

令和元年5月23日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15590

研究課題名(和文) Keap1-Nrf2系によるストレス感知機構

研究課題名(英文) Stress Sensor Mechanism by the Keap1-Nrf2 System

研究代表者

鈴木 隆史 (Suzuki, Takafumi)

東北大学・医学系研究科・講師

研究者番号：70508308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスや外来異物に対する応答系の破綻は様々な疾患発症と密接に関わっている。このような疾患を未然に防ぐ目的で、細胞は環境ストレスに対して素早い応答で対応し、恒常性を維持している。ストレスセンサーKeap1は転写因子Nrf2のコピキチン化反応を制御し、酸化ストレス防御機構の中心的役割を担う鍵因子である。本研究では、これまで同定されていなかったKeap1の過酸化水素に対するセンサーを明らかにすることに成功した。Keap1の過酸化水素センサーは4つのシステイン残基から成り、親電子性物質に対するセンサーとは異なる分子メカニズムであることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸化ストレスに対する応答系の破綻は様々な疾患発症と密接に関わっている。このような疾患を未然に防ぐ目的で、細胞は環境ストレスに対して素早い応答で対応し、恒常性を維持している。ストレスセンサーKeap1は転写因子Nrf2の活性を制御し、酸化ストレス防御機構の中心的役割を担う鍵因子である。本研究はKeap1が酸化ストレスを感知してNrf2を制御する分子メカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The Keap1-Nrf2 system plays a central role in the oxidative stress response, however the identity of the reactive oxygen species sensor within Keap1 remains poorly understood. Here, we show that a Keap1 mutant lacking eleven cysteine residues retains the ability to target Nrf2 for degradation, but is unable to respond to cysteine-reactive Nrf2 inducers. Of the eleven mutated cysteine residues, we found that four are important for sensing hydrogen peroxide. Our analyses revealed that Keap1 utilizes the cysteine residues redundantly to set up an elaborate fail-safe mechanism in which specific combinations of these four cysteine residues can form a disulfide bond to sense hydrogen peroxide. Importantly, this sensing mechanism is distinct from that used for electrophilic Nrf2 inducers, demonstrating that Keap1 is equipped with multiple cysteine-based sensors to detect various endogenous and exogenous stresses.

研究分野：医化学

キーワード：Keap1 Nrf2

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスや外来異物に対する応答系の破綻は様々な疾患発症と密接に関わる。このような疾患発症を未然に防ぐ目的で、細胞は環境由来ストレスに対して素早い応答で対応し、恒常性を維持している。転写因子 Nrf2 は酸化ストレス・異物代謝に関わる遺伝子群を統一的に制御し生体防御に働く。Nrf2 活性化による強力な生体防御機能の増強作用は国内外で注目を浴びており、様々な疾患の予防・治療への応用を目指して多くの Nrf2 誘導剤の開発が進んでいる。Nrf2 は、非刺激下で Keap1-Cullin3(Cul3)を構成因子とするユビキチンリガー複合体によりユビキチン化されプロテアソームにより分解されている。Keap1 はセンサー分子として機能し、酸化ストレス刺激を感知すると Nrf2 のユビキチン化反応を停止する。その結果、安定化した Nrf2 は核内に蓄積して抗酸化剤応答配列(ARE)を介して DNA に結合し転写を活性化する。Nrf2 活性化制御の主要な作用点は、Keap1 を介したユビキチン化反応調節である。

これまでに申請者らは、Keap1 分子は複数のシステイン残基を使い分けて、多様なストレス刺激に対する応答を可能にしている(システインコード)ことを見出した。しかし、このシステイン残基(即ち Keap1 ストレスセンサー)の使い分けの分子機構の詳細はよくわかっておらず、活性酸素種の感知に働く Keap1 センサーシステイン残基は未だ同定されていなかった。

