

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008年度～2009年度

課題番号：20890013

研究課題名（和文） ストレスセンサー分子Keap1の生理的機能解析

研究課題名（英文） Physiological function analysis of stress sensor Keap1

研究代表者

鈴木 隆史 (SUZUKI TAKAFUMI)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70508308

研究成果の概要（和文）：本研究では、ストレスセンサー分子 Keap1 についてマウス遺伝学を駆使して生理的機能解析を行った。その結果、Keap1 の部分的抑制によって転写因子 Nrf2 を活性化させ異物代謝系および酸化ストレス応答系遺伝子の発現を誘導し生体防御に働くことを実証した。また、Nrf2 抑制には機能的な Keap1 ホモ二量体形成が必須であり、ストレス刺激はこれを破綻させ Nrf2 を活性化すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the physiological function of stress sensor Keap1 by mouse genetics. We have found that partial repression of Keap1 leads to activation of transcriptional factor Nrf2, resulting in up-regulation of detoxifying enzymes and anti-oxidant proteins, which is effective for cytoprotection. We have further found that functional Keap1 homodimer is essential for Nrf2 repression, which is disrupted by stress stimuli.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：ストレス、転写因子、Keap1、Nrf2

1. 研究開始当初の背景

活性酸素種などの酸化ストレスや外来異物に対する応答系の破綻は、様々な疾患の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。これまでの研究から転写因子 Nrf2 が酸

化ストレス・異物代謝応答系に関わる酵素遺伝子の一群を統一的に制御していることが明らかになっている。Nrf2 は、定常状態では Keap1 分子によってユビキチン化されプロテアソーム依存的に分解されている。しかし、酸化ストレスや親電子性物質の投与により、Nrf2 の分解が停止し、Nrf2 は速やかに核に

蓄積し、小 Maf 群因子とヘテロ二量体を形成し、標的遺伝子群を活性化化する。

このようにして Nrf2 を活性化する刺激には、システイン残基と反応性の高い親電子性物質や酸化ストレス刺激が多く、また、Keap1 はシステイン残基に富んだ分子であることから、Keap1 がストレスセンサーとして働くと思定された。そこで、いくつかのグループによって精製タンパク質を用いて親電子性物質が結合しやすい高反応性システイン残基の同定の試みがなされたが、精製タンパク質の調整方法によって修飾されるシステイン残基が異なることが報告され、これらの試験管内反応の解析が生体内のレッドクス環境を十分に反映しているか疑問が残されている。また、Nrf2 抑制に生理的な必要な Keap1 の発現量はよくわかっていない。

申請者は、この謎を明らかにするために、試験管内における非生理的条件下でのシステイン残基の修飾反応ではなく、生体内で起こっているストレス応答を調べる必要があると考えた。細胞内ではグルタチオンやチオレドキシシンなど抗酸化タンパク質が多量に存在する中で、実際に Keap1 がセンサーとして働いているのか実証する必要がある。また、大腸菌を用いて作製された Keap1 組換え精製タンパク質では、立体構造やセンサーであるシステイン残基の向きなどが生体内と同じ状態を再現できているかどうかわからない。

また、Keap1 のストレス感知メカニズムを解明するためには、Keap1 の複合体を明らかにすることが必要である。Keap1 は Nrf2 をユビキチン化するために、様々な因子と複合体を形成していると考えられる。Keap1 は、ユビキチン E3 ライゲース Cullin3 と相互作用することが報告されているものの、ストレス感知のメカニズムは両者の結合親和性だけでは説明できない。Keap1 システイン残基の修飾が引き金となり Nrf2 活性化へとつながるメカニズムを解明するためには、Keap1 と相互作用する新たな因子が想定される。また、機能的な Keap1 複合体を明らかにするためには、既知、未知の相互作用因子の生理的な存在比の環境において調べる必要がある。

2. 研究の目的

生体防御機構の中心的役割を担う Keap1-Nrf2 系のストレス応答機構は未だ不明な点が多い。Keap1 のシステイン残基がストレスセンサーとして働くと考えられているが、ストレス刺激によって生体内で実際に Keap1 システイン残基が修飾されることは実証されていない。本研究では、生体内でストレス刺激を受けて修飾される Keap1 システイン残基を同定する系を確立し、真のスト

レスセンサーを明らかにする。また、生体内で Keap1 と相互作用する因子を同定し、Keap1-Nrf2 系によるストレス感知機構の解明を目指す。

生体内において Keap1 のシステイン残基がストレス応答の際に修飾されることを明らかにし、Keap1 によるストレス感知の実態を証明する。さらに、どのシステイン残基が生体内で修飾されるかを調べ、真のストレスセンサー残基を同定する。また、ストレス刺激の種類によって修飾されるシステイン残基に多様性があるかどうか検討を行い、多岐にわたるストレス刺激に Keap1-Nrf2 が応答するメカニズムに迫る。さらに、ストレス刺激の有無で Keap1 との相互作用に影響のある因子を単離し、Keap1 システイン残基の修飾が引き金となり Nrf2 活性化へと導く分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Keap1 遺伝子ノックダウンマウスの作製

