜穏やかに (1 回転あたり 15 s) 攪拌した。攪拌後 Cell lysis buffer 300 μ L を用いて 4 回十分に洗浄した後、SDS sample buffer 45 μ L を加え 95°C で 10 分間加熱してタンパク質を溶出させ、免疫沈降サンプルとした。抗 myc-tag 抗体 (CST, Cat#9B11)、抗 FLAG-M2 抗体 (Sigma, F3165-2MG)を用いた。

共免疫沈降後に質量分析を行う実験においては、10 cm 細胞培養ディッシュに 1 well あたり 2.0×10^6 個の HCT116 p53^{-/-}細胞を播種し、終夜培養後にプラスミドトランスフェクションした。1 well あたり ZBTB2-myc 過剰発現プラスミド 4 μ g と HIF-1 α (3A)過剰発現プラスミド 2 μ g を一過性に導入し、通常酸素下で 48 時間培養した。その後、上述の通りに 1 mL の Cell lysis buffer を用いて細胞溶解処理、超音波破碎処理、および不溶性画分の除去を行った。免疫沈降においては、同様に Dynabeads Immunoprecipitation kit Protein G を用い、室温で 3 μ g の抗 myc-tag 抗体と 50 μ L のビーズを 1 時間穏やかに攪拌して抗体とビーズの架橋を行った後、タンパク質サンプルを加え 4°C で終夜穏やかに (1 回転あたり 15 s) 攪拌した。攪拌後は Cell lysis buffer 500 μ L を用いて 4 回十分に洗浄した後、SDS sample buffer 45 μ L を加え 95°C で 10 分間加熱してタンパク質を溶出させ免疫沈降サンプルとした。質量分析実験は京都大学大学院生命科学研究科生命動態共用研究施設蛋白質解析室へ受託し、質量分析計 Q Exactive Plus (Thermo Fisher)と蛋白質同定ソフト Mascot Server (Matrix Science)を用いたデータベース検索により解析を行った。

2-5. WB(ウェスタンブロッティング)

WB に用いるサンプルは、6-well 細胞培養ディッシュに 1 well あたり 2.0×10^5 個の細胞を播種し、プラスミドトランスフェクション及び低酸素培養を行なった細胞もしくは免疫沈降実験の実験サンプルを用いた。具体的には、細胞を PBS (-)で 1 回洗浄後 SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH = 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-Mercaptoethanol)、若しくは CellyticM(Sigma)で溶出させ、溶出液を超音波破碎処理 Bioruptor UCW-310(Cosmo Bio)で清純化し、16,000 g で 5 分間遠心分離して不溶性画分を除いた。CellyticM 使用時はこの時点で細胞抽出液のタンパク質濃度を測定し、SDS sample buffer と混合して実験群間のタンパク質濃度を均一化させた。最後に、これらの処理を経た溶出液を 95 °C で 10 分間煮沸した。WB 実験実施に際しては、アクリルアミドゲルで電気泳動後、PVDF メンブレン Amersham™ Hybond™ P 0.45 PVDF (Cytiva, Cat#10600029)にセミドライ式トランスファー装置 (BioRad)を用いて転写し、TBST で希釈した 5%スキムミルク (Wako, Cat#190-12865)を用いてブロッキングした。メンブレンはその後適切な位置で切断し、Can Get Signal Solution I (TOYOBO, Cat#NKB-201)で 500 倍希釈した一次抗体液と 4 °C で終夜反応させた。その後メンブレンを TBST で十分に洗浄後、1%スキムミルク液で 5000 倍希釈した二次抗体液と室温で 2-3 時間反応させて二次抗体反応を行なった。最後に、再度メンブレンを TBST で十分に洗浄し、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Cat#RPN2232)を用いて HRP 化学発色させてタンパク質発現定量解析を行なった。現像に際しては Amersham Imager 600

(GE Healthcare)を使用した。WB 解析で用いた抗体を以下の Table 2.4 に示す。

Table 2.4. WB で用いた各抗体の型番及び希釈倍率

抗体	型番	抗体種	由来生物	希釈倍率
抗 β -actin抗体	SantaCruz, sc-69879	Monoclonal	Mouse	1:500
抗p53抗体	SantaCruz, DO-I	Monoclonal	Mouse	1:500
抗myc-tag抗体	CST, 9B11	Monoclonal	Mouse	1:500
抗V5-tag抗体	MBL, M-215	Monoclonal	Mouse	1:500
抗FLAG-M2抗体	Sigma F3165-.2MG	Monoclonal	Mouse	1:500
抗HIF-1 α 抗体	BD, 610595	Monoclonal	Mouse	1:500
抗HIF-1 β 抗体	Novus, NB-100-124	Monoclonal	Mouse	1:500
抗PARP1抗体	CST, 9542S	Polyclonal	Rabbit	1:500
抗PAR抗体	CST, E6F6A	Polyclonal	Rabbit	1:500
抗DDB2抗体	Bio-technique, AF3297	Polyclonal	Goat	1:500
抗Mouse-IgG抗体	Cytiva, NA931	Monoclonal	Sheep	1:5000
抗Rabbit-IgG抗体	Cytiva, NA934	Monoclonal	Donkey	1:5000
抗Goat-IgG抗体	Proteintech, SA00001-4	Polyclonal	Rabbit	1:5000

2-6. マイクロアレイ解析・定量的 real-time PCR

当研究室子安氏から譲渡を受けた、cDNA マイクロアレイ結果(HCT116 p53^{-/-}細胞に EV あるいは ZBTB2 過剰プラスミドをトランスフェクトし、通常酸素下または低酸素下で 24 時間培養したもの)について解析を行った。具体的には、まず低酸素 ZBTB2 過剰発現 / 低酸素 EV の誘導比が 2 倍以上であり、かつ同事象が複数のプローブについて成立している遺伝子を抽出した。次に、通常酸素 ZBTB2 過剰発現 / 通常酸素 EV の誘導比が 2 倍以上の遺伝子を除外した。さらに最後に、低酸素 EV / 通常酸素 EV の誘導比が 0.5 倍以下の遺伝子を除外した。

培養細胞からの RNA 抽出に際しては、Sepasol-RNA I SuperG (ナカライテスク, Cat#09379-84)を用いた。細胞は、6-well 細胞培養ディッシュに 1 well あたり 2.0×10^5 個の細胞を播種し、終夜培養後にプラスミドトランスフェクションした。1 well あたり一過性過剰発現プラスミドまたはそのコントロール全量 1.5 μ g、実験に資するプラスミド数に応じて均等分配して加えた。その後 24 時間後に低酸素処理を行う場合は低酸素培養を開始し、さらに 24 時間培養した。メーカー仕様書に基づき RNA 抽出後、NanoDrop 2000 (Thermo Fisher)で RNA 濃度を定量し、PrimeScript RT Reagent Kit (Takara Bio, Cat#RR037A)で逆転写反応を行なった。逆転写によって得た cDNA からの遺伝子発現の定量解析には TB Green Ex Taq II (Takara Bio, Cat#RR820)を用い、メーカー仕様書に基づき

定量的リアルタイム PCR 解析を行なった。PCR には Thermal Cycler Dice Real Time System Single (Takara Bio, Cat#TP-850)を用いた。リアルタイム PCR 実験で用いた primer 配列を以下の Table 2.5 に示す。

Table 2.5. 定量的 real-time PCR で用いた各プライマー配列

名称	配列(5'-3')
hACTB_rt_fwd	TGGCACCCAGCACAATGAA
hACTB_rt_rev	CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGC
hSTC1_rt_fwd	AAGCCATCACTGAGGTCGTC
hSTC1_rt_rev	CAGGCTTCGGACAAGTCTGT
hPAX8_rt_fwd	CATTTGAGCGGCAGCACTAC
hPAX8_rt_rev	AAGGGTGAGTGAGGATCTGC
hPARP1_rt_fwd	ACCAACTCCTACTACAAGCTGC
hPARP1_rt_rev	TTTGTTGCTACCGATCACCCTA
hZBTB2_rt_fwd	ACCAACTGACATACAGCCCCG
hZBTB2_rt_rev	TGGTCAGGGTGAGAAAAGGC

2-7. スプリットルシフェラーゼを用いたタンパク質間相互作用解析

2-7-1. ZBTB2 ホモ二量体形成解析

ZBTB2 ホモ二量体形成能の解析には、NanoBit® Protein:Protein Interaction System (Promega, Cat#N2014)のシステムを用いた。まず、ZBTB2 の C 末端に LgBit 及び SmBit を付加させた融合タンパク質を発現するプラスミド (pcDNA4B_ZBTB2-LgBit・pcDNA4B_ZBTB2-SmBit)、ネガティブコントロールとして LgBit 及び SmBit のみを発現するプラスミド (pcDNA4B_LgBit・pcDNA4B_SmBit)を用意した。本システムでは LgBit 及び SmBit は単体では会合せず化学発光を呈さないが、LgBit 及び SmBit を付加させた融合タンパク質間で物理的相互作用が形成されると、LgBit と SmBit の会合が誘導されて化学発光を呈する。つまり、ZBTB2-LgBit・ZBTB2-SmBit の融合タンパク質を用いる場合は、二分子の ZBTB2 間の相互作用すなわち二量体形成能の定量を可能にする。Fig 2.5 へ本システムの概要を示す。

6-well 細胞培養ディッシュに 1 well あたり 1.0×10^5 個の細胞を播種し、終夜培養後にプラスミドトランスフェクションした。1 well あたり pcDNA4B_ZBTB2-LgBit 400 ng・pcDNA4B_ZBTB2-SmBit 400 ng および pcDNA6B_ZBTB7A-V5 またはそのコントロールプラスミドを全量 1200 ng 加えた。なお、pcDNA6B_ZBTB7A-V5 またはそのコントロールプラスミドは、それぞれ 3:0・2:1・1:2・0:3 の濃度比で混合することで実験における濃度勾配を用意した。その翌日、96-well 白色細胞培養ディッシュに 1 well あたり 4000 個の細胞を播き直し、さらに 24 時間培養後にルシフェリンルシフェラー

ぜの基質を加え、37℃で 15 分間培養後に、マイクロプレートリーダー(Promega)を用いて化学発光を測定した。

2-7-1. PARP1-HIF-1 α 複合体形成解析

PARP1 と HIF-1 α 間の複合体形成能の解析には、PARP1 の N 末端に LgBit 付加させた融合タンパク質および HIF-1 α の N 末端に SmBit を付加させた融合タンパク質を発現するプラスミド (pcDNA6B_LgBit-PARP1・pcDNA4B_SmBit-HIF-1 α (2A))を用意した。6-well 細胞培養ディッシュに 1 well あたり 1.0×10^5 個の細胞を播種し、終夜培養後にプラスミドトランスフェクションした。1 well あたり pcDNA6B_LgBit-PARP1 500 ng、pcDNA4B_SmBit-HIF-1 α (2A) 500 ng、ZBTB2 または ZBTB7A もしくはその双方の発現プラスミドを 500 ng ずつ加えた。その翌日、96-well 白色細胞培養ディッシュに 1 well あたり 4000 個の細胞を播き直し、さらに 24 時間培養後にルシフェリシフェラーゼの基質を加え、37℃で 15 分間培養後に、マイクロプレートリーダー(Promega)を用いて化学発光を測定した。

NanoBit® Protein:Protein Interaction System

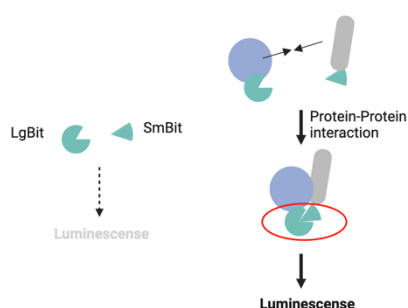


Fig 2.5. NanoBit® system を用いたタンパク質間相互作用の定量

2-8. *in silico* タンパク質相互作用解析

共同研究者の石中央教授 (東京大学大学院工学研究科)より、ZBTB2 および ZBTB7A のアミノ酸配列をもとに AlphaFold3⁵¹ で予想した ZBTB2-ZBTB7A ヘテロ二量体構造の予測解析結果の供与を受けた。生成させた 5 つの候補構造のうち、最上位の構造予測結果について示す。

2-9. 細胞増殖定量実験

プラスミドトランスフェクション後に終夜培養した HeLa 細胞を 96-well 細胞培養ディッシュに 1 well あたり 6.0×10^3 個播種し、さらに終夜培養した。その後まず、低酸素培養前の細胞数を測定するため生細胞測定試薬 SF (ナカライ, Cat#07553-44)を用いて定量を行った。具体的には、測定試薬 10 μ L を細胞培地 (FBS 不含) 10 μ L と混合し、1 well あたり 20 μ L 加えた。その後、90 分間 37 °C で培養し、化学発光の呈色を待った後 450 nm の吸光度について測定した。また、低酸素処理する細胞について低酸素培養を開始し、その 24 時間培養後に上述の通り生細胞測定を行った。測定試薬を加えて測定するまでの呈色反応時間は、各実験間で均一化して行なった。

2-10. TCGA 解析

2-10-1. 患者予後解析

Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>) を経由して GDC Data Portal (<https://portal.gdc.cancer.gov>)より TCGA RNA-seq および患者の生命予後のデータを取得した。その後まず、それぞれの癌種集団中の ZBTB2 および ZBTB7A の腫瘍内発現度の中央値を閾値として、ZBTB2 および ZBTB7A の発現度が高い患者群と低い患者群を判定して分類した。その後、Kaplan-Meier 法に基づき、分類した集団間を Log-rank test を用いて比較した。これを 11 種の癌種 (腎臓癌・悪性黒色腫・肝臓癌・神経膠腫・頭頸部癌・肺癌・膵臓癌・卵巣癌・直腸癌・乳癌・子宮頸癌) の患者集団について実施した。

2-10-2. がん変異量解析

共同研究者の安原崇哲教授 (京都大学大学院生命科学研究科) より、ZBTB2 及び 16 の低酸素誘導性遺伝子 (VEGFA・SLC2A1・P4HA1・ANGTPL4・LDHA・BNIP3・DDIT4・LOX・NDRG1・PGK1・ADM・CA9・MXI1・CORO1C・CCND1・HK2) の腫瘍内発現レベルを定量した RNA-seq と、患者腫瘍検体中の点変異 (SNPs) データを GDC Data Portal (<https://portal.gdc.cancer.gov>) から抽出した TCGA データの供与を受けた。まず、患者集団の中で SNPs が集団中の第三四分位数 (Q3) + 1.5 × 四分位範囲 (IQR) より大きい患者、および 0 を呈している患者を外れ値として除外した。次に、各々の患者腫瘍が低酸素画分の少ない通常酸素型の腫瘍か低酸素画分の多い低酸素型の腫瘍か判定するため、上述した 16 遺伝子のそれぞれについて、各集団で遺伝子発現度が集団の上位 25% か下位 25% か判定した。16 遺伝子のうち 4 遺伝子以上が上位 25% に含まれる患者を低酸素型腫瘍、4 遺伝子以上が下位 25% に含まれる患者を通常酸素型腫瘍と分類した。次に、患者集団中の ZBTB2 発現度の中央値をもとに、ZBTB2 発現が高い患者群と低い患者群を判定して分類した。8 種の癌種 (胃癌・皮膚癌・乳癌・肺癌・直腸癌・頭頸部癌・卵巣癌・子宮癌) の患者集団について実施した。

2-11. レンチウィルスを用いた shRNA の導入

shRNA による Loss of function 実験実施に際しては、まず The DECIPHER Lentiviral shRNA Expression Vector (Cellecta) へ、以下 Table 2.6 に示す ZBTB2 mRNA の特定領域に相補的なオリゴ DNA を挿入したプラスミドを用意した。次に、10 cm 細胞培養ディッシュに 1 well あたり 2.0×10^6 個播種して終夜培養した 293TN 細胞に、当該 DECIPHER shRNA プラスミド 3 μg と pPACKH1 HIV Lentivector Packaging Kit (System Biosciences) のプラスミド 3 種 (pPACKH1-GAG 1 μg ・pPACKH1-REV 1 μg ・pVSV-G 1 μg) を混合してトランスフェクションした。トランスフェクト 6-8 時間後に細胞培養培地を 6 ml の新たな培地と交換し、さらに 2 日間培養した。2 日後、細胞培養上清を 0.45 μm フィルターで濾過し、新たな細胞培地で 2 倍希釈し、さらにポリブレンを終濃度 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で加えた後にウィルス溶液とした。このウィルス溶液を、6-well 細胞培養ディッシュ 1 well あたり 1.0×10^5 個播種して 2 日間培養した U2OS 細胞に、1 well あたり 3.5 mL ずつ加えた。さらに、ウィルス感染効率向上のため、細胞培養ディッシュを 32°C 1200 g で 90 分間遠心した。感染後は翌日に

培地をウイルス不含培地へ交換し、翌々日から 1 週間は、細胞培養液を終濃度 1.0 $\mu\text{g/ml}$ で Puromycin を含む培地へ変更し、感染が成立した細胞を選択した。ZBTB2 mRNA の 3'-UTR 領域を標的にする shRNA を #1、CDS 領域を標的にする shRNA を #2 として使用した。

Table 2.6. shRNA・sgRNA・Genotype 確認に用いた各プライマー配列

名称	配列(5'-3')
shZBTB2UTR_s	ACCGGGCTGGTTTCTTTCTAAGTTGAGTTAATATTCATA GCTCAACTTGGAAAGAAGCCAGCTTTT
shZBTB2UTR_as	CGAAAAAAGCTGGCTTCTTTCCAAGTTGAGCTATGAAT ATTAACCTCAACTTAGAAAGAAACCAGCC
shZBTB2CDS#1_s	ACCGGCCCAGGTGAATTGGATAAATAGTTAATATTCATA GCTATTTGTCCGATTCACCTGGGTTTT
shZBTB2CDS#2_as	CGAAAAAACCCAGGTGAATCGGACAAATAGCTATGAAT ATTAACATTTTATCCAATTCACCTGGGC

2-12. 免疫細胞染色

プラスミドまたは siRNA トランスフェクションして終夜培養した U2OS 細胞、もしくは shRNA を安定的に導入した U2OS 細胞を 6-well 細胞培養ディッシュ内でカバーガラス (マツナミ, Cat#C022221) 上に 1 well あたり 2.0×10^5 個播種し、2 日間培養した。その後、低酸素処理を行う場合は低酸素培養を開始し、さらに培養した。17 時間 30 分後、細胞へ PARG 阻害剤 (10 μM) を処理した。その 30 分後、非照射群・照射群共に細胞培地を PBS 500 μL におだやかに置換し、照射群には UV 照射 (10 J/m^2) を行い、最後に細胞培地を元の培地へおだやかに再置換して更に 1 時間培養した。

免疫染色は以下の手順で実施した。まず細胞を PBS 500 μL でおだやかに洗浄後、0.5% TritonX-100 含有 4% PFA 1 ml を用いて、氷上で 30 分間固定処理した。次に、0.2% TritonX-100 含有 PBS 1 ml を用いて、室温で 5 分間細胞膜透過処理を行い、その後 2% BSA 含有 PBS 200 μL を用いて、室温で 30 分間ブロッキング処理を行った。抗体染色は 2% BSA 含有 PBS 200 μL に 500 倍希釈した抗 PAR 抗体 (CST, Cat#E6F6A) を室温で 1 時間加えた後、2% BSA 含有 PBS 200 μL に 1000 倍希釈した Alexa488 結合抗 Rabbit IgG 抗体 (Thermo Fisher, Cat#A11070) または Alexa594 結合抗 Rabbit IgG 抗体 (Thermo Fisher, Cat#A11012) をさらに室温で 1 時間加えることで行った。最後にカバーガラスは Prolong Glass Antifade Mountant with NucBlue Stain (Thermo Fisher, Cat#P36981) と共にスライドガラス (マツナミ, Cat#SCRE-01) 上へ固定し、蛍光観察へ用いた。撮影した蛍光写真は Image J を用いて 1 細胞ずつ蛍光強度を定量し、解析へ使用した。

2-13. 統計解析

実験結果は、平均値 $\pm$ 標準偏差 (棒・線グラフ結果) または平均値 $\pm$ 標準誤差 (ドットグラフ結果) で示す。条件間の有意差検定は、二群間の比較は Student's t-test、三群以上の比較に際しては Turkey's multiple comparison を行なった。p-value ≤ 0.05 を統計的に有意な差として、図中においては p > 0.05 を ns、p ≤ 0.05 を*、p < 0.01 を**、p < 0.001 を***として示す。

第III章

結果

—ZBTB2-HIF-1 経路の活性制御機構の解明—

3-1. ZBTB2 は HIF-1 活性化因子 PARP1 と複合体を形成する

本論文では、当研究室・子安氏らが見出した HIF-1 活性化因子 ZBTB2 の HIF-1 活性化機構へ迫るため、まず共免疫沈降実験と質量分析 (LC-MS/MS) を組み合わせて ZBTB2 と複合体を形成する因子群の探索を実施した。このアプローチを用いた理由は、子安氏および私が行った実験から ZBTB2 と HIF-1 の間の複合体形成が弱いと示唆されたためである。具体的には、HIF-1 の主要制御サブユニットの双方 (HIF-1 α 及び HIF-1 β) と ZBTB2 の複合体形成を共免疫沈降実験で検証した。ZBTB2 による HIF-1 活性化が観察できる HCT116 p53(-/-) 細胞に myc タグを融合した ZBTB2 と V5 タグを融合した HIF-1 α (3A) 及び HIF-1 β を一過性過剰発現させ、細胞抽出液を抗 myc 抗体を用いて免疫沈降した。ここで、本研究では通常酸素下でも安定的に高活性な HIF-1 α を発現させるため、HIF-1 α が酸素要求性水酸化酵素から水酸化修飾をうけるプロリン残基とアスパラギン残基をアラニンへ置換した恒常活性型 HIF-1 α (3A) を通常酸素下での HIF-1 α 過剰発現へ用いた。その結果、ZBTB2 と HIF-1 α 及び HIF-1 β の共沈は確認できず、ZBTB2 と HIF-1 の複合体形成が少なくとも強固ではないことを確認した (Fig 3.1A)。しかし一般に、これまでに報告されている多くの HIF-1 活性化因子は HIF-1 α と複合体を形成する。そこで私は、これらの結果から ZBTB2 による HIF-1 の活性化には ZBTB2 と複合体を形成する因子が介在因子として機能するのではないかと考えた。共免疫沈降実験と質量分析 (LC-MS/MS) を組み合わせて ZBTB2 と複合体を形成する因子群を探索することとした。

具体的には、HCT116 p53(-/-) 細胞に myc タグを融合した ZBTB2 および HIF-1 α (3A) を一過性過剰発現させ、抗 myc 抗体を用いて免疫沈降したサンプルを LC-MS/MS で質量分析した。HIF-1 α (3A) は、ZBTB2 が HIF-1 活性化因子として機能する条件で ZBTB2 と複合体を形成する因子を探索するために共発現させた。質量分析から同定したタンパク質 (ヒストンを除く) の上位 30 位までの結果を Table 3.1 に示す。上位 30 位までの因子群を用いて Gene ontology (GO) 解析を行った結果 (GOTERM_UP_BIOLOGICAL_PROCESS) を Table 3.2 に示す。Table 3.1 の 6 位および 12 位には、先行研究で ZBTB2 との複合体形成が報告されている ZNF639 と ZBTB25 が確認でき⁴³、本解析が妥当に実施されたことを認めた。

注目すべきは Table 3.1 の 1 位・4 位・5 位には、先行研究から HIF-1 活性化因子として報告されている³⁰⁻³³ XRCC6・XRCC5・PARP1 が確認できたことである。HCT116 p53(-/-) 細胞に myc タグを融合した ZBTB2 および FLAG タグを融合した PARP1 を一過性過剰発現させ、抗 myc 抗体を用いて行った共免疫沈降実験においても、ZBTB2 と PARP1 の複合体形成は確認された (Fig 3.2A)。加えて、ZBTB2 と PARP1 の複合体形成様式を詳細に明らかにするため、それぞれのタンパク質で特定のドメインを欠損した変異体 (Fig 3.2B,D) を用いた共免疫沈降実験も行った。例えば PARP1 については、アポトーシス刺激を受けると Caspase3 から 214 位で切断を受けることを考慮し NTD [1-213] や p89 [214-1014] 等を用いた。一方、ZBTB2 については、一般にタンパク質間相互作用を担うと報告される BTB/POZ ドメインやホモ二量体形成の寄与を検証するため、 Δ BTB [118-514] や ZBTB2 ホモ二量体形成に重要な N 末端の 8 位から 11 位の疎水性残基をアラニンに置換してホモ二量体形成を欠損させた変異体 (4A) を用いた。その結果、PARP1 は ZF1 から

tryptophan-glycine-arginine-rich (WGR)ドメインを用いて ZBTB2 と複合体形成し (Fig 3.2C)、ZBTB2 ホモ二量体形成の有無によらず ZBTB2 は BTB/POZ ドメインを用いて PARP1 と複合体形成する (Fig 3.2E)ことを見出した。以上の結果は、ZBTB2 と PARP1 が両者の BTB/POZ ドメインや ZF1 から WGR ドメインの領域を用いて複合体形成することを示すと共に、これまでの仮説から考えられた ZBTB2 による HIF-1 活性化を介在する介在因子が PARP1 である可能性を示唆する。

Table 3.1. LC-MS/MS 解析による ZBTB2 相互作用タンパク質の解析

Rank	Name	Score
1	XRCC6	1406
2	ZBTB2	1284
3	IMPDH2	1275
4	XRCC5	1032
5	PARP1	553
6	ZNF639	450
7	HSPA1B	310
8	RPA1	307
9	SSBP1	282
10	SAMD1	246
11	IMPDH2	244
12	ZBTB25	220
13	HSPA1L	212
14	IMPDH1	189
15	UBTF	183
16	XRCC6	181
17	RPS11	175
18	S100A9	171
19	ZNF639	114
20	HSPA8	109
21	RPL24	106
22	RPL27	99
23	CBX1	89
24	SERPINB12	87
25	RPL23	86
26	DNAJC9	82
27	RPS27AP5	76
28	RPL37A	73
29	CTSD	72
30	S100A8	71

