

令和 4 年 9 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2021

課題番号：17KK0183

研究課題名（和文）ストレスセンサーKeap1による転写因子Nrf2活性制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of transcription factor Nrf2 activity by the stress sensor Keap1

研究代表者

鈴木 隆史（SUZUKI, Takafumi）

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：70508308

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

渡航期間： 2.5ヶ月

研究成果の概要（和文）：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て、生体防御に働く転写因子である。Nrf2は、非刺激下ではKeap1-Cul3を構成因子とするユビキチンリガーゼ複合体によりユビキチン化され、プロテアソームにより迅速に分解されている。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は核内に蓄積して種々の標的遺伝子の転写を活性化する。本研究では、ストレス応答におけるNrf2活性化の分子基盤、特にKeap1によるユビキチン化反応の調節機構の解明を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Keap1-Nrf2タンパク質相互作用を阻害する化合物がNrf2活性化を引き起こすメカニズムとその影響を明らかにすることに成功した。これまでは試験管内反応においてのみ解析が実施されてきたが、本研究により、細胞レベルおよびマウス個体レベルでの実証に成功した。この研究成果は、Keap1-Nrf2タンパク質相互作用阻害による次世代型のNrf2活性剤の開発に有益な情報を提供する。

研究成果の概要（英文）：Nrf2 is a transcription factor that acts as defense system by regulating a group of genes involved in oxidative stress and xenobiotic metabolism. Keap1 functions as a sensor molecule and stops the ubiquitination reaction of Nrf2 when Keap1 senses oxidative stress. Stabilized Nrf2 accumulates in the nucleus and activates transcription of various target genes. In this study, we aim to elucidate the molecular basis of Nrf2 activation in the stress response, especially the regulation mechanism of ubiquitination by Keap1.

研究分野：医化学

キーワード：ストレス応答

## 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とが知られている。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すばやく応答し、恒常性を維持する。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て、生体防御に働く転写因子である。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、非刺激下では Keap1-Cullin3 (Cul3) を構成因子とするユビキチンリガーゼ複合体によりユビキチン化され、プロテアソームにより迅速に分解されている。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、種々の標的遺伝子の転写を活性化する。

Nrf2 活性化制御の主な作用点は、Keap1 を介したユビキチン化反応調節である。これまでに私たちは、Keap1 分子は複数のシステイン残基をセンサーとして保持 (システインコード) し、それら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ことを見出し、このメカニズムの存在を実証してきた。しかし、これらのシステイン残基 (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の実態は未だ同定されていない。

また、ストレス刺激に応答して Nrf2 ユビキチン化を停止する分子機構として、システイン残基修飾によって Keap1 に構造変化を生じ、その結果ユビキチンリガーゼ活性が減弱化すること (Keap1 構造変化仮説) が提唱されているが、ストレス刺激に応じてどのような Keap1 分子の構造変化が起こるのかは未だ解明されていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、Nrf2 活性化の分子基盤、特に次世代型 Nrf2 誘導剤として期待される Keap1-Nrf2 相互作用阻害剤による影響を明らかにすること、また、Keap1 上に存在する活性酸素種センサーとして機能するシステイン残基の生理機能の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 英国 University of Dundee の Albena Dinkova-Kostova 博士と共同研究を行い、新しい Nrf2 活性化剤として期待される Keap1-Nrf2 阻害剤 PRL-295 の解析を行なった。

(2) 米国 Fred Hutchinson Cancer Research Center の Thomas Kensler 博士と共同研究を行い、Keap1 センサーシステイン残基の機能解析を行なった。

## 4. 研究成果

### (1) Keap1-Nrf2 阻害剤 PRL-295 の解析

Keap1-Nrf2 阻害剤 PRL-295 は、米国 University of Illinois の Terry Moore 博士が開発し合成したものを分与いただいた (Lazzara et al, 2019, 図 1)。私たちはこれまでに、NMR (核磁気共鳴) を用いた試験管内反応の解析により、PRL-295 が Keap1-Nrf2 相互作用を阻害することを明らかにしていた (Horie et al, 2021)。本研究では、英国 University of Dundee の Albena Dinkova-Kostova 博士と共同研究を行い、FRET (Förster resonance energy transfer) や CETSA (Cellular Thermal Shift assay) を通して、実際に細胞内においても Keap1-Nrf2 相互作用を阻害することを明らかにすることに成功した。

