

7. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. Motohashi, H. and Yamamoto, M. *Trends Mol. Med.* **10**, 549-557 (2004, invited review)
8. Molecular mechanisms activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of antioxidant genes. Kobayashi, M. and Yamamoto, M. *Antioxidants Redox Signaling* **7**, 3840395 (2005, invited review)
9. Gene expression regulation and domain function of hematopoietic GATA factors. Shimizu, R. and Yamamoto, M. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **16**, 129-136, (2005)
10. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. Ferreira, R., Ohneda, K., Yamamoto, M. and Philipsen, S. *Mol. Cell Biol.* **25**, 1215-1217 (2005)
11. 「Nrf2と小Maf群転写因子」小林 聡, 山本雅之. *分子呼吸器病* **6**, 12-19 (2002)
12. 「Trends in Molecular Biotechnology “ノックダウンマウス”」大根田修, 山本雅之. *分子呼吸器病* **6**, 85-89 (2002)
13. 「Nrf2とレドックス制御」加藤恭丈, 山本雅之. *THE LUNG Perspectives* **10**, 71-74 (2002)
14. 「GATA転写因子と造血器腫瘍」張替秀郎, 山本雅之. *Molecular Medicine* **39**, 1298-1303 (2002)
15. 「マウス個体を用いた血液細胞の発生・分化とゲノムの機能発現」大崎牧, 山本雅之. *実験医学20巻「ゲノム機能を担う核・染色体のダイナミクス」増刊号*, pp 1662-1668 (2002)
16. 「新規エリスロポエチン発現促進剤 (K-7174) : 腎性貧血への試み」今川重彦, 中野陽子, 小原直, 鈴木教郎, 土肥 武, 児玉龍彦, 長澤俊郎, 山本雅之. *医学のあゆみ* **204**, 291-292 (2003)
17. 「環境応答系転写因子の分子機構の解明」山下年晴, 山本雅之. *化学工業* **54**, 641-645 (2003)
18. 「転写因子研究におけるin vivoイメージングの有用性」大根田絹子, 鈴木未来子, 山本雅之. 「in vivo イメージング技術で生命のダイナミズムを可視化する」*BIOベンチャー* **3**, 83-85 (2003)
19. 「二次性貧血に対する新規治療薬の開発」今川重彦, 中野陽子, 小原直, 鈴木教郎, 土肥武, 児玉龍彦, 長澤俊郎, 山本雅之. *医学のあゆみ* **204**, 903-904 (2003)
20. 「GATA転写因子からみる赤血球の発生・分化」長野真澄, 山本雅之. *実験医学* **22**, 361-366 (2004)
21. 「親電子性物質応答の分子機構」伊東 健, 山本雅之. *生化学* **76**, 339-348 (2004)
22. 「Keap1-Nrf2システムによる抗酸化酵素群の統一的発現制御機構」細谷朋方, 山本雅之. *分子呼吸器病* **8**, 147-150 (2004)
23. 「色素の分子進化」鈴木教郎, 山本雅之. *日本医事新報* **4177号**, 99-100 (2004)
24. 「転写因子と血液疾患」峯岸直子, 山本雅之. *臨床検査* **48**, 473-481 (2004)
25. 「GATA-1ノックダウンマウス」清水律子, 山本雅之. *Mebio* **21**, 58-62 (2004)
26. 「GATA-1変異と白血病・転写因子の質的異常と量的異常」長野真澄, 清水律子, 山本雅之. *医学の歩み* **211**, 159-162 (2004)

(書籍)

1. 「Annual Review血液2002」: X染色体連鎖型鉄芽球性貧血モデルおよび鉄代謝異常関連遺伝子改変動物の分子生物学的解析, 中島修・山本雅之, 中外医学社 pp. 59-66 (2002)
2. 「造血幹細胞: 基礎から遺伝子治療・再生医療へ」: 造血幹細胞の転写調節機構, 鈴木教郎・山本雅之, 中外医学社 pp. 66-74 (2002)
3. 「ヒト型モデル動物」(井上達, 野田哲生, 野本明男編): Nrf2遺伝子ノックアウトマウス, 野田秀平・山本雅之, シュプリンガー・フェアラーク東京 (2002)
4. 「酸化ストレスマーカー」(二木鋭雄, 野口範子, 内田浩二編): 第3章 酸化ストレス応答「転写制御」, 山本多恵・山本雅之 (2004)
5. 「キーワードで理解する転写イラストマップ」(田村隆明編): 組織特異的遺伝子発現, 小原直・鈴木教郎・山本雅之, pp. 139-149 (2004)
6. 「ヒトゲノム-生命システムの理解と医学への展開」: 遺伝子発現とクロマチン, 西川恵三・山本雅之, *Molecular Medicine* **41巻** 増刊号, pp. 110-117 (2004)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

2004（平成16）年度

特願2004-319143 生体分子の相互作用観察方法（山本雅之，本橋ほづみ，京基樹，川上文清，稲森和紀）

特願2004-319144 生体分子アレイ（山本雅之，本橋ほづみ，京基樹，川上文清，稲森和紀）

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

研究目標2 Nrf2-Keap1制御系におけるNrf2活性化機構を解明する

A. 研究目的

薬物の1次代謝産物は、生体内で異物代謝系第2相酵素群の発現を誘導する。我々は先に、転写因子Nrf2がこれら生体防御酵素群の発現を統一的に制御することを発見し、本知見を同因子の遺伝子破壊マウスを作製・解析して実証した。また、同欠損マウスではアセトアミノフェン等の薬物に対する感受性が亢進していること、すなわち、Nrf2が薬剤毒性に対する生体防御に重要なことを発見した。さらに、Nrf2の抑制性制御因子としてKeap1を単離し、同分子がNrf2機能を抑制的に制御していることを生化学的・遺伝学的に証明した。本研究の目的は、生体防御酵素群誘導の鍵ステップであるKeap1によるNrf2の機能抑制と刺激に応じたその抑制解除の分子メカニズムを解明することである。そのための手段として、生化学、構造生物学、細胞生物学的アプローチを採用し、多面的で詳細な検討を行った。従来から汎用されている培養細胞を用いた遺伝子導入レポーターアッセイ系では、Nrf2とKeap1の存在比により実験結果が大きく異なる場合があり、また、このシステムでは空気中の20%酸素濃度のもとでの実験を余儀なくされるので、実際の生体内に比べてかなり酸化的環境での事象を検出していることになる。特に、培養細胞は生体内に比べて絶えず高酸素の環境にさらされており、Nrf2-Keap1制御系が活性化されやすい状況におかれている。そこで、本研究ではなるべく生理的環境に近い条件で、Nrf2-Keap1制御系の機能解析を実施することを目指した。そのための手法として、マウス個体を用いた実験系を確立した。

