

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450115

研究課題名(和文) 毒性化合物センサーKeap1の三次元構造

研究課題名(英文) Three-dimensional Structure of Chemical Sensor Keap1

研究代表者

黒河 博文 (Kurokawa, Hirofumi)

東北大学・多元物質科学研究所・講師

研究者番号：80359546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は細胞内センサータンパク質Keap1ががんや様々な疾患を誘発する酸化ストレスや毒性化合物を感知するしくみの解明を目指したものである。酸化ストレスによって分子センサーKeap1が原子レベルでどのようにその形を変化させるかを見るためには結晶構造解析が必要であるため、組換え型タンパク質を調製して結晶化を行うことに成功した。また、Keap1に結合する化合物との相互作用を簡便に観測するための手法を開発し、食品に含まれる成分を中心に、化合物とセンサータンパク質との相互作用について検討した。

研究成果の概要(英文)：In this research the molecular mechanism of oxidative stress response by human cell are analyzed. In order to unveil the molecular mechanism in which the sensor protein Keap1 recognize the oxidative stress and various toxic chemicals, I prepared the recombinant Keap1 protein for the crystal analysis. The crystallization of Keap1 mutants was succeeded, and X-ray diffraction analysis was performed by using the synchrotron X-ray source performed X-ray diffraction experiment. The method to detect the intercalations between Keap1 and the toxic chemicals from vegetables was developed.

研究分野：構造生物学

キーワード：センサータンパク質 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は酸化ストレスや毒性化合物が存在すると、これらストレス物質を消去・解毒する生体防御シグナルを活性化する。細胞質タンパク Keap1 が酸化ストレスや毒性化学物質を感知するケミカルセンサーとして働き、下流の生体防御シグナルを活性化している。この下流シグナルの実体は、転写因子 Nrf2 による誘導的遺伝子発現系であり、二百を越える解毒・排出遺伝子群の発現を誘導し、毒性化合物を解毒・排出することで生体の恒常性を保っている。

代表者はこの生体防御シグナル系の理解には Keap1 を含む関連因子の分子レベルの認識機構の解明が必須と考え、以下に示す研究を展開してきた。まず生体防御シグナル活性化には、Nrf2-Maf ヘテロ二量体が特異な DNA 配列 (抗酸化剤応答性配列) に結合する点に着目した。

特にパートナー因子 Maf が認識する遺伝子配列が下流遺伝子の特異性を規定しているため、Maf ホモ二量体-DNA 複合体の結晶構造解析を実施し、Maf のユニークな遺伝子配列認識機構を解明した (Kurokawa et al., Mol. Cell. Biol. 2009)。さらに研究を進める過程でオートファジー関連因子 p62 が Keap1 と結合し、下流シグナルを活性化することが明らかとなった。

そこで Keap1-p62 複合体結晶構造を行い (Komatsu, Kurokawa et al., Nature Cell Biol (2010)), 肝細胞癌で異常蓄積する p62 が Keap1 の Nrf2 結合ポケットに競合的に結合することで Nrf2 を恒常的に活性化するという新しい生体防御シグナル活性化機構を明らかとした。

一方、ストレス感知については Keap1 の三次元構造の知見が必須であると考え、全長 Keap1 について電子線単粒子解析を実施し、Keap1 が「2つの房を持つサクランボ様の2量体構造」をとること、さらに、この2つの房の部分で転写因子 Nrf2 を認識することを明らかとした (Ogura et al., Proc Natl Acad Sci USA 2010)。

このように Keap1 関連の構造研究が進む一方、Keap1 のセンサー領域の高分解能の構造情報は得られておらず、酸化ストレスを感知する分子機構については不明な点が多かった。

## 2. 研究の目的

細胞質タンパク質 Keap1 は毒性化合物を感知するケミカルセンサーであり、標的化合物との結合をトリガーとして転写因子 Nrf2 を活性化し、生体防御遺伝子群を誘導発現する。Keap1 は数十種類のサイズ・形状も異なる毒性化合物と特異的に結合すると考えられて

