

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07340

研究課題名(和文) ストレスセンサーKeap1による活性酸素種感知機構の解明

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：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、細胞は酸化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のユビ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、Keap1の活性酸素種センサーの同定と生理機能解明、さらに酸化ストレス応答におけるNrf2活性化の分子基盤の解明を目的とした。さらに、構造機能連関解析により、Keap1-Nrf2制御系による酸化ストレス応答の分子メカニズム解明を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Keap1が活性酸素種を感知するメカニズムを明らかにしました。このメカニズムは、親電子性物質を感知するメカニズムとは異なり、Keap1はセンサーを使い分けてストレスを感知していることが明らかになりました。本研究を進めていくことで、Keap1-Nrf2システムの活性化メカニズムの分子基盤の理解が進み、Keap1-Nrf2システムを利用した新薬や治療法の開発が加速することが期待されます。

研究成果の概要(英文)：Disruption of the response system to oxidative stress is closely related to the development of various diseases. To prevent such diseases, cells respond rapidly to oxidative stress and maintain homeostasis. The stress sensor Keap1 regulates the ubiquitination of the transcription factor Nrf2 and is a key factor that plays a central role in the oxidative stress defense mechanism. In this study, we aimed to identify the reactive oxygen species sensor of Keap1 and elucidate its physiological function, as well as the molecular basis of Nrf2 activation in the oxidative stress response. Furthermore, we aimed to elucidate the molecular mechanism of oxidative stress response by the Keap1-Nrf2 regulatory system through structure-function linkage analysis.

研究分野：医化学

キーワード：Keap1

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生体応答系の破綻は、様々な疾患発症と密接に関わる。このようなストレス関連疾患の発症を未然に防ぐ目的で、生体は環境ストレスに対して迅速に応答し、恒常性を維持する仕組みを保持している。Nrf2 は酸化ストレスや異物・毒物代謝に関わる酵素群の遺伝子を統一的に制御しており、生体防御の要として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大きな注目を浴びており、その作用の様々な疾患の予防・治療への応用を目指して、国内外で多くの Nrf2 誘導剤の開発計画が進行している。Nrf2 は、非ストレス刺激下では Keap1-Cullin3 (Cul3) を構成因子とするユビキチン E3 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、ユビキチンリガーゼ複合体の基質認識アダプターとして機能するだけではなく、外来性ストレスのセンサー分子としても機能する。例えば、Keap1 が酸化ストレス刺激を感知すると、同複合体はユビキチンリガーゼ活性を失い Nrf2 のユビキチン化反応は停止する。その結果、分解を免れて安定化した Nrf2 は核内に蓄積して、抗酸化剤応答配列 (ARE) に結合し、種々の標的遺伝子の転写を活性化する。

2. 研究の目的

Nrf2 活性化制御の主な作用点は Keap1-Cul3 複合体によるユビキチン化反応の調節である。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して応答していることを見出し、本メカニズムの存在を実証してきた。このように親電子性物質に対する感知機構は明らかになりつつあるが、一方、活性酸素種 (ROS) に対する Keap1 の感知機構は未だ不明である。そこで、本研究では、Keap1 の ROS センサーの同定を試みた。さらに、ROS センサー欠失 Keap1 発現マウスを作製し、その生理機能解明を目指した。

また、ROS に応答して Nrf2 のユビキチン化を停止する分子メカニズムとして、システイン残基修飾によって Keap1 タンパク質に構造変化を惹起し、その結果、ユビキチンリガーゼ活性の減弱化を招来することによって Nrf2 が安定化すること、即ち Keap1 構造変化仮説を想定している。しかし、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い。本研究では、酸化ストレス応答において Nrf2 活性化を惹起する分子基盤、特に Keap1 による Nrf2 のユビキチン化反応に対する調節機構の解明を目指した。