B. 研究方法

(1) Nrf2蛋白質のドメイン分子機能解析

Nrf2分子の様々な欠失変異体を作製し、Nrf2分子の単位機能ドメインと予想される領域とGal4-DBDあるいは緑色蛍光蛋白質（GFP）との融合蛋白質を作製した。それらを、

一過性遺伝子導入法により培養細胞に発現させて、その転写活性化能、細胞内局在、代謝回転速度を指標に、各ドメインの機能を評価した。

(2) Nrf2 による転写活性化機構の解析

Nrf2 の転写活性化にクロマチンリモデリング因子が必要である可能性を考えて、BAF 複合体に含まれる Brg1 の欠損細胞株における Nrf2 の転写活性を検討した。また、Brg1 と Nrf2 の転写活性化ドメインとの相互作用を検討した。さらに、野生型細胞において、Brg1 を siRNA 法によりノックダウンした場合に Nrf2 による転写活性化反応が抑制されるかどうか、また、Brg1 過剰発現細胞を樹立して Nrf2 による転写活性化反応が亢進するかどうかを検討した。さらに、GST-Nrf2 融合蛋白質を作製し、Hela 細胞から調整した核抽出液と反応させて、Nrf2 に相互作用する核内蛋白質複合体を精製し、そこに含まれる因子を質量分析法により解析・同定した。

(3) Keap1蛋白質の分子解剖

Keap1分子の様々な欠失変異体を作製し、培養細胞に対する一過性遺伝子導入実験法により、その機能を1) Nrf2の抑制能と2) 親電子性試薬に対する反応性という観点から調べた。また、Keap1の特徴として、アクチンフィラメントへの結合が認められることから、そのNrf2抑制能に対する意義を調べるために、アクチンの脱重合剤存在下でのNrf2抑制能を検討した。さらに、Keap1はシステイン残基が数多く存在する蛋白質であることから、親電子性物質が直接SH基と反応をする可能性が考えられるので、質量分析法により、その標的となるシステイン残基の同定を試みた。

(4) Keap1による刺激の感知機構の解析

親電子性物質及び活性酸素種などの刺激に対する応答制御機構の実体は、Nrf2のKeap1による抑制からの解除・活性化であることから、Keap1によるNrf2抑制のメカニズムと、その解除のメカニズムを明らかにすることは重要である。本研究では主に、前者についての解析を行った。まず、BTB、IVR、DGRの3つに大別されるKeap1のドメイン分子構造のうち、

DGRドメインの構造をX線結晶構造解析により決定した。DGRドメインは、Nrf2が結合する領域であり、Keap1によるNrf2抑制に重要である。また、Keap1によりNrf2のプロテアソーム依存的な分解が促進されることを発見したので、Keap1がNrf2のユビキチン化を促進するかどうかを検討した。さらに、Keap1がユビキチンライゲース (E3) のアダプター分子として機能し、Nrf2の分解に関与しているという可能性を考えて、Cullinファミリー分子とKeap1との結合を調べた。

(5) マウス個体における Nrf2 活性化分子機構の解析

(i) 検証系その1 (重複ノックアウトレスキュー法)

keap1 遺伝子欠損マウスはメンデル則にしたがって生まれるが、離乳期までに上部消化管の異常な角化の亢進により摂食障害をきたして死亡する。この表現型は、*keap1* と *nrf2* の2重欠損マウスを作成して、Keap1 と同時に Nrf2 も欠損させることにより完全に回復する。このことから、*keap1* 欠損マウスの摂食障害による致死性は恒常的に活性化された Nrf2 に完全に依存しているものと結論される。したがって、他の本系制御候補因子の遺伝子欠損マウスを *keap1* 遺伝子欠損マウスと交配し、*keap1* 遺伝子欠損マウスの致死性が回避されるならば、その因子は Nrf2 の活性化に必要な因子であるといえる。この手法を用いて、小 Maf 群因子、あるいは、Ask1 の Nrf2 による転写活性化に対する重要性を検討した。具体的には、小 Maf 群因子欠損マウス、あるいは、*ask1* 遺伝子欠損マウスと *keap1* 遺伝子欠損マウスを交配して複合変異マウスを作成し、それらの寿命と体重増加、上部消化管の組織像、Nrf2 の標的遺伝子の発現レベルを調べた。

(ii) 検証系その2 (トランスジェニック相補レスキュー法)

keap1 遺伝子の転写開始点上流5.7 kbp領域 (KRDと呼ぶ) を用いたレポーター遺伝子発現を実施すると、内在性*keap1* 遺伝子の発現をほぼ再現できるということが、LacZ遺伝子をレポーターとしたトランスジェニックマウスアッセイにより明らかになった。そこで、KRD領域にKeap1 cDNAを結合させ、マウス受精卵に導入してトランスジェニック

クマウスを作成し、同マウスを*keap1*欠損マウスと交配したところ、*keap1*欠損による致死性をレスキューできることが明らかになった。そこで、いくつかの*Keap1*変異分子を*keap1*遺伝子KRD領域の制御下に発現するトランスジェニックマウスを作成し、同マウスが*keap1*欠損マウスのレスキューをかけられるかどうかを調べることにより、それら変異分子の機能検証を行った。

