

平成18年3月1日

## 「酸化ストレスの生体内センサーの構造と機能を解明」 (肺がんに関連する新たな現象も発見)

JST(理事長 沖村憲樹)と筑波大学(学長 岩崎洋一)は、酸化ストレスの生体内センサーの構造と機能を解明しました。また、肺がんに関連する新たな現象も見出しました。

酸化ストレス(注1)は、がんや動脈硬化・糖尿病などの発症要因の1つとして注目されています。酸化ストレスに対する生体防御機構の分子レベルの包括的理解は、学術的にも、また、医学的見地からも重要ですが、センサーとして働くKeap1(注2)と遺伝子発現活性化に働く転写因子Nrf2(注3)とが形成する複合体の詳細な構造が明らかになっていないことが、この生体防御機構のさらなる理解の大きな障害となっていました。

本研究では、マウスKeap1のDGRドメイン(注4)の立体構造をX線結晶構造解析で決定しました。また、同ドメインとNrf2の一部を共結晶化して、Keap1とNrf2の形成する複合体の立体構造を解明しました。さらに、肺がん症例において、Keap1の機能に変換をもたらす複数の遺伝子変異が存在することを見出し、その機能変換メカニズムの構造的基盤を明らかにしました。本研究の成果は、酸化ストレス感知の分子メカニズムの解明を進めるものであり、また、その破綻と疾患との関連の理解を進めるものです。

本研究成果は、JST戦略的創造研究推進事業総括実施型研究「環境応答プロジェクト」(研究総括：山本雅之 筑波大学教授\*1)と筑波大学が、文部科学省タンパク3000プロジェクト網羅的解析プログラム(研究代表者：横山茂之\*2)及び国立がんセンター(研究代表：太田力\*3)との共同研究によって得たものです。この内容は、米国科学雑誌「モレキュラーセル(Molecular Cell)」オンライン版に2006年3月2日(米国東部時間)に公開され、誌面でも同日に掲載されます。

\*1：筑波大学 先端学際領域研究センター教授

\*2：理化学研究所ゲノム科学総合研究センター タンパク質構造・機能研究グループ プロジェクトディレクター

\*3：国立がんセンター疾病ゲノムセンター室長

### (研究の背景)

酸素は、生物がエネルギーを合成する上で必要不可欠な物質ですが、生体内のDNA・蛋白質・脂質等の生体高分子を酸化させる有害性を併せ持っています。これらを“酸化ストレス”と呼んでいます。また、食物や薬物にも同じような有害性をもつ物質(親電子性物質と呼ぶ)が存在します。近年の研究により、酸化ストレスはがんや動脈硬化・糖尿病などの発症要因の1つとして注目されています。生物は、酸化ストレスに対する防御機構を備えており、これらの物質を消去あるいは無毒化

することで恒常性を維持しています。酸化ストレスに対する生体防御機構の分子レベルの包括的理解は、医学的見地からも重要です。

本研究グループではすでに、転写因子 Nrf2 が生体防御機構を担う様々な酵素や蛋白質の遺伝子発現を統一的に制御する因子であること、また、Keap1 は酸化ストレスセンサーとして機能し、ストレスに応じて Nrf2 活性を制御していることが明らかにしています。しかし、これまで、酸化ストレスセンサーとして働く Keap1 と実際の遺伝子発現活性化因子である Nrf2 とが形成する複合体の詳細な構造が明らかになっておらず、本システムのさらなる理解のための大きな障害となっていました。

#### (具体的な実験結果・考察)

今回の研究は、酸化ストレス防御の中心的な制御点である、Keap1 による Nrf2 認識機構への理解を深める点を目的としています。過去の研究により、Keap1 は DGR ドメインにより Nrf2 側の Neh2 ドメイン（注5）と直接相互作用することが明らかにされています。本研究では、まず第1に、マウス Keap1 の DGR ドメインの立体構造を X 線結晶構造解析により解明しました。その結果、DGR ドメインは、6 角形の  $\beta$  プロペラと呼ばれる環状の立体構造を形成していることが明らかになりました。次に、この DGR ドメインの Nrf2 認識機構を明らかにするために、DGR ドメインと Nrf2 (Neh2 ドメイン) の部分アミノ酸からなる複合体の立体構造を世界で初めて決定しました。Nrf2 の部分アミノ酸は、Keap1 の DGR ドメイン中央に存在する塩基性アミノ酸に富む領域（図2の青色領域）に、静電的な相互作用で結合します。さらに、本ドメインの両端が交差することで 6 角形の閉環構造を形成していることも明らかにされました。これらにより、Keap1 中心部に塩基性アミノ酸に富むポケットが形成され、Nrf2 との特異的な相互作用が可能になるものと考えられます。このことは、DGR ドメインの立体構造が Nrf2 との相互作用のために重要であることを強く示唆します。

また、Nrf2 と Keap1 による酸化ストレス防御機構の破綻と疾患の相関を検索した結果、*KEAP1* 遺伝子の変異を複数の肺がん症例検体及びヒト肺がん由来培養細胞において同定しました。これらのうち、2つの遺伝子変異は DGR ドメイン内に位置し、Nrf2 結合能を著しく減少させるものでした。上述の複合体構造解析のデータから、これらアミノ酸残基は Nrf2 と相互作用するための立体構造形成に関わる重要な位置に存在することが明らかになりました。すなわち、これら遺伝子変異は、DGR ドメインの立体構造を変化させて、Keap1 と Nrf2 との相互作用を減弱させ、ひいては、Nrf2 の活性化を招来して酸化ストレス応答系酵素群の遺伝子発現を活性化するものと考えられます。このように *KEAP1* 遺伝子変異を肺がん細胞に見出したことは、酸化ストレス応答機構の破綻と疾患との相関性の存在を示唆します。研究当初、酸化ストレス防御機構を抑制する遺伝子変異が見出されると予想していました。しかしながら、本研究によりそもそも生体防御のために存在するメカニズムが、がん細胞において恒常的に活性化していることが明らかになりました、がん化した細胞は、強い抗酸化能を獲得していると考えられますが、この点は今後のがん研究における重要な研究課題です。

### (今回の成果のポイント)

本研究を通して、私たちは酸化ストレス防御系における Keap1 の Nrf2 認識機構に関して、両分子の個々のアミノ酸残基がどのように相互作用するのかという点に関する分子レベルでの重要な知見を得ました。また、その分子認識を阻害する KEAP1 遺伝子の変異を肺がん細胞に見出しました。本研究は、疾患と関連した KEAP1 遺伝子変異についての初めての報告です。また、酸化ストレス応答機構の破綻による疾患発症は、医学的にきわめて興味深く、その解明は今後臨床医学に対しても重要な知見を与えることが期待されます。

### (研究成果の社会的意義)

酸化ストレスは、がん、動脈硬化・糖尿病などの発症要因の一つと考えられています。本研究は、それに対する生体防御機構の解明を目指しており、今回の成果は医学的に重要な知見を含んでいます。本研究の成果の一つである Keap1 による Nrf2 認識機構の理解は、この相互作用を阻害する物質・ペプチドの設計に重要な指針を与えます。このような物質は、Nrf2 を活性化して生体の酸化ストレス防御機構を活性化させるために、酸化ストレスに起因する疾患の薬剤になる可能性が高いと考えられます。実際に、ブロッコリースプラウト（ブロッコリーの新芽）などのような Nrf2 を活性化する健康食品が市場に現れており、本領域での今後の展開は注目されているところです。