Table 3.2. LC-MS/MS 解析による ZBTB2 相互作用タンパク質群の Gene-Ontology (GO)解析

Rank	Name	Count
1	Transcription regulation (KW-0805)	8
2	Transcription (KW-0804)	8
3	Innate immunity (KW-0399)	5
4	Immunity (KW-0391)	5
5	DNA repair (KW-0234)	4
6	DNA damage (KW-0227)	4
7	Host-virus interaction (KW-0945)	4
8	DNA recombination (KW-0233)	3
9	Stress response (KW-0346)	3
10	Autophagy (KW-0072)	3
11	GMP biosynthesis (KW-0332)	2
12	Purine biosynthesis (KW-0658)	2

A

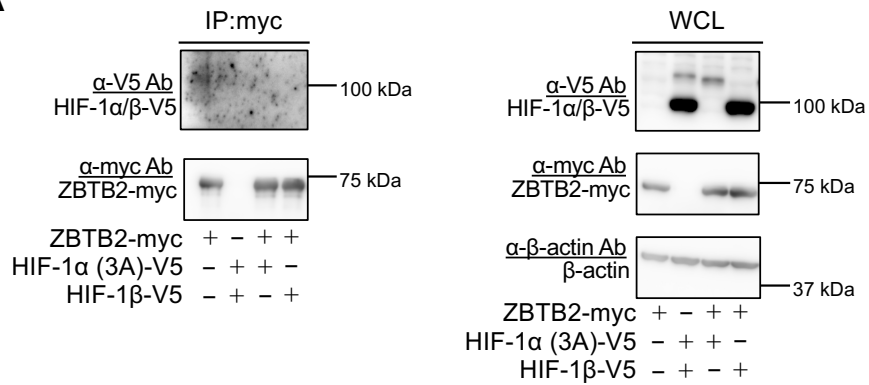
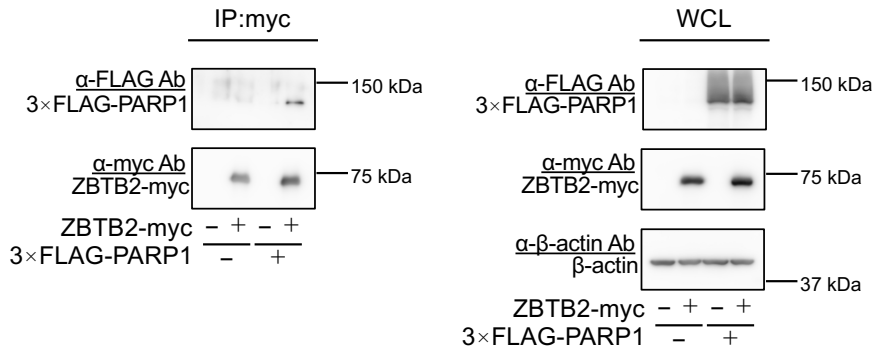
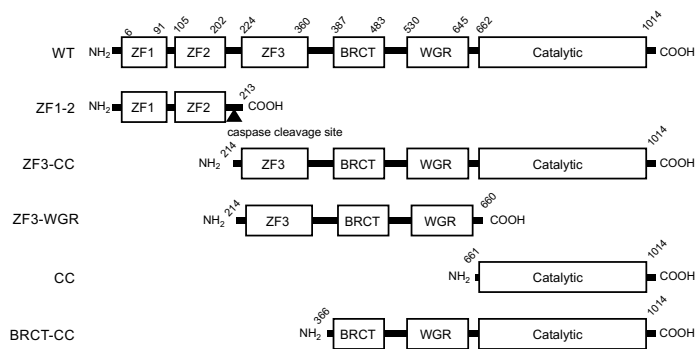
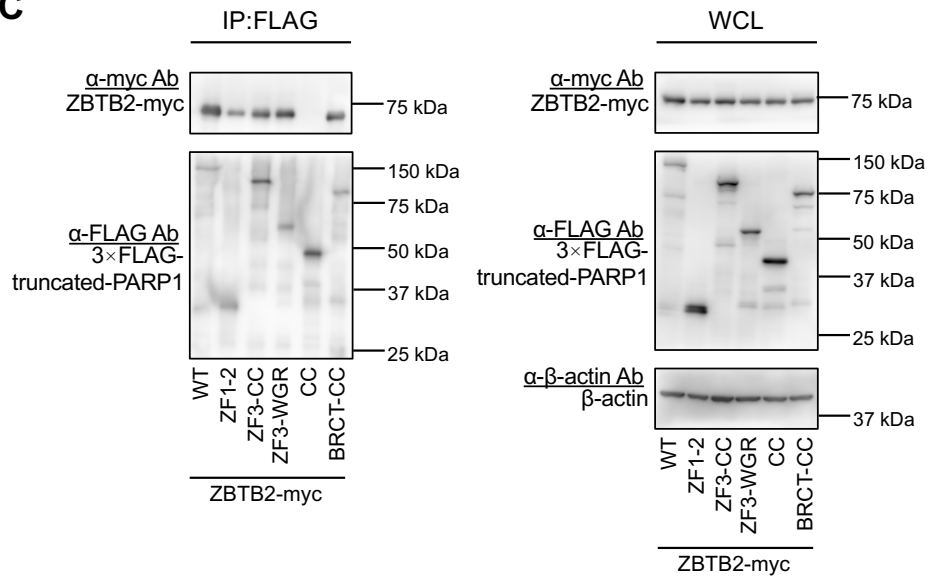
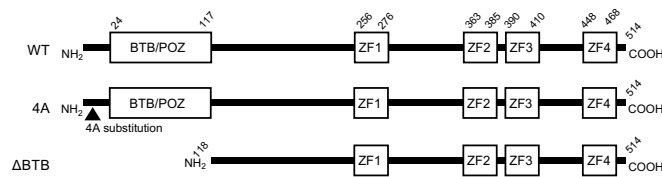


Fig 3.1. ZBTB2 は HIF-1α および HIF-1β とは強固に複合体を形成しない

A) HCT116 p53(-/-)細胞へ図中に示すタンパク質発現ベクターを導入後、共免疫沈降実験で ZBTB2 と HIF-1α および ZBTB2 と HIF-1β 間の複合体形成を検証した Western blotting。抗 myc 抗体による免疫沈降サンプル (左)、全細胞抽出液 (右)を図中に示す各抗体で検出した。

A**B****C****D**

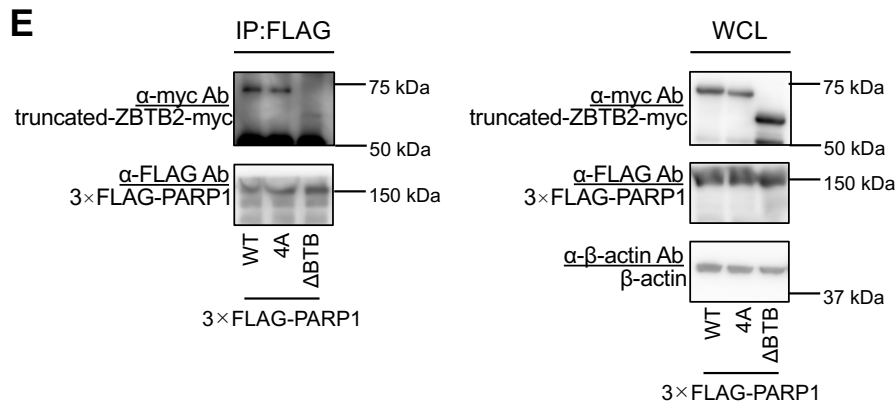


Fig 3.2. ZBTB2 は PARP1 と複合体を形成する

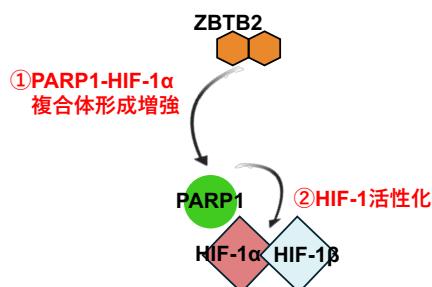
A-E) HCT116 p53(-/-)細胞へ図中に示すタンパク質発現ベクターを導入後、共免疫沈降実験で ZBTB2 と PARP1 間の複合体形成を検証した Western blotting。ZBTB2 と PARP1 (A)、ZBTB2 とドメイン欠損 PARP1 変異体 (C)、PARP1 とドメイン欠損 ZBTB2 変異体 (E)間の複合体形成について、抗 myc 抗体 (A)および抗 FLAG 抗体 (C,E)による免疫沈降サンプル (左)、全細胞抽出液 (右)を図中に示す各抗体で検出し検証した。C で用いたドメイン欠損型 PARP1 変異体の構造を (B)に、E で用いた ZBTB2 変異体の構造を (D)へ示す。

3-2. ZBTB2 は PARP1 と協調して HIF-1 を活性化する

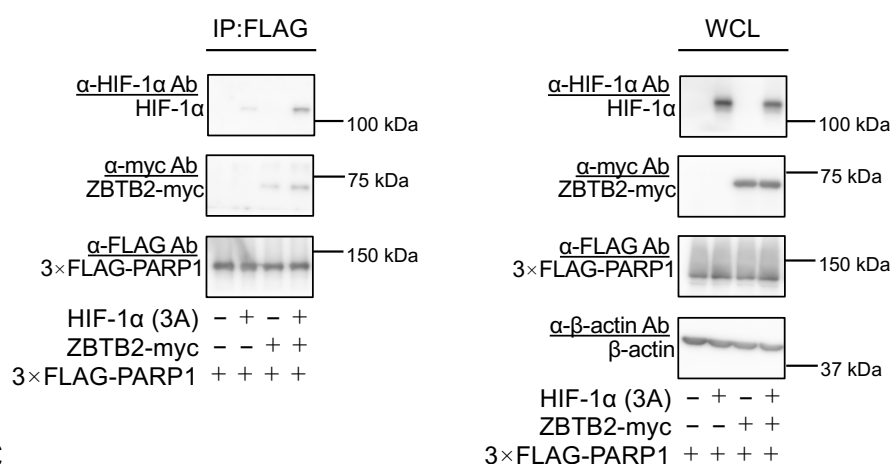
続いて、ZBTB2 が HIF-1 活性化時に PARP1 と協調的に HIF-1 を活性化しているか検証した。ここでまず私は、先行研究で報告されている PARP1 と HIF-1 α の複合体形成^{30,31}に注目し、ZBTB2 が HIF-1 活性化能を持つ PARP1 と HIF-1 α の複合体形成を増強させて PARP1 と協調的に HIF-1 を活性化しているのではないかという作業仮説 (Fig 3.3A)を立て、これを検証した。まず、HCT116 p53(-/-)細胞に FLAG タグを融合した PARP1、HIF-1 α (3A)そして myc タグを融合した ZBTB2 を一過性過剰発現させ、抗 FLAG 抗体を用いて共免疫沈降実験を行った。その結果、PARP1 と共に沈降する HIF-1 α の量(すなわち PARP1-HIF-1 α 複合体)は ZBTB2 の過剰発現により顕著に増加し、ZBTB2 が PARP1-HIF-1 α 間の複合体形成を促進していることを見出した (Fig 3.3B)。さらにここで、PARP1 が行う転写制御についての先行研究の中で、PARP1 の酵素活性依存的な働きと非依存的な働きの双方が示されていることを考慮し^{40,52-55}、PARP1 の酵素活性依存性について検証した。PARP1 の酵素活性部位にあたる 988 位のアスパラギン酸残基⁵⁰をリジン残基に置換して酵素活性を欠損させた変異体 PARP1 (E988K)を用い、同様に PARP1-HIF-1 α 複合体形成を共免疫沈降実験によって評価した。まず WB において、PARP1(E988K)の過剰発現は、野生型 PARP1 で見られる自己ポリ ADP リボシル化修飾に起因するスメア状のバンドシフトを呈さなかったことから、この E988K 変異体が酵素活性を欠損していることを認めた (Fig 3.3C)。その上で、PARP1 の酵素活性によらず PARP1 と ZBTB2、HIF-1 α との間で複合体形成が検出され、さらに ZBTB2 による PARP1-HIF-1 α 複合体の増強も PARP1 酵素活性非依存的であることを見出した (Fig 3.3C)。

次に、PARP1-HIF-1 α 複合体形成の変化が HIF-1 活性へ与える影響を検証するため、HIF-1 活性レポーターである HIF-1 α Trans-activation domain (TAD [531 aa ~ 826 aa])を活用したレポーター (Fig 2.1)と、本研究で新たに構築した STC1 プロモーターを用いたレポーター (Fig S1.2B)の二種を用いたルシフェラーゼアッセイを行った。まず、PARP1 または ZBTB2 もしくはその双方を細胞に一過性過剰発現させた後、細胞を通常酸素および低酸素下で 24 時間培養して、両者が HIF-1 活性に与える影響を検証した。その結果、低酸素下で亢進する HIF-1 α TAD レポーター活性および STC1 レポーター活性に対して、PARP1 単独の過剰発現は有意な効果を与えないが、ZBTB2 存在下で PARP1 を過剰発現した場合にはレポーター活性が有意に増強することを見出した (Fig 3.4B,C)。なおここで、PARP1 の過剰発現は、内在性 HIF-1 α や過剰発現した ZBTB2 の発現量には著明な効果を与えなかった (Fig 3.4A)。次に、siRNA を用いて PARP1 をノックダウンし、さらに ZBTB2 を一過性過剰発現させた後、細胞を通常酸素および低酸素下で 24 時間培養して、両者が HIF-1 活性に与える影響を検証した。その結果、低酸素下 ZBTB2 過剰発現によって亢進するレポーター活性が、PARP1 のノックダウンによって部分的ではあるが顕著に減弱することを見出した (Fig 3.4E)。以上から、ZBTB2 が PARP1 と協調して PARP1 の酵素活性非依存的に HIF-1 を活性化させていることを見出した。

A 作業仮説



B



C

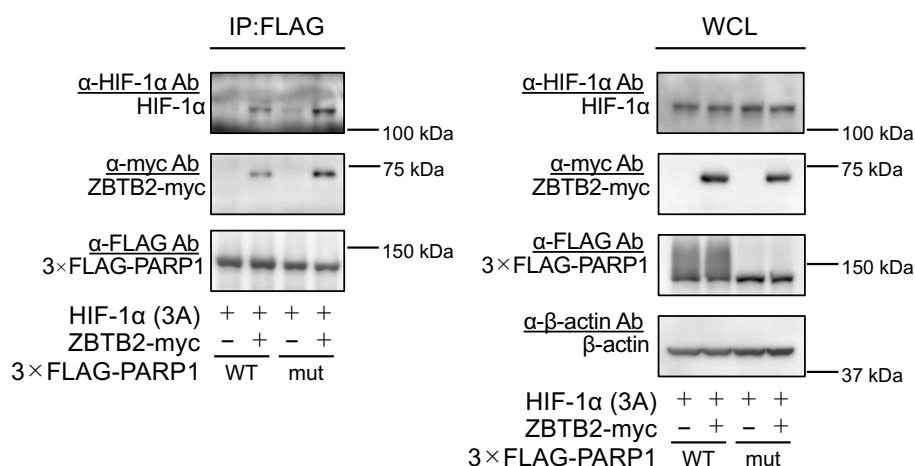


Fig 3.3. ZBTB2 は PARP1 と HIF-1 α の複合体形成を促進する

A) ZBTB2 が PARP1 の役割に与える影響の作業仮説。B,C) HCT116 p53(-/-)細胞へ図中に示すタンパク質発現ベクターを導入後、共免疫沈降実験で PARP1 と HIF-1 α 間の複合体形成を検証した Western blotting。抗 FLAG 抗体による免疫沈降サンプル (左)、全細胞抽出液 (右)を図中に示す各抗体で検出した。野生型 PARP1 (WT)もしくは変異型 PARP1 (E988K) (mut)の発現プラスミドを使用した。

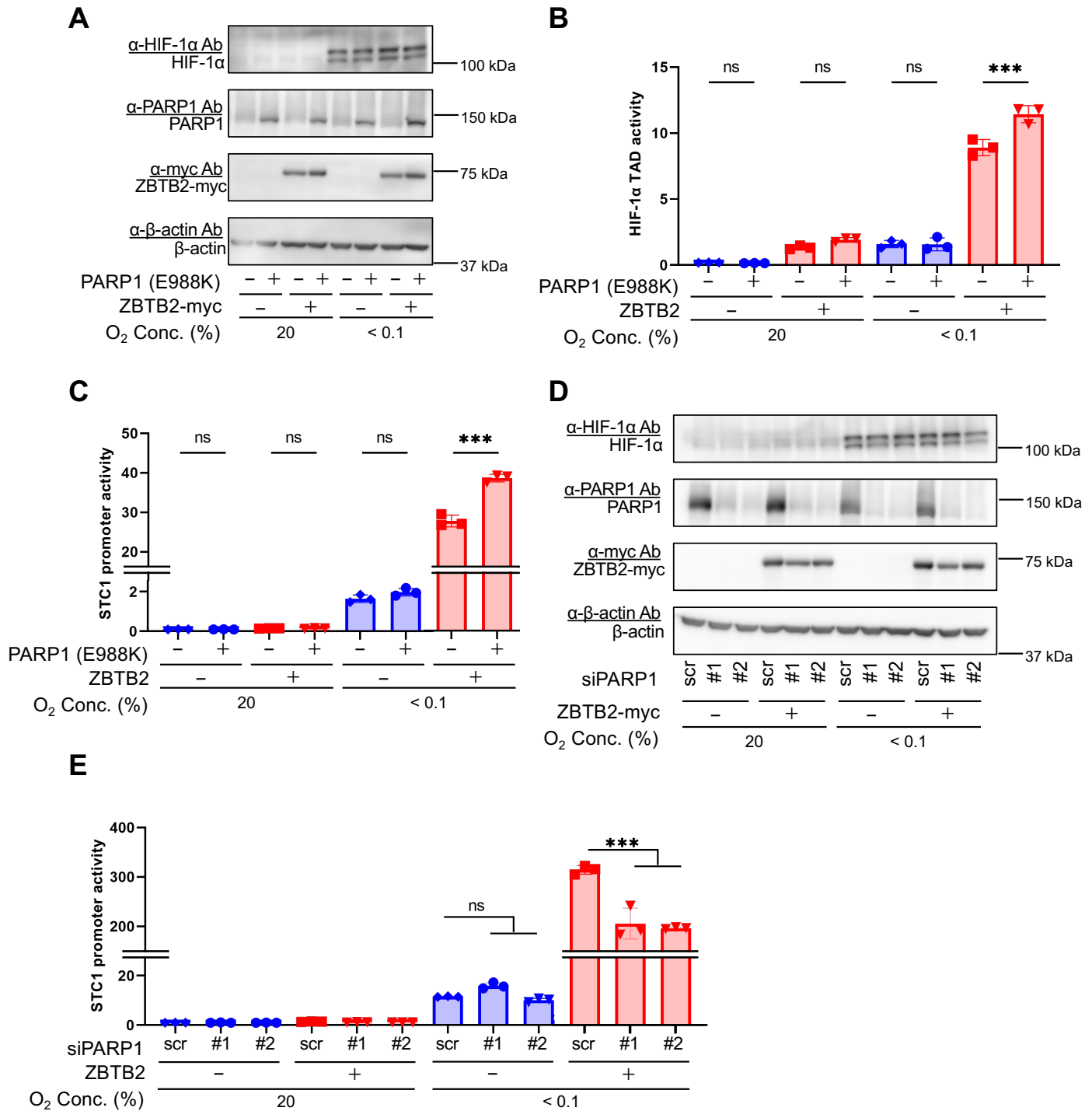


Fig 3.4. ZBTB2 は PARP1 と PARP1 酵素活性非依存的に協調して HIF-1 を活性化する

A-E) HCT116 p53(-/-)細胞を用いた PARP1 および ZBTB2 過剰発現下での HIF-1αTAD ルシフェラーゼアッセイ (B)および STC1 プロモータールシフェラーゼアッセイ (C)と PARP1 ノックダウンおよび ZBTB2 過剰発現下での STC1 プロモータールシフェラーゼアッセイ (E)による HIF-1 活性定量実験。TK プロモーターの制御下で発現する Renilla ルシフェラーゼを内部標準として用いた。各実験の細胞抽出液について、図中に示す各抗体で各タンパク質発現を Western blotting で検出した C (A), E (D)。平均値 ± s.d. (n = 3) ***p < 0.001 n.s. no significance

3-3. ZBTB2 による HIF-1 活性化経路制御因子のスクリーニング

-ZBTB7A は ZBTB2 とヘテロ二量体を形成し ZBTB2 ホモ二量体形成を阻害する-

ここまでの結果から、ZBTB2 が PARP1 と協調的に HIF-1 を活性化することが明らかになった。そこで次に私は、新たに見出した PARP1 の関与を足がかりに PARP1 に関連する因子を探索して、ZBTB2 による HIF-1 活性化を制御する内在性因子の探索を試みた。

まず初めに、ZBTB2 と複合体形成する因子群を探索した質量分析実験で見出した PARP1・XRCC5・XRCC6 に着目した絞り込みを実施した。この理由は、ZBTB2 による HIF-1 活性化を制御する因子が ZBTB2 と複合体を形成する際に、PARP1・XRCC5・XRCC6 とともに相互作用するのではないかとという作業仮説 (Fig 3.5A) が考えられたためである。オープンアクセスデータベースである Biogrid (<https://thebiogrid.org/>) を用いて、三因子との相互作用が報告されている遺伝子を探索した。その結果、225 の遺伝子を同定し (Fig 3.5B)、特にその内の 81 遺伝子が PARP1・XRCC5・XRCC6 のいずれか 2 因子と低スループット解析で相互作用が報告されていることを見出した。最終的に、81 遺伝子について GO 解析を行った結果、20 の遺伝子が RNA ポリメラーゼII依存的な転写を制御する遺伝子群 (GO:0006357) に分類されることを見出した (Table 3.3)。続いて、BTB-ZF ファミリーに着目した絞り込みも実施した。この理由は、一般に BTB-ZF ファミリーは N 末端の BTB/POZ ドメインに相同性を有する^{56,57} ため、ZBTB2 が N 末端を介してホモ二量体形成するように、N 末端に相同性を有するファミリー因子と ZBTB2 がヘテロ二量体を形成するのではないかとという作業仮説 (Fig 3.5C) が想起されたためである。ZBTB2 と相同性を有する因子が ZBTB2 とヘテロ二量体を形成して、ZBTB2 による HIF-1 活性化を制御するのではないかと考えた。以上を考慮し、私は ZBTB2 の N 末端ドメイン (NTD [1-113]) と全 49 の BTB-ZF ファミリー因子の間の相同性をペプチドアラインメント解析により検証した。二遺伝子間で相同性が見られた領域内の同一性値を Table 3.4 と Fig 3.5D へ示す。最上位には、先行研究で ZBTB2 との複合体形成が報告されている ZBTB25⁴³ が確認できたことから、本解析の妥当性を認めた。そして二つの絞り込みに共通する因子として ZBTB7A が確認された。ZBTB7A は、ペプチドアラインメント解析において、ZBTB2 の N 末端との相同領域内で 44.9% の同一性を持つことから上位 6 位に位置し (Table 3.4)、GO 解析でも抽出された。ここで先行研究により、ZBTB7A も N 末端の 20 位と 21 位の疎水性アミノ酸残基を介してホモ二量体を形成することが報告されている⁵⁸。そして、ペプチドアラインメント解析結果 (Fig 3.6A) を見ると、当該アミノ酸残基は ZBTB2 のホモ二量体形成に重要な 10 位 11 位の疎水性残基との相同性を有することが明らかであった。以上の結果は、ZBTB7A が ZBTB2 とヘテロ二量体を形成して、ZBTB2 による HIF-1 活性化を制御する因子として働く可能性を示唆する。

そこで続いて、ZBTB7A が ZBTB2 に与える影響を検証した。まず、ZBTB7A と ZBTB2 が複合体 (ヘテロ二量体) を形成するかを検証するため、*in silico* で AlphaFold3 を用いて ZBTB7A-ZBTB2 複合体の構造予測を行った。その結果、両者の N 末端ドメイン (ZBTB2 [1-117] と ZBTB7A [1-101]) を用いた構造予測において、ZBTB7A と ZBTB2 が相同性を持つ N 末端領域の間で相互作用する可能性を見出した (Fig 3.6B 右)。特にここで、ZBTB7A は ZBTB2 のホモ二量体形成に重要な N 末端の疎水性残基を覆うように位置していた (Fig 3.6B 右)。次に、ZBTB2 と ZBTB7A の

複合体形成能を実験的に検証するため、HCT116 p53(-/-)細胞へ myc タグを融合した ZBTB7A と V5 タグを融合した ZBTB2 を一過性過剰発現させ、抗 myc 抗体を用いて共免疫沈降実験を行った。その結果、ZBTB7A は ZBTB2 に共沈し、*in silico* 解析と一貫して ZBTB7A と ZBTB2 が複合体 (ヘテロ二量体) 形成することを見出した (Fig 3.6C)。最後に、ZBTB7A と ZBTB2 のヘテロ二量体形成が ZBTB2 ホモ二量体形成へ与える影響を検証するため、スプリットルシフェラーゼの系を活用して ZBTB2 ホモ二量体形成能の定量実験を行った。この理由は、先行研究から ZBTB2 のホモ二量体形成は ZBTB2 が HIF-1 を活性化する上で重要であり⁴⁷、ZBTB7A と ZBTB2 のヘテロ二量体形成が ZBTB2 のホモ二量体形成に何らかの影響を与えているのではないかと考えられたためである。そこで、ルシフェラーゼ遺伝子を分割した LgBit および SmBit を ZBTB2 の C 末端に融合させた融合タンパク質を発現するプラスミドを HCT116 p53(-/-)細胞へ一過性に導入し、ZBTB2 ホモ二量体形成後に LgBit と SmBit が会合して生じるルシフェラーゼ発光の強度を定量して、ZBTB2 ホモ二量体形成能を評価した。この条件にさらに ZBTB7A 発現プラスミドを三段階の濃度で一過性に導入し、ZBTB7A が ZBTB2 ホモ二量体形成に与える影響を評価した。その結果、ZBTB2 ホモ二量体形成により生じるルシフェラーゼ発光が、導入した ZBTB7A の発現プラスミドの量に依存して顕著に減少し、ZBTB7A が ZBTB2 とヘテロ二量体を形成すると、ZBTB2 ホモ二量体形成を阻害することを見出した (Fig 3.6D)。