倫理面への配慮

本研究では遺伝子組換えマウスを実験に使用したが、その飼育、薬剤投与、屠殺にあたっては、動物愛護の精神にのっとり、与える苦痛が最小限になるように配慮した。また、無駄な屠殺を行うことがないように、計画を十分に吟味してから実験を行うようにつとめた。本実験計画は、すでに筑波大学動物実験委員会及び遺伝子組換え安全委員会に申請をおこない、それぞれから承認されている。

C. 研究結果

(1) Nrf2 蛋白質のドメイン分子機能解析

Nrf2 の転写活性化に関与するドメインとして、塩基性領域ロイシンジッパー (bZip) 構造の N 末端側に存在する CBP との結合領域と、RNA ポリメラーゼ II の CTD に類似したアミノ酸配列を有する C 末端領域の重要性が示された。CBP との結合領域は、NF-E2 p45 や Nrf1 といった他の CNC 群因子においても保存されており、クロマチンリモデリング因子である Brg1 依存的な転写活性化に必要であることが明らかになった。また、非刺激時における Nrf2 分解に関与するドメインとして、Nrf2 分子の最も N 末端側領域が必要であることが示された。さらに、その C 末端側に隣接して Keap1 との相互作用に必要な部分が存在することも明らかになった。

(2) Nrf2 による転写活性化機構の解析

Brg1 欠損細胞株においては、野生型細胞株に比べて Nrf2 の転写活性が抑制されている

ことが観察された。Brg1 は Nrf2 の転写活性化ドメインに直接相互作用することが示された。さらに、Brg1 ノックダウン細胞及び Brg1 過剰発現細胞をそれぞれ樹立し、Nrf2 の活性化の指標として、標的遺伝子である NQO-1 と HO-1 の発現レベルを調べた。その結果、Brg1 ノックダウン細胞では HO-1 の遺伝子発現が障害されており、一方、Brg1 過剰発現細胞では HO-1 遺伝子の転写活性が亢進していた。しかしながら、NQO-1 の転写に対しては、両細胞ともコントロール細胞との間で差が認められず、Brg1 の重要性は標的遺伝子ごとに異なる可能性も示唆された。一方、Hela 細胞の核抽出液中から得られた Nrf2 に結合する蛋白質複合体に含まれる因子を質量分析法により同定したところ、クロマチンリモデリング因子やメディエーターとして TIF1 β が得られた。予備的ではあるが、TIF1 β が Nrf2 の転写活性を促進するという結果が得られている。

(3) Keap1 の分子解剖

Keap1 には、N 末端側から、NTR、BTB、IVR、DGR、CTR の各ドメインが存在する。Nrf2 との結合には DGR ドメインが必須であるが、その機能抑制には、BTB、IVR、DGR いずれの領域が欠失しても不十分になる。すなわち、Nrf2 機能を抑制するためには Keap1 分子の複数のドメインが必要であり、Keap1 分子全体のコンフォメーションが保たれていることが必要である。CTR ドメインの欠失変異分子は、過剰発現すれば Nrf2 機能を抑制するにも関わらず、親電子性試薬に反応してその抑制が解除することができないことから、毒物・試薬に対する反応性を担っている領域であることが予想される。また、BTB ドメイン欠失変異体は Nrf2 と結合できるにも関わらず、Nrf2 分子の分解を促進することができない。すなわち、BTB ドメインは Nrf2 分子の分解に重要な機能貢献を果たしている可能性が考えられる。アクチン重合阻害剤の添加により、細胞質にトラップされていた Nrf2 が核へ移行したことから、Keap1 はアクチンフィラメントを足場にして Nrf2 の捕捉と分解を行っているものと推測される。また、質量分析法をもちいた解析により、IVR ドメインのシステイン残基に親電子性試薬が直接作用すること、すなわち、

Keap1が親電子性試薬のセンサーとして機能することが明らかになった。

(4) Keap1による刺激の感知機構の解析

DGRドメインの構造を決定したところ、通常の6角柱である β バレル構造とは異なり、6つの側面構造のうち、1番目の側面と6番目の側面が、咬み合う構造をとっていることが明らかになった。また、Nrf2はバレル構造の底面周辺に結合することが、同部位のKeap1変異分子の検討から示唆された。一方、Nrf2のN末端領域がKeap1依存的にユビキチン化されることを見出し、Keap1はユビキチンライゲースであるCullin3と特異的に結合することを発見した。すなわち、Keap1はユビキチンライゲースCullin3のアダプター分子として機能する。さらに、定常状態におけるCullin3-Keap1によるNrf2の分解には、Keap1分子のIVRドメインに存在する2つのシステイン残基が必須であることが明らかになった。

(5) マウス個体における Nrf2 活性化分子機構の解析

(i) 検証系その1 (重複ノックアウトレスキュー法)

小 Maf 群因子欠損マウスと *keap1* 遺伝子欠損マウスの交配により得られた複合変異マウスでは、致死性は回避され、生後4ヶ月以上生存可能であった。また、複合変異マウスの生後10日齢における前胃の組織像はほぼ正常であった。Nrf2の標的遺伝子として *keratin6* 遺伝子の発現レベルを調べたところ、*keap1* 欠損マウスでは著明に発現が亢進していたのに対して、複合変異マウスでは野生型マウスと同程度の発現レベルであった。しかしながら、この重複変異マウスは、週齢を重ねるにつれて体重が野生型マウスに比べて少なくなり、上部消化管の組織にも異常な角化亢進が認められるようになった。

次いで、*ask1* 遺伝子欠損マウスと *keap1* 遺伝子欠損マウスを交配して複合変異マウスを得たが、こちらは致死性を回避することはできず、*keap1* 遺伝子欠損マウスと同様に離乳期前後で死亡した。前胃の組織像及び遺伝子発現プロファイルともに、*keap1* 欠損マウスと複合変異マウスとの間に差異は認められなかった。

(ii) 検証系その2 (トランスジェニック相補レスキュー法)