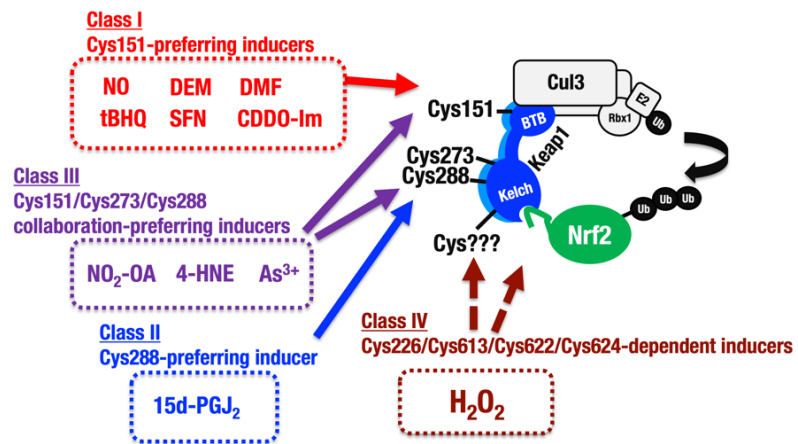


図 Keap1による多様なストレス感知機構“システインコード仮説”
Keap1はシステイン残基を使い分け多様なストレスを感知することができる。

3. 研究の方法

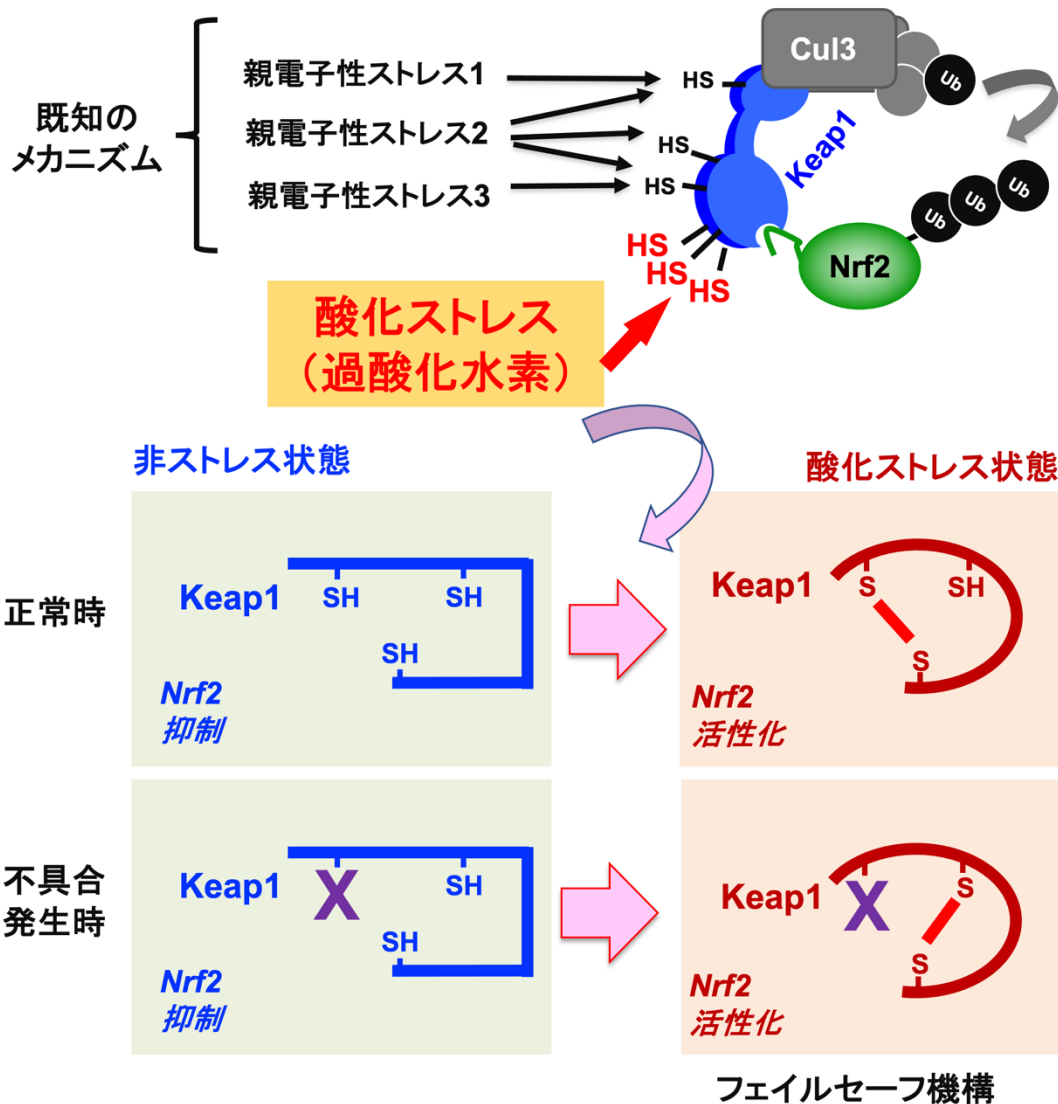
本研究では、Nrf2 誘導剤と高反応性の Keap1 のシステイン残基に対する系統的なシステイン残基置換実験を実施した。また、それらの Keap1 変異体分子やマウスの解析を実施した。

さらに、本研究では、Keap1-Cul3 複合体のタンパク質構造を明らかにするために、X 線結晶構造解析およびクライオ電子顕微鏡法を用いて Keap1 全長タンパク質の構造解明に挑戦した。

4. 研究成果

Nrf2 誘導剤と高反応性の Keap1 のシステイン残基に対する系統的なシステイン残基置換実験を実施した。それらの Keap1 変異体分子やマウスの解析の結果、Keap1 は複数のセンサーシステイン残基を使い分け、多様な環境ストレスに対して、精密な応答をしていることを見出した。このマルチセンシング機構は Keap1 分子中のシステイン残基に暗号化されたメカニズムであることから、このメカニズムを「システイン・コード」と命名した。その過程で、Keap1 の 25 個のシ