一方、私たちは、肺がん細胞において KEAP1 遺伝子変異が原因となる Nrf2 の恒常的活性化を見出しました。Nrf2 が恒常的に活性化したがん細胞は、強い抗酸化能を獲得しているだけでなく、抗がん剤などの薬剤の解毒代謝・排出能が活性化されていることが推測されます。これは当初の予想とは相反する結果でした。このことは、生体防御のために存在するメカニズムが、細胞のがん化などの局面においては負の効果をもたらす可能性があることを示しています。このように、酸化ストレス防御系には二面性があり、今後、この点を解明していくことは、肺がん細胞の性状の理解に対して重要な知見を与えるものと考えられます。

## [用語解説]

### (注1) 酸化ストレス

酸素や電子を好む性質のある物質（親電子性物質）は、DNA、タンパク質、脂質などの生体物質を酸化させて傷害を与える有害性を持ち、その機能異常が最終的にはがん・動脈硬化・糖尿病などの発症要因となると考えられています。これら物質による有害性を総称して、酸化ストレスと呼びます。

### (注2) Keap1

酸化ストレスを感知するセンサーであり、また、転写因子 Nrf2 の安定性を制御する因子としても機能します。Keap1 は Nrf2 のユビキチン化を促すことで、最終的にプロテアソームによるタンパク質分解に至らしめます。一方、細胞が酸化ストレスに暴露されると、Keap1 がそのシグナルを感知して Nrf2 分解が抑制され、結果的に安定化して自由になった Nrf2 が核へ移行し、酸化ストレス防御酵素群の遺伝子発現をオンにして、酸化ストレスに対する生体防御応答が活性化します。ヒトの分子のことは、特に KEAP1 と表記します。

### (注3) Nrf2

酸化ストレス応答系酵素群の遺伝子発現を活性化する転写因子。Nrf2 はその標的遺伝子が持っている特定の DNA 配列（MARE 配列）に結合する際に、パートナー因子（小 Maf 群因子）との 2 量体を形成します。

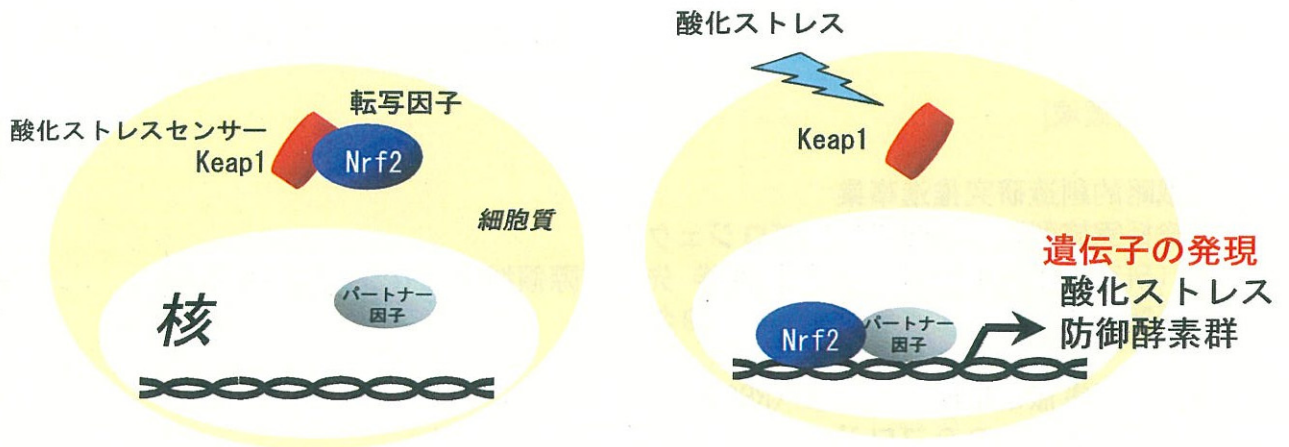
### (注4) DGR ドメイン

Keap1 の Nrf2 結合部位として機能します。名前の由来は、その部位（ドメイン）が 2 回繰り返されたグリシン残基を 6 個保持することによります。Kelch（ケルチ）ドメインとも呼ばれます。

### (注5) Neh2 ドメイン

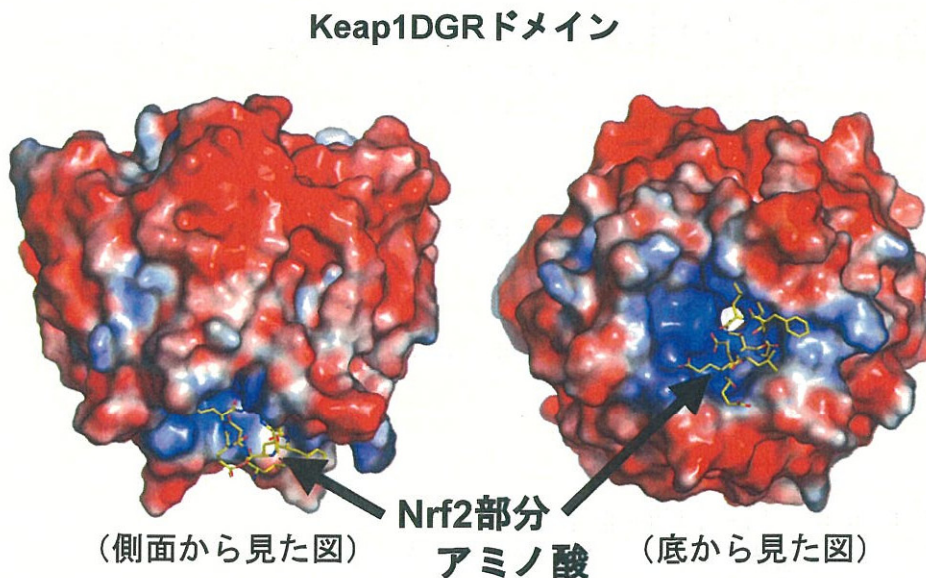
タンパク質における機能的に重要なアミノ酸配列（ドメイン）は、異なる動物種間でも保存されると考えられています。マウスとニワトリの Nrf2 間で保存されたドメインを、Neh（Nrf2-ECH-homology, ECH: ニワトリ Nrf2 の別名）と名付けており、Neh1 から Neh6 まで存在します。Neh2 ドメインは、Nrf2 のアミノ末端に位置し、Keap1 と直接結合します。また本研究における Nrf2 部分アミノ酸との複合体解析では、このドメインの一部を用いています。

図1 Nrf2-Keap1による酸化ストレス防御機構



酸化ストレス応答の遺伝子発現をつかさどるタンパク質 Nrf2 は、平常時では（左）、酸化ストレスセンサーKeap1 により細胞質に留められたため、遺伝子発現が抑制されています。一方、細胞に酸化ストレスが暴露されると（右）、センサーである Keap1 がそれを感じ、Nrf2 は Keap1 から解放されて核へ移行し、酸化ストレス防御酵素群の遺伝子発現をオンにして、酸化ストレスに対する生体防御応答を活性化します。

図2 Keap1 の DGR ドメインと Nrf2 部分アミノ酸の複合体構造



それぞれ側面（左）・底面（右）から見た立体構造。Keap1 の DGR ドメインは底面から見ると、六角形のβプロペラ構造を形成しています。青色領域は塩基性アミノ酸、赤色領域は酸性アミノ酸を示します。これに対して、Nrf2 の部分アミノ酸は、DGR ドメイン底面の塩基性アミノ酸に富むポケットに入り込むように結合します。

[論文名]

“Structural Basis for Defects of Keap1 Activity Provoked by its Point Mutations in Lung Cancer”

(肺ガン由来 KEAP1 遺伝子の点変異によりもたらされる機能障害の構造的基盤)

[研究領域]

戦略的創造研究推進事業

総括実施型研究 環境応答プロジェクト

(研究総括：山本 雅之 筑波大学 先端学際領域研究センター 教授)