いる。これは従来の分子認識モデル (「鍵と鍵穴モデル」, 「誘導適合モデル」等) とは異なる新奇の分子認識機構の存在を示唆するものである。

さらに Keap1 は毒性化合物と結合するとコンフォメーションを変化させる分子スイッチの側面も有する。本研究は「Keap1 がケミカルセンサーとして複数の毒性化合物を特異的に認識し、その情報をタンパク質コンフォメーション変化によって下流シグナルへと変換する機構」の解明を目指し、それまで不明であった結晶構造解析による三次元構造の観点から解明を目指すものである。

## 3. 研究の方法

Keap1 がケミカルセンサーとして数十種類の多様な毒性化合物と特異的に結合する機構を解明するために、1) 毒性化合物が共有結合した不活性型 Keap1 の三次元構造解析を行う。具体的には組換え型 Keap1 センサードメインを大量発現・精製し、複数の毒性化合物共存下での X 線結晶構造解析を実施する (図 1a)。

このために大腸菌を用いた大量発現系を用いて組換え型 Keap1 を大量発現する。得られたタンパク質サンプルを用いて結晶化のスクリーニングを行い、結晶が得られたら放射光施設において X 線回折実験を実施する。

さらに、Keap1 は毒性化合物に結合する際にコンフォメーション (分子の形) を変化させて下流の転写シグナルを ON/OFF する分子スイッチであると考えられている (図 1b)。本研究では、2) 毒性化合物が結合していない活性型 Keap1 の三次元構造解析も実施する。

上記で得られた活性型と不活性型構造についてコンピュータグラフィックスを用いた詳細な比較を行い、Keap1 によるケミカルセンシングの分子機構とシグナル伝達に関わるダイナミックな分子スイッチ機構を原子レベルで解明する。

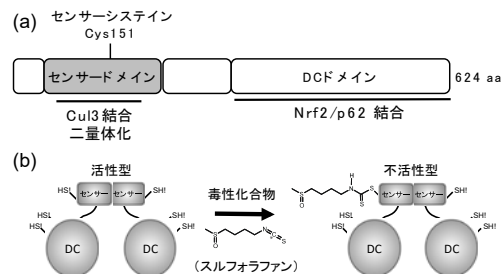


図1 (a)Keap1のドメイン構造。(b)Keap1は毒性化合物によってシステインが修飾され不活性化する

## 4. 研究成果

まず結晶構造解析の実施と機能解析の観点から様々な毒性化合物との相互作用に

について解析を行う目的で Keap1 のセンサー領域を大腸菌を用いて大量発現・精製を行った。

Keap1 のセンサー領域について大腸菌での大量発現用ベクターを構築し、複数のアミノ末端およびカルボキシル末端切断変異体を調製した。これらの変異体を大腸菌を用いて組換え型タンパク質として発現し、その発現量を検討することで、構造解析に適した末端切断変異体のスクリーニングを行った。

蛋白質精製のためのイオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーの条件検討も行った。さらに、得られた情報を基に別の動物種について Keap1 の大腸菌発現系を作成した。

得られた組換え型タンパク質試料を結晶化に適した不純物の少ない試料とするために、以下の方法で高純度に精製した。まず Ni-NTA カラムによるアフィニティ精製を行い、続いてゲルろ過クロマトグラフィー精製を実施した。SDS 電気泳動により純度を確認したところ、それぞれ、95%以上の高純度のタンパク質を数ミリグラムのオーダーで得ることができた。また、センサーシステインを変異させた組換えタンパク質も発現・精製し、結晶化を行った。

複数の結晶化スクリーニングキットを用いて、結晶化マイクロプレートを用いて結晶化条件を検討した。得られた結晶については放射光施設での結晶回折実験を実施した。得られたタンパク質結晶の写真を図 2 に示す。