ステイン残基のうち、11個を Keap1 のユビキチンリガーゼ活性を保ったまま別のアミノ酸に置換した Keap1 分子を作出することに成功した。また、そのうち重要な7個のシステイン残基を改変したマウスの作出にも成功した。それらの分子やマウスの解析の結果、Keap1 は複数のセンサーシステイン残基を使い分け、酸化ストレスを感知していることを見出した。酸化ストレスによって Keap1 の複数のシステイン残基の間でジスルフィド結合が形成され、その結果 Nrf2 を活性化すると考えられた。このメカニズムの解明により、Keap1 は、仮に不具合が発生した場合においても酸化ストレスを感知して生体を守ることができる巧妙な仕組み（フェイルセーフ機構）を備えていることが明らかになった。この仕組みは、酸化ストレス感知に必要なシステイン残基の一部が親電子性ストレスなどによる修飾を受けてしまった場合でも、残ったシステイン残基の間でジスルフィド結合（SS 結合）を形成することで Nrf2 活性化を引き起こすことを可能にするメカニズムである。そのため、システイン残基を1つずつ失わせる従来の解析方法では明らかにすることは難しく、複数のシステイン残基を同時に失わせる解析アプローチを採用することによって明らかにすることに成功した。この過酸化水素を感知する Keap1 システイン残基の解明は、長い歴史のある酸素生物学の研究分野での最も重要な発見の一つである。



さらに、Keap1-Cul3 複合体のタンパク質構造を明らかにするために、Keap1, Cul3, Nrf2 の精製タンパク質の調製に成功した。いくつかの結晶を得ることに成功しており、高分解能の X 線結晶構造解析を行うため、結晶化の条件検討を現在進めている。また、クライオ電子顕微鏡法を用いた Keap1 全長タンパク質の構造解析も進めており、粒子の撮影に成功している。現在より高分解能の像を得るための条件検討を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 YUMOTO Akane, KOKUBO Toshiaki, IZUMI Ryutaro, SHIMOMURA Michihiko, FUNATSU Osamu, TADA Motoki N., OTA-MURAKAMI Naoko, IINO Kayoko, SHIRAKAWA Masaki, MIZUNO Hiroyasu, KUDO Takashi, TAKAHASHI Satoru, SUZUKI Takafumi, URUNO Akira, YAMAMOTO Masayuki, SHIBA Dai	4. 巻 -
2. 論文標題 Novel method for evaluating the health condition of mice in space through a video downlink	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.20-0102	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 Cvetko Filip, Caldwell Stuart T., Higgins Maureen, Suzuki Takafumi, Yamamoto Masayuki, Prag Hiran A., Hartley Richard C., Dinkova-Kostova Albena T., Murphy Michael P.	4. 巻 296
2. 論文標題 Nrf2 is activated by disruption of mitochondrial thiol homeostasis but not by enhanced mitochondrial superoxide production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100169 ~ 100169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.016551	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 Baird Liam, Suzuki Takafumi, Takahashi Yushi, Hishinuma Eiji, Saigusa Daisuke, Yamamoto Masayuki	4. 巻 40
2. 論文標題 Geldanamycin-Derived HSP90 Inhibitors Are Synthetic Lethal with NRF2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e00377-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00377-20	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 Suzuki Takafumi、(共著者36名省略)	4. 巻 3
2. 論文標題 Nrf2 contributes to the weight gain of mice during space travel	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01227-2	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 該当する

1. 著者名 Suzuki Takafumi, Hidaka Takanori, Kumagai Yoshito, Yamamoto Masayuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Environmental pollutants and the immune response	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 1486 ~ 1495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-020-0802-6	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 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 Horie Yuta, Suzuki Takafumi, Inoue Jin, Iso Tatsuro, Wells Geoffrey, Moore Terry W., Mizushima Tsunehiro, Dinkova-Kostova Albena T., Kasai Takuma, Kamei Takashi, Koshiba Seizo, Yamamoto Masayuki	4. 巻 4
2. 論文標題 Molecular basis for the disruption of Keap1-Nrf2 interaction via Hinge & Latch mechanism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02100-6	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 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 Alben 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Anqi Zhang, Saki Adachi, Tomonori Hosoya, Ken Itoh, Takafumi Suzuki, Masayuki Yamamoto.
2. 発表標題 Establishment of Hmox1-DsRed reporter mouse system.
3. 学会等名 第86回日本生化学会東北支部例会
4. 発表年 2020年

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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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

	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
--	---------------------------	-----------------------	----

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			
英国	Dundee University			
米国	Fred Hutchinson Cancer Research Center			