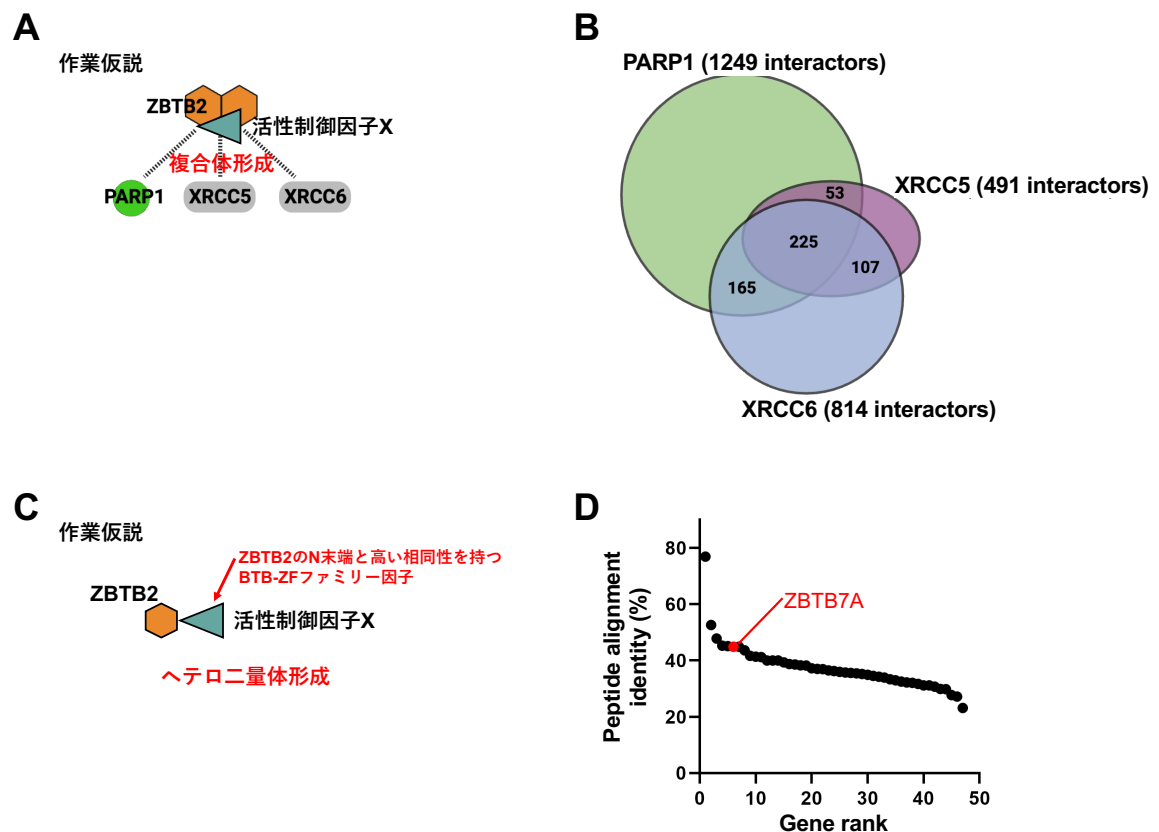


Fig 3.5. ZBTB2 阻害因子のスクリーニング

A) 作業仮説。ZBTB2-HIF-1 経路の活性制御因子は ZBTB2 と複合体形成する因子とも相互作用するか。B) PARP1・XRCC5・XRCC6 と相互作用する因子群の Biogrid 探索解析結果ベン図。C) 作業仮説。ZBTB2-HIF-1 経路の活性制御因子は ZBTB2 の N 末端と相同性を有し、ZBTB2 とヘテロ二量体を形成するか。D) ZBTB2NTD [1-113] と全 BTB-ZF ファミリー因子とのペプチドアラインメント解析結果。ZBTB7A を代表値として示す。

Table 3.3. PARP1・XRCC5・XRCC6 と相互作用する因子のうち、RNA polymerase II 依存的転写を制御する因子群

Genelist (GO0006357) Regulation of transcription by RNA polymerase II)
BAZ1A
BRCA1
ERG
ESR1
HIF1A
HOXB7
HSF1
MECOM
MSX2
PGR
POU2F1
TCF7L2
TFAP2A
THRA
TNIP1
TP53
USF1
YY1
ZBTB7A
ZEB1

Table 3.4. ZBTB2NTD [1-113]と全 BTB-ZF ファミリーのペプチドアラインメント解析

rank	name	identity
1	ZBTB25	76.92
2	ZBTB49	52.63
3	ZBTB4	47.83
4	MIZ1 (ZBTB17)	45.26
5	ZNF913 (ZBTB11)	45.1
6	ZBTB7a	44.9
7	ZBTB7b	44.9
8	ZBTB1	43.64
9	ZBTB48	41.67
10	HIC2 (ZBTB30)	41.38
11	ZBTB40	41.18
12	HIC1 (ZBTB29)	40
13	PATZ1 (ZBTB19)	40
14	ZBTB44	40
15	ZBTB5	39.33
16	CIBZ (ZBTB38)	38.75
17	ZFP161 (ZBTB14)	38.55
18	ZNF295 (ZBTB21)	38.27
19	ZBTB8a	38.2
20	ZFP238 (ZBTB18)	37.23
21	ZBTB10	37.04
22	ZBTB43	36.9
23	ZBTB3	36.46
24	MYNN (ZBTB31)	36.28
25	ZBTB39	35.96
26	ZBTB42	35.71
27	ZBTB26	35.59
28	KAISO (ZBTB33)	35.4
29	ZBTB9	35.23
30	ZBTB7c	34.94
31	ZBTB22	34.52
32	ZBTB34	34.23
33	ZBTB46	33.93
34	ZBTB45	33.33
35	ZBTB8b	32.95
36	GZF1 (ZBTB23)	32.53
37	ZFP131 (ZBTB35)	32.18
38	ZBTB37	32.04
39	ZBTB16	31.68
40	ZBTB41	31.17
41	PATZ2 (ZBTB24)	31.13
42	BCL6 (ZBTB27)	30.68
43	ZFP651 (ZBTB47)	29.91
44	ZBTB6	29.81
45	ZBTB32	27.69
46	ZBTB20	27.19
47	ZBTB12	23.15
48	BCL6B (ZBTB28)	not detected

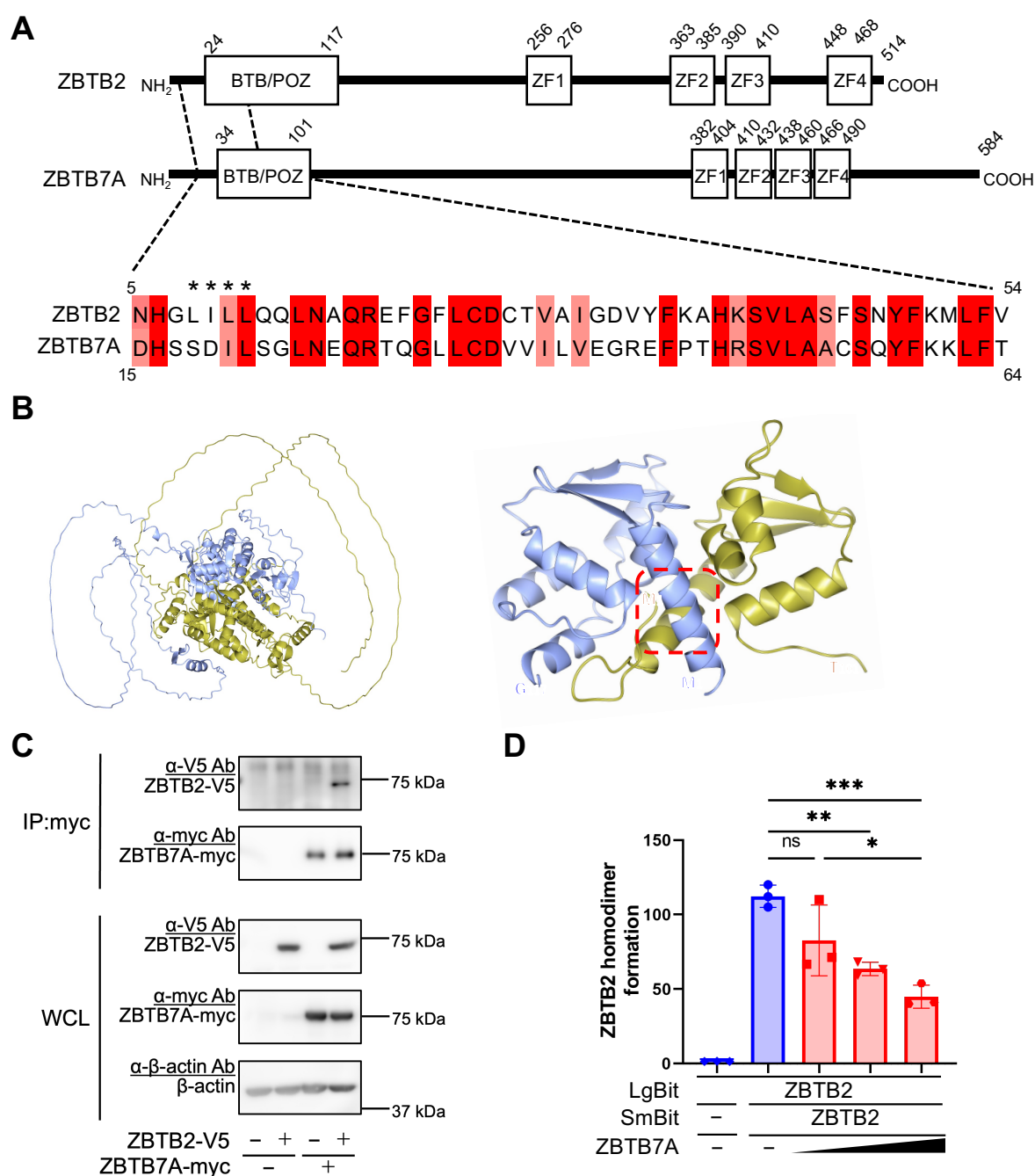


Fig 3.6. ZBTB7A は ZBTB2 とヘテロ二量体を形成し、ZBTB2 ホモ二量体形成を阻害する

A) ZBTB2 (5 aa ~ 54 aa)および ZBTB7A (15 aa ~ 64 aa) のペプチドアラインメント解析結果。両者に同一なアミノ酸を赤枠で、相同なアミノ酸を薄赤枠で、ZBTB2 ホモ二量体形成に重要なアミノ酸残基に*を示す。B) AlphaFold3 による ZBTB2-ZBTB7A ヘテロ二量体の構造予測 (ZBTB2 を薄青、ZBTB7A を黄色)。解析へ両タンパク質全長 (左)、N 末端ドメイン ZBTB2 (1 aa ~ 117 aa) および ZBTB7A (1 aa ~ 101 aa) (右) を用いた。C) HCT116 p53(-/-) 細胞へ図中に示すタンパク質発現ベクターを導入後、共免疫沈降実験で ZBTB2-ZBTB7A ヘテロ二量体形成を検証した Western blotting。抗 myc 抗体による免疫沈降サンプル (上)、全細胞抽出液 (下) を図中に示す各抗体で検出した。D) スプリットルシフェラーゼを用いた ZBTB2 ホモ二量体形成能の定量。図中に示すタンパク質発現ベクターを導入後、ZBTB2 ホモ二量体が生じる化学発光を定量した。ZBTB7A 過剰発現プラスミドを三段階の濃度で過剰発現した。平均値 $\pm$ s.d. (n = 3) *p $\leq$ 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, n.s. no significance

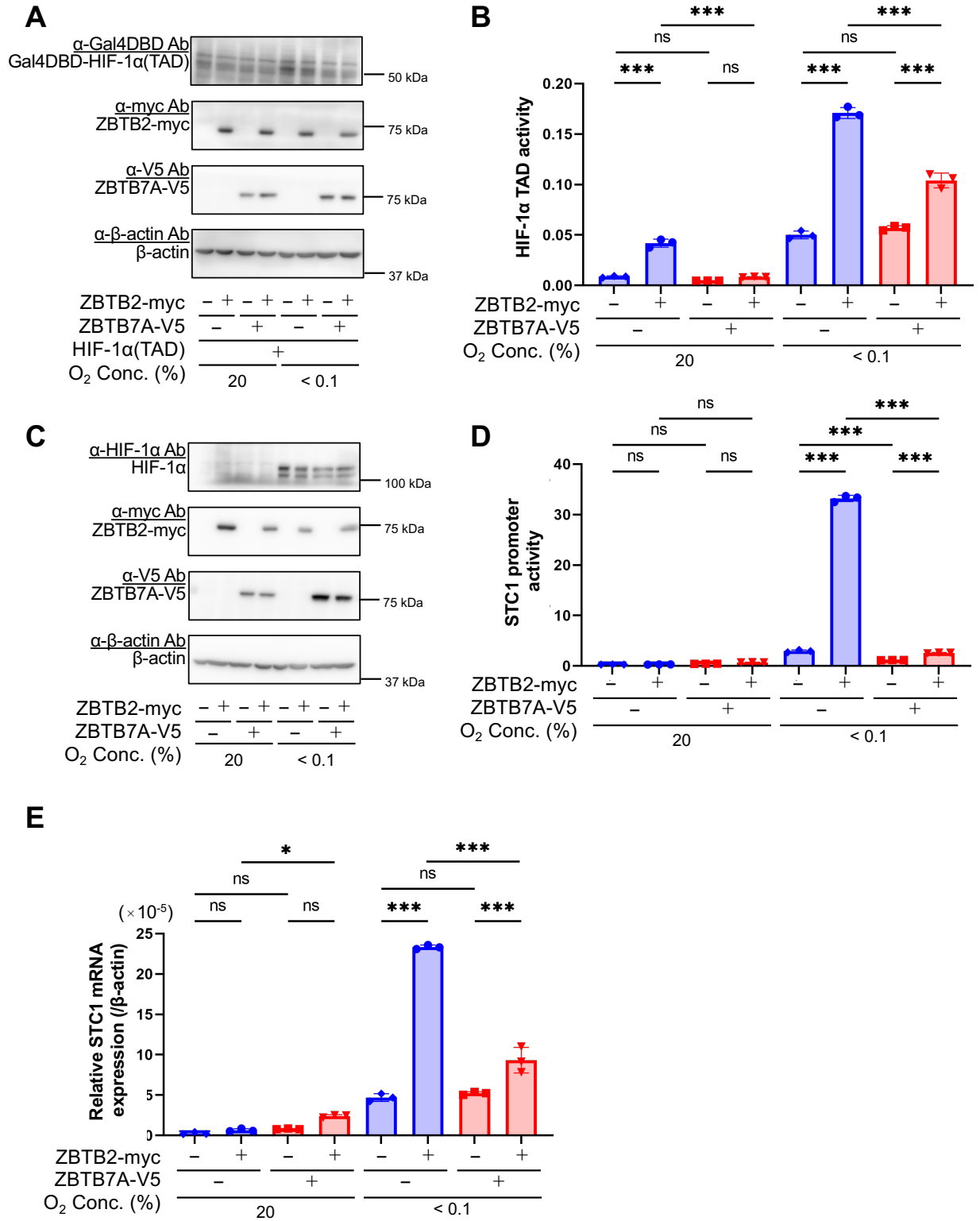
3-4. ZBTB7A は ZBTB2 とヘテロ二量体を形成し ZBTB2 ホモ二量体形成を阻害して、HIF-1 の活性化および低酸素下での細胞増殖を抑制する

次に、ZBTB7A が ZBTB2 ホモ二量体形成を阻害した結果、ZBTB2 による HIF-1 活性化を抑制的に制御する因子として働いているかを検証した。

まず、HCT116 p53(-/-)細胞へ ZBTB7A または ZBTB2 もしくは双方を一過性過剰発現させる条件で、二種の HIF-1 活性レポーターを用いたルシフェラーゼアッセイ及び qRT-PCR による HIF-1 下流遺伝子の発現定量実験を実施した。まず、HIF-1 α の転写活性化能を HIF-1 α Trans-activation domain (TAD [531 aa ~ 826 aa])を活用したルシフェラーゼレポーター (Fig 2.1)によって評価した。その結果、ZBTB7A の非過剰発現下では ZBTB2 は HIF-1 転写活性を活性化するのに対して、ZBTB7A の過剰発現下では ZBTB2 による HIF-1 転写活性の活性化が有意に減弱することを見出した (Fig 3.7A,B)。ここで、ZBTB7A の過剰発現は、ZBTB2 や Gal4DBD-HIF-1 α TAD 融合タンパク質の発現量には著明な効果を与えず (Fig 3.7A)、ZBTB7A が働く作用点は、ZBTB2 や HIF-1 α 発現量の調節よりむしろ ZBTB2 が持つ HIF-1 転写活性の活性化能もしくはその上流の ZBTB2 ホモ二量体形成能であると考えられた。次に、本研究で構築した (Fig S1.2B)STC1 遺伝子のプロモーター活性を測定するルシフェラーゼレポーター実験を行った。その結果、ZBTB7A の非過剰発現下では ZBTB2 が STC1 プロモーター活性の低酸素誘導を有意に増強するのに対して、ZBTB7A の過剰発現下ではそれが有意に減弱することを見出した (Fig 3.7C,D)。ここで、ZBTB7A の過剰発現は、ZBTB2 や内在性 HIF-1 α の発現量には著明な効果を与えず (Fig 3.7C)、一貫して ZBTB7A が働く作用点は、ZBTB2 や HIF-1 α 発現量の調節よりむしろ ZBTB2 が持つ HIF-1 の活性化能もしくはその上流の ZBTB2 ホモ二量体形成能であると考えられた。次に、本研究で同定した (Fig S1A,B)ZBTB2 が HIF-1 を活性化して発現を誘導する HIF-1 下流遺伝子の発現定量を qRT-PCR で実施した。その結果、ZBTB7A の非過剰発現下では ZBTB2 は STC1 や PAX8 といった HIF-1 下流遺伝子の低酸素誘導を有意に増強するが、ZBTB7A の過剰発現下ではそれが有意に減弱することを見出した (Fig 3.7E,F)。さらに、3-2 の項で述べた PARP1-HIF-1 α の複合体形成に対する ZBTB7A の効果を、スプリットルシフェラーゼを用いた蛋白質間相互作用解析法で検証した。HCT116 p53(-/-)細胞へ、LgBit を融合した PARP1、SmBit を融合した HIF-1 α (2A)、および ZBTB7A または ZBTB2 を一過性過剰発現させ、PARP1-HIF-1 α 複合体形成後に生じるルシフェラーゼ発光の強度を定量した。その結果、ZBTB7A の非過剰発現下では ZBTB2 は PARP1-HIF-1 α 複合体形成を増強するのに対して、ZBTB7A の過剰発現下では ZBTB2 による PARP1-HIF-1 α 複合体形成の増強は有意に減弱することを見出した (Fig 3.7G)。以上の結果は、ZBTB7A が ZBTB2 による HIF-1 活性化を抑制的に制御する因子として働くことを示す。

さらに、私は本現象を細胞生物学的観点から評価するため、ZBTB7A が低酸素下での細胞増殖を抑制するかを検証した。この理由は、これまでの研究から ZBTB2 は HIF-1 を活性化すると低酸素環境下での細胞増殖を亢進させることが明らかであり⁴⁷、がんにおける STC1 及び PAX8 の高発現が細胞増殖の亢進に関連する^{59,60} ことも報告されているためである。そこで私は、ZBTB7A が ZBTB2 による HIF-1 活性化を抑制するとき、低酸素下での細胞増殖も抑制するのではないかと考

えた。HeLa 細胞へ ZBTB7A を一過性過剰発現させ、低酸素培養前後の細胞数を WST8 法により検証した。その結果、ZBTB7A の過剰発現下では、低酸素下での細胞増殖が有意に低下することを見出した (Fig 3.8A,B)。さらに私は、ZBTB7A の過剰発現が低酸素下での細胞増殖を低下させることが、ZBTB7A が ZBTB2 のホモ二量体形成を阻害することに起因するかを検証した。ここで以前の研究結果から、HeLa 細胞へ ZBTB2 の N 末端 (NTD [1-113]) を模したポリペプチドを発現するプラスミドを一過性に導入すると、当該ポリペプチドが ZBTB2 ホモ二量体形成を阻害して、HIF-1 活性化および低酸素下での細胞増殖を抑制することが明らかだった⁴⁷。そこで私は、ZBTB7A と ZBTB2NTD [1-113] を共に過剰発現させたとき、両者が共に ZBTB2 ホモ二量体形成を阻害して細胞増殖を低下させているのであれば、両者の過剰発現は細胞増殖低下現象に対して相乗効果を持たないのではないかと考えた。HeLa 細胞へ ZBTB7A と ZBTB2NTD [1-113] を共に一過性過剰発現させ、低酸素培養前後の細胞数を WST8 法により検証した。その結果、両者を共発現させても細胞増殖の低下は、両者を単独に過剰発現させたときと同等であり、共発現の相乗効果は確認できなかった (Fig 3.8A,B)。すなわち、ZBTB7A と ZBTB2NTD [1-113] が作用点を共通し、ZBTB2 ホモ二量体形成を阻害していることを見出した。以上の結果は、これまでの結果と一貫して、ZBTB7A が ZBTB2 による HIF-1 活性化を抑制的に制御する因子として働くことを示す。



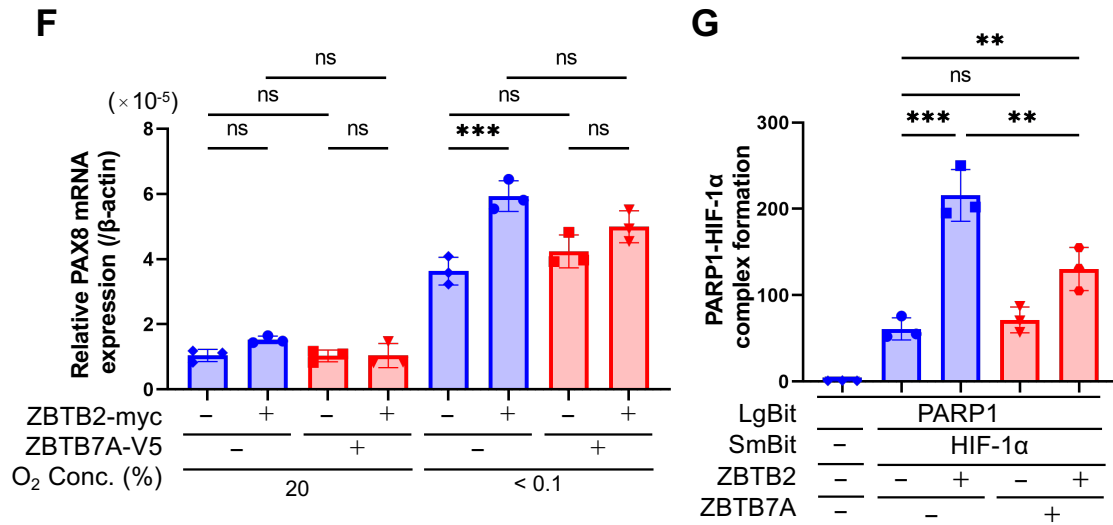


Fig 3.7. ZBTB7A は ZBTB2 による HIF-1 活性化を抑制する

A-F) HCT116 p53(-/-)細胞へ図中に示すタンパク質発現ベクターを導入後、HIF-1αTAD ルシフェラーゼ (B)および STC1 プロモータールシフェラーゼ (D)アッセイ及び STC1 mRNA (E)および PAX8 mRNA (F)発現の qRT-PCR 定量実験を行った HIF-1 活性定量実験。TK プロモーターの制御下で発現する Renilla ルシフェラーゼを内部標準として用いた。各実験の細胞抽出液について、図中に示す各抗体で各タンパク質発現を Western blotting で検出した B (A), D (C)。G) スプリットルシフェラーゼを用いた PARP1 と HIF-1α 間の複合体形成能の定量。図中に示すタンパク質発現ベクターを導入後、PARP1-HIF-1α 複合体が生じる化学発光を定量した。平均値 ± s.d. (n = 3) *p ≤ 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, n.s. no significance

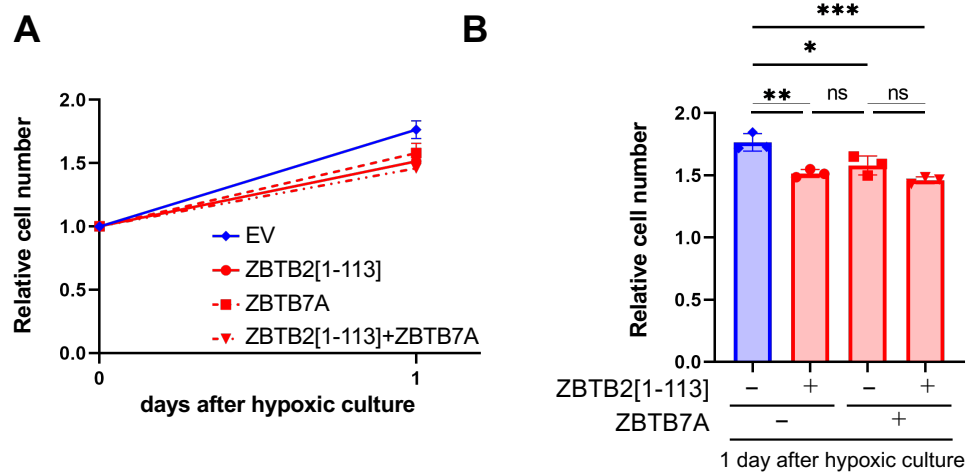


Fig 3.8. ZBTB7A は ZBTB2 ホモ二量体を形成を阻害し、低酸素下の細胞増殖を抑制する

A,B) HeLa 細胞を用いた低酸素培養前後の細胞数定量実験。図中に示すタンパク質発現ベクターを導入後、低酸素培養前後の細胞数を定量した。低酸素培養前の細胞数で各条件を標準化したデータを示す。折れ線グラフ (A)および低酸素培養後の細胞数を棒グラフ (B)で示す。平均値 $\pm$ s.d. (n = 3) * $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s. no significance

