

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510066

研究課題名（和文） 第二相解毒酵素群の発現を誘導するNrf2-Maf転写因子複合体の三次元構造解析

研究課題名（英文） Three-dimensional Structure of Nrf2-Maf transcription factor complex mediating the induction of phase II detoxifying enzymes

研究代表者

黒河 博文 (KUROKAWA HIROFUMI)

東北大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：80359546

研究成果の概要（和文）：Nrf2 転写因子は Maf 転写因子と二量体を形成し、毒性化学物質や酸化ストレス（環境ストレス）に応答して第二相解毒酵素群の発現誘導を統一的に制御する。その結果、毒性化学物質は速やかに消去される。申請者らは Maf ホモ二量体と DNA との複合体の結晶構造を明らかとし、Nrf2-Maf が結合する抗酸化剤応答配列中の GC 配列を Maf 転写因子がユニークな方法で認識していることを明らかとした。また、毒性化学物質の感知に関わり、Nrf2 抑制因子である Keap1 全長構造の電子線単粒子解析に成功した。これにより Keap1 による Nrf2 抑制制御の分子機構が明らかとなった。さらに、肝臓癌などで異常蓄積する p62 タンパク質が Keap1 と競合的に結合することで Nrf2 を活性化し、癌細胞の増殖に有利な環境を作り出していることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

Nrf2 and Maf transcription factors form hetero dimer and mediate the induction of phase II detoxifying enzymes in response to oxidative stress. We determined the crystal structure of Maf dimer in complex with its cognate DNA and revealed the unique DNA recognition mechanism by Maf. We also determined the 3D structure of Keap1, a negative regulator of Nrf2 transcription factor in response to oxidative stress, by using single particle electron microscopy. Keap1 consists of two large spheres connected by stem region. In addition we found that p62, a selective autophagy substrate, competitively binds to Keap1 and activates Nrf2. Crystal structure of p62-Keap1 complex has been solved and showed that p62 competitively binds to Nrf2 binding pocket of Keap1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響化学

キーワード：タンパク質、結晶構造解析、毒性化学物質、酸化ストレス、Keap1

1. 研究開始当初の背景

親電子性分子や酸化ストレスは遺伝子

DNA に直接作用して、遺伝子変異を惹起して、癌や動脈硬化、糖尿病など様々な疾患を誘発するが、一方、私たちの体には親電子性分子や酸化ストレスを感知し、無害化する仕組みも備わっている。すなわち、細胞内に活性酸素や親電子性分子が出現すると、一群の抗酸化酵素群や解毒代謝酵素群が活性化され、それらのストレス分子は無毒化される。

Paul Talalay らは、第二相解毒酵素群の誘導が化学発癌予防に大切であることを示した。さらに、これらの第二相解毒酵素群の転写は抗酸化剤応答配列(ARE: Anti-oxidant Responsive Element)と呼ばれる共通のシス配列によって制御されていることが示された。

山本雅之らは、転写因子 Nrf2 が第二相解毒酵素群の遺伝子発現を統一的に制御することを見出した。さらに、Nrf2 は Maf 転写因子とヘテロ二量体を形成して抗酸化剤応答性配列 (ARE) に結合することも明らかとなった。実際、Nrf2-Maf 転写因子は、第二相解毒代謝酵素群だけでなく、酸化ストレス防御タンパク質の発現誘導をしていることも示された。Nrf-MafGヘテロ二量体と MafG ホモ二量体が異なる DNA 配列特異性を示すこと、また、それぞれが発現誘導するターゲット遺伝子群が一部は重複するが大部分は異なることが分子生物学・細胞生物学の観点から示された。しかし、Nrf2-Maf が ARE 配列を認識する分子機構は不明のままであった。

2. 研究の目的

Nrf2 および Maf 転写因子は毒性化学物質などの環境ストレスに対する解毒代謝酵素群や抗酸化酵素群の発現・誘導を転写レベルで統一的に制御しており、その転写活性化の分子機構を解明することは、「環境ストレスから人体を守るしくみ」の本質的理解につながる重要な研究である。

本研究では Nrf2-Maf-DNA 複合体の X 線結晶構造解析を中心に関連する構造解析を実施する。得られた複合体の三次元構造を詳細に解析し、DNA 配列 (ARE) 認識機構と Nrf2-Maf ヘテロ二量体形成の特異的結合の構造的基盤、および酸化ストレスに依存した転写活性化の分子機構を明らかとする。