2. 研究の目的

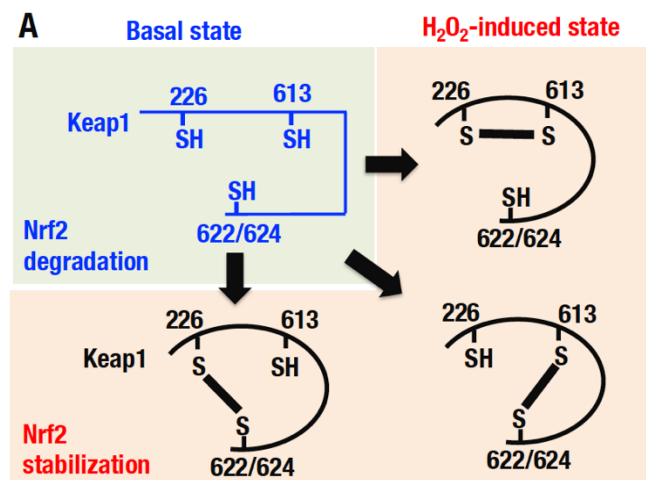
本研究は、ストレス応答における Nrf2 活性化の分子基盤、および Keap1 の活性酸素種センサーの同定と生理機能解明を目的とした。

3. 研究の方法

マウス Keap1 分子は 25 個のシステイン残基を有するが、様々な組み合わせでシステイン残基の変異体を作製し、培養細胞への一過性過剰発現実験により、Nrf2 抑制能を調べた。また、Keap1 欠失マウス由来線維芽細胞を用いて安定発現細胞株を作製し、過酸化水素に対する応答能を調べた。さらに、過酸化水素に対する応答に重要なシステイン残基についてノックインマウスを作製し、マウス個体レベルの検証を行った。

4. 研究成果

過酸化水素 (H_2O_2) に対する Nrf2 活性化には、Keap1 の C226/613/622/624 の 4 つのシステイン残基が重要であることを見出した。これらのシステイン残基が 3 つのセンサーを形成し、過酸化水素の感知にはこのうち 2 箇所が必要であることがわかった。このことは、3 つのセンサー部位のうちいずれか 2 箇所が過酸化水素によってジスルフィド結合を形成することで、Keap1 の構造変化を引き起こし、Nrf2 ユビキチン化反応を停止させるメカニズムであると考えられた(図)。これは、3 つのセンサーのうち 1 箇所が親電子性物質や SO_2H/SO_3H などの酸化修飾を受けた場合でも、過酸化水素に応答できる仕組み、すなわち”fail-safe”メカニズムとして働く新しい感知機構と考えられる。この成果は現在論文発表するため投稿中である。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件) (全て査読有り)

1. Kanamoto M, Tsuchiya Y, Nakao Y, **Suzuki T**, Motohashi H, Yamamoto M, Kamata H. (2018) Structural instability of IκB kinase β promotes autophagic degradation through enhancement of Keap1 binding. *PLoS One*. 13(11): e0203978. doi: 10.1371/journal.pone.0203978.
2. Kikuchi K, Iida M, Ikeda N, Moriyama S, Hamada M, Takahashi S, Kitamura H, Watanabe T, Hasegawa Y, Hase K, Fukuhara T, Sato H, Kobayashi EH, **Suzuki T**, Yamamoto M, Tanaka M, Asano K. (2018) Macrophages Switch Their Phenotype by Regulating Maf Expression during Different Phases of Inflammation. *Journal of Immunol*. 2018 201(2):635-651. doi: 10.4049/jimmunol.1800040.
3. Dayalan Naidu S, Muramatsu A, Saito R, Asami S, Honda T, Hosoya T, Itoh K, Yamamoto M, **Suzuki T**, Dinkova-Kostova A. (2018) C151 in KEAP1 is the main cysteine sensor for the cyanoenone class of NRF2 activators, irrespective of molecular size or shape. *Scientific Reports* 8, 8037. doi:10.1038/s41598-018-26269-9.