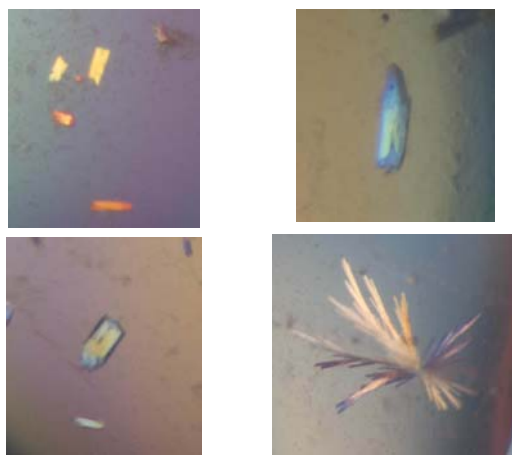


図2 得られたセンサー領域のタンパク質結晶

当初は結晶も小さく放射光施設での実験では X 線回折を確認できなかった。変異型 Keap1 の結晶化条件の改善を行い、二種類の変異型 Keap1 について 10~50 ミクロン程度の結晶を得ることができた (図 2)。つくば高エネ研の Photon Factory にて X 線回折実験を実施したところ、構造解析に十分な 3.2 Å 分解能の X 線回折を確認した (図 3)。しかし、複数の結晶が重なった状態で結晶化をするため、構造解析に適した単結晶のデータを

取得することができなかったため、さらなる結晶化条件の検討を行った。

これと平行して、より良質な結晶化が得られるように、Keap1 分子表面の変異導入実験も行い Keap1 組換え蛋白質の大量発現を実施した。

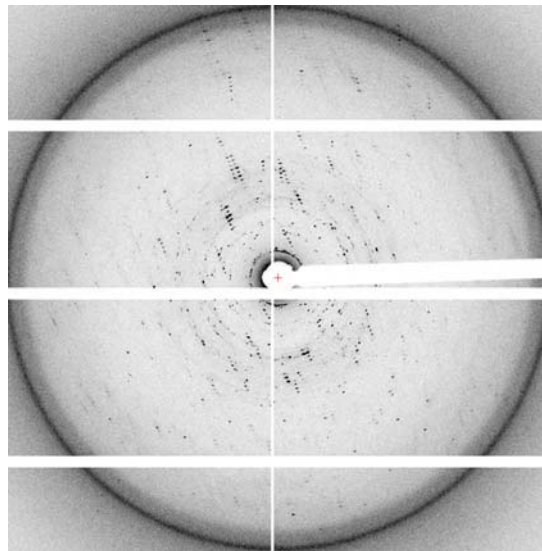


図3 得られたセンサー領域のX線回折像

これらの実験を進める中、海外のグループから Keap1 センサードメインの結晶構造解析の論文が先行して報告された。本研究で解析してきた Keap1 はこのグループと比べてより分子サイズが大きい、天然に近い状態での解析であるなど、優位な面もあったが、得られる情報には共通の部分も多いことが予想された。

このため、Keap1 センサー単独での結晶構造解析での論文発表が困難と判断し、Keap1 とパートナー分子 Cul3 との複合体構造解析も並行して実施することとした。この目的で Cul3 組換え蛋白質について大量発現と高純度精製および Keap1 との複合体の調製を実施した。

組換え型 Keap1 と Cul3 は安定な複合体を形成することをゲルろ過クロマトグラフィーを用いて確認した。複合体の結晶化スクリーニングを実施したが現時点では結晶を得ることができなかった。

その後、海外のグループが Keap1-Cul3 複合体について X 線結晶構造をデータベースに登録したことから、再度の研究方針の見直しが必要となった。

X 線構造解析中心の研究から、機能解析の観点へとシフトする必要性が生じたため、様々なストレス化合物との相互作用について検討を実施した。Keap1 を介して細胞の生体防御系を活性化すると考えられている化合物について Keap1 のセンサーシステインとの反応性を検出する新しい手法を開発することに成功した。Keap1 を介して細胞の生体

防御系を活性化すると考えられている食品由来加工物を含む12化合物について Keap1との反応性に関する研究を実施した。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒河 博文 (KUROKAWA, Hirofumi)

東北大学・多元物質科学研究所・講師

研究者番号: 80359546

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )