

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19417

研究課題名（和文）ストレスセンサーKeap1のタンパク質構造解析に基づく生体防御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of cytoprotective mechanisms by structural analysis of stress sensor Keap1

研究代表者

山本 雅之（Yamamoto, Masayuki）

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50166823

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：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て生体防御機構の中 心的役割を担う鍵因子である。Keap1は多様なストレス刺激にตอบสนองしてNrf2のユビキチン化反応を制御する。このストレスに対する生体応答の分子基盤においては、ストレス刺激を感知したKeap1タンパク質の構造変化が鍵になることが示唆されているが、その詳細は不明である。本研究では、ストレスセンサーであるKeap1を包含するユビキチンリガーゼ複合体の活性が、ストレス刺激によりいかに不活化するのかを明らかにし、生体のNrf2活性化の分子機構を明らかにすることに挑戦した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Keap1のストレス感知機構を構造生物学的に理解することは、現在大きく展開中のNrf2誘導剤の創薬開発に有益な情報を提供する。Nrf2誘導剤はストレス防御・疾患予防などへの応用が期待されているが、これまで開発されてきたNrf2誘導剤には特異性の問題点が指摘されている。Keap1に特異的に反応しNrf2を活性化できる化合物を開発することができれば、より副作用の少ない安全なNrf2誘導剤の開発につながるものと期待される。この点で、本研究の成果は有益な創薬ツールを提供する。

研究成果の概要（英文）：Stress sensor Keap1 is a key factor that controls ubiquitination reaction of transcription factor Nrf2 and plays a central role in the stress defense mechanism. Keap1 regulates Nrf2 ubiquitination in response to various stress stimuli. Regarding the molecular basis of the stress response, it has been suggested that the structural change of the Keap1 protein is the key, but the details are unknown. In this study, we aimed to clarify how the activity of the ubiquitin ligase complex containing Keap1 is inactivated by stress stimulation, and challenged to elucidate the molecular mechanism of Nrf2 activation in our body.

研究分野：医化学

キーワード：ストレス応答

### 1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスや外来異物・毒物に対する生体応答系の破綻は、種々の疾患発症に関わることが知られている。生体はこのような疾患発症を未然に防ぐ目的で、環境由来ストレスに対してすばやく応答し、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・異物代謝に関わる遺伝子群を統一的に制御して、生体防御に働く転写因子である (図 1)。Nrf2 活性化による強力な生体防御機能の増強作用は近年大きな注目を浴びており、様々な疾患の予防・治療への応用を目指して多くの Nrf2 誘導剤の開発が進んでいる。非刺激下では、Nrf2 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 はセンサー分子としても機能し、ており、ストレスを感知すると迅速に Nrf2 ユビキチン化反応を停止する。その結果、Nrf2 は安定化して核内に蓄積し、抗酸化剤応答配列 (ARE) に結合して、種々の標的遺伝子の転写を活性化する (図 1)。

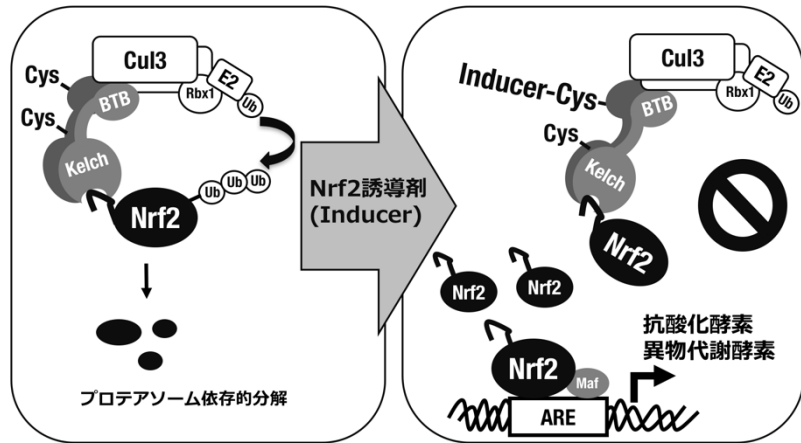


図 1 Keap1-Nrf2システム 転写因子Nrf2はKeap1-Cul3複合体を介してユビキチン化を受けプロテアソーム依存的に分解抑制される。Keap1はNrf2誘導剤 (Inducer) を感知し Nrf2分解を止める。安定化したNrf2は核蓄積しMafとヘテロ二量体を形成し抗酸化剤応答配列AREを介して抗酸化酵素や異物代謝酵素などの生体防御遺伝子を活性化する。Keap1 によるInducer感知メカニズムは未だ不明な点が多い。