*keap1*遺伝子のKRD領域にLacZ遺伝子に連結してトランスジェニックマウスを作成したところ、得られた5ライン中の4ラインで内在性の*keap1*遺伝子の発現をほぼ再現することが可能であった。したがって、*keap1*遺伝子の転写開始点上流KRD領域には、内在性の*keap1*遺伝子の発現をほぼ再現するのに十分な制御領域が含まれていると判断した。そこで、同領域にKeap1 cDNAを結合してトランスジェニックマウスを作成し、同マウスを*keap1*欠損マウスと交配して、複合変異マウスを作成したところ、この複合変異マウスは、野生型対照マウスと同様に生存可能であった。すなわち、トランスジェニック由来Keap1が内在性*keap1*欠損による致死性をレスキューできること、換言すると、トランスジェニック相補レスキュー法が確立できた。

そこで、このシステムを利用して、いくつかのKeap1変異分子をKRD制御下に発現するトランスジェニックマウスを作成し、それらのマウスが*keap1*欠損マウスをレスキューできるか否かを調べることにより、それら変異分子の機能検証を行った。具体的には、これまで培養細胞を用いた実験から重要性が示唆されていたKeap1 IVRドメインのシステイン残基の変異分子 (Keap1CA変異体) と、これまで培養細胞を用いた実験では重要性が確認できていなかったBTBドメインの欠失変異分子 (Keap1 Δ BTB変異体) をそれぞれKRDに連結して、トランスジェニックマウスを作成し、トランスジェニックの発現量を確認のうえで、*keap1*遺伝子欠損マウスと交配して複合変異マウスを作成した。得られたマウスについて、寿命、体重、前胃の組織像と遺伝子発現をパラメーターとして、それぞれのKeap1変異分子の機能を検討した。その結果、Keap1CA変異体を発現する複合変異マウスも、Keap1 Δ BTBを発現する複合変異マウスもいずれも*keap1*遺伝子欠損マウスと同様に離乳期で致死であった。前胃の異常な角化の亢進、Nrf2標的遺伝子の発現亢進が認められた。これは、Keap1 IVRドメインのシステイン残基とBTBドメインが、いずれも定常状態におけるKeap1によるNrf2機能の抑制に必須であることを実証するも

のである。

D. 考察

Nrf2 は非常に強い転写活性化能を有する転写因子である。生体は、Nrf2 分子の機能を蛋白質量と細胞内局在というポイントで制御することにより、刺激に応じた速やかな反応を可能にしている。興味深い点は、Nrf2 の強力な転写活性化能が発揮されるトリガーを与えるメカニズムと、その強い転写活性化のメカニズムである。我々の解析から、これが、Nrf2 と Keap1 の相互作用、Nrf2 の分解、Nrf2 の核移行、Nrf2 の転写活性化能の獲得、Keap1 とアクチンフィラメントとの相互作用、といった要素に分けることができることが明らかになった。

Nrf2 の強力な転写活性の分子基盤解明は、転写制御機構の解明という観点から非常に興味深い課題である。本研究から、Nrf2 の周辺で機能する因子群が明らかにされつつあり、今後それらの貢献度が標的遺伝子の制御領域の環境によりどのように異なるのかをさらに明らかにしていく必要がある。

定常状態における Nrf2 の分解機構と Keap1 によるその制御メカニズムの理解は、本研究により大きく進展した。一方、親電子性物質及び活性酸素種に曝露された場合に、Nrf2 がどのようにして Keap1 による分解を免れて核内に蓄積するようになるのかは、まだ明らかではない。刺激に応じて Cullin3-Keap1 を中心とするユビキチンライゲース活性が制御されるのか、あるいは、Nrf2 とユビキチンライゲース複合体との相互関係に変化が生じるのか、今後の重要な検討課題である。Keap1 による Nrf2 機能抑制の解除のトリガーとして、Keap1 分子自身がセンサー機能を果たしている可能性が考えられ、その際には IVR ドメインの 2 つのシステイン残基と BTB ドメインがその鍵を握るものと予想される。今後の Keap1-Nrf2 システムの反応性を変化させる薬剤の開発にとって、本知見はきわめて重要であり、システイン残基 SH 基を介する新たなストレス応答シグナル伝達

機構の存在という概念を創出するものである。

本研究の大きな特色は、個体を用いた検証系の確立に成功し、培養細胞や試験管内での実験で議論の収斂しなかった点に、より確かな証拠を提示できたという点にある。

本研究において、Nrf2 の転写活性化機能に小 Maf 群因子が必要であることが証明された。しかし、そのマウスにおいては、週齢を経るうちに *keap1* 欠損マウスの表現型が顕在化してきたことから、小 Maf 群因子欠失による効果は部分的であったと解釈される。すなわち、Nrf2 の転写活性化には小 Maf 群因子を必ずしも必要としない局面が存在することが示唆される。一方、*ask1* 遺伝子欠損マウスとの交配では *keap1* 欠損マウスの致死性の回避にはいたらなかったことから、Nrf2 の転写活性化能には *ask1* 機能は必須ではない、または、他の因子により代償可能であると解釈できる。ストレス応答時に Ask1 が CBP をリン酸化することが報告されており、また、CBP は Nrf2 の転写共役因子として機能することが示されていることから、Nrf2 の転写活性化には Ask1 による CBP のリン酸化が必要なのではないかと考えて実験を行ったが、この実験ではその仮説を支持することはできなかった。

本研究では、生体内における生理的なレドックス状態において、しかも、本来の Nrf2 と Keap1 の存在量に近い状況で Keap1 の分子機能の評価をするシステムの構築に成功した。これにより、これまでの研究からその重要性が示唆されていた IVR ドメインの 2 つのシステイン残基が生体内においても重要であることが実証された。さらに、このシステムの有効性を端的に示す結果となったのは、培養細胞においては重要性がはっきりしていなかった BTB ドメインが、個体レベルでは Keap1 の機能に必須であることを明らかにできた点である。BTB ドメインは Keap1 の 2 量体化をもたらすことが示されており、今後、Keap1 の 2 量体化がその機能にどのような意味をもつのかを検討する必要があると考えられる。