3-5. ZBTB7A の低発現は患者予後不良に相関する

最後に、がん患者の生命予後へ ZBTB7A が与える影響をがんゲノム情報の公共データベース The Cancer Genome Atlas (TCGA)を用いて、がん患者腫瘍における ZBTB7A および ZBTB2 の腫瘍内発現量と患者生命予後の相関関係を評価して検証した。11 種の癌 (腎臓癌・肝臓癌・神経膠腫・頭頸部癌・肺癌・膵臓癌・卵巣癌・直腸癌・乳癌・子宮頸癌・胃癌)の患者集団の TCGA RNA-seq データから、それぞれの集団における ZBTB7A の発現量の中央値を算出し、患者集団を ZBTB7A 高発現な集団と低発現な集団へ分類して Kaplan-Meier 解析を実施した。その結果、腎臓癌・胃癌の 2 癌種で統計的に有意な差をもって ZBTB7A の低発現が患者予後不良に相関することを見出した (Fig 3.9A,B)。頭頸部癌については ZBTB7A の低発現が患者予後不良に相関する傾向が見られた (Fig 3.9C)。上記の癌種では ZBTB7A は、がん抑制遺伝子として働いていると考えられた。

最後に、ZBTB7A のがん抑制遺伝子としての働きに ZBTB2 ホモ二量体形成の阻害が関与しているか否かの検証を試みた。仮説として、ZBTB7A による ZBTB2 ホモ二量体形成の阻害が ZBTB7A の働きに重要である場合、ZBTB2 発現が低い患者では ZBTB7A はその阻害対象が存在せず、以て患者生命予後へ与える影響も少ないことが予想される。そこで、Fig 3.9 で解析した患者集団を、さらに ZBTB2 の腫瘍内発現量の中央値を元に、ZBTB2 高発現な集団と低発現な集団へ分類し、合計 4 集団の患者で Kaplan-Meier 解析を実施した。その結果、解析に供した腎臓癌・胃癌・頭頸部癌の全ての患者群において、ZBTB2 低発現集団で統計的に有意な差を持って ZBTB7A の低発現が患者予後不良に相関することを見出した (Fig 3.10B,D,F)。ZBTB2 高発現集団では、腎臓癌では ZBTB7A の低発現が患者予後不良に相関するが、胃癌・頭頸部癌では有意な効果を認めなかった (Fig 3.10A,C,E)。以上の結果から、腎臓癌・胃癌・頭頸部癌患者において ZBTB7A の腫瘍内低発現はがん患者の予後不良に相関し、かつ相関関係は腫瘍内で ZBTB2 を高発現する患者群よりも ZBTB2 を低発現する患者群で顕著であることを見出した。

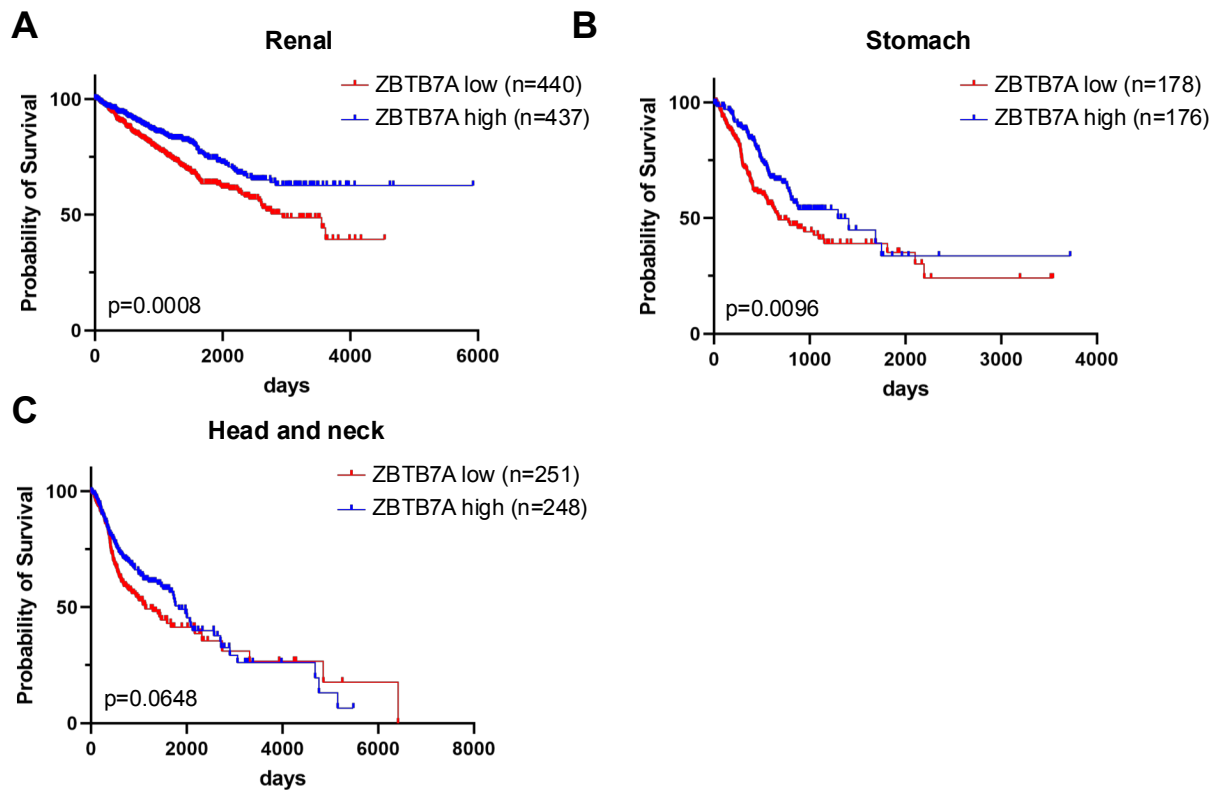


Fig 3.9. ZBTB7A の低発現はがん患者の予後不良に相関する

A-C) TCGA データベースを用いた Kaplan-Meier 全生存期間解析。腎臓癌 (A)・胃癌 (B)・頭頸部癌 (C)の患者集団について ZBTB7A を腫瘍内で高発現する患者群を青で、低発現する患者群を赤で示す。Log-rank test.

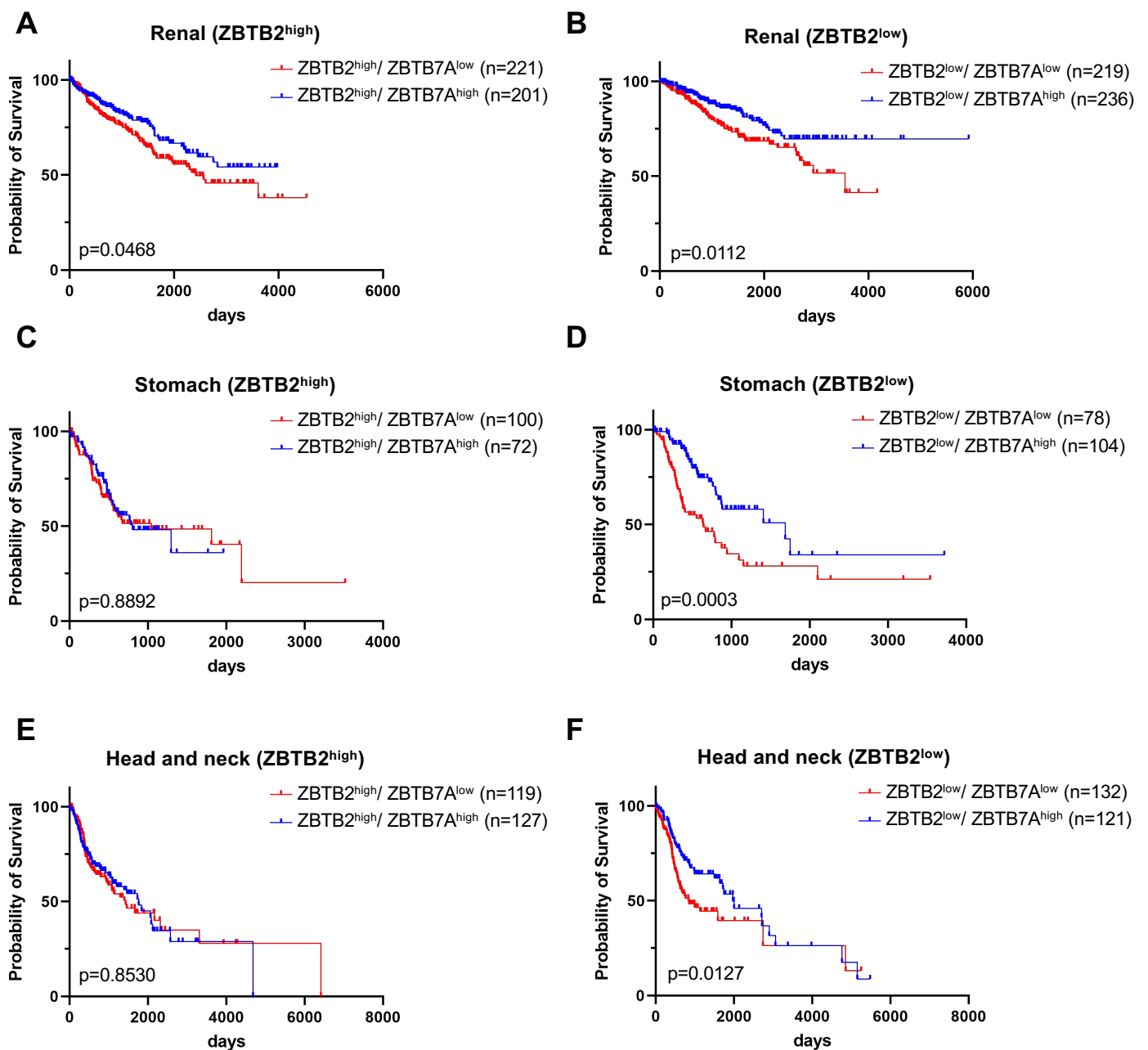


Fig 3.10. ZBTB7A の低発現は ZBTB2 低発現な患者群で強く患者予後不良に相関する

A-E) TCGA データベースを用いた Kaplan-Meier 全生存期間解析。腫瘍内 ZBTB2 発現度をもとに分類した、腎臓癌 ZBTB2 高発現 (A)・腎臓癌 ZBTB2 低発現 (B)・胃癌 ZBTB2 高発現 (C)・胃癌 ZBTB2 低発現 (D)・頭頸部癌 ZBTB2 高発現 (E)・頭頸部癌 ZBTB2 低発現 (F)の患者集団について ZBTB7A を腫瘍内で高発現する患者群を青で、低発現する患者群を赤で示す。Log-rank test.

第IV章

結果

—ZBTB2 による HIF-1 活性化が低酸素環境下で果たす役割の解明—

4-1. ZBTB2 は PARP1 を HIF-1 を介した低酸素応答へ動員して、PARP1 の DDR における活性を抑制する

第四章から私は、ZBTB2 による HIF-1 活性化が低酸素環境下で果たす役割を検討した。具体的には、PARP1 が古典的には DDR に働く中心的な因子であり³⁴、ゲノム DNA の損傷時に DNA 損傷部位へ集積して、同様に DNA 損傷部位へ集積する様々なエフェクター因子群をポリ ADP リボシル修飾して DNA 損傷修復を促進し、恒常性維持に関わることに注目した。この理由は、第三章 Fig 3.3 の PARP1-HIF-1 α の複合体形成を評価した共免疫沈降実験は、ZBTB2 が PARP1 を HIF-1 活性制御へ動員するように働くことを示しているが、このときに ZBTB2 が PARP1 の DDR における活性にはどのような影響を及ぼしているか不明であったためである。ZBTB2 が PARP1 を HIF-1 活性制御へ動員した時に、PARP1 の DDR での活性が変化し、これが ZBTB2 が低酸素環境下で果たす役割なのではないかと考えた。特に、DDR 活性の低下はゲノム恒常性を破綻させ、悪性固形腫瘍に広く見られるホールマークとして挙げられるゲノム不安定な状態を引き起こすため、近年注目されている²⁷。そこで、ZBTB2 は PARP1 を HIF-1 活性制御へ動員する時に、PARP1 の DDR での活性を低下させ、ゲノム不安定性を誘導しているのではないかという作業仮説 (Fig 4.1A)を立て、この仮説を検証することとした。

まず、DNA 損傷後に PARP1 が DNA 損傷部位で形成する Poly ADP-ribose (PAR)修飾鎖量を PARP1 の DDR における活性とみなし、免疫染色実験で PAR 量を定量して PARP1 の DDR での活性を評価することとした。U2OS 細胞へ ZBTB2 を一過性過剰発現させ、通常酸素および低酸素下で細胞を培養し、その後 UV で DNA 損傷を加え、さらに 1 時間後に細胞を回収して DNA 損傷誘導後に PARP1 が形成した PAR 量を定量した。その結果、ZBTB2 過剰発現により、DNA 損傷後に核内に蓄積する PAR 量が、空ベクターを導入して UV を照射した陰性コントロールと比較して、低酸素下で有意に低下することを見出した (Fig 4.1C)。その一方、ZBTB2 過剰発現は、DNA 損傷後に核内に蓄積する PAR 量へ、通常酸素下では有意な効果を与えなかった (Fig 4.1E)。なおここで、ZBTB2 の過剰発現は、通常酸素下および低酸素下共に内在性 PARP1 の発現量には著明な効果を与えなかった (Fig 4.1B,D)。続いて、ZBTB2 のノックダウン条件での検証も行った。U2OS 細胞へ shRNA 発現プラスミドを安定導入して ZBTB2 ノックダウン細胞を樹立し (Fig 4.1J)、当該細胞を通常酸素および低酸素下で細胞を培養し、その後 UV で DNA 損傷を加え、さらに 1 時間後に細胞を回収して DNA 損傷誘導後に PARP1 が形成した PAR 量を定量した。その結果、ZBTB2 ノックダウンにより、DNA 損傷後に核内に蓄積する PAR 量が、空ベクターを導入して UV を照射した陰性コントロールと比較して、低酸素下で有意に増加することを見出した (Fig 4.1G)。その一方、ZBTB2 ノックダウンは、DNA 損傷後に核内に蓄積する PAR 量へ、通常酸素下では有意な効果を与えなかった (Fig 4.1I)。なおここで、ZBTB2 のノックダウンは、通常酸素下および低酸素下共に内在性 PARP1 の発現量には著明な効果を与えなかった (Fig 4.1F,H)。以上の結果は、ZBTB2 は低酸素下で DDR における PARP1 の活性を抑制していることを示す。

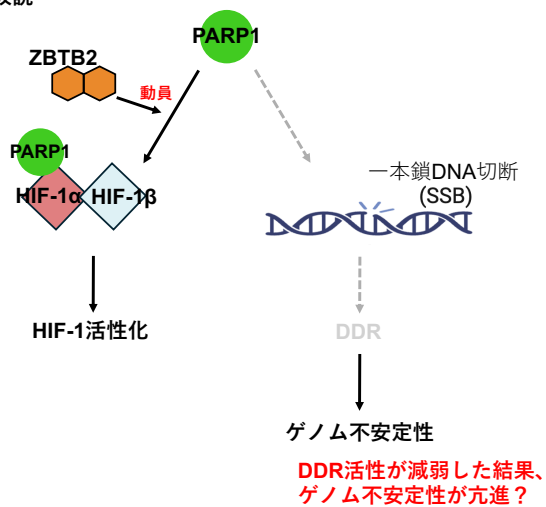
次に、DDR における PARP1 活性をさらに検証するため、PARP1 下流因子 DNA damage-binding protein 2 (DDB2)に着目した。DDB2 は、UV 損傷修復経路において DNA 損傷部位へ集積する

と、PARP1 と相互作用して PAR 修飾を受け、活性の調節を受ける因子である⁶¹⁻⁶³。特に、PAR 修飾された DDB2 は、損傷部位から解離し、より下流の損傷修復因子との交換反応が促進されることが知られている^{61,62}。DDB2 に着目し、PARP1 依存的な DDB2 動態と DDB2 が受ける PAR 修飾量を定量することで PARP1 活性を評価できると考えた。具体的には、まず UV 損傷誘導後に時間依存的に形成・解離する PARP1-DDB2 複合体の動態を共免疫沈降実験によって評価した。U2OS 細胞へ、FLAG タグを融合した PARP1 を一過性過剰発現させ、通常酸素下および低酸素下で培養後に UV を照射し、その 3 分・12 分後に細胞抽出液を回収し、抗 FLAG 抗体を用いて共免疫沈降実験を行った。その結果、UV 照射後の PARP1-DDB2 複合体の動態について、低酸素下で空ベクターを導入した陰性コントロールの条件では、PARP1-DDB2 複合体が UV 照射後 3 分後に形成した後、12 分後には解離する傾向が確認できるのに対し、ZBTB2 過剰発現ベクターを導入した条件では 12 分後の PARP1-DDB2 複合体の解離が顕著に抑制されていることを見出した (Fig 4.2A 左)。同様の解離遅延は、細胞へ PARP1 酵素活性阻害剤 Olaparib (10 μ M) を処理した場合にも確認された (Fig 4.2A 右・2B 右)。この一方、通常酸素下では、ZBTB2 過剰発現群およびその非過剰発現陰性コントロール群の間で PARP1-DDB2 複合体の動態に有意な差を認めなかった (Fig 4.2B 左)。続いて、UV 照射後に DDB2 が受ける PAR 修飾量を免疫沈降実験で定量した。U2OS 細胞へ、FLAG タグを融合した DDB2 を一過性過剰発現させ、低酸素下で培養後に UV を照射し、12 分後に細胞抽出液を回収して抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、ZBTB2 過剰発現により UV 損傷後に DDB2 が受ける PAR 修飾が顕著に低下することを見出した (Fig 4.2C,D)。以上の結果は、ZBTB2 が低酸素下で DDR における PARP1 活性を低下させ、下流の DDR 経路も抑制することを示唆する。

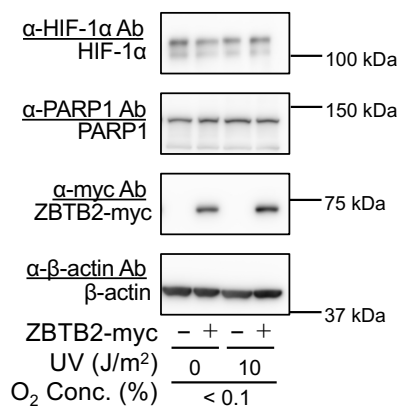
これまでの結果から、ZBTB2 が低酸素下で PARP1 の DDR における活性を抑制することを見出した。そこで続いて、低酸素下特有の現象が「ZBTB2 が PARP1 を HIF-1 活性制御へ動員すること」が引き金となって起こっているかを検証した。具体的には、通常酸素下で HIF-1 α を過剰発現させることで、PARP1 を HIF-1 活性制御へ動員し、PARP1 活性が低下するかを評価した。その結果、これまでの結果と一貫して通常酸素下では ZBTB2 単独の過剰発現は PARP1 活性へ顕著な効果を与えず、HIF-1 α 単独の過剰発現も PARP1 活性へ顕著な効果を与えないが、両者を共発現させたときに PARP1 活性が有意に低下することを見出した (Fig 4.3B)。なおここで、HIF-1 α の過剰発現は、内在性 PARP1 の発現量には著明な効果を与えなかった (Fig 4.3A)。さらに、低酸素下で HIF-1 α をノックダウンして PARP1 の HIF-1 活性制御への動員を抑制し、この時の DDR における PARP1 活性を評価した。その結果、低酸素下の HIF-1 α 存在下では ZBTB2 は PARP1 活性を抑制する一方で、HIF-1 α 非存在下では ZBTB2 は PARP1 活性へ顕著な効果を与えないことを見出した (Fig 4.3D)。なおここで、HIF-1 α のノックダウンは、内在性 PARP1 の発現量には著明な効果を与えなかった (Fig 4.3C)。

以上の結果は、ZBTB2 が PARP1 を HIF-1 活性制御へ動員して、PARP1 の DDR での活性を減弱させていることを示す。

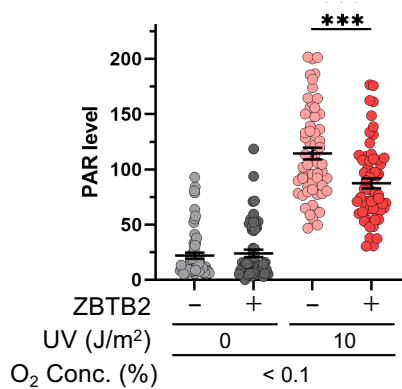
A 作業仮説



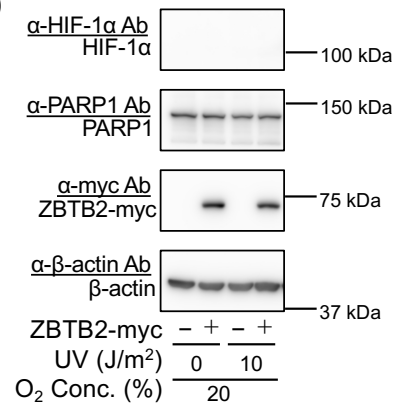
B



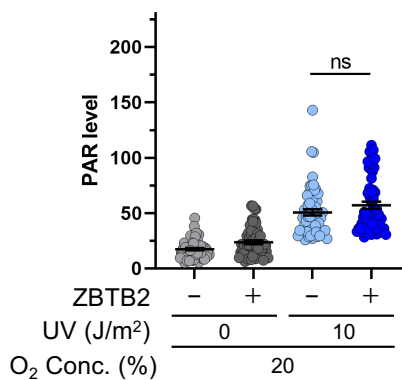
C



D



E



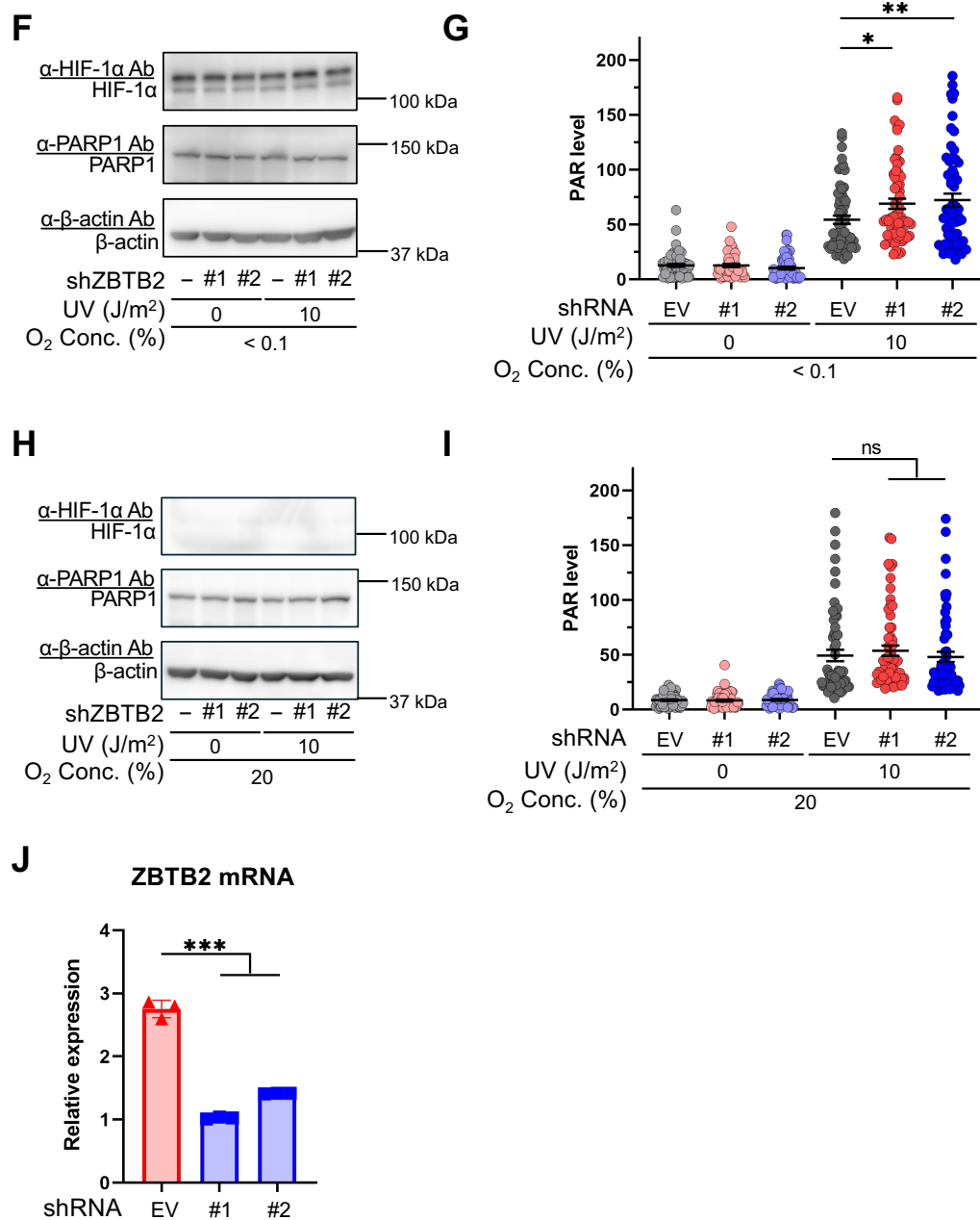


Fig 4.1. ZBTB2 は低酸素下で DDR における PARP1 活性を抑制する

A) ZBTB2 が PARP1 の役割に与える影響の作業仮説。B-J) U2OS 細胞を用いて UV 照射後に核内に蓄積する PAR 量を定量した免疫染色実験。ZBTB2 過剰発現後に低酸素下 (C)、通常酸素下 (E) および shRNA による ZBTB2 ノックダウン後に低酸素下 (G)、通常酸素下 (I) で培養した細胞へ UV を照射し、1 細胞あたりに蓄積する PAR 量を定量した (n = 60)。各実験の細胞抽出液について図中に示す各抗体で各タンパク質発現を Western blotting で検出した C (B)、E (D)、H (G)、J (I)。F-I へ用いた細胞について ZBTB2 mRNA を qRT-PCR で定量した (J)。免疫染色実験の代表的染色図は参考資料 Fig S3.1 に示す。平均値 ± s.e. (C,E,G,I)、平均値 ± s.d. (n = 3) (I) * $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s. no significance