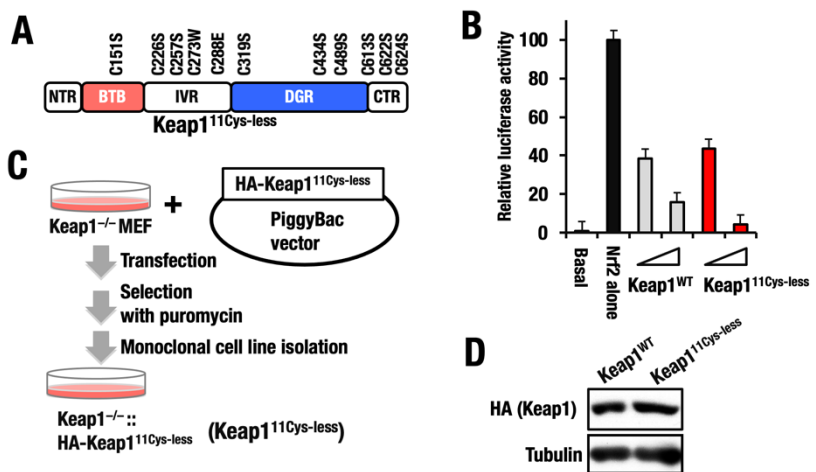
### 2. 研究の目的

Nrf2 活性化制御の主な作用点は Keap1 を介したユビキチン化反応段階である。ストレスに応答して Nrf2 のユビキチン化を停止する分子メカニズムとして、Keap1 のシステイン残基修飾により同分子に構造変化を生じ、その結果ユビキチンリガーゼ活性が減弱化すること (Keap1 構造変化仮説) が提唱されているが、ストレス刺激に応じてどのように 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、ストレス応答における Nrf2 活性化の分子基盤、特に Keap1 によるユビキチン化反応の調節機構の解明に挑んだ。

### 3. 研究の方法

Keap1 によるユビキチン化反応の調節機構を明らかにするために、Keap1-Cul3 ユビキチンリガーゼ複合体が Nrf2 をユビキチン化する構造機能連関を明らかにする。Keap1-Cul3 複合体の全容を解明するためには Keap1 タンパク質の全長構造を解く必要があるが、これまでに私たちを含めて誰もこの課題を達成できていなかった。原因として、Keap1 はシステイン残基を数多く含んでおり、凝集しやすく調製が難しいことが挙げられる。そこで私たちは、マウス Keap1 の 25 個のシステイン残基のうち 11 個に変異を導入した Keap1-11Cys-less 変異体分子を作製し、溶液中で安定な Keap1 全長タンパク質を調製することを試みた (図 2)。さらに、この Keap1-11Cys-less 変異体分子を利用して、結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡解析、NMR 構造解析を実施し、これまで未解決であった Keap1-Cul3 複合体の構造解明に挑戦することを目的とした。