E. 結論

Nrf2-Keap1 制御系の構造・機能連関とその分子機構を解析し、Nrf2 転写活性化のメカニズムを担う因子群を同定するとともに、Keap1 による Nrf2 機能抑制のメカニズムを明らかにした。また、親電子性試薬が Keap1 に直接作用することを証明し、Keap1 がセンサー分子として機能し得ることを明らかにした。一方、マウス個体を用いた Nrf2-Keap1 制御系の機能検証システムを確立し、同システムを用いることにより、生理的条件において、Nrf2 の転写活性化に小 Maf 群因子が必要であること、IVR ドメインのシステイン残基と BTB ドメインがそれぞれ、Keap1 機能に必須であることを実証した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

研究目標 1 薬剤の急性毒性・晩発性毒性の発症における Nrf2-Keap1 制御系の関与を明らかにする の項に同じ。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

研究目標 1 薬剤の急性毒性・晩発性毒性の発症における Nrf2-Keap1 制御系の関与を明らかにする の項に同じ。

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kusunoki, H., Motohashi, H., Katsuoka, F., Morohashi, A., Yamamoto, M. and Tanaka, T.	Solution structure of the DNA-binding domain of MafG.	<i>Nature Str. Biol.</i>	9	252-256	2002
Morimitsu, Y., Nakagawa, Y., Hayashi, H., Fujii, H., Kumagai, T., Nakamura, Y., Osawa, T., Horio, F., Itoh, K., Iida, K., Yamamoto, M. and Uchida, K.	A sulforaphane analogue that potentially activates the Nrf2-dependent detoxification pathway.	<i>J. Biol. Chem.</i>	277	3456-3463	2002
Satoh, K., Itoh, K., Yamamoto, M. , Tanaka, M., Hayakari, M., Ookawa, K., Yamazaki, T., Sato, T., Tsuchida, S. and Hatayama, I.	Nrf2 transactivator-independent GSTP1-1 expression in 'GSTP1-1 positive' single cells inducible in female mouse liver by DEN: a preneoplastic character of possible initiated cells.	<i>Carcinogenesis</i>	23	457-462	2002
Cho, H.Y., Jedlika, A.E., Reddy, S.P.M., Zhang, L.Y., Yamamoto, M. , Kensler, T.W. and Kleeberger, S.R.	Linkage analysis of susceptibility to hyperoxic lung injury: role of Nrf2 as a candidate gene.	<i>Am. J. Res. Cell Mol. Biol</i>	26	175-182	2002
Kwak, M.K., Itoh, K., Yamamoto, M. and Kensler, T.	Regulation of the expression of Nrf2 transcription factor by cancer chemopreventive agents through antioxidant response element (ARE)-like sequences in its proximal promoter region.	<i>Mol. Cell Biol.</i>	22	2883-2892	2002
Thimmulappa, R.K., Mai, K.H., Srisuma, S., Kensler, T.W., Yamamoto, M. and Biswal, S.	Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray.	<i>Cancer Res.</i>	62	5196-5203	2002
Kobayashi, M., Itoh, K., Suzuki, T., Osanai, H., Nishikawa, K., Katoh, Y., Takagi, Y. and Yamamoto, M.	Identification of the interactive interface and phylogenic conservation of the Nrf2-Keap1 system.	<i>Genes Cells</i>	7	807-820	2002
Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Cole, R. N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M. and Talalay, P.	Direct evidence that sulfhydryl group of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants.	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i>	99	11908-11913	2002
Sasaki, H., Sato, H., Matsumura, K., Sato, K., Maehara, K., Wang, H., Itoh,	Electrophile response element mediated regulation of the expression of the cystine/glutamate exchange	<i>J. Biol. Chem.</i>	277	44765-71	2002

K., Tamba, M., Yamamoto, M. and Bannai, S.	transporter.				
Pratt, S.J., Drejer, A., Foott, H., Barut, B., Brownlie, A., Postlethwait, J., Katoh, Y., Yamamoto, M. and Zon, L.I.	Isolation and characterization of zebrafish NFE2.	<i>Physiol. Genomics</i>	11	91-98	2002
Chanas, S.A., Jiang, Q., McMahon, M., McWalter, G.K., McLellan, L.I., Elcombe, C.R., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Moffat, G.J., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J.D.	Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice.	<i>Biochem. J.</i>	365	405-416	2002
Motohashi, H., O'Connor, T., Katsuoka, F., Engel, J.D. and Yamamoto, M.	Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors.	<i>Gene (invited review)</i>	294	1-12	2002
Katsuoka, F., Motohashi, H., Tamagawa, Y., Kure, S., Igarashi, K., Engel, J.D. and Yamamoto, M.	Small Maf compound mutants display CNS neuronal degeneration, aberrant transcription and Bach protein mislocalization coincident with myoclonus and abnormal startle response.	<i>Mol. Cell Biol.</i>	23	1163-1174	2003
Ramos-Gomez, M., Dolan, P.M., Itoh, K., Yamamoto, M. and Kensler, T.W.	Influence of <i>nrf2</i> genotype on modulation by oltipraz of benzo[a]pyrene-DNA adducts and tumor yield in mice.	<i>Carcinogenesis</i>	24	461-467	2003
Kwak, M.K., Wakabayashi, N., Itoh, K., Motohashi, H., Yamamoto, M. and Kensler, T.W.	Modulation of <i>keap1</i> and <i>nrf2</i> – dependent gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones: IDENTIFICATION OF NOVEL GENE CLUSTERS.	<i>J. Biol. Chem.</i>	278	8135-8145	2003
Itoh, K., Wakabayashi, W., Katoh, Y., Ishii, T., O'Connor, T. and Yamamoto, M.	Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles.	<i>Genes Cells (cover)</i>	8	379-391	2003
Hirayama, A., Yoh, K., Nagase, S., Ueda, A., Itoh, K., Morito, N., Hirayama, K., Takahashi, S., Yamamoto, M. and Koyama, A.	EPR imaging and analysis of reducing activity in oxidative stress-related Nrf2 transcription factor deficient mice.	<i>Free Rad. Biol. Med.</i>	34	1236-1242	2003
Noda, S., Harada, N., Hida, A., Fujii-Kuriyama, Y., Motohashi, H. and Yamamoto, M.	Gene expression of detoxifying enzymes in AhR and Nrf2 compound null mutant mouse.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	303	105-111	2003
Moriguchi, T., Motohashi, H., Hosoya, T., Nakajima, O., Takahashi, S., Ohsako, S.,	Distinct specificity of xenobiotic response in AhR-humanized model mouse.	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i>	100	5652-5657	2003