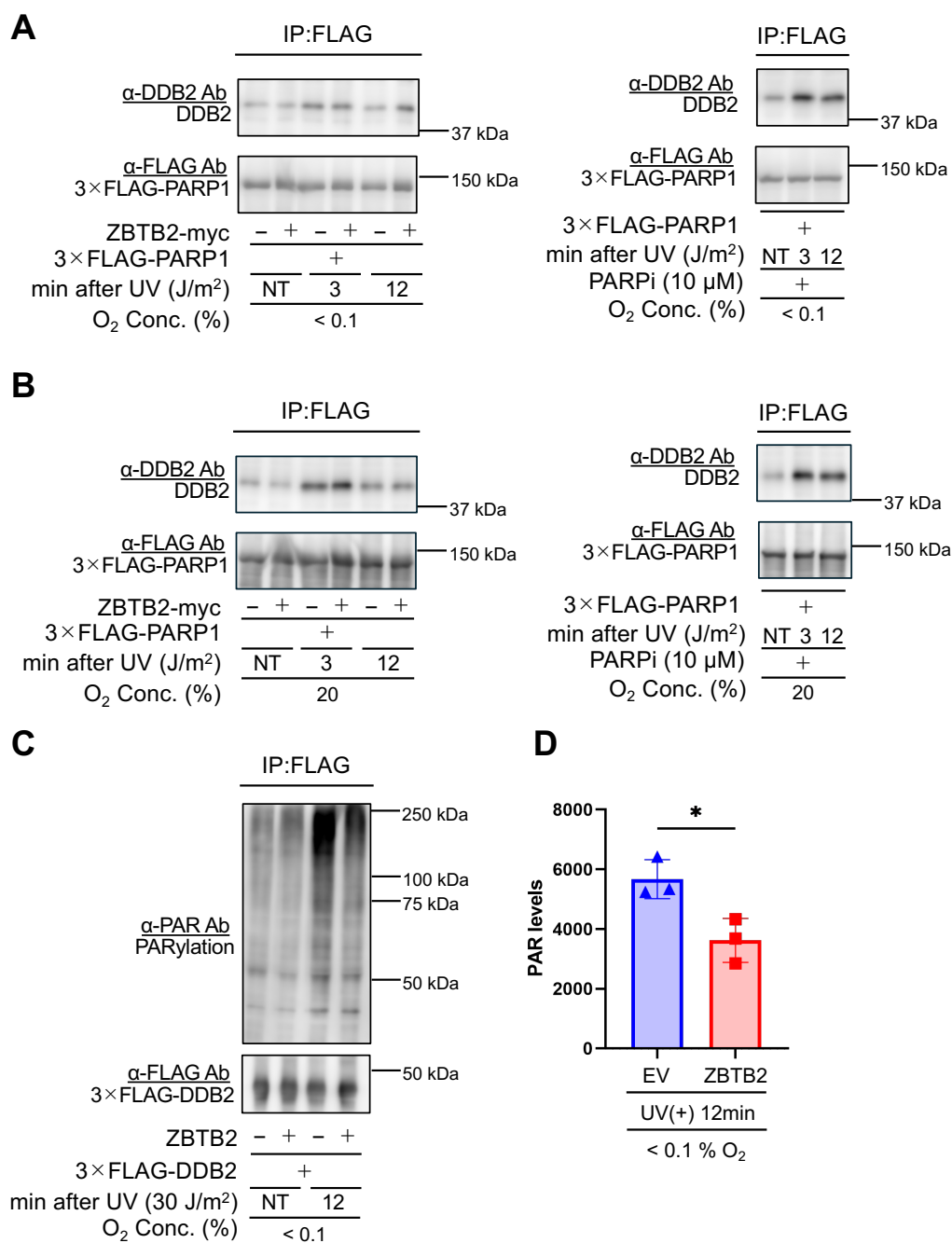


Fig 4.2. ZBTB2 は低酸素下で PARP1-DDB2 経路を抑制する

A-B) U2OS 細胞へ ZBTB2 および 3 $\times$ FLAG-PARP1 発現ベクターを導入後、共免疫沈降実験で PARP1 と DDB2 間の複合体形成を検証した Western blotting。ZBTB2 を過剰発現後に低酸素酸素下 (A)、通常酸素下(B)で培養した細胞へ UV を照射し、その後図中に示す時間培養した後、抗 FLAG 抗体による免疫沈降を行った。免疫沈降サンプルを図中に示す各抗体で検出した。PARP1 阻害剤処理なし(左)、PARP1 阻害剤 (10 μ M)処理有り (右)。

C,D) U2OS 細胞へ ZBTB2 および 3 $\times$ FLAG-DDB2 発現ベクターを導入後、共免疫沈降実験で DDB2 の PAR 修飾量を検証した Western blotting とその定量図。低酸素下で細胞へ UV を照射し、その 12 分後にサンプルを回収した。抗 FLAG 抗体による免疫沈降を行なって、免疫沈降サンプルを図中に示す各抗体で検出した (C)。UV 照射後 12 分後の PAR 修飾量の定量結果 (D)。平均値 $\pm$ s.d. (n = 3) *p $\leq$ 0.05

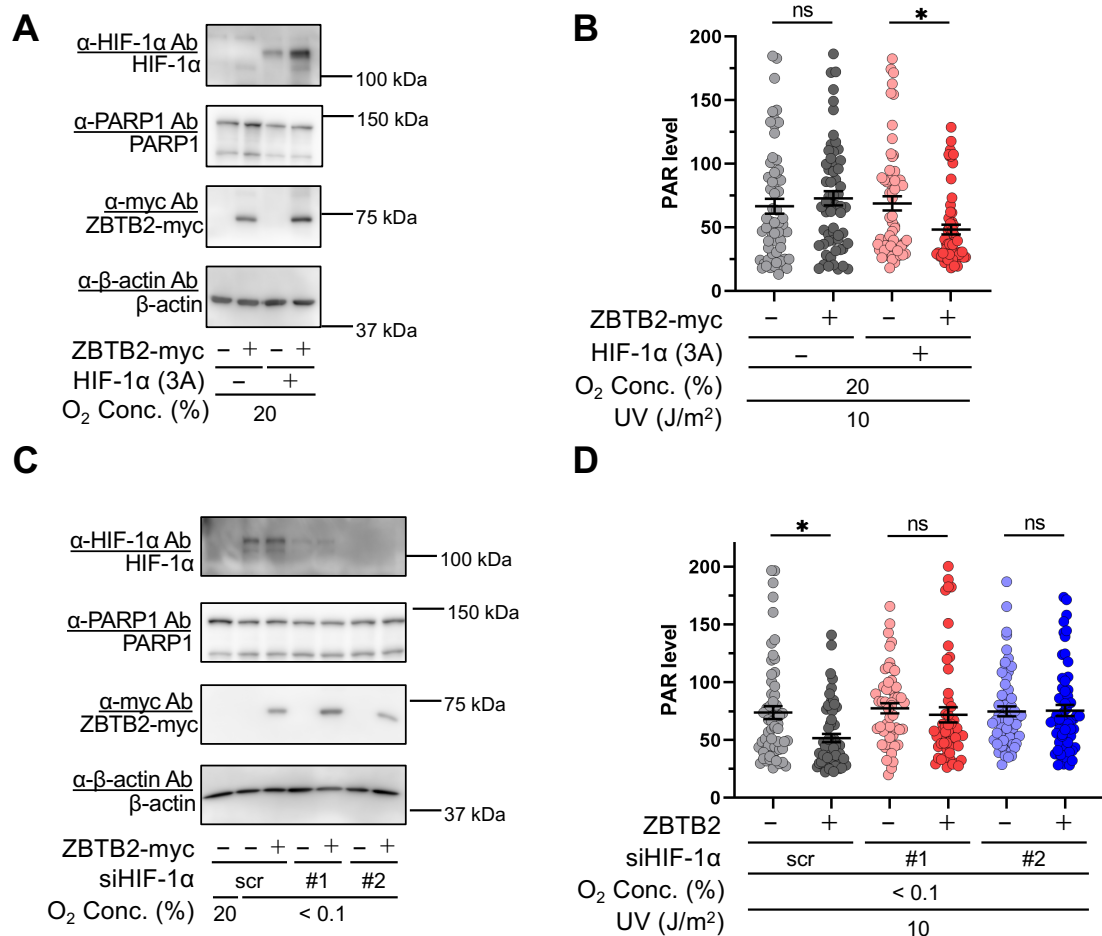


Fig 4.3. ZBTB2 は PARP1 を HIF-1 活性制御へ動員して、DDR における PARP1 活性を抑制する

A-D) U2OS 細胞を用いて UV 照射後に核内に蓄積する PAR を定量した免疫染色実験。ZBTB2 または HIF-1α もしくはその双方を過剰発現後に通常酸素下 (B)、HIF-1α ノックダウンおよび ZBTB2 過剰発現後に低酸素下 (D) で培養した細胞へ UV 照射し、1 細胞あたりに蓄積する PAR 量を定量した (n = 60)。各実験の細胞抽出液について図中に示す各抗体で各タンパク質発現を Western blotting で検出した B (A)、D (C)。免疫染色実験の代表的染色図は参考資料 Fig S3.1 に示す。平均値 ± s.e. *p ≤ 0.05, n.s. no significance

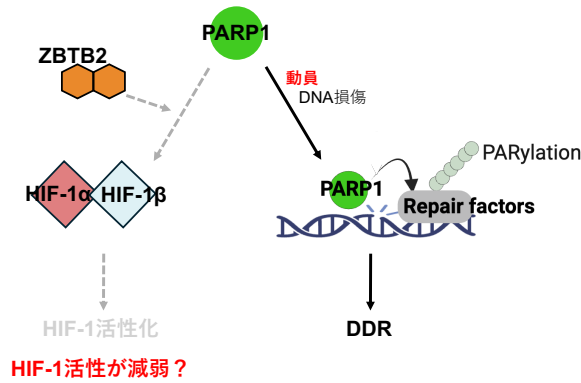
4-2. PARP1 の低酸素応答と DDR での役割は競合関係にある

—DNA 損傷存在下で PARP1 の HIF-1 活性制御への寄与は減弱する—

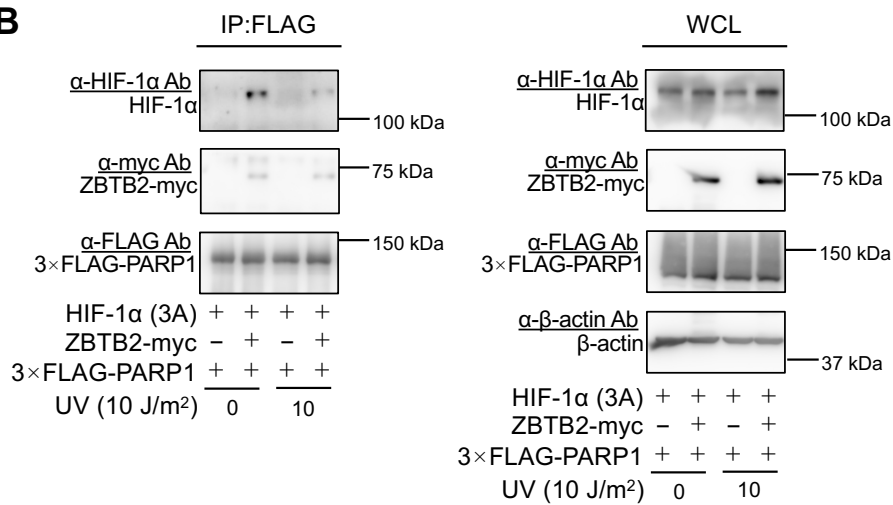
PARP1 は HIF-1 を介した低酸素応答と DDR の双方に働き、さらに Fig 4.3 の結果は、PARP1 の HIF-1 活性制御への参加が PARP1 の DDR における活性を減弱させることを示していた。つまり、ここまでの結果は、PARP1 が低酸素応答と DDR のどちらで機能するかは競合関係にあり、ZBTB2 や DNA 損傷がこの競合関係を制御していることを示唆する。そこで私は、本仮説をさらに評価することとした。具体的には、競合関係が成立した場合、DNA 損傷を加えた後に PARP1 が DDR で機能するときには、PARP1 の低酸素応答での役割が減弱するのではないかと新たな作業仮説 (Fig 4.4A)を考え、DNA 損傷誘導後の PARP1-HIF-1 α 複合体形成や HIF-1 活性を共免疫沈降と HIF-1 レポーターアッセイを用いて評価した。

まず、DNA 損傷誘導後の PARP1-HIF-1 α の複合体形成を共免疫沈降実験により評価した。HCT116 p53(-/-)細胞に、FLAG タグを融合した PARP1、HIF-1 α (3A)そして myc タグを融合した ZBTB2 を一過性過剰発現させ、共免疫沈降実験 6 時間前に細胞に紫外線 (10 J/m²)を照射し、その後抗 FLAG 抗体を用いて共免疫沈降実験を行った。その結果、ZBTB2 過剰発現により形成する PARP1-HIF-1 α の複合体形成は、DNA 損傷存在下では顕著に減弱することを見出した (Fig 4.4B)。なお、DNA 損傷の有無によらず ZBTB2 は PARP1 と複合体を形成していた。次に、DNA 損傷誘導後の HIF-1 活性を第三章で用いた二つの HIF-1 活性評価レポーターを用いて定量した。HCT116 p53(-/-)細胞へ ZBTB2 を一過性過剰発現させ、終夜培養後に UV で DNA 損傷を与え、その後 24 時間後から低酸素培養を開始して、さらに 24 時間後にレポーターアッセイを実施した。その結果、DNA 損傷非存在下で ZBTB2 過剰発現により亢進するレポーター活性は、DNA 損傷存在下で DNA 損傷量依存的に減少することを見出した (Fig 4.4D,E)。ここで、細胞への紫外線の照射は、ZBTB2 および内在性 HIF-1 α の発現量には著明な効果を与えず (Fig 4.4C)、DNA 損傷は ZBTB2 と PARP1 が持つ HIF-1 活性化活性を抑制している可能性を見出した。以上の結果は、DNA 損傷存在下では PARP1 が HIF-1 活性化よりむしろ DDR へ働くために HIF-1 の ZBTB2 依存的な低酸素誘導が減弱することを示し、PARP1 が低酸素応答と DDR のどちらで機能するかは競合関係にあることを示唆する。

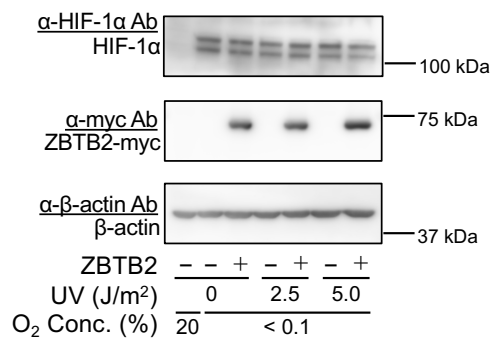
A 作業仮説



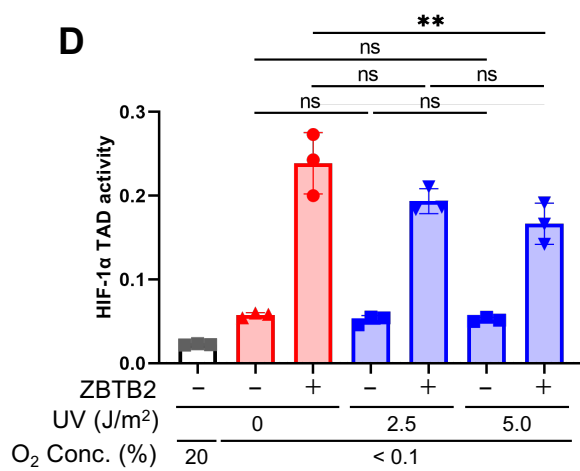
B



C



D



E

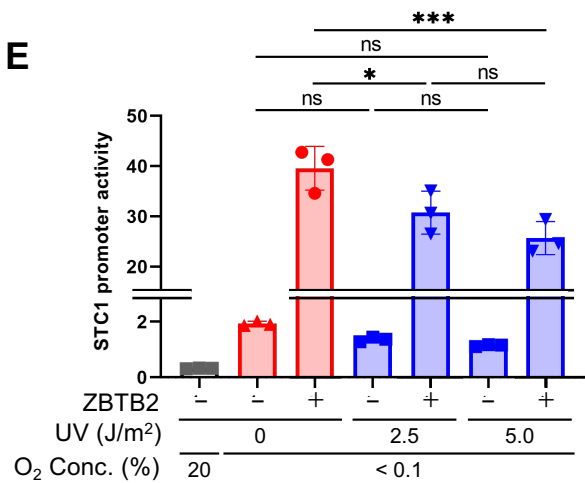


Fig 4.4. DNA 損傷存在下で PARP1 の HIF-1 活性制御への寄与は減弱する

A) ZBTB2 が PARP1 の役割に与える影響の作業仮説。B) HCT116 p53(-/-)細胞へ図中に示す過剰発現ベクターを導入後、共免疫沈降実験で PARP1 と HIF-1 α 間の複合体形成を検証した Western blotting。抗 FLAG 抗体による免疫沈降サンプル (左)、全細胞抽出液 (右)を図中に示す各抗体で検出した。C-E) HCT116 p53(-/-)細胞へ ZBTB2 過剰発現および UV 照射後、HIF-1 α TAD ルシフェラーゼアッセイ(D)および STC1 プロモータールシフェラーゼアッセイ (E)を行った HIF-1 活性定量実験。TK プロモーターの制御下で発現する Renilla ルシフェラーゼを内部標準として用いた。E の細胞抽出液について、図中に示す各抗体で各タンパク質発現を Western blotting で検出した (C)。平均値 $\pm$ s.d. (n = 3) *p $\leq$ 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, n.s. no significance

4-3. 低酸素シグネチャーの高い臨床腫瘍組織において ZBTB2 の腫瘍内発現量とゲノム変異蓄積量は相関する

最後に、作業仮説 (Fig 4.1A)に従って、ZBTB2 が低酸素下で PARP1 の DDR での活性を抑制した結果、ゲノム不安定性を引き起こしているか検討した。上述したように、PARP1 を介した DNA 損傷修復はゲノム恒常性の維持へ重要である。そこで私は、ZBTB2 によって低酸素下で PARP1 の DDR での活性が低下した場合、ゲノム不安定性が亢進して、偶発的に起こる DNA 損傷を正しく修復できず、DNA 損傷部位周辺に変異が蓄積するようになるのではないかと考えた。そこで、がん患者腫瘍検体中の一塩基置換 (SNPs)量をゲノム不安定性の指標にし、ZBTB2 がゲノム恒常性および不安定性へどのような影響を及ぼしているかを検証した。具体的には、TCGA データベース中の患者腫瘍組織中の一塩基置換 (SNPs)と RNA-seq データを活用した。まず、ZBTB2 が低酸素下でのみ PARP1 活性を抑制する結果を踏まえ、ZBTB2 および 16 の低酸素誘導性遺伝子の発現レベルをもとに患者集団を 4 集団へ分類した。低酸素誘導性遺伝子群の発現が高い患者群を Hypoxia signature high、低い患者を Hypoxia signature low とし、その後 ZBTB2 高発現な患者および低発現な患者を分類した。その結果、胃がんおよび皮膚がんのデータセットにおいて、Hypoxia signature high かつ腫瘍内で ZBTB2 を高発現する患者集団では、SNPs が他の患者群と比較して有意に高いことを見出した (Fig 4.5A-D)。ZBTB2 が低酸素下で PARP1 活性を低下させることと合わせると、以上の結果は、ZBTB2 が低酸素下で PARP1 の DDR での活性を低下させることは、腫瘍組織におけるがん変異およびゲノム不安定性を亢進させることを示す。

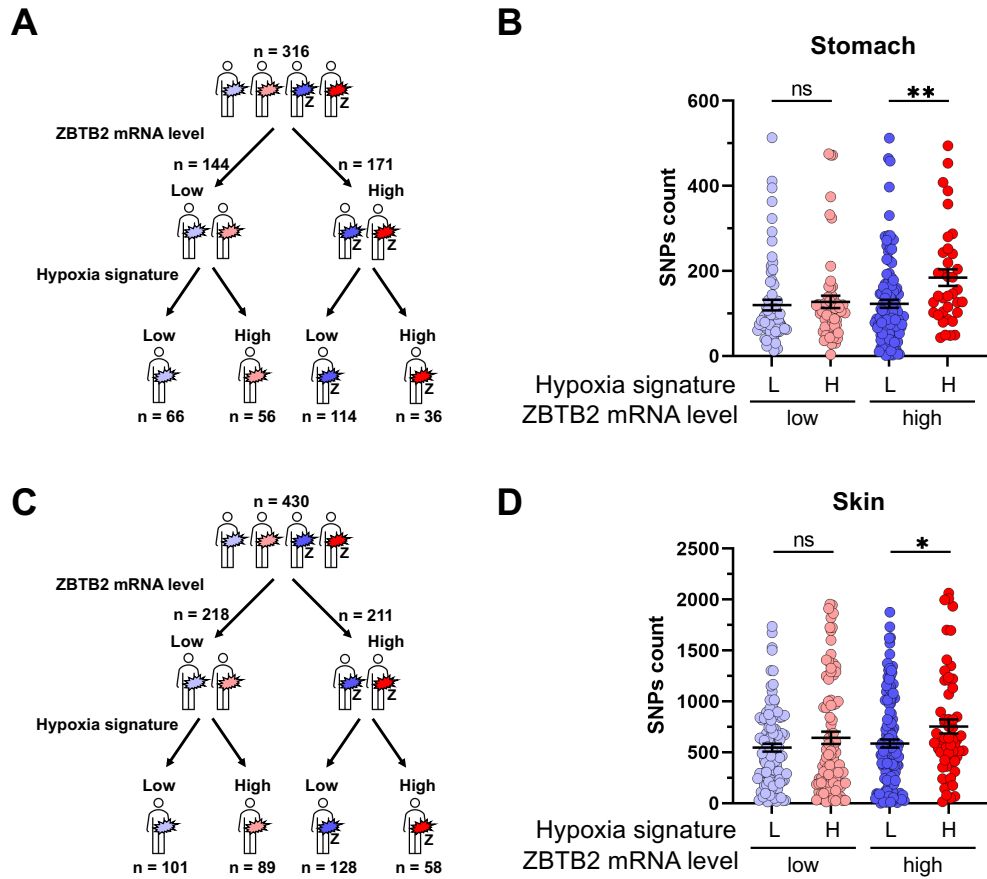


Fig 4.5. ZBTB2 は低酸素型腫瘍を呈する患者群でのがん変異蓄積へ関連する

A-D) TCGA データセットを用いた患者分類の概念図 (A,C)。胃がん患者 (B)、皮膚がん患者 (D) 集団におけるがん変異 (一塩基置換:SNPs) 量の定量。低酸素シグネチャーが低い低酸素画分の少ない腫瘍 (L)、低酸素シグネチャーが高い低酸素画分の多い腫瘍 (H)。平均値 $\pm$ s.e. * $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. no significance

第V章

考察

5-1. 第三章の要約と考察

第三章では、ZBTB2 が PARP1 と協調して働く HIF-1 活性化機構の解明を通じ、ZBTB2 による HIF-1 活性化を制御する因子として BTB-ZF ファミリーの一員である ZBTB7A が抑制的制御因子として働くことを見出した。具体的には、まず共免疫沈降と質量分析を組み合わせた解析やレポーターアッセイによって、ZBTB2 は PARP1 と複合体を形成して PARP1 と協調的に HIF-1 を活性化することを見出した (Fig 5.1A)。そして本結果を足がかりの一つとして、ZBTB2 による HIF-1 活性化を制御する因子を探索した結果、ZBTB7A を得た。共免疫沈降やスプリットルシフェラーゼ実験から ZBTB7A は ZBTB2 とヘテロ二量体を形成して ZBTB2 ホモ二量体形成を阻害することを確認した。さらに、HIF-1 活性レポーターアッセイや細胞増殖定量実験を行って、ZBTB7A は ZBTB2 ホモ二量体形成を阻害して、ZBTB2 による HIF-1 活性化を抑制的に制御することを見出した (Fig 5.1B)。TCGA 解析によると、ZBTB7A の低発現ががん患者の予後不良に相関し、以上の結果から ZBTB7A が ZBTB2 による HIF-1 活性化を抑制的に制御すること、この働きを以て ZBTB7A ががん抑制遺伝子として機能していることを見出した。

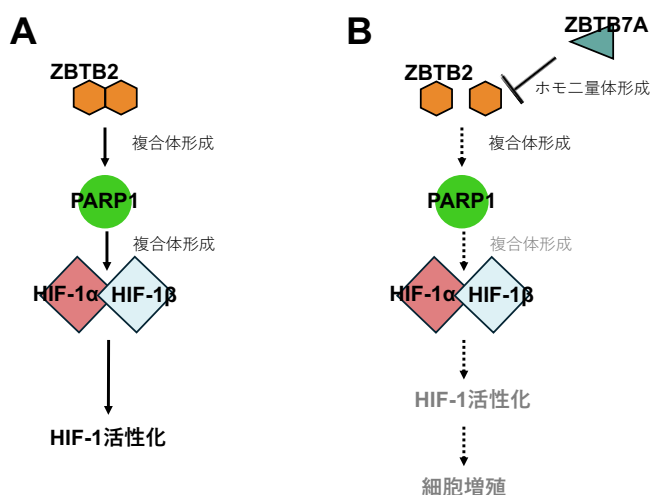


Fig 5.1. 第三章の要約

A) ZBTB2 による HIF-1 活性化機構の概略。B) ZBTB7A による ZBTB2-HIF-1 経路の活性制御機構の概略。

5-1.1 本研究の位置付け

三つの観点から本研究の位置付けを述べる。

一点目は、本研究で新たに ZBTB2 による HIF-1 活性化機構を解明し、同機構へ抑制的に働く因子を同定したことに関連する。本研究以前は、ZBTB2 を HIF-1 活性化因子として同定したものの、ZBTB2 による HIF-1 活性化がどのように制御されているかは完全には明らかでなかった。この課題に対して本研究では、PARP1 が関与する HIF-1 活性化機構を解明し、さらに ZBTB7A を ZBTB2 による HIF-1 活性化を抑制的に制御する因子として同定して解決した。この発見は ZBTB7A をがん治療開発へ活用できるかという展望も生み、本研究は課題解決と共に、治療応用を見据えた展望も提示するものとなった。