図2 Keap1-11Cys-less変異体の創出





## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 17件／うち国際共著 11件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Liu Zhiyuan, Hou Yongyong, Li Lu, Yang Yang, Jia Jingkun, Hong Zhixuan, Li Tingfeng, Xu Yuanyuan, Fu Jingqi, Sun Yongxin, Yamamoto Masayuki, Wang Huihui, Pi Jingbo	4. 巻 367
2. 論文標題 Nrf2 deficiency aggravates the increase in osteoclastogenesis and bone loss induced by inorganic arsenic	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxicology and Applied Pharmacology	6. 最初と最後の頁 62～70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.taap.2019.02.003	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 Nagashima Ryuichi, Kosai Hitomi, Masuo Masahiro, Izumiya Keiko, Noshikawaji Taketo, Morimoto Motoko, Kumaki Satoru, Miyazaki Yasunari, Motohashi Hozumi, Yamamoto Masayuki, Tanaka Nobuyuki	4. 巻 202
2. 論文標題 Nrf2 Suppresses Allergic Lung Inflammation by Attenuating the Type 2 Innate Lymphoid Cell Response	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1331～1339
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1801180	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 Yagishita Yoko, Uruno Akira, Chartoumpakis Dionysios V, Kensler Thomas W, Yamamoto Masayuki	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Nrf2 represses the onset of type 1 diabetes in non-obese diabetic mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Endocrinology	6. 最初と最後の頁 403～416
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/JOE-18-0355	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 Cho Hye-Youn, Miller-DeGraff Laura, Blankenship-Paris Terry, Wang Xuting, Bell Douglas A., Lih Fred, Deterding Leesa, Panduri Vijayalakshmi, Morgan Daniel L., Yamamoto Masayuki, Reddy Anita J., Talalay Paul, Kleeberger Steven R.	4. 巻 364
2. 論文標題 Sulforaphane enriched transcriptome of lung mitochondrial energy metabolism and provided pulmonary injury protection via Nrf2 in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxicology and Applied Pharmacology	6. 最初と最後の頁 29～44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.taap.2018.12.004	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 Kanamoto Mayu, Tsuchiya Yoshihiro, Nakao Yuki, Suzuki Takafumi, Motohashi Hozumi, Yamamoto Masayuki, Kamata Hideaki	4. 巻 13
2. 論文標題 Structural instability of I B kinase promotes autophagic degradation through enhancement of Keap1 binding	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0203978
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0203978	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 Sakurai Hirofumi, Morishima Yuko, Ishii Yukio, Yoshida Kazufumi, Nakajima Masayuki, Tsunoda Yoshiya, Hayashi Shih-Yuan, Kiwamoto Takumi, Matsuno Yosuke, Kawaguchi Mio, Yamamoto Masayuki, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 129
2. 論文標題 Sulforaphane ameliorates steroid insensitivity through an Nrf2-dependent pathway in cigarette smoke-exposed asthmatic mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 473 ~ 485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.400	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 Ikehata Hironobu, Yamamoto Masayuki	4. 巻 360
2. 論文標題 Roles of the KEAP1-NRF2 system in mammalian skin exposed to UV radiation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Toxicology and Applied Pharmacology	6. 最初と最後の頁 69 ~ 77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.taap.2018.09.038	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 Sun Jing, Fu Jingqi, Zhong Yang, Li Lu, Chen Chengjie, Wang Xiaolei, Wang Linlin, Hou Yongyong, Wang Huihui, Zhao Rui, Zhang Xixuan, Yamamoto Masayuki, Xu Yuanyuan, Pi Jingbo	4. 巻 121
2. 論文標題 NRF2 mitigates acute alcohol-induced hepatic and pancreatic injury in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Food and Chemical Toxicology	6. 最初と最後の頁 495 ~ 503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fct.2018.09.042	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 Taguchi Keiko, Masui Saho, Itoh Tohru, Miyajima Atsushi, Yamamoto Masayuki	4. 巻 167
2. 論文標題 Nrf2 Activation Ameliorates Hepatotoxicity Induced by a Heme Synthesis Inhibitor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 227 ~ 238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/toxsci/kfy233	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 Rojo Ana I., Pajares Marta, Garcia-Yague Angel J., Buendia Izaskun, Van Leuven Fred, Yamamoto Masayuki, Lopez Manuela G., Cuadrado Antonio	4. 巻 18
2. 論文標題 Deficiency in the transcription factor NRF2 worsens inflammatory parameters in a mouse model with combined tauopathy and amyloidopathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Redox Biology	6. 最初と最後の頁 173 ~ 180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.redox.2018.07.006	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 Dayalan Naidu Sharadha, Muramatsu Aki, Saito Ryota, Asami Soichiro, Honda Tadashi, Hosoya Tomonori, Itoh Ken, Yamamoto Masayuki, Suzuki Takafumi, Dinkova-Kostova Albena T.	4. 巻 8