Aoki, Y., Nishimura, T., Tohyama, C., Fujii-Kuriyama, Y., and Yamamoto, M.					
McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J.D.	Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of ARE-driven gene expression.	<i>J. Biol. Chem.</i>	278	21592-21600	2003
Aono, J., Yanagawa, T., Itoh, K., Li, B., Yoshida, H., Kumagai, Y., Yamamoto, M. and Ishii, T.	Activation of Nrf2 and accumulation of ubiquitinated A170 by arsenic in osteoblasts.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	305	271-277	2003
Nioi, P., McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J.	Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence.	<i>Biochem. J.</i>	374	337-348	2003
Pi, J., Horikuchi, S., Sun, Y., Nikaïdo, M., Hayashi, T., Yamauchi, H., Itoh, K., Yamamoto, M., Sun, G., Waalkes, M.P., Shimojo, N. and Kumagai, Y.	A potential mechanism for the impairment of nitric oxide formation caused by prolonged oral exposure to arsenate in rabbits.	<i>Free Rad. Biol. Med.</i>	35	102-113	2003
Morito, N., Yoh, K., Itoh, K., Hirayama, A., Koyama, A., Yamamoto, M. and Takahashi, S.	Nrf2 regulates the sensitivity of death receptor signals through intra-cellular glutathione levels.	<i>Oncogene</i>	18	9275-9281	2003
Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., Motohashi, H., Noda, S., Takahashi, S., Imakado, S., Kotsuji, T., Otsuka, F., Roop, D.R., Harada, T., Engel, J.D. and Yamamoto, M.	Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation.	<i>Nature Genetics</i>	35	238-245	2003
Hayashi, A., Suzuki, H., Itoh, K., Yamamoto, M. and Sugiyama, Y.	Transcription factor Nrf2 is required for the constitutive and inducible expression of multidrug resistance-associated protein1 (Mrp1/Abcc1) in mouse embryo fibroblasts.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	310	824-829	2003
Jowsey, I.R., Jiang, Q., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J.D.	Expression of the aflatoxin B1-8,9-epoxide-metabolizing murine glutathione S-transferase A3 subunit is regulated by the Nrf2 transcription factor through an antioxidant response element.	<i>Mol. Pharmacol.</i>	64	1018-1028	2003
Kwak, M.K., Wakabayashi, N., Greenlaw, J.L.,	Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the	<i>Mol. Cell. Biol.</i>	23	8786-8794	2003

Yamamoto, M. and Kensler, T.W.	Keap1-Nrf2 signaling pathway.				
Itoh, K., Mochizuki, M., Ishii, Y., Ishii, T., Shibata, T., Kawamoto, Y., Kelly, V., Sekizawa, K., Uchida, K. and Yamamoto, M.	Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy-D ^{12,14} -prostaglandin J ₂ .	<i>Mol. Cell Biol.</i>	24	36-45	2004
Kyo, M., Yamamoto, T., Motohashi, H., Kamiya, T., Kuroita, T., Tanaka, T., Kawakami, B. and Yamamoto, M.	Evaluation of MafG interaction with Maf recognition element arrays by surface plasmon resonance imaging technique.	<i>Genes Cells</i>	9	153-164	2004
Ishii, T., Itoh, K., Ruiz, E., Leake, D.S., Unoki, H., Yamamoto, M. and Mann, G.E.	Role of Nrf2 in the regulation of CD36 and stress protein expression in murine macrophages: activation by oxidatively modified LDL and 4-hydroxynonenal.	<i>Circulation Res.</i>	94	609-616	2004
Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A.T. Holtzclaw, W.D., Kang, M-I., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Kensler, T.W. and Talalay, P.	Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: Fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers.	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i>	101	2040-2045	2004
Kang, M.I., Kobayashi, A., Wakabayashi, N., Kim, S.G. and Yamamoto, M.	Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes.	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i>	101	2046-2051	2004
Motohashi, H., Katsuoka, F., Engel, J.D. and Yamamoto, M.	Small Maf proteins are obligate transcriptional cofactors for normal keratinocyte differentiation in the Keap1-Nrf2 regulatory pathway.	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i>	101	6379-6384	2004
Morito, N., Yoh, K., Hirayama, A., Itoh, K., Nose, M., Koyama, A., Yamamoto, M. and Takahashi, S.	Nrf2 deficiency improves autoimmune nephritis caused by the <i>fas</i> mutation <i>lpr</i> .	<i>Kidney Int.</i>	65	1703-1713	2004
Ito, T., Tsukumo, S., Suzuki, N., Motohashi, H., Yamamoto, M., Fujii-Kuriyama, Y., Mimura, J., Lin, T-M., Peterson, R. E. Tohyama, C. and Nohara, K.	A constitutively active arylhydrocarbon receptor induces growth inhibition of Jurkat T cells through changes in the expression of genes related to apoptosis and cell cycle arrest.	<i>J. Biol. Chem.</i>	279	25204-25210	2004
Goldring, C. E. P., Kitteringham, N. R., Elsby, R., Randle, L. E., Clement, Y. N., Williams, D. P., McMahon, M., Hayes, J. D., Itoh, K., Yamamoto, M. and Park, B. K.	Activation of hepatic Nrf2 <i>in vivo</i> by acetaminophen in CD-1 Mice.	<i>Hepatology</i>	39	1267-1276	2004