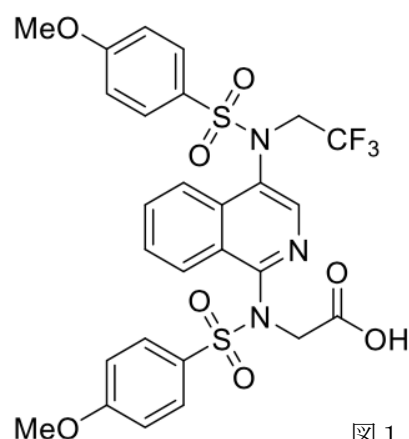


図 1

当初の計画では、私が University of Dundee に渡航し、いずれの解析も実施する予定であったが、新型コロナウイルス流行の影響により渡航を中止し、CETSA 解析は Dinkova-Kostva 研究室の Sharadha Dayalan Naidu 研究員が実施した。また、マウスへのアセトアミノフェン投与による肝障害が PRL-295 投与により軽減されることを示す実験も University of Dundee にて実施予定であったが、同様の理由で計画を変更し、東北大学において実施した。

FRET 解析では、HeLa 細胞に sfGFP-Nrf2 と mCherry-Keap1 の共過剰発現を行い、PRL-295 処理

前後の同一細胞の観察を行なった (図 2)。処理前の細胞では Nrf2 は主に細胞質に局在し、FRET 解析から Keap1 と Nrf2 は細胞質において相互作用していることが確認された。一方、PRL-295 処理 1 時間後の細胞では Nrf2 は核内にも局在するようになり、同時に細胞質における Keap1-Nrf2 相互作用は減弱化することが確認された。

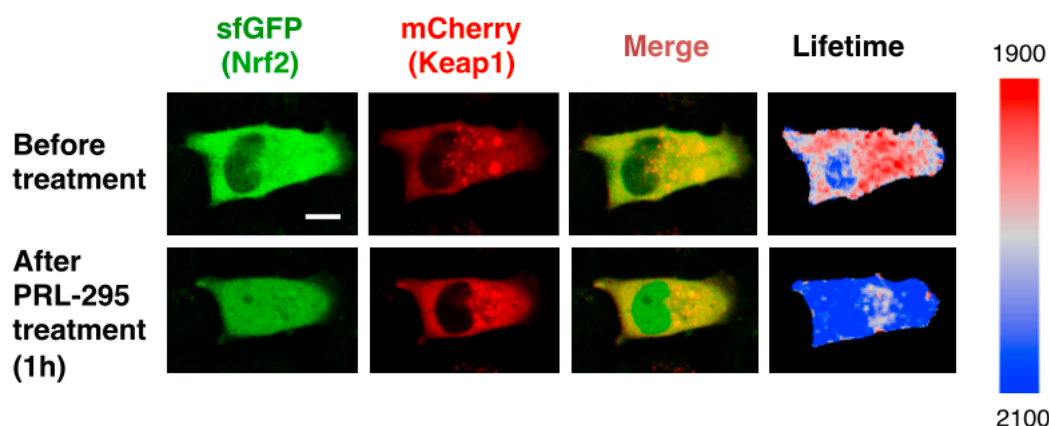


図 2

CETSA 解析では、HL-60 細胞に PRL-295 処理を行い、そのタンパク質抽出液の処理する温度を変化させ、Keap1 の熱安定性の変化を調べることで、細胞内においても PRL-295 が直接 Keap1 と相互作用をしていることを明らかにした (図 3)。以上の解析結果は、*iScience* 誌に発表した。