2. 論文標題 C151 in KEAP1 is the main cysteine sensor for the cyanoenone class of NRF2 activators, irrespective of molecular size or shape	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8037
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-26269-9	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 Orru Claudia, Szydłowska Marta, Taguchi Keiko, Zavattari Patrizia, Perra Andrea, Yamamoto Masayuki, Columbano Amedeo	4. 巻 69
2. 論文標題 Genetic inactivation of Nrf2 prevents clonal expansion of initiated cells in a nutritional model of rat hepatocarcinogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Hepatology	6. 最初と最後の頁 635 ~ 643
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhep.2018.05.010	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 Ziros PG., Habeos IG., Chartoumpakis DV., Ntalampyra E., Somm E., Renaud CO., Bongiovanni M., Trougakos IP., Yamamoto M., Kensler TW., Santisteban P., Carrasco N., Ris-Stalpers C., Amendola E., Liao XH., Rossich L., Thomasz L., Juvenal GJ., Refetoff S., Sykiotis GP	4. 巻 28
2. 論文標題 NFE2-Related Transcription Factor 2 Coordinates Antioxidant Defense with Thyroglobulin Production and Iodination in the Thyroid Gland	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Thyroid	6. 最初と最後の頁 780 ~ 798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/thy.2018.0018	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 Yamamoto Masayuki, Kensler Thomas W., Motohashi Hozumi	4. 巻 98
2. 論文標題 The KEAP1-NRF2 System: a Thiol-Based Sensor-Effector Apparatus for Maintaining Redox Homeostasis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physiological Reviews	6. 最初と最後の頁 1169 ~ 1203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/physrev.00023.2017	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 Dayalan Naidu Sharadha, Suzuki Takafumi, Yamamoto Masayuki, Fahey Jed W., Dinkova-Kostova Albena T.	4. 巻 62
2. 論文標題 Phenethyl Isothiocyanate, a Dual Activator of Transcription Factors NRF2 and HSF1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Nutrition & Food Research	6. 最初と最後の頁 1700908 ~ 1700908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mnfr.201700908	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 Yoshida Eiki, Suzuki Takafumi, Morita Masanobu, Taguchi Keiko, Tsuchida Kohei, Motohashi Hozumi, Doita Minoru, Yamamoto Masayuki	4. 巻 23
2. 論文標題 Hyperactivation of Nrf2 leads to hypoplasia of bone in vivo	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 386 ~ 392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12579	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 Shekh-Ahmad Tawfeeq, Eckel Ramona, Dayalan Naidu Sharadha, Higgins Maureen, Yamamoto Masayuki, Dinkova-Kostova Albena T, Kovac Stjepana, Abramov Andrey Y, Walker Matthew C	4. 巻 141
2. 論文標題 KEAP1 inhibition is neuroprotective and suppresses the development of epilepsy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 1390 ~ 1403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/brain/awy071	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Yamamoto M
2. 発表標題 The Keap1-Nrf2 System for Understanding of Diseases and Drug Development
3. 学会等名 World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本雅之
2. 発表標題 KEAP1-NRF2システムと病態・創薬
3. 学会等名 バルドキシロン全国研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本雅之
2. 発表標題 KEAP1-NRF2 システムとがんの治療
3. 学会等名 秋田大学病院がんプロ講演 (招待講演)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 Yamamoto M
2. 発表標題 KEAP1-NRF2 Regulatory Pathway for Environmental Stress Response
3. 学会等名 Environmental Health and Toxicology meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本雅之
2. 発表標題 Keap1-Nrf2制御系の構造生物学的アプローチと病態
3. 学会等名 第42回蛋白質と酸素の構造と機能に関する九州シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamamoto M
2. 発表標題 Nrf2 and its future
3. 学会等名 EUROTOX2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamamoto M
2. 発表標題 KEAP1-NRF2 System Regulating Cellular Oxidative Stress Response
3. 学会等名 Nrf2 Seminar, Faculty of Pharmacy Paris Sud (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本雅之
2. 発表標題 がんの生物学と医学におけるKEAP1-NRF2制御系の役割
3. 学会等名 第77回日本癌学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamamoto M
2. 発表標題 KEAP1-NRF2 System Regulating Oxidative Stress Response
3. 学会等名 NHRI-ToMMo conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamamoto M
2. 発表標題 Roles KEAP1-NRF2 System Plays in Neurosciences and Diseases
3. 学会等名 Stanford University symposium (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 鈴木隆史、山本雅之	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 271
3. 書名 人体の細胞生物学 : カラー図解 第3章3. 遺伝子発現の調節	

〔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
研究協力者	鈴木 隆史  (Suzuki Takafumi)	東北大学・大学院医学系研究科・講師  (11301)	
研究協力者	磯 達朗  (Iso Tatsuro)	東北大学・大学院医学系研究科・技術補助員  (11301)	