Yanagawa, T., Itoh, K., Uwayama, J., Shibata, Y., Yamaguchi, A., Sano, T., Ishii, T., Yoshida, H. and Yamamoto, M.	Nrf2 deficiency causes tooth decolorization due to iron transport disorder in enamel organ.	Genes Cells (cover photo)	9	641-651	2004
McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J.D.	Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron.	<i>J. Biol. Chem.</i>	279	31556-31567	2004
Cho, H-Y., Reddy, S.P.M., Yamamoto, M. and Kleeberger, S.R.	The transcription factor Nrf2 protects against pulmonary fibrosis.	<i>FASEB J.</i>	18	1258-1260	2004
Takagi, Y., Kobayashi, M., Li, L., Suzuki, T., Nishikawa, K., and Yamamoto, M.	MafT, a new member of the small Maf protein family in zebrafish.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	320	62-69	2004
Kobayashi, A., Kang, M.I., Ohkawa, H., Ohtuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K. and Yamamoto, M.	Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2.	<i>Mol. Cell Biol.</i>	24	7310-7319	2004
Yamamoto, T., Yoh, K., Kobayashi, K., Ishii, Y., Kure, S., Koyama, A., Sekizawa, K., Motohashi, H., and Yamamoto, M.	Identification of polymorphisms in the promoter region of human <i>NRF2</i> gene.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	321	72-79	2004
Iida, K., Itoh, K., Kumagai, Y., Oyasu, R., Hattori, K., Kawai, K., Shimazui, T., Akaza, H., and Yamamoto, M.	Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis.	<i>Cancer Res.</i>	64	6124-6431	2004
Rangasamy, T., Cho, C.Y., Thimmulappa, R.K., Zhen, L., Srisuma, S.S., Kensler, T.W., Yamamoto, M. , Petrache, I., Tudor, R.M., and Biswal, S.	Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice.	<i>J. Clin. Invest.</i>	114	1248-1259	2004
McWalter, G.K., Higgins, L.G., McLellan, L.I., Henderson, C.J., Song, L., Thornalley, P.J. Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J.D.	Transcription factor Nrf2 is essential for induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, glutathione S-transferases, and glutamate cysteine ligase by broccoli seeds and isothiocyanates.	<i>J. Nutr.</i>	134	3499S-3506S	2004
Cho, H-Y., Reddy, S.P., DeBiase, A., Yamamoto, M. and Kleeberger, S.R.	Gene expression profiling of NRF2-mediated protection against oxidative injury.	<i>Free Rad. Biol. Med.</i>	38	325-343	2005
Katsuoka, F., Motohashi, M., Engel, J.D. and Yamamoto, M.	Nrf2 transcriptionally activates the <i>mafG</i> gene through an antioxidant response element.	<i>J. Biol. Chem.</i>	280	4483-4490	2005

Katoh, Y., Iida, K., Kang, M-I., Kobayashi, A., Mizukami, M., Tong, K.I., McMahon, M., Hayes, J.D., Itoh, K. and Yamamoto, M.	Evolutionary conserved N-terminal domain of Nrf2 is essential for the Keap1-mediated degradation of the protein by proteasome.	<i>Arch. Biochem. Biophys.</i>	433	342-350	2005
Itoh, K., Tong, K.I. and Yamamoto, M.	Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles.	<i>Free Radical Biol. Med.</i> (invited review)	36	1208-1213	2004
Motohashi, H. and Yamamoto, M.	Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism.	<i>Trends Mol. Med.</i> (invited review)	10	549-557	2004
Kobayashi, M. and Yamamoto, M.	Molecular mechanisms activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of antioxidant genes.	<i>Antioxidants Redox Signaling</i> (invited review)	7	384-395	2005

Review

Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors

Hozumi Motohashi^a, Tania O'Connor^a, Fumiki Katsuoka^b,
James Douglas Engel^b, Masayuki Yamamoto^{a,*}

^a*Institute of Basic Medical Sciences and Center for Tsukuba Advanced Research Alliance, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8577, Japan*

^b*Department of Biochemistry, Molecular Biology and Cell Biology, Northwestern University, Evanston, IL, USA*

Received 14 March 2002; received in revised form 17 May 2002; accepted 11 June 2002

Received by A.J. van Wijnen

Abstract

Recent progress in the analysis of transcriptional regulation has revealed the presence of an exquisite functional network comprising the Maf and Cap 'n' collar (CNC) families of regulatory proteins, many of which have been isolated. Among Maf factors, large Maf proteins are important in the regulation of embryonic development and cell differentiation, whereas small Maf proteins serve as obligatory heterodimeric partner molecules for members of the CNC family. Both Maf homodimers and CNC-small Maf heterodimers bind to the Maf recognition element (MARE). Since the MARE contains a consensus TRE sequence recognized by AP-1, Jun and Fos family members may act to compete or interfere with the function of CNC-small Maf heterodimers. Overall then, the quantitative balance of transcription factors interacting with the MARE determines its transcriptional activity. Many putative MARE-dependent target genes such as those induced by antioxidants and oxidative stress are under concerted regulation by the CNC family member Nrf2, as clearly proven by mouse germline mutagenesis. Since these genes represent a vital aspect of the cellular defense mechanism against oxidative stress, Nrf2-null mutant mice are highly sensitive to xenobiotic and oxidative insults. Deciphering the molecular basis of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors will undoubtedly lead to a new paradigm for the cooperative function of transcription factors. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Basic region leucine zipper structure; Maf recognition element; Nuclear factor erythroid 2; Antioxidant responsive element

1. The dawn of Maf-CNC biology

1.1. Isolation of Maf family proteins

The advent of 'Maf-CNC biology' arose from isolation of the *v-maf* oncogene, the transforming gene of avian retrovirus AS42, which causes musculoaponeurotic fibrosarcoma in chickens (Nishizawa et al., 1989). A distinctive feature of the *v*-Maf protein product of this oncogene is its basic leucine zipper (bZip) domain, the crystal structure of which has been determined in a GCN4 homodimer

Abbreviations: CNC, Cap 'n' collar; bZip, basic region leucine zipper; TRE, TPA responsive element; CRE, c-AMP responsive element; EHR, extended homology region; MARE, Maf recognition element; Nrf2, NF-E2 related factor 2; NRL, neural retina leucine zipper; ALAS-E, δ -aminolevulinic synthase-erythroid; PBGD, porphobilinogen deaminase; NF-E2, nuclear factor-erythroid 2; EMSA, electromobility shift assay; BTB, broad complex, tramtrack, bric-a-brac; Bach, BTB and CNC homology; ATF4, activating transcription factor 4; CBP, CREB-binding protein; SMRT, silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors

* Corresponding author. Tel.: +81-298-53-6158; fax: +81-298-53-7318.