図 3

## (2) Keap1 センサーシステイン残基の機能解析

私たちはこれまでに Keap1 がセンサーシステイン残基を使い分けて親電子性物質や酸化ストレスを感知していることを、主に培養細胞を用いた解析から明らかにしてきた (Saito et al, 2016; Suzuki et al, 2019)。しかし、マウス個体レベルの解析は十分に実施されていなかった。そこで、米国 Fred Hutchinson Cancer Research Center の Thomas Kensler 博士と共同研究を行い、Keap1 センサーシステイン残基のマウス個体レベルの機能解析の実施を試みた。しかし、新型コロナウイルス流行の影響により渡航不可能になったため、私たちが作製した各種 Keap1 センサーシステイン残基変異マウスの凍結受精卵を送付し、米国 Fred Hutchinson Cancer Research Center にて個体復元を行い、現在 Thomas Kensler 博士らが解析を進めている。これまでの予備実験により、CDDO-Im 投与による Nrf2 活性化は Keap1-Cys151 を介していることがマウス個体レベルの解析から明らかになっている。今後、さらなる解析を進め、論文化を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Suzuki Takafumi, Muramatsu Aki, Saito Ryota, Iso Tatsuro, Shibata Takahiro, Kuwata Keiko, Kawaguchi Shin-ichi, Iwawaki Takao, Adachi Saki, Suda Hiromi, Morita Masanobu, Uchida Koji, Baird Liam, Yamamoto Masayuki	4. 巻 28
2. 論文標題 Molecular Mechanism of Cellular Oxidative Stress Sensing by Keap1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 746 ~ 758.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.06.047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nagasu Hajime, Sogawa Yuji, Kidokoro Kengo, Itano Seiji, Yamamoto Toshiya, Satoh Minoru, Sasaki Tamaki, Suzuki Takafumi, Yamamoto Masayuki, Wigley W. Christian, Proksch Joel W., Meyer Colin J., Kashiwara Naoki	4. 巻 33
2. 論文標題 Bardoxolone methyl analog attenuates proteinuria-induced tubular damage by modulating mitochondrial function	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 12253 ~ 12263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201900217R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kanamoto Mayu, Tsuchiya Yoshihiro, Nakao Yuki, Suzuki Takafumi, Motohashi Hozumi, Yamamoto Masayuki, Kamata Hideaki	4. 巻 13
2. 論文標題 Structural instability of I B kinase promotes autophagic degradation through enhancement of Keap1 binding	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0203978
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0203978	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kikuchi Kenta, Iida Mayumi, Ikeda Naoki, Moriyama Shigetaka, Hamada Michito, Takahashi Satoru, Kitamura Hiroshi, Watanabe Takashi, Hasegawa Yoshinori, Hase Koji, Fukuhara Takeshi, Sato Hideyo, Kobayashi Eri H., Suzuki Takafumi, Yamamoto Masayuki, Tanaka Masato, Asano Kenichi	4. 巻 201
2. 論文標題 Macrophages Switch Their Phenotype by Regulating Maf Expression during Different Phases of Inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 635 ~ 651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1800040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Dayalan Naidu Sharadha, Muramatsu Aki, Saito Ryota, Asami Soichiro, Honda Tadashi, Hosoya Tomonori, Itoh Ken, Yamamoto Masayuki, Suzuki Takafumi, Dinkova-Kostova Albena T.	4. 巻 8
2. 論文標題 C151 in KEAP1 is the main cysteine sensor for the cyanoenone class of NRF2 activators, irrespective of molecular size or shape	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8037
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-26269-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshida Eiki, Suzuki Takafumi, Morita Masanobu, Taguchi Keiko, Tsuchida Kohei, Motohashi Hozumi, Doita Minoru, Yamamoto Masayuki	4. 巻 23
2. 論文標題 Hyperactivation of Nrf2 leads to hypoplasia of bone in vivo	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 386 ~ 392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12579	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Dayalan Naidu Sharadha, Suzuki Takafumi, Yamamoto Masayuki, Fahey Jed W., Dinkova-Kostova Albena T.	4. 巻 62