二点目は、本研究が示した BTB-ZF ファミリー因子である ZBTB7A がファミリー間でヘテロ二量体を形成し、これがホモ二量体として働く同一ファミリー因子の活性を抑制したことに関連する。本研究以前は、BTB-ZF ファミリー間のヘテロ二量体形成はホモ二量体形成に比べて稀であり、これまで報告されているヘテロ二量体形成も少なかった⁵⁷。この状況下で、本研究では ZBTB2 と ZBTB7A のヘテロ二量体形成を示し、ヘテロ二量体が形成された場合、ホモ二量体形成依存的に機能する ZBTB2 の HIF-1 活性化能を阻害しうることを示すものとなった。BTB-ZF ファミリー間の機能的相互作用について、更なる疑問と展望を提示するものとなった。

三点目は、本研究が示した ZBTB2 が PARP1 と協調して PARP1 の酵素活性非依存的に HIF-1 を活性化することに関連する。本研究以前は、PARP1 による HIF-1 活性化は PARP1 の酵素活性依存的である^{30,31}ことが報告されていた。本研究は、先行研究とは一貫せず酵素活性非依存的な働きを提示するものとなった。PARP1 の酵素活性非依存的な転写因子制御はこれまでも報告されており⁵²⁻⁵⁵、本研究はこれに加わる形となった。しかし、先行研究との不一致点は議論の対象であると考えている。本研究は ZBTB2 と協調する際の PARP1 の働きに注目している点が先行研究と異なり、酵素活性非依存的作用が見えた可能性が挙げられる。未だ酵素活性非依存的な PARP1 の転写制御機構は明らかではないが、この点を解明する必要がある。

5-1.2 未到達点と展望

本研究の未到達点の一つは、ZBTB2 による HIF-1 活性化を抑制的に制御する因子として ZBTB7A を同定したものの、新規がん治療法として ZBTB7A を ZBTB2 による HIF-1 活性化抑制へ用いることができるかを確認する Proof-of-concept を取得できていない点にある。本研究では、ZBTB7A の過剰発現系を用いて、ZBTB7A の過剰発現が ZBTB2 のホモ二量体形成・ZBTB2 による HIF-1 活性化・低酸素下での細胞増殖を抑制することを *in vitro* 解析で示した。そのため、内在性 ZBTB7A が ZBTB2 を抑制するか否かについて、内在性の ZBTB7A のノックダウン条件下で ZBTB2 による HIF-1 活性化を評価する実験や、内在性 ZBTB7A の発現がどのように制御されているかを同定する実験を行う必要がある。加えて、ZBTB2 によって促進される腫瘍増殖を ZBTB7A が抑制できるかを *in vivo* 解析で検討する必要がある。ZBTB7A を過剰発現またはノックダウンした細胞をマウスに移植し、腫瘍増殖や腫瘍転移能を評価する必要がある。さらに、ZBTB7A が N 末端を介して ZBTB2 と複合体を形成することを踏まえると、治療応用に向けて ZBTB7A の N 末端の構造を模したペプチドを活用できないか検証する必要がある。細胞膜透過性の ZBTB7A の N 末端ペプチドを合成し、当該ペプチドが HIF-1 活性や腫瘍増殖へ与える影響について *in vitro* および *in vivo* 解析で検証する必要がある。これらの点を検証し、ZBTB2 による HIF-1 活性化を抑制する治療を開発することが、本研究が提示する大きな展望である。

さらに、ZBTB2 による HIF-1 活性化を制御する因子をゲノムワイドに探索できていないことも今後取り組むべき課題である。本研究では足がかりとして、BTB-ZF ファミリーが N 末端に相同性を有し ZBTB2 とヘテロ二量体を形成する可能性があることに注目し、全 BTB-ZF ファミリー遺伝子と ZBTB2 の N 末端の間の相同性をペプチドアラインメント解析によって評価して (Table 3.4)、

ZBTB7A に注目した。これは、先行研究から ZBTB7A ホモ二量体形成や ZBTB7A と DNA 損傷修復因子との相互作用も報告されており、さらに ZBTB2 と ZBTB7A のホモ二量体形成に重要な疎水性アミノ酸残基に相同性があり両者がヘテロ二量体を形成する可能性が高いと考えたためである。そのため、本研究で評価していない未評価の Table 3.3 および Table 3.4 に同定された因子群は ZBTB2 阻害因子あるいは活性化因子として機能する可能性がある。特に、Table 3.4 の 1 位・2 位・26 位・48 位に位置する ZBTB25・ZBTB49・ZBTB42・ZBTB28 らの因子は、ZBTB2 とヘテロ二量体を形成することが報告されておりこれらの因子が ZBTB2 阻害因子として働く可能性は非常に高い。これらの因子群の検討や、網羅的スクリーニングを通じた ZBTB2 による HIF-1 活性化を制御する因子の探索が ZBTB2 が受ける制御機構を更なる解明につながると考える。

最後に、本研究では病的ながんを対象に ZBTB7A が ZBTB2 に及ぼす影響を評価したため、転じて、ZBTB2 が ZBTB7A へ及ぼす影響や生理的条件下での ZBTB2-ZBTB7A ヘテロ二量体の役割については未だ検討の余地がある。例えば、ZBTB7A は発生段階で胎児型ヘモグロビンから成人型ヘモグロビンへ発現が切り替わるヘモグロビンスイッチ反応や免疫細胞の分化や骨形成に関わると報告されている⁶⁴⁻⁶⁶。がん治療として ZBTB7A を活用する場合、正常組織に与える影響を考慮する必要があり、正常組織で ZBTB2-ZBTB7A ヘテロ二量体形成がどのような役割を持つかは新たな検討材料である。

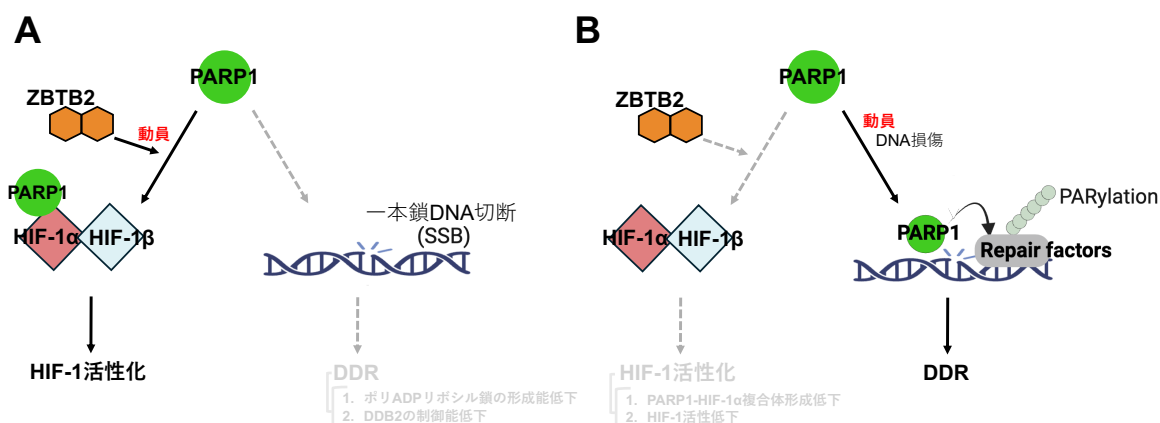
5-1.3 がん抑制遺伝子としての ZBTB7A の働きについて

本研究では、Fig 3.9 で患者腫瘍組織における ZBTB7A の低発現ががん患者の予後不良に相関すること、Fig 3.10 で ZBTB7A の低発現とがん患者の予後不良との相関は ZBTB2 低発現な患者群で強いことを示した。しかし、ZBTB7A がどのようにがん抑制遺伝子として機能しているかは未だ検討の余地がある。この理由の一つは、ZBTB7A の低発現とがん患者の予後不良との相関が、TCGA 解析を実施した 11 種の癌種のうち 2 種の腎臓癌と胃癌でのみ統計的に有意に観察されたことにある。さらに、がんにおける ZBTB7A の働きについては相反する報告がなされている。例えば、ZBTB7A は元来 ARF-MDM2-p53 経路を抑制して骨髄腫発生に関わるがん悪性因子として報告されており⁶⁷、近年でもいくつかの癌種で ZBTB7A の高発現が報告されている^{68,69}。一方で、前立腺癌や骨肉腫では ZBTB7A は SOX9 を抑制してがん抑制遺伝子として働くという報告^{70,71}や、急性骨髄腫患者で ZBTB7A 機能喪失変異が観察される⁷²ことも報告されている。よって、なぜ本研究で腎臓癌と胃癌でのみ有意な差が検出されたかは議論と更なる研究を要する。一つの可能性は、腎臓癌では多くの患者が HIF-1 α の分解に寄与する VHL や TCEB1 遺伝子に機能喪失変異を持つ⁷³ことにあると考えている。一般に腫瘍の酸素状態はがん患者間で大きく異なるため、低酸素環境が促進する腫瘍悪性化を評価する上で、TCGA 解析は患者腫瘍の酸素状態を考慮に入れることが難しく完全ではない。一方で、腎臓癌の患者集団においてはその大多数が VHL や TCEB1 に変異を有する HIF-1 が活性化した腫瘍であり、HIF-1 が促進する腫瘍悪性化を TCGA 解析によっても容易に評価できたと考える。そのため、ZBTB7A のコンテキスト依存的な機能の解明には、腫瘍の酸素状態を考慮に入れることが重要だと考えている。

さらに、ZBTB7A が ZBTB2 ホモ二量体形成の阻害を介してがん抑制遺伝子として機能していると仮定すると、ZBTB2 低発現な患者群で ZBTB7A がより強く機能していることを示唆する Fig 3.10 の結果も議論を要する。この結果は、ZBTB7A が ZBTB2 ホモ二量体形成非依存的にがん抑制遺伝子として働いているとも考えられるためである。しかし一方で、Fig 3.6D や Fig 3.7 の結果は ZBTB7A による ZBTB2 阻害効果が限定的であることを示しており、故に、ZBTB7A は ZBTB2 高発現な状況では ZBTB2 を十分に阻害できないとも考えられる。この仮説に迫るには、表面プラズモン共鳴解析を行なって ZBTB2 ホモ二量体形成の形成と解離の動態やその動態へ ZBTB7A が与える影響について詳しく解析する必要があると考える。

5-2. 第四章の要約と考察

第四章では、ZBTB2 による HIF-1 活性化が低酸素環境下で果たす役割を検討した。具体的には、PARP1 が DDR の中心的因子であることを踏まえ、ZBTB2 が PARP1 を HIF-1 活性化へ動員した時に、PARP1 の DDR における活性が変化し、以て ZBTB2 が低酸素環境下で何らの役割を果たすのではないかと仮説を立て、これを検証した。まず、DNA 損傷後の PARP1 のポリ ADP リボース鎖形成能や下流因子 DDB2 の制御能に対して ZBTB2 が与える影響を検討し、ZBTB2 が低酸素下で PARP1 を HIF-1 活性化へ動員し、PARP1 の DDR における活性を減弱させることを見出した (Fig 5.2A)。次に、DNA 損傷存在下では ZBTB2 が PARP1 と行う HIF-1 活性化が減弱することから、逆に PARP1 が DDR へ動員されるときには PARP1 が行う HIF-1 活性の増強が減弱することを見出した (Fig 5.2B)。以上の結果から、PARP1 は低酸素応答と DDR の双方に寄与するが、どちらかの応答に参加するときにはもう一方の応答への参加が低下するというモデル (Fig 5.2A,B)を打ち立てた。さらに最後に本研究では、TCGA 解析によって腫瘍検体中の SNPs を定量して、DDR 活性低下を引き金に誘導されるゲノム不安定性に ZBTB2 が関与するか検証した。その結果、ZBTB2 による PARP1 抑制が腫瘍組織においてゲノム不安定性を亢進させることを明らかにした (Fig 5.2C)。以上の結果から、PARP1 が持つ低酸素応答と DDR における役割が競合関係にあるというモデルと、ZBTB2 が上述の競合関係を制御することを通じて、低酸素環境下でゲノム不安定性を亢進させる役割を持つことを示した。



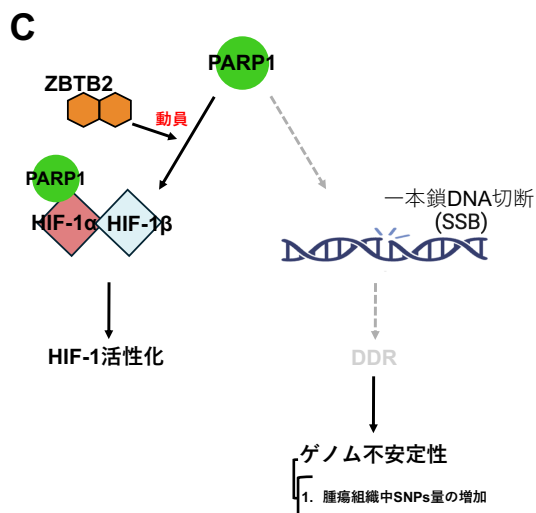


Fig 5.2. 第四章の要約

A-C) ZBTB2 および DNA 損傷による PARP1 制御機構の概略図。A) ZBTB2 は PARP1 を HIF-1 活性制御へ動員し、PARP1 の DDR における活性を低下させる。B) DNA 損傷存在下で PARP1 は DNA 損傷応答に動員されると、PARP1 の HIF-1 活性制御への寄与が低下する。C) ZBTB2 は PARP1 を HIF-1 活性制御へ動員し、PARP1 の DDR における活性を低下させ、ゲノム不安定性を誘導する。

5-2.1 本研究の位置付け

三つの観点から本研究の位置付けを述べる。

一点目は、本研究が新たに発見した ZBTB2 の機能、すなわち低酸素環境下で PARP1 の DDR への寄与を抑制する機能を示したことに関連する。本研究以前は、患者臨床検体を用いた臨床研究や ZBTB2 を安定的に過剰発現する細胞をマウスに移植して行う Xenograft 実験において、ZBTB2 が腫瘍悪性化を促進することを見出していた。しかし、腫瘍悪性化に対して ZBTB2 による HIF-1 活性化に伴う HIF-1 下流遺伝子群の発現亢進が重要なのか、もしくは ZBTB2 が何か別の役割を果たしているかは未だ不明であった。本研究では、ZBTB2 が HIF-1 を活性化するとき、ZBTB2 は PARP1 を HIF-1 活性制御へ動員する反面、DDR における PARP1 活性を低下させて、ゲノム不安定性を亢進させることを見出した。一般に、ゲノム不安定性の亢進はがんの悪性形質の一つであり、がん進展過程で多様なクローン進化を生じさせて腫瘍の不均一性を増大させる要因であると考えられている⁷⁹。つまり、ZBTB2 が促進する腫瘍悪性化においては、ZBTB2 による HIF-1 下流遺伝子群の発現亢進のみならず、ゲノム不安定性亢進を伴った腫瘍不均一性の増大が重要である可能性がある。実際に *in vitro* や *in vivo* 実験で ZBTB2 が上述したようなクローン進化を誘導するか検証する必要があるが、要約すると、本研究は ZBTB2 の新たな役割として低酸素環境下で ZBTB2 がゲノム不安定性を亢進させて腫瘍悪性化を促進することを解明するものとなった。

二点目は、本研究が示した PARP1 の低酸素応答での役割と DDR での役割が競合するモデルに関連する。本研究以前は、PARP1 がいくつかの転写因子の制御因子として働くことが示されていたが、PARP1 の転写制御における役割と DDR における二面的役割がどのように結びついているかは明らかでなかった。本研究では、PARP1 が持つ二面的役割が競合関係にあることを示すも

のとなった。同様の傾向は、PARP1 による Wnt シグナル制御に着目した先行研究からも示唆されており³⁹、本研究はより具体的に PARP1 の二面的役割が競合関係にあることを示すものとなった。さらに、本研究では、PARP1 が持つ役割が競合関係にある結果、PARP1 が転写制御に参加する反面で腫瘍の悪性形質であるゲノム不安定性が誘導されることを示し、PARP1 が二面的役割を持つことが腫瘍進展へ重要である可能性を示唆した。PARP1 研究において PARP1 の転写因子制御における役割と DDR における役割の関連性を検証する必要性を提示するものとなった。

三点目は、本研究が示した ZBTB2 が DDR における PARP1 活性を抑制的に制御することに関連する。PARP1 は DNA 損傷時に DNA 損傷部位で様々な損傷修復エフェクター因子をポリ ADP リボシル化修飾して損傷修復を促進させる酵素である。本研究以前は、いくつかの因子が PARP1 と複合体を形成して PARP1 の活性化因子として働いて DNA 損傷修復を促進し⁷⁴⁻⁷⁷、その中でも Phosphatase 1 Nuclear Targeting Subunit (PNUTS)や Tumor Susceptibility Gene 101 (TSG101)はがん細胞の DNA 損傷への耐性に寄与して腫瘍悪性を促進していることが報告されていた^{75,77}。一方で PARP1 阻害因子としては B-cell/CLL lymphoma 2 (BCL2)が一つ報告されていた⁷⁸。本研究は、ZBTB2 を新たに PARP1 阻害因子とし、腫瘍悪性化過程における重要性を提示するものとなった。しかし一方で、PARP1 活性化因子の先行研究と同様に、本研究で PARP1 阻害因子を腫瘍悪性化因子として提示した点は、議論を要する。先行研究が提示するように DNA 損傷ストレスへの耐性を考えると、ZBTB2 によって PARP1 活性が低下している細胞は DNA 損傷ストレスへ感受性となることが期待されるためである。本研究では、ZBTB2 によって PARP1 活性が低下している細胞では、ゲノム不安定性が亢進して、がん進展過程で多様なクローン進化が起こり腫瘍の不均一性を増大させていると考察しているものの更なる検証が必要である。以上から本研究は、新たに PARP1 を抑制的に制御する因子を報告したものとなり、そして、その役割や腫瘍悪性化への寄与を解明する課題と重要性を提示するものとなった。

5-2.2 未到達点

本研究の未到達点は、ZBTB2 が促進する「DDR で働く因子を低酸素応答に動員した結果、細胞のゲノム不安定性を向上させて変異獲得を誘導する」機構をなぜ生体が有するかという生物学的意義を解明できていない点である。ゲノム不安定性の亢進は発がんを促進するものであると共に、低酸素環境は生理的には主に骨髄などのゲノム恒常性維持が最も重要な幹細胞が存在する領域に生じるものである。故に、生体恒常性維持の観点からは、ZBTB2 が促進するゲノム不安定性の亢進は生理的環境下では避けられるべきであると考えられる。そのため本研究では、がん細胞で ZBTB2 を介したゲノム不安定性の亢進がクローン進化につながり腫瘍悪性を促進すると示唆したが、生理的条件下で本機構がどのようにいつ働いているかは大きな疑問であり、更なる研究を要する。ただ一方で、ZBTB2 による HIF-1 活性化が p53 活性化条件で起こらない⁴⁷ように、本研究で私は、ZBTB2 による PARP1 の DDR 活性抑制も p53 活性化条件下では起こらないことを確認している (Fig S2.1A-C)。この結果は、p53 を活性化できる正常細胞では ZBTB2 によるゲノム不安定性亢進現象は起こらない可能性を示唆している。もしくは BTB-ZF ファミリー因子群の多くが

免疫細胞で機能を有すること⁴¹や、B 細胞の免疫グロブリン遺伝子の再構成が起こる胚中心が低酸素環境である^{73,74}という報告を踏まえると、ZBTB2 が促進するゲノム不安定性亢進が B 細胞体細胞突然変異過程で抗体レパートリーの増大に寄与している可能性もあると考えている。これまでに先行の報告で、低酸素環境が免疫グロブリン遺伝子のクラススイッチ組み換えを制御する^{85,86}ことや、マウス組織間の ZBTB2mRNA 発現定量から ZBTB2 が二次リンパ組織である脾臓で高発現すること⁴²も示されている。これらの可能性を検証するためには、ZBTB2 の KO マウスを樹立したのちに、表現型を解析する必要がある。

また、第三章で ZBTB2 による HIF-1 活性化を抑制する因子として同定した ZBTB7A が、PARP1 の DDR 活性やゲノム不安定性に関与するかを解明できていない点も未到達点である。第三章の結果を踏まえると、ZBTB7A は ZBTB2 が PARP1 を低酸素応答へ動員することを抑制すると期待される。*in vitro* で低酸素下で ZBTB7A を一過性過剰発現させたときに、UV 照射後に PARP1 が形成するポリ ADP リボシル量を定量する実験や、ZBTB7A の腫瘍内発現量と変異蓄積量の関連性を検証するような TCGA 解析を実施する必要がある。

さらに、臨床でがん患者で報告されている ZBTB2 の変異と本研究の知見との関わりを解明できていない点も未到達点である。具体的には、これまでの研究でゲノム不安定なマイクロサテライト不安定性型大腸がん患者において、ZBTB2 の ZF1 ドメイン中の 261 位のアルギニン残基や 262 位のシステイン残基に高頻度に変異が観察されることが報告されている⁸⁷。がん患者でなぜ変異が高頻度に観察されるのかにアプローチするため、変異体 ZBTB2 が UV 照射後の PARP1 のポリ ADP リボシル形成能やゲノム不安定性に与える影響を、本研究の結果を踏まえた上で評価する必要がある。

5-2.3 治療応用への展望

本研究による展望は、ZBTB2 によって HIF-1 が活性化した腫瘍でゲノム不安定性が亢進していることを治療応用できないかという点にある。本研究では、PARP1 の活性評価実験や TCGA 解析を用いたゲノム不安定性の定量を通じて、低酸素下で ZBTB2 が PARP1 を低酸素応答へ動員すると PARP1 の DDR での活性が低下し、これが腫瘍組織におけるゲノム不安定性亢進に寄与する可能性を示した。ここで、近年注目されているゲノム不安定性を標的としたがん治療を踏まえると、本研究の知見から ZBTB2 によって HIF-1 が活性化した腫瘍への治療法を開発できないかという点は大きな展望である。例えば、近年はゲノム不安定性が亢進した腫瘍でがんネオ抗原が増加し、さらに DNA 損傷修復不全に伴って形成される微小核依存的な cGAS-STING 経路や IFN シグナル応答を活性化した結果、DNA 損傷修復応答が破綻した細胞に免疫チェックポイント阻害剤が奏功する可能性が注目されている⁸⁰⁻⁸²。さらに、DNA 損傷修復応答関連遺伝子群の欠損が同治療への効果予測に応用できる可能性が示唆されている^{83,84}。これらの知見を踏まえると、ZBTB2 を高発現する腫瘍に免疫チェックポイント阻害剤が奏功する可能性や ZBTB2 の腫瘍内発現度が免疫チェックポイント治療効果を予測するバイオマーカーとなる可能性がある。免疫系が確立されたマウスへ ZBTB2 低発現な腫瘍と高発現な腫瘍を移植し、免疫チェックポイント阻害剤を投与した後

の腫瘍増殖や腫瘍組織に浸潤する免疫細胞の量や活性化状態を定量し、治療コンセプトやバイオマーカーとしての有用性を検証する必要性が考えられる。

5-3. 要約と今後の展望

本研究では、ZBTB2によるHIF-1活性化がどのような制御を受けているかや、ZBTB2によるHIF-1活性化が低酸素環境下で果たす役割の検証を目的として行った。そして、ZBTB2とPARP1が協調して働くHIF-1活性化機構をZBTB7Aが抑制的に制御していることを見出した。さらに、ZBTB2によってHIF-1が活性化した腫瘍でDDR活性が低下してゲノム不安定性が亢進していることを示し、ゲノム不安定性はがんの悪性形質の一つであることから、ZBTB2が低酸素環境下でゲノム不安定性を亢進させて腫瘍悪性化を促進しているという役割を見出した。さらに、分子生物学的な発見としてDDRにおいて重要な因子であるPARP1のDDRと低酸素応答における役割が競合関係にあり、ZBTB2やDNA損傷が同競合関係への決定因子として働きうることも示した。今後は、上述した研究成果をがん治療へ応用することが展望であり、さらにZBTB2が腫瘍低酸素で果たす役割が生理的にはいつ、どのようなときに働いてどのような役割を持つか解明することが展望であると考え、本論文を結ぶ。

VI. 補足資料

6-1. ZBTB2 が HIF-1 を活性化して発現を誘導する HIF-1 下流遺伝子の同定、および ZBTB2 の HIF-1 活性化能を解析するレポーターアッセイ系の構築

当研究室に所属していた Chow 氏が行った研究で、ZBTB2 は HIF-1 を活性化すると特定のサブセットの HIF-1 下流遺伝子群の発現を誘導することが明らかにされた⁴⁸。本研究では、これらの知見を踏まえ、ZBTB2 による HIF-1 活性化 (ZBTB2-HIF-1 経路)を詳細に評価するための ZBTB2-HIF-1 経路下流遺伝子の同定と、当該遺伝子のプロモーター領域を活用したレポーターアッセイ系の構築を行った。この理由は、以前までの研究で使用していた HIF-1 α Trans-activation domain (TAD [531 aa ~ 826 aa])を活用したルシフェラーゼレポーター (Fig 2.1)では、ZBTB2 による HIF-1 活性化が引き起こすレポーター発光の誘導比が 3 倍程度と低かったためである。ZBTB2-HIF-1 経路制御下にある遺伝子をまず同定し、当該遺伝子の内在性のプロモーター領域を用いて、誘導比の問題解決を試みた。