E-mail address: masi@tara.tsukuba.ac.jp (M. Yamamoto).

(Ellenberger et al., 1992) and in the Jun-Fos (AP-1) heterodimer (Glover and Harrison, 1995). The bZip domain is comprised of a region rich in basic residues adjacent to a 'zipper' formed by a heptad repeat of hydrophobic, most often leucine, residues. Typically, the basic region mediates DNA binding to the MARE, whereas the leucine zipper is responsible for homodimerization or forming dimers with other bZip factors. The transforming activity of the *v*-Maf protein is achieved through the presence of its bZip motif and N-terminal two thirds, as revealed by detailed structure-function analyses (Kataoka et al., 1993).

Since the discovery of *v-maf*, its cellular counterpart *c-maf* and six other *v-maf*-related genes have been identified (Table 1). These genes constitute the Maf family and can be divided into the large and small Maf subfamilies. Large Maf proteins encompass *c-Maf*, MafB (Kataoka et al., 1994a), Nrl (Swaroop et al., 1992), and L-Maf (Ogino and Yasuda, 1998) and possess an N-terminal acidic domain that serves as a transactivation domain. Small Maf proteins include MafK, MafF (Fujiwara et al., 1993), and MafG (Kataoka et al., 1995) and lack a canonical transactivation domain.

Table 1
Summary of Maf and CNC protein families

Gene	Expression profiles	Phenotype of null-mutant mice	Reference
c-maf (maf-2)	lens, T-lymphocytes (mouse) spleen, kidney, intestine, muscle (rat)	lens formation defect, lethality within 24 hours of birth	Nishizawa et al. (1989) Sakai et al. (1997) Kawauchi et al. (1999) Kim et al. (1999b)
mafB (maf-1)	hindbrain, lens (mouse) intestine, liver, spleen (chicken) spleen, liver, muscle (rat)	defective inner ear development in kreisler mutant (hind brain-specific deficiency of MafB)	Kataoka et al. (1994a) Cordes et al. (1994) Sakai et al. (1997)
nrl	retina (mouse)	complete loss of rod cell function	Swaroop et al. (1992) Mears et al. (2001)
L-maf (mafA) (s-maf)	lens (chicken) retina (quail) somite (zebrafish)	–	Ogino et al. (1998) Benkhelifa et al. (1998) Kajihara et al. (2001)
mafG	various organs including heart, spleen, brain, bone marrow, liver, lung, kidney (mouse)	defective platelet production from megakaryocytes mild motor disorder	Kataoka et al. (1995) Shavit, et al. (1998)
mafK	various organs including lung, heart, spleen, intestine (mouse)	no abnormality	Fujiwara et al. (1993) Kotkow et al. (1996) Shavit et al. (1998)
mafF	various organs including lung, intestine (mouse)	no abnormality	Fujiwara et al. (1993) Onodera et al. (1999)
p45	hematopoietic cells (mouse)	complete lack of platelet production from megakaryocytes	Andrews et al. (1993a) Shivdasani et al. (1995)
nrf1	various organs including heart, liver, kidney (mouse)	lethality in late embryonic stage due to non-cell autonomous anemia	Chan et al. (1993) Caterina et al. (1994) Chan et al. (1998)
nrf2	various organs including heart, liver, intestine, kidney (mouse)	impaired induction of antioxidant responsive genes	Moi et al. (1994) Itoh et al. (1997)
nrf3	placenta (human)	–	Kobayashi et al. (1999)
bach1	hematopoietic cells (mouse)	–	Oyake et al. (1996)
bach2	B lymphocytes, brain (mouse)	–	Oyake et al. (1996)

Amino acid sequence alignment of the Maf proteins (Fig. 1) illustrated a high conservation among their basic DNA-binding domains. In addition, immediately upstream of the basic domain, a stretch of 23 amino acids referred to as the extended homology region (EHR) was found to be a highly conserved domain specific to Maf family proteins (Fig. 1, pink box). These two highly conserved regions, the EHR and the basic domain, direct specific DNA binding of Maf proteins to a palindromic consensus sequence (TGCTGAC(G)TCAGCA) known as the MARE (Maf recognition element). There are two types of MARE: a 13 bp T-MARE containing a TPA-responsive element (TRE: TGACTCA) and a 14 bp C-MARE containing a cyclic AMP-responsive element (CRE: TGACGTCA) (Kataoka et al., 1994b; Kerppola and Curran, 1994; Fig. 2). The specific flanking regions TGC and GCA at either end of the core TRE/CRE are crucial for recognition of the MARE by Maf proteins (Kerppola and Curran, 1994; see Section 5.1). As well as binding Maf factors, the TRE and CRE motifs present in the MARE are recognized by the AP-1 and ATF/CREB family of transcription factors, respectively.

1.2. Emergence of the CNC-small Maf heterodimer

The important roles that the CNC-small Maf heterodimer plays in biological processes originally emerged from its activity as an erythroid-specific transcriptional activator, NF-E2. Four years after the discovery of the *v-maf* founder, the study of the Maf family unexpectedly merged with another stream of molecular biology, that of erythroid-specific gene regulation. Analysis of erythroid-specific transcription represents one of the most refined model systems in which to decipher the mechanisms governing tissue-specific gene regulation. Functional sequence elements in the regulatory regions of various erythroid-specific genes, such as ALAS-E (Cox et al., 1991; Lim et al., 1994), PBGD (Mignotte et al., 1989a), ferrochelatase (Taketani et al., 1992), and the globin locus control region (LCR; Talbot and Grosveld, 1991), were defined. Thus, functional assays with transgenic mice, transfection assays in erythroid cells, and in vitro and in vivo DNA footprinting identified CACCC, GATA, and AP-1-like motifs as major compo-