2. 論文標題 Phenethyl Isothiocyanate, a Dual Activator of Transcription Factors NRF2 and HSF1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Nutrition & Food Research	6. 最初と最後の頁 1700908 ~ 1700908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mnfr.201700908	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Dayalan Naidu Sharadha, Suzuki Takafumi, Dikovskaya Dina, Knatko Elena V., Higgins Maureen, Sato Miu, Novak Miroslav, Villegas Jose A., Moore Terry W., Yamamoto Masayuki, Dinkova-Kostova Albena T.	4. 巻 25
2. 論文標題 The isoquinoline PRL-295 increases the thermostability of Keap1 and disrupts its interaction with Nrf2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103703 ~ 103703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103703	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Takafumi Suzuki and Masayuki Yamamoto.
2. 発表標題 Multiple sensor mechanism of the Keap1-Nrf2 system.
3. 学会等名 The Environmental Response V, 17th JBS Biofrontier Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takafumi Suzuki, Aki Muramatsu, Ryota Saito, Tatsuro Iso, Saki Adachi, Hiromi Suda, Masanobu Morita, Liam Baird, Masayuki Yamamoto
2. 発表標題 Molecular mechanism of cellular oxidative stress sensing by Keap1.
3. 学会等名 The Environmental Response V, 17th JBS Biofrontier Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saki Adachi, Eiki Yoshida, Eriko Naganuma, Takafumi Suzuki, Masayuki Yamamoto
2. 発表標題 Activation of transcription factor Nrf2 suppresses autoimmune arthritis.
3. 学会等名 The Environmental Response V, 17th JBS Biofrontier Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Liam Baird, Takafumi Suzuki, Masayuki Yamamoto.
2. 発表標題 Identification of a compound which is synthetic lethal with Nrf2 activity.
3. 学会等名 The Environmental Response V, 17th JBS Biofrontier Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuta Horie, Tatsuro Iso, Jin Inoue, Takafumi Suzuki, Seizo Koshiba, Takashi Kamei, Masayuki Yamamoto.
2. 発表標題 Verification of the hinge & latch mechanism of Keap1-Nrf2 system by NMR method.
3. 学会等名 The Environmental Response V, 17th JBS Biofrontier Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 45. Seizo Koshiba, Tatsuro Iso, Jin Inoue, Aki Muramatsu, Takafumi Suzuki, Takanori Kigawa and Masayuki Yamamoto
2. 発表標題 Structural and functional analyses of oxidative stress response by Keap1-Nrf2 system.
3. 学会等名 28th ICMRBS,
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木隆史、村松亜紀、斎藤良太、磯達朗、山本雅之
2. 発表標題 システム反応性Nrf2誘導剤に対する応答を欠失したKeap1変異体の創出
3. 学会等名 第91回日本生化学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 Keap1酸化ストレスセンサーの機能解析
3. 学会等名 第91回日本生化学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木隆史
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第84回日本生化学会東北支部例会 奨励賞受賞講演（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村松亜紀、鈴木隆史、Dinkova-Kostova, 山本雅之
2. 発表標題 TBE-31はKeap1Cys151を介してNrf2を活性化し抗炎症に働く
3. 学会等名 第84回日本生化学会東北支部例会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 鈴木隆史、山本雅之	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 271
3. 書名 人体の細胞生物学：カラー図解 第3章3. 遺伝子発現の調節	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東北大学大学院医学系研究科医化学分野  <a href="http://www.dmbc.med.tohoku.ac.jp/official/index.html">http://www.dmbc.med.tohoku.ac.jp/official/index.html</a></p>
--



6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ディンコバコストバ アルベナ  (Dinkova-Kostova Albena)	ダンディー大学・School of Medicine・Professor	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ケンスラー トーマス  (Kensler Thomas)	フレッドハッチンソンがん研究センター・Public Health Sciences Division・Professor	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
United Kingdom	University of Dundee			
United States of America	Fred Hutchinson Cancer Research Center			