まず下流遺伝子同定を行うため、子安氏から譲渡を受けた、cDNA マイクロアレイの結果 (HCT116 p53^{-/-}細胞に EV あるいは ZBTB2 過剰発現プラスミドをトランスフェクトし、通常酸素下及び低酸素下で 24 時間培養したもの)を活用した。はじめに、低酸素下での ZBTB2 過剰発現と低酸素下での EV 過剰発現を比較し、ZBTB2 過剰発現が EV 過剰発現に比較して 2 倍以上の遺伝子発現を誘導する遺伝子を抽出した。なおここで、マイクロアレイ解析で生じる PCR バイアス問題が考慮されたため、2 倍以上の誘導比が遺伝子ごとに複数のプローブで確認できるかを判定し、575 の遺伝子を単離した。次に、低酸素依存性を検討した。通常酸素下での ZBTB2 過剰発現と通常酸素下での EV 過剰発現を比較し、ZBTB2 過剰発現が EV 過剰発現に比較して 2 倍以上の遺伝子発現を誘導する遺伝子を確認し、これらの遺伝子は HIF-1 下流遺伝子でない可能性があるため 575 の遺伝子リストから除外し、296 の遺伝子抽出した。さらに、低酸素 EV と通常酸素 EV を比較し、低酸素刺激による発現誘導比が 0.5 倍以下の遺伝子も、HIF-1 下流遺伝子でない可能性があるため除外し、最終的に 34 の遺伝子を抽出した。34 の遺伝子について、低酸素下での ZBTB2 過剰発現と低酸素下での EV 過剰発現を比較し、ZBTB2 過剰発現が EV 過剰発現に比較して最も遺伝子発現を誘導したプローブを代表値として、以下の (Table S1.1)へ示す。最後に、これらの遺伝子群の発現を qRT-PCR によって確認した。なお、本実験では ZBTB2 による HIF-1 活性化が p53 存在下で抑制されることを踏まえ、p53 からの影響を考慮した。HCT116 p53^{-/-}細胞へ、ZBTB2 または p53 もしくは双方を一過性過剰発現させ、通常酸素および低酸素培養後に qRT-PCR によって遺伝子発現を定量した。その結果、Stanninocalcin-1 (STC1)・Paired box-8 (PAX8)の発現は、低酸素刺激により亢進し、そして ZBTB2 過剰発現によってその低酸素刺激依存的発現亢進が顕著に増強されることを見出した (Fig S1.1A,B)。また、ZBTB2 過剰発現による発現亢進は p53 存在下では観察されず、二遺伝子が ZBTB2-HIF-1 経路活性と一貫した発現誘導パターンを示すことを見出した。以上の結果から STC1 および PAX8 を ZBTB2 が HIF-1 を活性化して発現を誘導する HIF-1 下流遺伝子として同定した。

続いて、STC1 遺伝子のプロモーター領域の中で ZBTB2-HIF-1 経路からの制御を受ける領域の同定に移行した。プロモーター領域内には HIF-1 α が結合する低酸素応答領域 Hypoxia responsive element (HRE)の存在が予想される。そこで、STC1 プロモーター-3000 bp から+2000 bp (転写開始点を+1 とする)の領域に存在する HRE を、転写因子の結合部位を予測するオープンアクセスデータベースである JASPAR (<https://jaspar.genereg.net>)を用いて推定した (Table S1.2)。遺伝子構造を Fig S1.2A へ示す。その後、最もスコアの高い HRE を含むプロモーター領域 (+560 bp ~ +1645 bp)を pGL4.23_luc2 プラスミドの最小限プロモーターとルシフェラーゼ構造遺伝子 (luc2 CDS)の上流に組み込み、プロモーター活性をルシフェラーゼアッセイにより評価した。その結果、STC1 プロモーター活性は、遺伝子発現と一貫した挙動を示し、同プロモーター領域が ZBTB2-HIF-1 経路から制御を受ける可能性を見出した (Fig S1.2B)。さらに、上記で見出した低酸素応答性が HIF-1 依存的か否かを検証した。プロモーター領域内の HRE に変異を導入、もしくは HeLa 細胞で HIF-1 β (ARNT)を KO した細胞を用いて HIF-1 機能喪失下でプロモーター活性を評価した。その結果、プロモーター活性の低酸素および低酸素下 ZBTB2 応答性は、HRE 変異及び HIF-1 β (-/-)細胞で完全に消失した (Fig S1.3A,B)。なお、HIF-1 β (-/-)および ZBTB2 過剰発現の成立については Fig S1.3C で確認した。さらに、HIF-1 α 過剰発現系を用いた HIF-1 機能獲得下での検討も実施した。HIF-1 α 恒常活性化変異体 HIF-1 α (3A)を用いて実験を行い、その結果、レポーター活性は HIF-1 α (3A)変異体の過剰発現により亢進し、さらに ZBTB2 を共発現させることで顕著に亢進することが確認された (Fig S1.3D)。これらの結果から、STC1 プロモーター領域 (+560 bp ~ +1645 bp)から構築したレポーターは ZBTB2-HIF-1 経路活性を鋭敏に反映することを見出した。

Table S1.1. マイクロアレイ解析により抽出した 34 の候補 ZBTB2-HIF-経路下流遺伝子

Gene	probe	A : N_EV	B : N_ZBTB2	C : H_EV	D : H_ZBTB2	D/C	B/A	C/A
ZNF771	219780_at	1.3410528	1.7721866	1	13.04232	13.04232	1.32148906	0.74568279
PARP15	1553380_at	1.8248757	1.9222466	1	11.460415	11.460415	1.05335755	0.54798253
LOC100287728///ZNF75D	230583_s_at	2.8745685	1.6448748	2.7311714	25.432432	9.31191356	0.57221625	0.95011526
TDH	1553494_at	1.3215379	1.503708	1	7.8986096	7.8986096	1.13784705	0.75669415
ADAMTS18	242823_at	3.34221	5.6488414	4.3381877	28.23558	6.50861188	1.69015155	1.29799974
ADAMTSL1	237217_at	1	1	1	6.47909	6.47909	1	1
TBX3	228344_s_at	4.2880898	4.453873	4.457735	28.44254	6.38049144	1.03866132	1.03956195
A2M	217757_at	5.3406835	3.931126	3.145177	19.951815	6.34362231	0.7360717	0.58890908
STC1	204597_x_at	7.9055476	1.1212994	32.73944	203.0186	6.2010407	0.14183703	4.14132476
TPSAB1///TPSB2	217023_x_at	6.5261765	6.985935	9.008748	54.610023	6.06188818	1.07044837	1.38040214
CDHR1	213369_at	2.5493133	2.2226837	1.7698525	10.4414215	5.89959983	0.87187546	0.69424676
PAX8	221990_at	8.351621	12.992862	6.745881	38.080875	5.64505585	1.55572936	0.80773313
MMAB	242082_at	13.432848	10.300394	14.765473	79.93118	5.41338432	0.76680641	1.09920644
EMCN	222885_at	3.218948	2.4934847	5.1755953	27.251122	5.26531161	0.77462721	1.60785303
GUCY1A3	239580_at	1	1	1	4.4371047	4.4371047	1	1
HLA-DRB4	215666_at	1	1.0807478	4.89137	20.737494	4.23960854	1.0807478	4.89137
PIH2	234426_x_at	10.436833	1	5.232683	21.157234	4.04328602	0.09581451	0.50136694
FOLR2	229619_at	6.8965406	5.358238	5.4744644	21.556536	3.93765206	0.77694576	0.79379862
RAB7B	553982_a_at	8.702867	15.85233	8.565837	32.529026	3.79753035	1.82150664	0.98425461
PDE6B	1557777_at	32.17185	20.795685	19.798685	71.99491	3.63634807	0.64639382	0.61540399
COL4A4	214602_at	3.8701055	3.9802563	10.164236	35.895714	3.5315703	1.02846196	2.62634597
CLIC5	234329_at	1.9012358	1.5466986	1.9406378	6.82925	3.51907502	0.81352276	1.02072442
MYOZ3	213955_at	6.4414554	5.5136495	8.272098	28.98579	3.50404335	0.85596331	1.28419705
DKFZp547J222	234771_at	2.7993786	2.2830267	1.9940695	6.563648	3.29158437	0.81554767	0.71232576
ATP13A4	559571_a_at	4.321466	4.992703	4.359402	11.1594925	2.55986773	1.15532622	1.0087785
ANKS1B	219989_s_at	1	1.4700568	3.874966	9.838412	2.53896731	1.4700568	3.874966
N4BP2L1	214887_at	1.2127752	1	1	2.5040321	2.5040321	0.82455512	0.82455512
CD44	1565868_at	46.14331	32.450443	24.487392	60.649677	2.4767716	0.70325347	0.53068131
UNC13D	228350_at	4.173832	8.210626	2.7568605	6.6276503	2.40405719	1.96716734	0.66051065
UBXN10	238657_at	4.660329	8.78274	3.5218914	8.285044	2.35244165	1.8845751	0.75571733
C1orf61	222301_at	112.18826	105.95109	57.94642	134.59314	2.32271709	0.94440443	0.51651055
MGC39584	242822_at	23.009758	27.654251	22.750372	52.599316	2.31202004	1.20184884	0.98872713
DHRS2	214079_at	627.8331	1217.0396	405.08243	890.3201	2.1978739	1.93847632	0.64520719
KIAA0146	236284_at	20.14113	5.329815	10.239218	20.634153	2.0152079	0.26462343	0.50837356

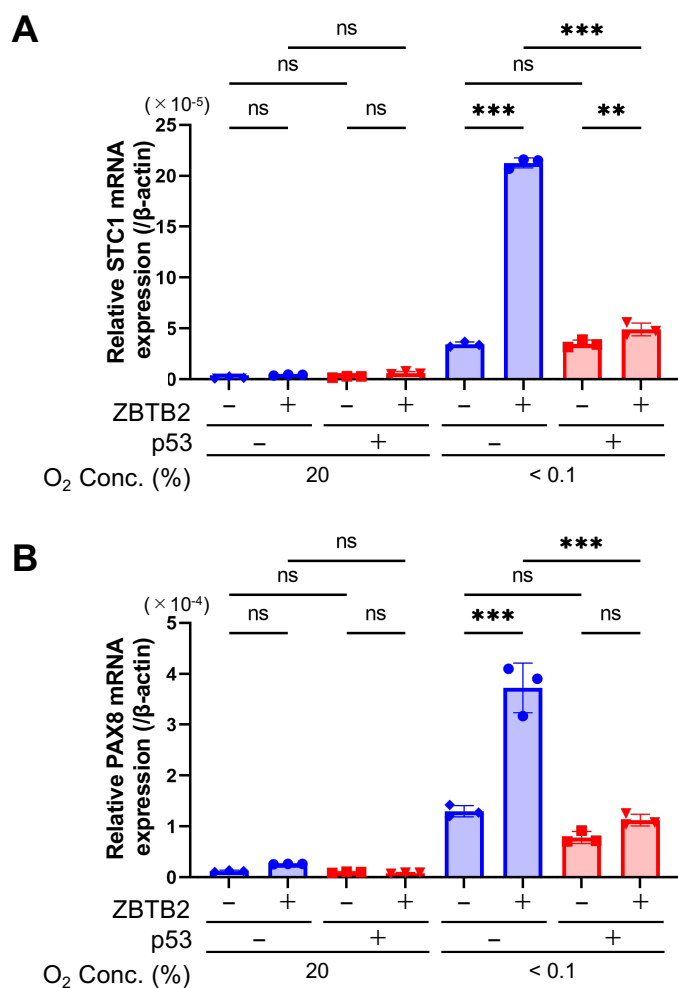


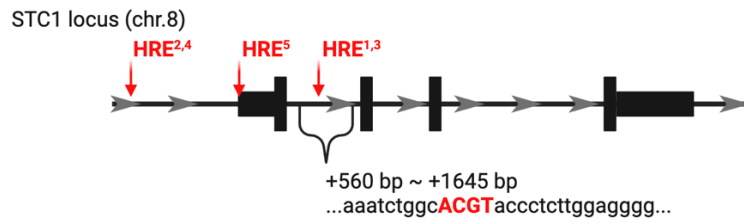
Fig S1.1. STC1 および PAX8 は ZBTB2-HIF-1 経路により発現制御を受ける

A-B) マイクロアレイ解析により得た候補下流遺伝子の検証。HCT116 p53(-/-)細胞へ図中に示すタンパク質発現ベクターを導入後、Stanninocalcin-1 (STC-1) (A)および Paired box-8 (PAX8) (B)の mRNA 発現を qRT-PCR によって定量した。平均値 ± s.d. (n = 3) **p < 0.01, ***p < 0.001, n.s. no significance

Table S1.2. STC1 遺伝子座における HIF-1α 結合部位 (HRE) の *in silico* 解析

Matrix ID	Name	Score	Relative score	start	Predicted sequence
MA1106.1	HIF1A	9.52969	0.916505469	662	GCACGTACCC
MA0259.1	ARNT::HIF1A	6.18132	0.850309249	-870	GTATGTGC
MA0259.1	ARNT::HIF1A	5.60164	0.833016036	662	GCACGTAC
MA1106.1	HIF1A	5.58145	0.823540703	-870	GTATGTGCAG
MA0259.1	ARNT::HIF1A	5.02466	0.815803124	15	AGAGGTGC

A



B

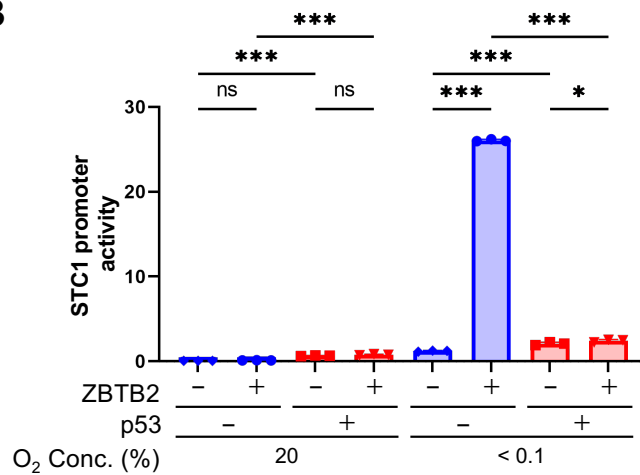


Fig S1.2. STC1 プロモーターは ZBTB2-HIF-1 経路により制御を受ける

A) STC1 遺伝子座の構造図。図中へ Table S1.2 の *in silico* 解析で同定した HIF-1 α 結合部位 (HRE) の予測位置を 1~5 に示す。レポータープラスミドへは、図中に配列を示す 1 位・3 位に順位する HRE (赤字) 周辺の領域 +560 bp ~ +1645 bp (転写開始点を+1 とする) を用いた。B) HCT116 p53(-/-) 細胞へ図中に示すタンパク質発現ベクターを導入後、STC1 遺伝子のプロモーター領域 (+560 bp ~ +1645 bp) のプロモーター活性をルシフェラーゼアッセイによって定量した。TK プロモーターの制御下で発現する Renilla ルシフェラーゼを内部標準として用いた。平均値 $\pm$ s.d. (n = 3) *p $\leq$ 0.05, ***p < 0.001, n.s. no significance

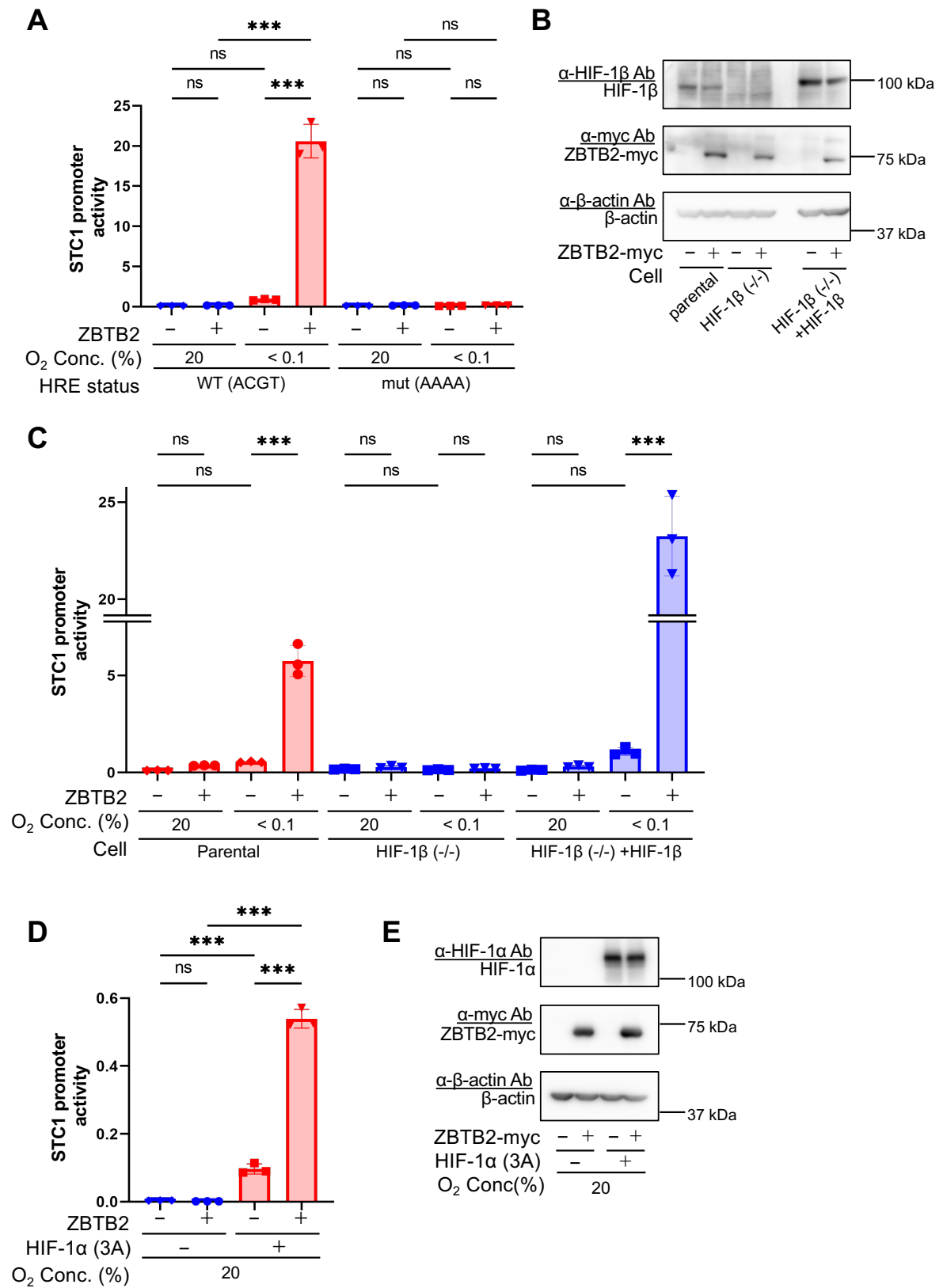


Fig S1.3. STC1 プロモーターは ZBTB2-HIF-1 経路により制御を受ける

A-E) STC1 プロモーターレポーター活性のルシフェラーゼアッセイ。HCT116 p53(-/-)細胞を用いてレポータープラスミド中 HRE へ変異導入 (A)、HeLa HIF-1 β (-/-)細胞 (B)を用いた HIF-1 α 機能喪失下、および HCT116 p53(-/-)細胞を用いて通常酸素下で HIF-1 α の恒常活性化変異体を過剰発現 (D)を用いた HIF-1 α 機能獲得下で ZBTB2 を過剰発現させ、STC1 プロモーターレポーター活性を定量した。TK プロモーターの制御下で発現する Renilla ルシフェラーゼを内部標準として用いた (A,B,D)。HeLa parental 細胞を陰性コントロールとして用いた (B,C)。細胞抽出液 B (C),D (E)について、図中に示す各抗体で各タンパク質発現を Western blotting で検出した。平均値 $\pm$ s.d. (n = 3) ***p < 0.001, n.s. no significance

6-2.がん抑制遺伝子 p53 と ZBTB2

当研究室・子安氏によって ZBTB2 による HIF-1 活性化は、がん抑制遺伝子 p53 の存在下では抑制されることが明らかであり、本研究でも DDR における PARP1 活性の抑制現象と p53 との相互作用を検証した。ここで、本研究で用いた U2OS 細胞は、ARF 遺伝子欠損によって MDM2 高活性状態にあり、p53 活性は低レベルに保たれている。そこで、MDM2 阻害剤の Nutlin-3a を細胞へ 10 μ M 処理し、当該条件下での PARP1 活性を免疫染色実験で評価した。その結果、WB の結果から Nutlin-3a 処理により p53 発現レベルが亢進し p53 の活性化を認める条件で (Fig S2.1A)、Nutlin-3a 処理下では ZBTB2 過剰発現による PARP1 活性低下が見られないことを見出した (Fig S2.1B)。さらに、PARP1 と HIF-1 α の複合体形成に p53 が与える影響も評価した。HCT116 p53(-/-)細胞と HCT116 p53(+/-)細胞に対して、FLAG タグを融合した PARP1、HIF-1 α (3A)そして myc タグを融合した ZBTB2 を一過性過剰発現させ、抗 FLAG 抗体を用いて共免疫沈降実験を行った。その結果、p53 を欠損する HCT116 p53(-/-)細胞では PARP1 に共沈する HIF-1 α の量(すなわち PARP1-HIF-1 α 複合体)は ZBTB2 の過剰発現により顕著に増加する一方で、p53 を有する HCT116 p53(+/-)細胞では ZBTB2 の過剰発現による PARP1-HIF-1 α 複合体の形成が顕著に減弱していることを見出した (Fig S2.1C)。以上の結果は、ZBTB2 による HIF-1 活性化と同様に、ZBTB2 による PARP1 制御に対しても、がん抑制遺伝子 p53 の存在下では抑制されることを示す。

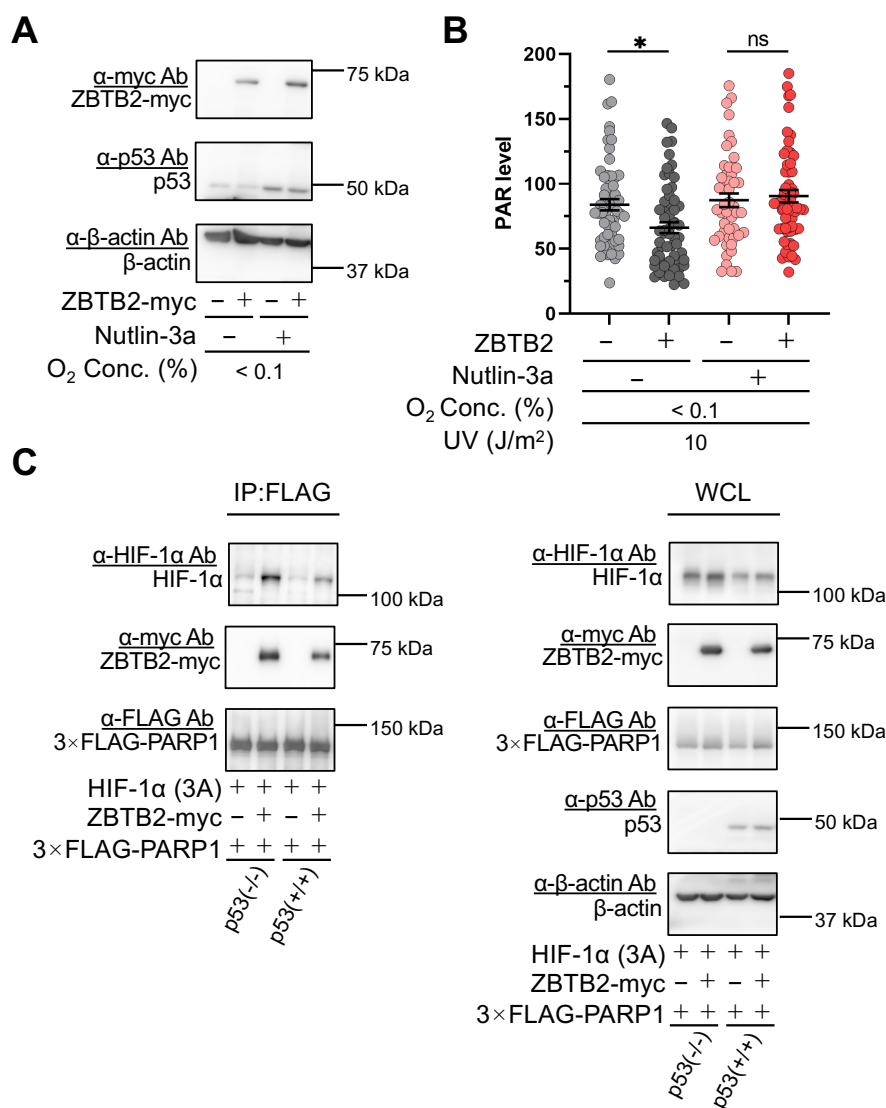
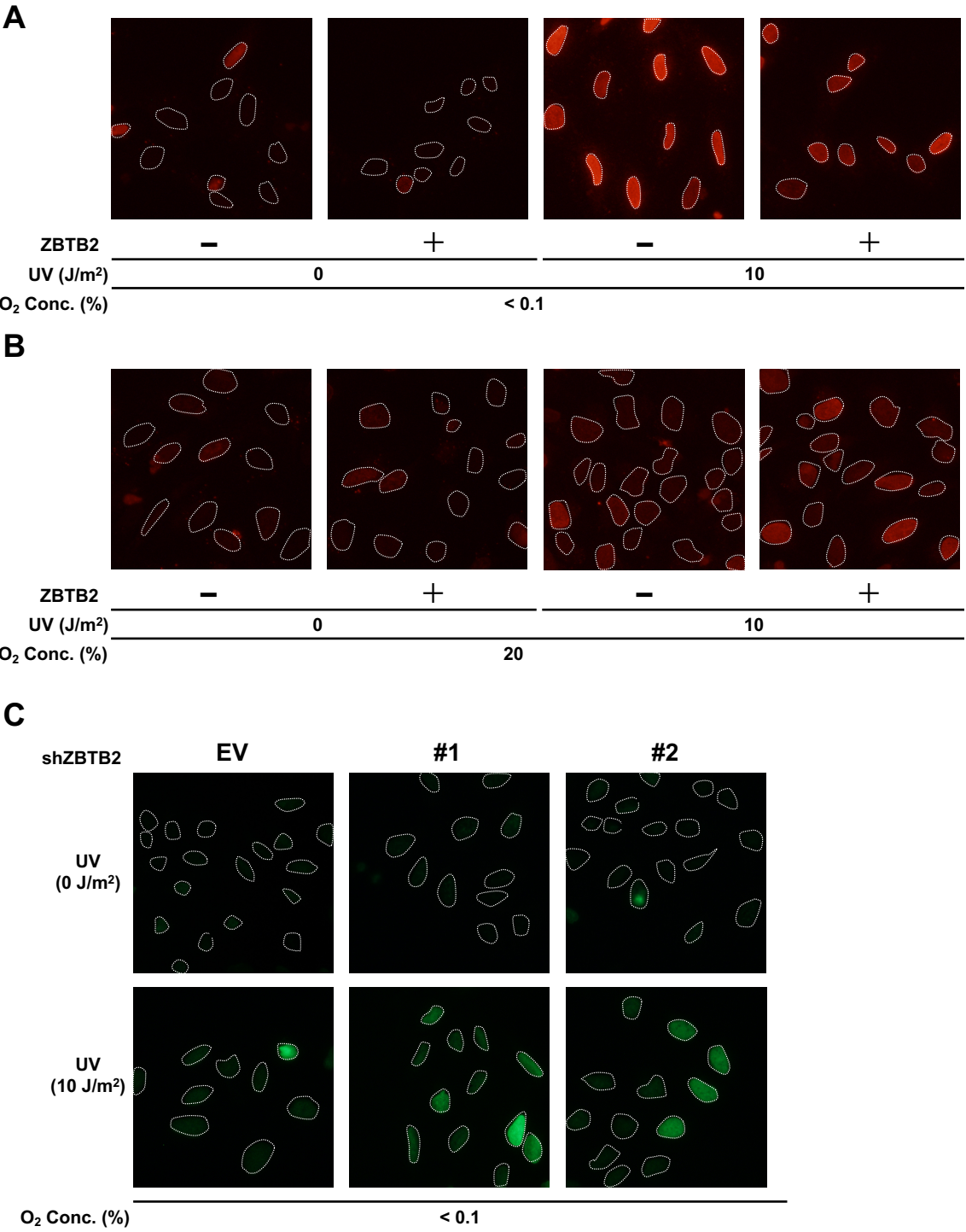