4. Yoshida E, **Suzuki T**, Morita M, Taguchi K, Tsuchida K, Motohashi H, Doita M, and Yamamoto M. (2018) Hyperactivation of Nrf2 leads to hypoplasia of bone in vivo. *Genes to Cells* 23, 386-392. doi:10.1111/gtc.12579
5. Dayalan Naidu S, **Suzuki T**, Yamamoto M, Fahey JW and Dinkova-Kostova AT. (2018) Phenethyl isothiocyanate, a dual activator of transcription factors NRF2 and HSF1. *Molecular Nutrition & Food Research* 62, e1700908 doi:10.1002/mnfr.201700908
6. **Suzuki T**, Yamamoto M. (2017) Stress-sensing mechanisms and the physiological roles of the Keap1-Nrf2 system during cellular stress. *Journal of Biological Chemistry* 292, 16817-16824. doi:10.1074/jbc.R117.800169.
7. Sogawa Y, Nagasu H, Iwae S, Ihoriya C, Itano S, Uchida A, Kidokoro K, Taniguchi S, Takahashi M, Satoh M, Sasaki T, **Suzuki T**, Yamamoto M, Horng T and Kashihara N. (2017) Infiltration of M1, but not M2, macrophages is impaired after unilateral ureter obstruction in Nrf2-deficient mice. *Scientific Reports* 7, 8801. doi:10.1038/s41598-017-08054-2
8. Higashi C, Kawaji A, Tsuda N, Hayashi M, Saito R, Yagishita Y, **Suzuki T**, Uruno A, Nakamura M, Nakao K, Furusako S, Yamamoto M. (2017) The novel Nrf2 inducer TFM-735 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *European Journal of Pharmacology*. 802, 76-84. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.02.044.
9. **Suzuki T**, Seki S, Hiramoto K, Naganuma E, Kobayashi HE, Yamaoka A, Baird L, Takahashi N, Sato H and Yamamoto M. (2017) Hyperactivation of Nrf2 in early tubular development induces nephrogenic diabetes insipidus. *Nature Communications*. 8, 14577. doi. 10.1038/NCOMMS14577.
10. Hidaka T, Ogawa E, Kobayashi HE, **Suzuki T**, Funayama R, Nagashima T, Fujimura T, Aiba S, Nakayama K, Okuyama R, Yamamoto M. (2017) The aryl hydrocarbon receptor AhR links atopic dermatitis and air pollution via induction of neurotrophic factor Artemin. *Nature Immunology*. 18, 64-73. doi: 10.1038/ni.3614.

[学会発表] (計 13 件)