Keap1 遺伝子の発現量が与える影響について、生理的な解析はほとんどなされていない。申請者らのグループは Cre-loxP システムを用いて Keap1 の条件付き遺伝子破壊マウスの作製を行った (Okawa et al, 2005)。その際に loxP 配列等を Keap1 遺伝子に挿入したことにより、Keap1 遺伝子の発現が減少していることを見いだしていた。このマウスにおける Keap1 の発現量および Nrf2 活性性に与える影響について検討を行う。また、毒物に対する耐性についてもマウス個体レベルの解析を行う。

(2) 生体における Keap1 ドミナントネガティブ効果の検証

がん細胞において KEAP1 遺伝子の変異がいくつも報告されている (Padmanabhan et al, 2006; Shibata et al, 2008)。その約半数がヘテロ接合型であるため、Keap1 ノックアウトアレルをヘテロ接合型でもつマウスは、大きな Nrf2 活性化は観察されていないため、がん細胞においてヘテロ接合型 KEAP1 変異が NRF2 活性化を引き起こすのに十分かどうか議論の余地がある。これをマウス個体レベルで検証するためにダブルトランスジェニックマウスを Keap1 遺伝子破壊マウスと交配し、マウス遺伝学を用いて検証を行う。申請者らはこれまでに Keap1 を発現するトランスジェニックマウス作製に成功しており、このトランスジェニックマウスは Keap1 遺伝子破壊マウスの食道前胃の過角化および致死性を改善することが可能である (Suzuki et al, 2008)。この系を用いて、各種の Keap1 変異体が野性型 Keap1 に与える影響について個体レベルの解析を行う。

(3) 生理的 Keap1 複合体の解析

生体内での Keap1 の本来の機能を明らか

にするために、申請者らがすでに作製したトランスジェニックマウスが有効であると考えた。このマウスは、HA タグを融合させた Keap1 分子 (HA-Keap1) を発現する (文献 1)。このトランスジェニックマウスが発現する HA-Keap1 分子は生体内での機能が確認されており、またその発現量は内在性 Keap1 の発現量とほぼ同等であることが確認されている。さらに、システイン残基やドメイン欠失変異体を発現するトランスジェニックマウスも数種類作製しており、野生型 Keap1 との比較解析も可能である。これらの利点を活かすことにより、生体内で働く Keap1 分子を取り出してきて、修飾されるシステイン残基や相互作用因子を明らかにするツールになると考えられる。この系を確立することにより、生体内で Keap1 複合体の挙動およびシステイン残基の修飾がこれに与える影響を調べる。この解析によって同定されたシステイン残基および相互作用因子について機能解析を行い、ストレス感知機構の解明を目指す。

4. 研究成果

(1) Keap1 遺伝子ノックダウンマウスの作製と解析

申請者らのグループは Keap1 完全欠損マウスでは Nrf2 の恒常的な活性化が起こり生後 3 週間以内に食道前胃の過角化により致死に至ることが報告した (Wakabayashi et al, 2003)。この致死性は Nrf2 遺伝子との二重欠損によって改善されることから、Nrf2 の恒常的な活性化によって致死に至ることが明らかにされた。本研究では、部分的 Keap1 の遺伝子破壊マウスの作製に成功し、このマウスでは Nrf2 が活性化しているものの、致死に至らないことがわかった。また、この Keap1 ノックダウンマウスはアセトアミノフェン毒性に対して耐性であることが明らかになった。このことは、生体内では Keap1 の発現量が Nrf2 抑制に重要であり、部分的な Keap1 抑制は、致死に至らしめることなく、Nrf2 活性化を引き起こすことが可能であることを示している (Taguchi et al, 印刷中)。

(2) Keap1 変異体分子によるドミナントネガティブ効果の検証

近年、がん細胞において Keap1 の体細胞変異が高頻度に発見された。これらの Keap1 変異は Nrf2 抑制に必須な IVR や DGR ドメインに多く観察され、Nrf2 の恒常的な活性化が引き起こされると考えられている。しかしながら、この変異の約半数はヘテロ接合型の変異が多く、正常なアリルが残っているにも関わらず Nrf2 の恒常的な活性化を引き起こしうることか疑問が残されていた。そこで、変異体 Keap1 が野生型 Keap1 とヘテロ二量体を形成するた