Fig S2.1. がん抑制遺伝子 p53 は ZBTB2 による PARP1 制御を抑制的に制御する

A-B) U2OS 細胞を用いて UV 照射後に核内に蓄積する PAR 量を定量した免疫染色実験。ZBTB2 過剰発現後に Nutlin-3a (10 μ M) を処理し、低酸素下で培養した細胞へ UV 照射し、1 細胞あたりに蓄積する PAR 量を定量した (n = 60)。細胞抽出液 B (A) について図中に示す各抗体で各タンパク質発現を Western blotting で検出した。C) HCT116 p53(-/-) および p53(+/+) 細胞へ図中に示すタンパク質発現ベクターを導入後、共免疫沈降実験で PARP1-HIF-1 α 複合体形成を検証した Western blotting。抗 FLAG 抗体による免疫沈降サンプル (左)、全細胞抽出液 (右) を図中に示す各抗体で検出した。平均値 $\pm$ s.e. * $p \leq 0.05$, n.s. no significance

6-3.ポリ ADP リボシル量を定量した免疫染色実験の代表的染色図



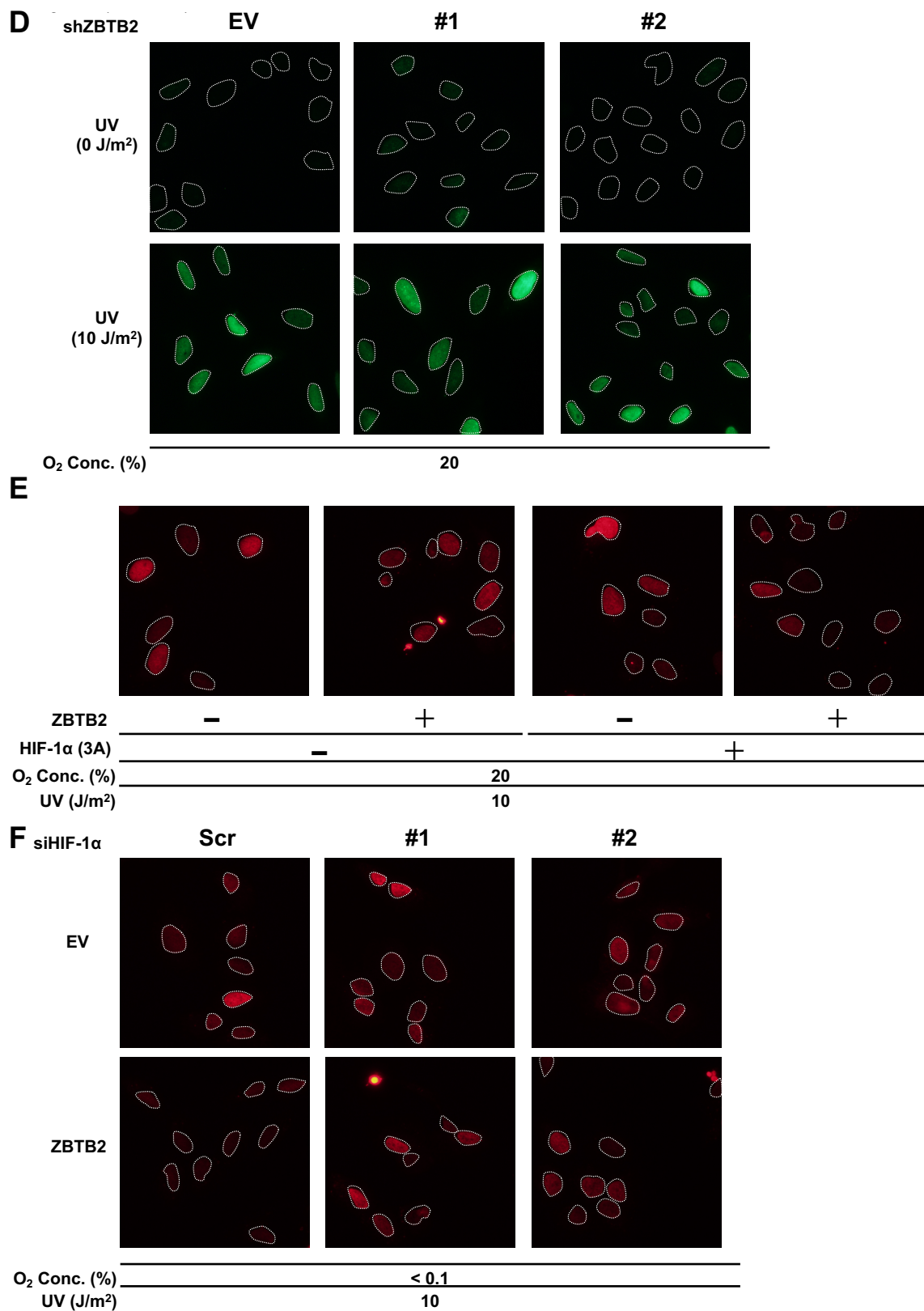


Fig S3.1. ポリ ADP リボシル量を定量した免疫染色実験の代表的染色図

A-F) Fig 4.1B (A)、Fig 4.1D (B)、Fig 4.1F (C)、Fig 4.1H (D)、Fig 4.3B (E)、Fig 4.3D (F)それぞれの実験結果に対応する代表的染色図を示す。

VII. 参考文献

- 1 G.L. Semenza, M.K. Neifelt, S.M. Chi, et al., Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991) 5680–5684.
- 2 G.L. Semenza, Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine, *Cell.* 148 (2012) 399–408.
- 3 P. Lee, N.S. Chandel, M.C. Simon, Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21 (2020) 268–283.
- 4 M. Ohh, C.W. Park, M. Ivan, et al., Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the β -domain of the von Hippel - Lindau protein, *Nat. Cell Biol.* 2 (2000) 423–427.
- 5 M.S. Maxwell, Patrick H. Wiesener, G.-W. Chang, et al., The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis, *Nature.* 399 (1999) 271–275.
- 6 S. Salceda, J. Caro, Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 22642–22647.
- 7 P.C. Mahon, K. Hirota, G.L. Semenza, FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1, *Genes Dev.* 15 (2001) 2675–86.
- 8 G.L. Wang, B.H. Jiang, E.A. Rue, et al., Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 5510–5514.
- 9 N. Gupta, J.B. Wish, Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Inhibitors: A Potential New Treatment for Anemia in Patients With CKD, *Am. J. Kidney Dis.* 69 (2017) 815–826.
- 10 P. Vaupel, P. Schlenger, K. Knoop, et al., Oxygenation of Human Tumors: Evaluation of Tissue Oxygen Distribution in Breast Cancers by Computerized O₂ Tension Measurements', *Cancer Res.* 51 (1991) 3316–3322.
- 11 P. Vaupel, L. Harrison, Tumor Hypoxia: Causative Factors, Compensatory Mechanisms, and Cellular Response, *Oncologist.* 9 (2004) 4–9.
- 12 C.J. Yeom, Y. Goto, Y. Zhu, M, et al., Microenvironments and cellular characteristics in the micro tumor cords of malignant solid tumors, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 13949–13965.
- 13 P. Vaupel, Hypoxia and Aggressive Tumor Phenotype: Implications for Therapy and Prognosis, *Oncologist.* 13 (2008) 21–26.
- 14 B.W. Miller, J.P. Morton, M. Pinese, et al., Targeting the LOX / hypoxia axis reverses many of the features that make pancreatic cancer deadly: inhibition of LOX abrogates metastasis and enhances drug efficacy , *EMBO Mol. Med.* 7 (2015) 1063–1076.
- 15 S. Koyasu, M. Kobayashi, Y. Goto, et al., Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge, *Cancer Sci.* 109 (2018) 560–571.

- 16 A. Nagao, M. Kobayashi, S. Koyasu, et al., HIF-1-dependent reprogramming of glucose metabolic pathway of cancer cells and its therapeutic significance, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 1–13.
- 17 E.E. Wicks, G.L. Semenza, Hypoxia-inducible factors: cancer progression and clinical translation, *J. Clin. Invest.* 132 (2022).
- 18 Y. Goto, L. Zeng, C.J. Yeom, et al., UCHL1 provides diagnostic and antimetastatic strategies due to its deubiquitinating effect on HIF-1 α , *Nat. Commun.* 6 (2015).
- 19 M. Kobayashi, A. Morinibu, S. Koyasu, et al., A circadian clock gene, PER2, activates HIF-1 as an effector molecule for recruitment of HIF-1 α to promoter regions of its downstream genes, *FEBS J.* 284 (2017) 3804–3816.
- 20 B.M. Ortmann, N. Burrows, I.T. Lobb, et al., The HIF complex recruits the histone methyltransferase SET1B to activate specific hypoxia-inducible genes, *Nat. Genet.* 53 (2021) 1022–1035.
- 21 J.I. Perez-Perri, V.L. Dengler, K.A. Audetat, et al., The TIP60 Complex Is a Conserved Coactivator of HIF1A, *Cell Rep.* 16 (2016) 37–47.
- 22 Y. Chen, Y. Wang, W. Luo, et al., ZMYND8 acetylation mediates HIF-dependent breast cancer progression and metastasis Find the latest version: ZMYND8 acetylation mediates HIF-dependent breast cancer progression and metastasis, *J. Clin. Invest.* 128 (2018) 1937–1955.
- 23 Y. Shirai, C.C.T. Chow, G. Kambe, et al., An overview of the recent development of anticancer agents targeting the hif-1 transcription factor, *Cancers (Basel)*. 13 (2021) 1–21.
- 24 R. Huang, P.K. Zhou, DNA damage repair: historical perspectives, mechanistic pathways and clinical translation for targeted cancer therapy, Springer US, 2021.
- 25 J.L. Hopkins, L. Lan, L. Zou, DNA repair defects in cancer and therapeutic opportunities, *Genes Dev.* 34 (2022) 278–293.
- 26 K.B. Kuchenbaecker, J.L. Hopper, D.R. Barnes, et al., Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers, *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* 317 (2017) 2402–2416.
- 27 D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell.* 144 (2011) 646–674.
- 28 M. Rose, J.T. Burgess, K. O’Byrne, et al., PARP Inhibitors: Clinical Relevance, Mechanisms of Action and Tumor Resistance, *Front. Cell Dev. Biol.* 8 (2020) 1–22.
- 29 D.T. Le, J.N. Durham, K.N. Smith, et al., Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade, *Science (80-.)*. 357 (2017) 409–413.
- 30 M. Elser, L. Borsig, P.O. Hassa, et al., Poly(ADP-ribose) polymerase 1 promotes tumor cell survival by coactivating hypoxia-inducible factor-1-dependent gene expression, *Mol. Cancer Res.* 6 (2008) 282–290.

- 31 J.M. Martí, A. Garcia-Diaz, D. Delgado-Bellido, et al., Selective modulation by PARP-1 of HIF-1 α -recruitment to chromatin during hypoxia is required for tumor adaptation to hypoxic conditions, *Redox Biol.* 41 (2021).
- 32 J.H. Um, C.D. Kang, J.H. Bae, et al., Association of DNA-dependent protein kinase with hypoxia inducible factor-1 and its implication in resistance to anticancer drugs in hypoxic tumor cells, *Exp. Mol. Med.* 36 (2004) 233–242.
- 33 Y. Yang, H. Lu, C. Chen, Y. Lyu, et al., HIF-1 Interacts with TRIM28 and DNA-PK to release paused RNA polymerase II and activate target gene transcription in response to hypoxia, *Nat. Commun.* 13 (2022).
- 34 A. Ray Chaudhuri, A. Nussenzweig, The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18 (2017) 610–621.
- 35 X. Yue, C. Bai, D. Xie, et al., DNA-PKcs: A Multi-Faceted Player in DNA Damage Response, *Front. Genet.* 11 (2020).
- 36 T.Y. Reynolds, S. Rockwell, P.M. Glazer, Genetic instability induced by the tumor microenvironment, *Cancer Res.* 56 (1996) 5754–5757.
- 37 K.R. Luoto, R. Kumareswaran, R.G. Bristow, Tumor hypoxia as a driving force in genetic instability, *Genome Integrity.* 4 (2013) 1.
- 38 A.R. Kaplan, P.M. Glazer, Impact of hypoxia on DNA repair and genome integrity, *Mutagenesis.* 35 (2021) 61–67.
- 39 M. Idogawa, M. Masutani, M. Shitashige, et al., Ku70 and poly(ADP-ribose) polymerase-1 competitively regulate β -catenin and T-cell factor-4-mediated gene transactivation: Possible linkage of DNA damage recognition and Wnt signaling, *Cancer Res.* 67 (2007) 911–918.
- 40 M.J. Schiewer, K.E. Knudsen, Transcriptional roles of PARP1 in cancer, *Mol. Cancer Res.* 12 (2014) 1069–1080.
- 41 O.M. Siggs, B. Beutler, The BTB-ZF transcription factors, *Cell Cycle.* 11 (2012) 3358–3369.
- 42 B.N. Jeon, W. Il Choi, M.Y. Yu, et al., ZBTB2, a novel master regulator of the p53 pathway, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 17935–17946.
- 43 I.D. Karemaker, M. Vermeulen, ZBTB 2 reads unmethylated CpG island promoters and regulates embryonic stem cell differentiation, *EMBO Rep.* 19 (2018) 1–11.
- 44 R. Russo, V. Russo, F. Cecere, et al., ZBTB2 protein is a new partner of the Nucleosome Remodeling and Deacetylase (NuRD) complex, *International Journal of Biological Macromolecules.* 168 (2021) 67–76.
- 45 D. Olivieri, S. Paramanathan, A.F. Bardet, et al., a Btb-Domain Transcription Factor Recruits Chromatin Remodelers and a 1 Histone Chaperone During the Exit From Pluripotency 2 3, *J. Biol. Chem.* 297 (2020) 2020.12.03.409912.
- 46 J.W. Bruce, M. Bracken, E. Evans, et al., ZBTB2 represses HIV-1 transcription and is regulated

- by HIV-1 Vpr and cellular DNA damage responses, 2021.
- 47 S. Koyasu, S. Horita, K. Saito, et al., ZBTB 2 links p 53 deficiency to HIF- 1 -mediated hypoxia signaling to promote cancer aggressiveness, *EMBO Rep.* (2022).
 - 48 C.C.T. Chow, M. Kobayashi, G. Kambe, et al., ZBTB2 is Recruited to a Specific Subset of HIF- 1 Target Loci to Facilitate Full Gene Expression Under Hypoxia, *J. Mol. Biol.* 435 (2023) 168162.
 - 49 L. Zeng, A. Morinibu, M. Kobayashi, et al., Aberrant IDH3 α expression promotes malignant tumor growth by inducing HIF-1-mediated metabolic reprogramming and angiogenesis, *Oncogene.* 34 (2015) 4758–4766.
 - 50 V. Rolli, M. O’Farrell, J. Ménissier-de Murcia, et al., Random mutagenesis of the poly(ADP-ribose) polymerase catalytic domain reveals amino acids involved in polymer branching, *Biochemistry.* 36 (1997) 12147–12154.
 - 51 J. Abramson, J. Adler, J. Dunger, et al., Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3, *Nature.* 630 (2024) 493–500.
 - 52 P.O. Hassa, M. Covic, S. Hasan, et al., The Enzymatic and DNA Binding Activity of PARP-1 Are Not Required for NF- κ B Coactivator Function, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 45588–45597.
 - 53 T. Wu, X.J. Wang, W. Tian, et al., Poly(ADP-ribose) polymerase-1 modulates Nrf2-dependent transcription, *Free Radic. Biol. Med.* 67 (2014) 69–80.
 - 54 Z. Liu, W.L. Kraus, Catalytic-Independent Functions of PARP-1 Determine Sox2 Pioneer Activity at Intractable Genomic Loci, *Mol. Cell.* 65 (2017) 589-603.e9.
 - 55 Y.N. Tian, H.D. Chen, C.Q. Tian, et al., Polymerase independent repression of FoxO1 transcription by sequence-specific PARP1 binding to FoxO1 promoter, *Cell Death Dis.* 11 (2020).
 - 56 S. Piepoli, S. Barakat, L. Nogay, et al., Sibling rivalry among the ZBTB transcription factor family: homodimers versus heterodimers, *Life Sci. Alliance.* 5 (2022) 1–15.
 - 57 S. Barakat, E. Ezen, İ. Devecioğlu, et al., Dimerization choice and alternative functions of ZBTB transcription factors, *FEBS J.* 291 (2024) 237–255.
 - 58 N. Sakurai, M. Maeda, S.U. Lee, et al., The LRF transcription factor regulates mature B cell development and the germinal center response in mice, *J. Clin. Invest.* 121 (2011) 2583–2598.
 - 59 F. Zhao, G. Yang, M. Feng, et al., Expression, function and clinical application of stanniocalcin-1 in cancer, *J. Cell. Mol. Med.* 24 (2020) 7686–7696.
 - 60 R.R. Kakun, Z. Melamed, R. Perets, PAX8 in the Junction between Development and Tumorigenesis, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022).
 - 61 M. Robu, R.G. Shah, N. Petitclerc, et al., Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in the removal of UV-induced DNA lesions by nucleotide excision repair, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 1658–1663.
 - 62 M. Robu, R.G. Shah, N.K. Purohit, et al., Poly(ADP-ribose) polymerase 1 escorts XPC to UV-induced DNA lesions during nucleotide excision repair, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017)

E6847–E6856.

- 63 K. Apelt, H. Lans, O.D. Schärer, et al., Nucleotide excision repair leaves a mark on chromatin: DNA damage detection in nucleosomes, *Cell. Mol. Life Sci.* 78 (2021) 7925–7942.
- 64 T. Maeda, T. Merghoyb, R.M. Hobbs, et al., Immunology: Regulation of B versus T lymphoid lineage fate decision by the proto-oncogene LRF, *Science* (80-.). 316 (2007) 860–866.
- 65 K. Tsuji-Takechi, T. Negishi-Koga, E. Sumiyaa, et al., Stage-specific functions of leukemia/lymphoma-related factor (LRF) in the transcriptional control of osteoclast development, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 2561–2566.
- 66 T. Masuda, X. Wang, M. Maeda, et al., Gene regulation: Transcription factors LRF and BCL11A independently repress expression of fetal hemoglobin, *Science* (80-.). 351 (2016) 285–289.
- 67 T. Maeda, R.H. Hobbs, T. Morghoub, et al., Role of the proto-oncogene Pokemon in cellular transformation and ARF repression, *Nature*. 433 (2005) 278–285.
- 68 Constantinou C, Spella M, Chondrou V, et al., The multi-faceted functioning portrait of LRF/ZBTB7A, *Hum. Genomics*. 13 (2019) 1–14.
- 69 S. Gupta, A.K. Singh, K.S. Prajapati, et al., Emerging role of ZBTB7A as an oncogenic driver and transcriptional repressor, *Cancer Lett.* 483 (2020) 22–34.
- 70 G. Wang, A. Lunardi, J. Zhang, et al., Zbtb7a suppresses prostate cancer through repression of a Sox9-dependent pathway for cellular senescence bypass and tumor invasion, *Nat. Genet.* 45 (2013) 739–746.
- 71 J. Guarnerio, L. Riccardi, R. Taulli, et al., A genetic platform to model sarcomagenesis from primary adult mesenchymal stem cells, *Cancer Discov.* 5 (2015) 396–409.
- 72 L. Hartmann, S. Dutta, S. Opatz, et al., ZBTB7A mutations in acute myeloid leukaemia with t(8;21) translocation, *Nat. Commun.* 7 (2016).
- 73 Y. Sato, T. Yoshizato, Y. Shiraishi, et al., Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma, *Nat. Genet.* 45 (2013) 860–867.
- 74 X. Sun, K. Fu, A. Hodgson, et al., Sam68 Is Required for DNA Damage Responses via Regulating Poly(ADP-ribosyl)ation, *PLoS Biol.* 14 (2016) 1–28.
- 75 F. Wang, S. Zhu, L.A. Fisher, et al., Phosphatase 1 nuclear targeting subunit mediates recruitment and function of poly (ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA Repair, *Cancer Res.* 79 (2019) 2526–2535.
- 76 P.C. Hsu, R.K. Gopinath, Y.A. Hsueh, et al., CHK2-mediated regulation of PARP1 in oxidative DNA damage response, *Oncogene*. 38 (2019) 1166–1182.
- 77 A.B. Tufan, K. Lazarow, M. Kolesnichenko, et al., TSG101 associates with PARP1 and is essential for PARylation and DNA damage-induced NF- κ B activation , *EMBO J.* 41 (2022) 1–19.
- 78 C. Dutta, T. Day, N. Kopp, et al., BCL2 suppresses PARP1 function and nonapoptotic cell death,

- Cancer Res. 72 (2012) 4193–4203.
- 79 R. Vendramin, K. Litchfield, C. Swanton, Cancer evolution: Darwin and beyond, *EMBO J.* 40 (2021) 1–20.
 - 80 A. Snyder, V. Makarov, T. Merghoub, et al., Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma, *N. Engl. J. Med.* 371 (2014) 2189–2199.
 - 81 D.L. Jardim, A. Goodman, D. de Melo Gagliato, et al., The Challenges of Tumor Mutational Burden as an Immunotherapy Biomarker, *Cancer Cell.* 39 (2021) 154–173.
 - 82 T. Reisländer, F.J. Groelly, M. Tarsounas, DNA Damage and Cancer Immunotherapy: A STING in the Tale, *Mol. Cell.* 80 (2020) 21–28.
 - 83 D.T. Le, J.N. Durham, K.N. Smith, et al., Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade, *Science* (80-.). 357 (2017) 409–413.
 - 84 M.Y. Teo, K. Seier, I. Ostrovnaya, et al., Alterations in DNA damage response and repair genes as potential marker of clinical benefit from PD-1/PD-L1 blockade in advanced urothelial cancers, *J. Clin. Oncol.* 36 (2018) 1685–1694.
 - 85 S.H. Cho, A.L. Raybuck, K. Stengel, et al., Germinal centre hypoxia and regulation of antibody qualities by a hypoxia response system, *Nature.* 537 (2016) 234–238.
 - 86 R.K. Abbott, M. Thayer, J. Labuda, et al., Germinal Center Hypoxia Potentiates Immunoglobulin Class Switch Recombination, *J. Immunol.* 197 (2016) 4014–4020.
 - 87 A.E. Gylfe, J. Kondelin, M. Turunen, et al., Identification of candidate oncogenes in human colorectal cancers with microsatellite instability, *Gastroenterology.* 145 (2013) 540-543.e22.

謝辞

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Gouki KAMBE, Minoru KOBAYASHI, Hiroshi ISHIKITA, Sho KOYASU, Ester M. HAMMOND, Hiroshi HARADA

ZBTB7A forms a heterodimer with ZBTB2 and inhibits ZBTB2 homodimerization required for full activation of HIF-1

Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 733, 150604, 2024.

doi: 10.1016/j.bbrc.2024.150604.

本研究計画推進に対し、当研究室 OB・提携研究員・医学研究科画像診断学・核医学研究室助教の子安翔先生には、多くの研究マテリアルや予備的知見をいただくと共に、論文作成時にご協力をいただきました。コロナ禍で大学院の研究開始が遅れる中、実験材料の整備などのスタートアップに時間を費やすことなく円滑に研究計画を策定・推進できました。この場をもって改めて感謝いたしますと共に今後のご活躍を祈念いたします。

さらに、修士・博士過程の五年間において所属研究室のスタッフの先生方及び博士の先輩方や同期の高橋樹くん、ZBTB2 研究の直属の先輩として指導いただいた Chow 先輩、後輩たち、放生研事務の方々には大変お世話になりました。今後の皆様のご健康とご活躍を何よりも祈っています。

さらに、所属研究室スタッフ外の方々にも大変お世話になりました。

論文作成にあたっては、京都大学大学院生命科学研究科生命動態共用研究施設蛋白質解析室の渡邊祐三先生に LC-MS/MS 解析を、東京大学大学院工学研究科の石北央教授に AlphaFold3 解析を、京都大学生命科学研究科の安原崇哲教授に TCGA 解析と DDR に関するアドバイスを、Oxford 大学の Ester HAMMOND 教授にアドバイスをいただくなど多くの方に多大な協力をいただきました。改めて御礼申し上げます。また、修士・博士課程の中で生命科学研究科で副指導教官として、高田穰名誉教授・鈴木淳教授の両先生にもご指導いただきました。普段研究に向き合っていると視点が固まってしまう一方で、新しい視点で私の研究を指導いただき、数々の貴重なアドバイスをいただきました。ありがとうございました。さらに、本研究計画策定に際しては、学部時代にはじめて配属となった北海道大学薬学部臨床病態解析学研究室のスタッフの武田宏司教授、大久保直登助教、前原経助教からご指導いただいた研究の基礎となる計画の見通し方や日々の実験の進め方なども大きく支えとなりました。全ての今後の先生方のご活躍を祈念しますと共に、この場をもって改めて感謝いたします。

神邊 剛生

Email: kambe.gouki.83z@st.kyoto-u.ac.jp