

令和元年6月19日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19027

研究課題名(和文) An investigation into the mechanism regulating the oxidative stress-dependent activation of the Keap1-Nrf2 pathway

研究課題名(英文) An investigation into the mechanism regulating the oxidative stress-dependent activation of the Keap1-Nrf2 pathway

研究代表者

Baird Liam (Baird, Liam)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90724914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Keap1-Nrf2経路は親電子性物質や酸化ストレスに対する主要な生体防御機構である。Keap1がNrf2活性を制御する分子メカニズムを明らかにするために、Keap1-Nrf2相互作用部位に変異を導入した新しいNrf2変異体発現マウスを作製して解析を行った。また、Nrf2活性を制御するKeap1-Cul3複合体の相互作用に酸化ストレスが与える影響を調べた。以上の解析から、酸化ストレスによるNrf2活性制御はKeap1-Nrf2-Cul3複合体の構成を変化させることによるものではないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Nrf2活性化による疾患治療効果を最大限にするために、詳細なNrf2の誘導機構の理解が不可欠である。本研究の成果は酸化ストレスによるNrf2活性化の分子機構において新しい知見を与えた。今後のNrf2活性化メカニズムの研究およびNrf2誘導剤の開発において有益な情報を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The Keap1-Nrf2 pathway is the body's principle inducible defense against electrophilic and oxidative stress, and as such plays an important role in cellular homeostasis and human health. In order to study the molecular mechanism of Keap1-dependent Nrf2 regulation, I used a new mouse model of Nrf2 activation, in which the weak binding DLG motif has been mutated into an additional ETGE motif, which binds tightly to Keap1. Analysis of this mouse revealed no change in the oxidative stress response, suggesting that the release of the DLG motif is not required for Nrf2 activation in response to electrophilic inducers. This approach was complemented by in vitro studies of the Keap1-Cul3 complex, which revealed that the majority of Nrf2 inducers do not impact the composition of the Keap1-Cul3 complex.

研究分野：Molecular Biology

キーワード：Keap1-Nrf2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くのヒト疾患は環境因子によって細胞の恒常性が破綻することで生じる。このような生体の恒常性破綻を防ぐために、哺乳類は様々なストレス応答シグナル系を備え、それを活性化することにより、生体をダメージから守り、恒常性を維持する。Keap1-Nrf2系は親電子性物質や酸化ストレスに対する主要な生体防御機構である。親電子性物質や酸化ストレスはがん、心血管系疾患、メタボリックシンドロームなど多くの疾患の発症に関与している。このようなヒト疾患における重要性のため、Nrf2は創薬標的として注目されている。このNrf2標的薬の効果および特異性を最大限にするために、Nrf2誘導機構の詳細な理解が必要である。

2. 研究の目的

Nrf2は非ストレス状態ではKeap1を含むユビキチンE3ライゲースによって負に制御されているが、細胞内外からの小分子誘導剤によってKeap1の活性は調節される。このNrf2を安定化させる正確なメカニズムは未だよくわかっていない。特に、誘導剤がKeap1に結合した際に、どのようにユビキチンライゲース機能を阻害しているのか不明である。Keap1の不活化は様々な仕組みによって引き起こされる。例えば、ユビキチンE3ライゲース複合体からKeap1が乖離すること、あるいはKeap1-Nrf2の相互作用の変化によって生じうる。本研究では、酸化ストレスに反応してNrf2を活性化する際のKeap1不活化のメカニズムについて解析を行った。