めにドミナントネガティブ効果を発揮する可能性が考えられた。これを検証するために、野生型 Keap1 とがん由来の変異体 Keap1 (G430C) を同時に発現するトランスジェニックマウスを作製し検討を行った。その結果、がん由来 Keap1 変異分子の共発現によって野生型 Keap1 による Nrf2 抑制能は減弱化した。それに相関して、Keap1 遺伝子破壊マウスで見られるような食道前胃の過角化が観察された。このことから、がん細胞において 1 ヒットの変異によるヘテロ型 Keap1 変異でも十分に Nrf2 を活性化しうることが実証された。同様に、二量体化に必須な BTB ドメインの欠失体あるいは点変異体 mutHKVVL 分子を共発現した結果、野生型 Keap1 による Nrf2 抑制能は減弱しなかった。このことは、Keap1 による Nrf2 抑制には BTB ドメインを介した二量体形成が必須であることを強く示唆しており、がん細胞において見いだされる変異が BTB ドメインに少ないことを説明しうるものである。さらに、ストレス感知に重要と考えられる高反応性システイン残基 Cys273/288 について修飾型ミミックするような変異体 C273&288A 分子の共発現によって野生型 Keap1 による Nrf2 抑制能は減弱化した。このことは、二量体の Keap1 分子のうち、片側の Keap1 のシステイン残基が修飾されることによって、Nrf2 活性化を引き起こすことが可能であることを示唆する。すなわち、Keap1 が鋭敏なストレスセンサーとして働くのに合理的なメカニズムであると考えられた (図 1 参照、投稿準備中)。

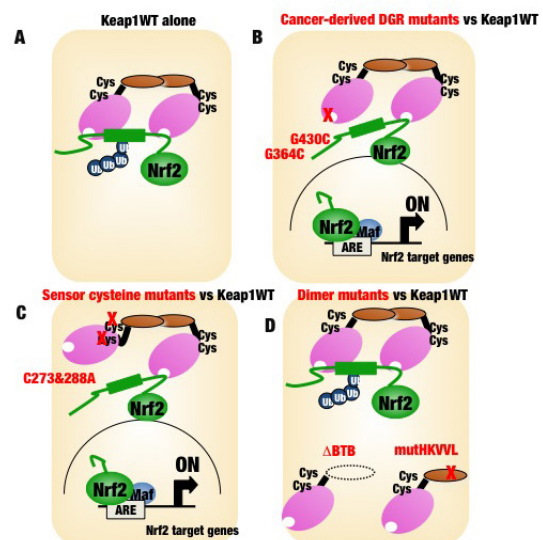


図 1 Keap1 変異体によるドミナントネガティブ効果

(3) 生理的 Keap1 複合体の解析

マウス胎児由来繊維芽細胞 (MEF) における Keap1 複合体についてゲル濾過を用いて解析を行った。その結果、複合体の大きさから、ほとんどの Keap1 は二量体を形成しており、

一部の Keap1 が Cul3 と相互作用をしていると考えられた。HA-Keap1 を発現するトランスジェニックマウス由来 MEF を用いて HA タグを利用した免疫沈降法により HA-Keap1 と内在性 Cul3 の相互作用を確認することに成功した。また、精製蛋白質や培養細胞への過剰発現実験などにより親電子性物質処理による Keap1 の Cys151 の修飾が、Keap1-Cul3 の相互作用が阻害する可能性が報告されているが、本研究において確立した系を用いて検証した結果、親電子性物質ジエチルマレイン酸によって Keap1-Cul3 相互作用が阻害されることはないことがわかった。このことは、これまで考えられていた仮説とは異なる Nrf2 活性化メカニズムが存在する可能性を示唆する。今後、親電子性物質の違いや新規メカニズムは何なのかを明らかにするべく検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Taguchi K, Maher JM, Suzuki T, Kawatani Y, Motohashi H, Yamamoto M. Genetic analysis of cytoprotective functions supported by graded expression of Keap1. Mol Cell Biol. 2010. 印刷中 (査読あり)

[学会発表] (計 18 件)

1. 山本雅之、柴田龍弘、太田力、Kit Tong、黒河博文、鈴木隆史、田口恵子、本橋ほづみ Nrf2-Keap1 ストレス応答系は両刃の剣：発癌支持作用と化学発癌予防作用第 68 回日本癌学会学術総会 2009 年 10 月 1-3 日横浜
2. Takafumi Suzuki, Jonathan Maher, Yukie Kawatani, Masayuki Yamamoto. Select heterozygous Keap1 mutations have a dominant-negative effect on wildtype Keap1 in vivo. International symposium 2009 on Signaling Functions of Reactive Oxygen Species. 2009 年 6 月 18 日阿蘇
3. 本橋ほづみ、藤田理恵、鈴木隆史、Kit Tong、黒河博文、山本雅之生体における Keap1/Nrf2 制御系の機能貢献と応答機構第 62 回日本酸化ストレス学会 2009 年 6 月 11-12 日福岡
4. 鈴木隆史、Jonathan Maher、山本雅之 Keap1 変異体によるドミナントネガティブ効果のトランスジェニックレスキュー法を用いた検証 Biochemistry and Molecular Biology 2008 年 12 月 9-12 日神戸

[図書] (計 1 件)

1. 鈴木隆史、山本雅之 南山堂 転写制御とエピジェネティクスーゲノムでコードに向けて一第V部第 16 章「環境応答と転写因子」2008 p143-149.

[その他]

ホームページ

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 隆史 (SUZUKI TAKAFUMI)
東北大学・医学系研究科・助教
研究者番号：70508308

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：