1. **鈴木隆史**、村松亜紀、斎藤良太、磯達朗、山本雅之 システイン反応性 Nrf2 誘導剤に対する応答を欠失した Keap1 変異体の創出 第 91 回日本生化学大会, 京都, 2018 年 9 月 24-26 日 (ポスター発表 1P-362/口頭発表 1T14e-02)
2. 村松亜紀、**鈴木隆史**、斎藤良太、磯達朗、須田博美、守田匡伸、山本雅之 Keap1 酸化ストレスセンサーの機能解析 第 91 回日本生化学大会, 京都, 2018 年 9 月 24-26 日 (ポスター発表 1P-361/口頭発表 1T-14e-01)
3. Seizo Koshiba, Tatsuro Iso, Jin Inoue, Aki Muramatsu, **Takafumi Suzuki**, Takanori Kigawa and Masayuki Yamamoto. Structural and functional analyses of oxidative stress response by Keap1-Nrf2 system. 28th ICMRBS, Dublin, 19th August 2018 (P209).
4. 村松亜紀、**鈴木隆史**、Dinkova-Kostova, 山本雅之 TBE-31 は Keap1Cys151 を介して Nrf2 を活性化し抗炎症に働く 第 84 回 第 84 回日本生化学会東北支部例会 岩手医科大学, 2018 年 5 月 19 日
5. **鈴木隆史**、Keap1-Nrf2 系によるストレス応答メカニズムとその生理的意義 第 84 回日本生化学会東北支部例会 奨励賞受賞講演 岩手医科大学, 2018 年 5 月 19 日
6. 村松亜紀、**鈴木隆史**、Dinkova-Kostova, 山本雅之 TBE-31 は Keap1Cys151 を介して Nrf2 を活性化し抗炎症に働く 新学術領域 酸素生物学・ダイニングコード合同若手会議, 仙台秋保温泉 2018 年 1 月 30 日-2 月 1 日
7. **鈴木隆史**、関詩織、長沼絵理子、高橋信行、佐藤博、山本雅之 尿細管発生期における転写因子 Nrf2 の恒常的活性化は腎性尿崩症を引き起こす ConBio2017, 神戸, 2017 年 12 月 6-9 日 (ポスター発表 3P-1149/口頭発表 2PT26-14)
8. 村松亜紀、**鈴木隆史**、Dinkova-Kostova, 山本雅之 TBE-31 は Keap1Cys151 を介して Nrf2 を活性化し抗炎症に働く ConBio2017, 神戸, 2017 年 12 月 6-9 日 (ポスター発表 1P-0583)
9. 佐藤慶、**鈴木隆史**、長沼絵理子、杉浦久敏、一ノ瀬正和、山本雅之 骨髄球系細胞における転写因子 Nrf2 活性化がエラスターゼ誘導性肺気腫の形成を阻害する 第 40 回生命科学系学会合同年次大会, 神戸, 2017 年 12 月 6-9 日 (ポスター発表 2LBA-103)
10. 井上仁、村松亜紀、**鈴木隆史**、磯達朗、小柴生造、山本雅之 酸化ストレス応答における Keap1 の構造・相互作用解析 第 56 回 NMR 討論会, 首都大学南大沢キャンパス, 八王子市, 2017 年 11 月 14-16 日
11. **鈴木隆史**、山本雅之 Keap1-Nrf2 系による酸化ストレス防御機構 第 7 回日本分子状水素医学生物学会年会, ホテル名古屋ガーデンパレス, 名古屋, 2017 年 10 月 29-30 日(招待講演 2)
12. **鈴木隆史**、山本雅之 Keap1-Nrf2 システムによる酸化ストレス応答機構 第 17 回日本蛋白質学会大会, 仙台国際センター, 仙台 2017 年 6 月 20-22 日 (ワークショップ 1WD-02)
13. **鈴木隆史**、関詩織、長沼絵理子、高橋信行、佐藤博、山本雅之. 尿細管発生期における転写因子 Nrf2 の恒常的活性化は腎性尿崩症を引き起こす 第 60 回 日本腎臓学会学術会, 仙台国際センター, 仙台, 2017 年 5 月 26-28 日 (口頭 O-216)

[図書] (計 1 件)

1. **鈴木隆史**、山本雅之 カラー図解 人体の細胞生物学 第3章3. 遺伝子発現の調節 日本医
事新報社 2018 ISBN978-4-7849-3232-0

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

東北大学・大学院医学系研究科 医化学分野

<http://www.dmbc.med.tohoku.ac.jp/official/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：山本 雅之

ローマ字氏名：YAMAMOTO, Masayuki

研究協力者氏名：磯 達朗

ローマ字氏名：ISO, Tatsuro

研究協力者氏名：村松 亜紀

ローマ字氏名：MURAMATSU, Aki

研究協力者氏名：齋藤 良太

ローマ字氏名：SAITO, Ryota

研究協力者氏名：BAIRD, Liam

ローマ字氏名：BAIRD, Liam

研究協力者氏名：須田 博美

ローマ字氏名：SUDA, Hiromi

研究協力者氏名：守田 匡伸

ローマ字氏名：MORITA, Masanobu

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。