3. 研究の方法

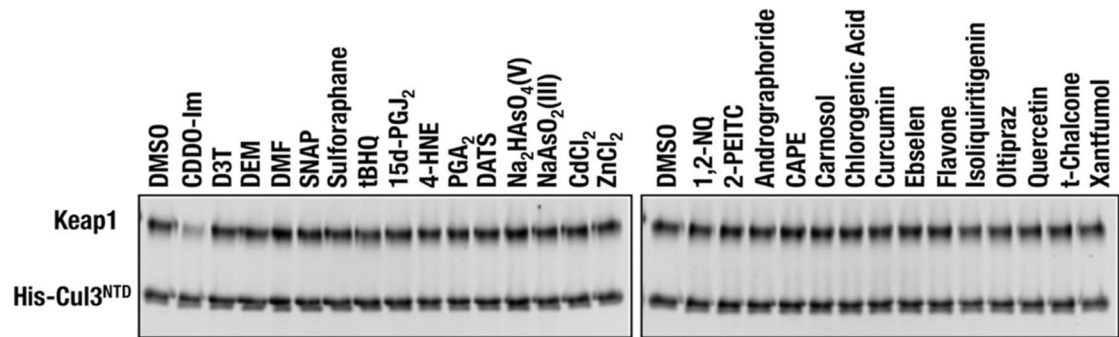
Keap1によるNrf2制御の分子メカニズムを明らかにするために、Nrf2がKeap1と相互作用する部位に変異を導入したNrf2-Dual ETGE変異体発現マウスを解析した。Nrf2はDLGとETGEの2つのモチーフを介してKeap1と結合するが、結合親和性の弱いDLGモチーフを、結合親和性の強いETGEモチーフと置換したNrf2を発現するマウスを作製した。この解析により、酸化ストレス時におけるDLGモチーフの重要性を明らかにできると期待される。すなわち、酸化ストレス応答において結合親和性の弱いDLGモチーフがKeap1から解離することが必要かどうか調べることが可能になる。また、Keap1-Cul3-Nrf2複合体の構成に酸化ストレスが影響を与えるのか調べるために、様々な分子生物学的手法を用いてストレスの有無の違いを調べた。

4. 研究成果

Nrf2-Dual ETGEマウスの樹立に成功し、生存および生殖可能であった。このマウスから腹腔マクロファージを採取し、酸化ストレスに対する応答を調べた結果、有意な変化は観察されなかった。Nrf2標的遺伝子の発現誘導を調べたところ、野生型マウスとNrf2-Dual ETGEマウスに有意な違いは観察されなかった。以上の結果は、酸化ストレスに反応してNrf2が活性化するためにDLGモチーフがKeap1から外れることは必要ないことを示唆する。現在、オートファジーシャペロンp62によるNrf2の安定化における影響を、このNrf2-Dual ETGEマウスを用いて検証を行っている。

また、Keap1-Cul3複合体の構成に酸化ストレスが影響を与えるのか調べるために、29種類のNrf2誘導剤を用いてその相互作用を調べた。その結果、CDDO-lmを除く、ほとんどの化合物はKeap1-Cul3複合体の相互作用に影響しないことがわかった。

以上の解析から、酸化ストレスによるKeap1不活化はKeap1-Cul3-Nrf2複合体の構成には影響しないことがわかった。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Suzuki T, Seki S, Hiramoto K, Naganuma E, Kobayashi EH, Yamaoka A, Baird L, Takahashi N, Sato H, Yamamoto M. Hyperactivation of Nrf2 in early tubular development induces nephrogenic diabetes insipidus. *Nat Commun*. 2017 Feb 24;8:14577. doi: 10.1038/ncomms14577. (査読有り)
2. Baird L, Tsujita T, Kobayashi EH, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Yamamoto M. A Homeostatic Shift Facilitates Endoplasmic Reticulum Proteostasis through Transcriptional Integration of Proteostatic Stress Response Pathways. *Mol Cell Biol*. 2017 Feb 1;37(4). pii: e00439-16. doi: 10.1128/MCB.00439-16. (査読有り)
3. Iso T, Suzuki T, Baird L, Yamamoto M. Absolute Amounts and Status of the Nrf2-Keap1-Cul3 Complex within Cells. *Mol Cell Biol*. 2016 Nov 28;36(24):3100-3112. Doi: 10.1128/MCB.00389-16 (査読有り)

[学会発表] (計 1 件)

1. Baird L, Stress Proteins in Growth, Development & Disease; Gordon Research Conference; Sunday River, Maine, USA; July 2017. Poster title “A Homeostatic Shift Facilitates Endoplasmic Reticulum Proteostasis through Transcriptional Integration of Proteostatic Stress Response Pathways”

[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:
 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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 山本 雅之

ローマ字氏名: Yamamoto, Masayuki

研究協力者氏名: 鈴木 隆史

ローマ字氏名: Suzuki, Takafumi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。