3. 研究の方法

本研究は、毒性化学物質や酸化ストレスなど様々な環境ストレスに応答して、生体防御系酵素群の発現誘導を統一的に制御する Nrf2-Maf 転写因子について、ターゲット DNA 配列である ARE を含む DNA との複合体について結晶構造解析を行うものである。

Nrf2-MafG ヘテロ二量体を調製する際に、MafG ホモ二量体の混在を避けるために、ARE 配列を工夫する必要がある。ARE 配列は TGAC/GNNNGC をコンセンサスとする配列である。NNN の配列や前後の配列によって、MafG ホモ二量体、Nrf2-MafG ヘテロ二量体の親和性が異なることが明らかとなっている。これまでの研究から、hBglHS4 配列は Nrf2-MafG ヘテロ二量体は結合できるが、MafG ホモ二量体の結合能は極めて弱いことが示されている。この hBglHS4 を選択することで、結晶化に適した均一 Nrf2-MafG-DNA 複合体サンプルの調製が可能となる。

得られた複合体について結晶化スクリーニングを実施する。微結晶が得られたら、pH、沈殿剤濃度、蛋白質濃度などを最適化して、X 線回折実験が可能なサイズの結晶を取得する。

複合体の結晶が得られたら、所属部局に設置の X 線回折装置を用いてデータ測定を行う。さらに高分解能 X 線回折データを Photon Factory (KEK つくば) および Spring8 にて測定する。構造決定に必要なセレノメチオニン化蛋白質サンプルは、ネイティブ複合体同様に大腸菌発現系にて調製予定である。放射光施設にて Se-MAD の測定を行い、複合体の結晶構造を決定する。

得られた Nrf2-MafG-DNA 複合体の三次元構造について、グラフィックコンピュータを用いて詳細に解析をし、DNA 配列認識機構および Nrf2-MafG ヘテロ二量体の特異性を決定する分子機構の解明を目指す。

研究の進展により、酸化ストレス依存的に Nrf2 の活性を制御する Keap1 の構造情報の重要性が高まったため、全長 Keap1 の電子線単粒子解析による三次元構造解析を実施することとした。

さらに、肝細胞癌において Nrf2 を活性化する機構解明に p62 が重要であることが明らかとなったため、p62-Keap1 複合体結晶構造解析を含めた、p62 による Nrf2 活性化機構の解明も行うこととした。

4. 研究成果

Nrf2 転写因子は Maf 転写因子と二量体を形成し、毒性化学物質や酸化ストレス (環境ストレス) に応答して第二相解毒酵素群の発現誘導を統一的に制御する。その結果、毒性化学物質は速やかに消去される。

Nrf2, Maf は塩基性ロイシンジッパー (bZip) 転写調節因子である。結合 DNA 配列である ARE は TGACNNNGC という配列を有し、これは他の bZip 転写因子が認識する配列とは外側に GC 配列を有している点が明らかに異なる。また、Nrf2 は単独では二量体を形成せず、DNA 結合能も示さない。

Maf はホモ二量体として DNA 結合能を有する一方で, Nrf2 とヘテロ二量体も形成する. このヘテロ二量体形成が転写活性化に必須である. 申請者らは Maf ホモ二量体と DNA (ARE 配列と類似した MARE 配列) との複合体の結晶構造を明らかとし(文献③), Nrf2-Maf が結合する ARE 配列中の G C 配列を Maf 転写因子がユニークな方法で認識していることを明らかとした(図 1).

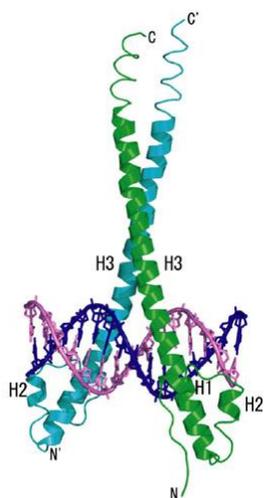


図 1. MafG ホモ二量体とターゲット DNA 複合体の X 線結晶構造.

また, 毒性化学物質の感知に関わる分子センサーであり, ストレス依存的な Nrf2 抑制因子としてはたらく Keap1 全長構造の電子線単粒子解析に成功した(文献②).

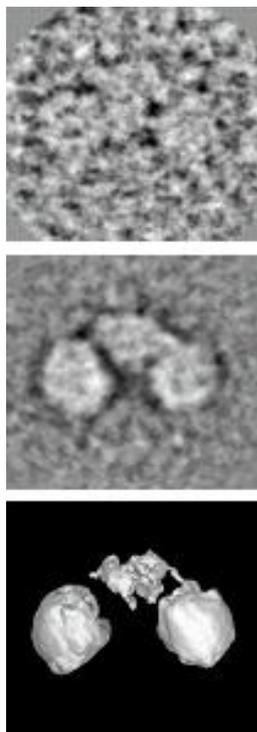


図 2. 全長 Keap1 の電子線単粒子解析. (上図) 元電顕画像. (中図) 2 次元平均画像. (下図) 3 次元平均による表面構造.

全長 Keap1 は 2 つの房を持つサクランボ様の構造をしていた(図 2). 酸化ストレス感知に重要なセンサーシステインの 1 つは, この大きな房に含まれていることが予想された. 今回の結果と以前の Nrf2 分子の Neh2 領域(DLG と ETGE モチーフを含む)の NMR 構造解析および Keap1-DC と Nr2-ETGE 複合体結晶構造の結果とから, Keap1 二量体の 2 つの DC ドメインが Nrf2 の DLG と ETGE サイトを同時に認識し, ユビキチン化を促進するという Nrf2 抑制機構の構造基盤を解明した.

さらに, 肝臓癌などで異常蓄積する p62 タンパク質が Keap1-DC ドメインと結合することで Nrf2 を活性化し, 癌細胞の増殖に有利な環境を作り出していることを明らかとした(文献②).

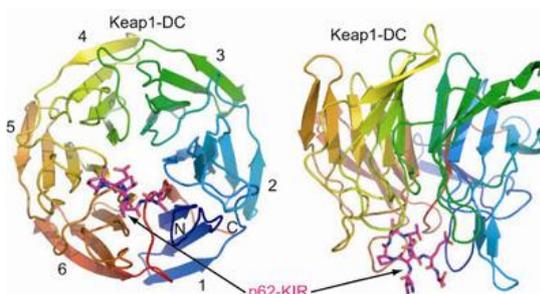


図 3. Keap1-p62 複合体の X 線結晶構造. (左) 底面からの図. (右) 側面からの図

選択的オートファジー基質 p62 は肝細胞癌などで異常蓄積する. また, p62 の蓄積によって Nrf2 が活性化することも知られていたが, その分子機構は不明のままであった. Keap1 と p62 との複合体結晶構造解析から, p62 が Nrf2 の結合サイトに競合的に結合して, Nrf2 を活性化することが明らかとなった(図 3).

生体防御に関わる Keap1-Nrf2 系が癌細胞によりハイジャックされ, Nrf2 が常に活性化されてしまうと癌細胞を守ってしまうという驚くべき事実が明らかとなった.

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 3 件)

① Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y. S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K. I., Kim, M., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., Tanaka, K., and Yamamoto, M., The selective autophagy

substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1.、Nature Cell Biology、査読有、12 巻、2010、213-223

②Ogura, T., Tong, K.I., Mio, K., Maruyama, Y., Kurokawa, H., Sato, C., and Yamamoto, M., Keap1 is a forked-stem dimer structure with two large spheres enclosing the intervening, double glycine repeat, and C-terminal domains.、Proc Natl Acad Sci U S A、査読有、107 巻、2010、2842-2847.

③ Kurokawa, H., Motohashi, H., Sueno, S., Kimura, M., Takagawa, H., Kanno, Y., Yamamoto, M., and Tanaka, T., Structural basis of alternative DNA recognition by Maf transcription factors.、Molecular and Cellular Biology、査読有、29 巻、2009、6232-6244

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① 黒河博文、本橋ほづみ、佐藤主税、山本雅之 発癌性物質や酸化ストレスに応答する生体防御系センサーの構造基盤 平成 23 年度ターゲットタンパク研究プログラム公開シンポジウム 3 月 12 日 2012 年、学術総合センター
- ② 黒河博文、本橋ほづみ、佐藤主税、山本雅之 発癌性物質や酸化ストレスに応答する生体防御系センサーの構造基盤 平成 22 年度ターゲットタンパク研究プログラム公開シンポジウム 3 月 11 日 2011 年、東京大学安田講堂

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒河 博文 (KUROKAWA HIROFUMI)

東北大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：80359546