研究期間：平成14年度～平成19年度

新世紀重点研究創生プラン (RR2002)

タンパク3000プロジェクト網羅的解析プログラム

(プロジェクトディレクター：横山茂之 独立行政法人 理化学研究所横浜研究所ゲノム科学総合研究センター タンパク質構造・機能研究グループ)

研究機関：平成14年度～平成18年度

\*\*\*\*\*

お問い合わせ先：

山本 雅之 (やまもと まさゆき)

小林 聡 (こばやし あきら)

ERATO 山本環境応答プロジェクト

〒305-8577 つくば市天王台1-1-1 筑波大学先端学際領域研究センター

TEL : 029-853-7319 ; FAX : 029-853-7318

E-mail : [masi@tara.tsukuba.ac.jp](mailto:masi@tara.tsukuba.ac.jp) ; [akirak@tara.tsukuba.ac.jp](mailto:akirak@tara.tsukuba.ac.jp)

横山 茂之 (よこやま しげゆき)

独立行政法人理化学研究所ゲノム科学総合研究センター

タンパク質構造・機能研究グループ

〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22

TEL : 045-503-9196 ; FAX : 045-503-9195

E-mail : [yokoyama@riken.jp](mailto:yokoyama@riken.jp)

星 潤一 (ほし じゅんいち)

独立行政法人 科学技術振興機構

戦略的創造事業本部 特別プロジェクト推進室

〒332-0012 川口市本町4-1-8

TEL : 048 - 226 - 5623 ; FAX : 048 - 226 - 5703

E-mail : [hoshi@jst.go.jp](mailto:hoshi@jst.go.jp)

.....

## 論文タイトル

### Structure Basis for Defects of Keap1 Activity Provoked by Its Point Mutations in Lung Cancer

肺癌細胞における点遺伝子変異によりもたらされるKeap1タンパク質の機能障害の構造的基盤

米国科学雑誌「Molecular Cell 誌」3月3日号  
(モレキュラーセル)

解禁時間 平成18年3月3日午前2時  
(新聞 3月3日朝刊)

#### 研究分担

- ・ 国立大学法人 筑波大学 先端学際領域研究センター  
大学院人間総合科学研究科
- ・ 独立行政法人 科学技術振興機構
- ・ 独立行政法人 理化学研究所ゲノム科学総合研究センター  
(文部科学省”タンパク3000プロジェクト”)
- ・ 国立がんセンター疾病ゲノムセンター

## 1 研究背景と目的

- 研究背景
1. 酸化・親電子性物質ストレスに対する生体防御メカニズム
  2. Keap1-Nrf2システムによるストレス応答の制御機構
  3. 酸化・親電子性物質ストレスセンサーKeap1と転写因子Nrf2の構造と機能の解析

#### 研究目的

## 2 研究成果の概要

1. Keap1 DGRドメインの立体構造
2. Keap1 DGRドメインとNrf2部分アミノ酸の複合体構造
3. 肺癌におけるKEAP1遺伝子変異の同定

## 3 研究成果の意義

## 研究背景 1

酸化・親電子性物質ストレスに対する  
生体防御メカニズム



**Nrf2-Keap1**

第1相異物代謝

酸化・還元等

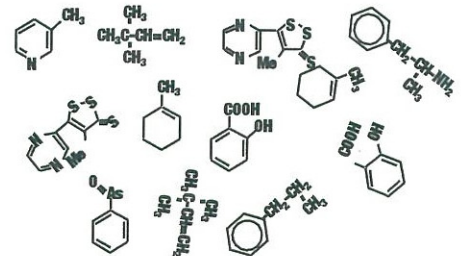
第2相異物代謝

生体防御酵素群

グルタチオン・グルクロン抱合等

水溶性化  
尿へ排泄

酸化ストレスを排泄・還元する  
ために重要な生体防御反応

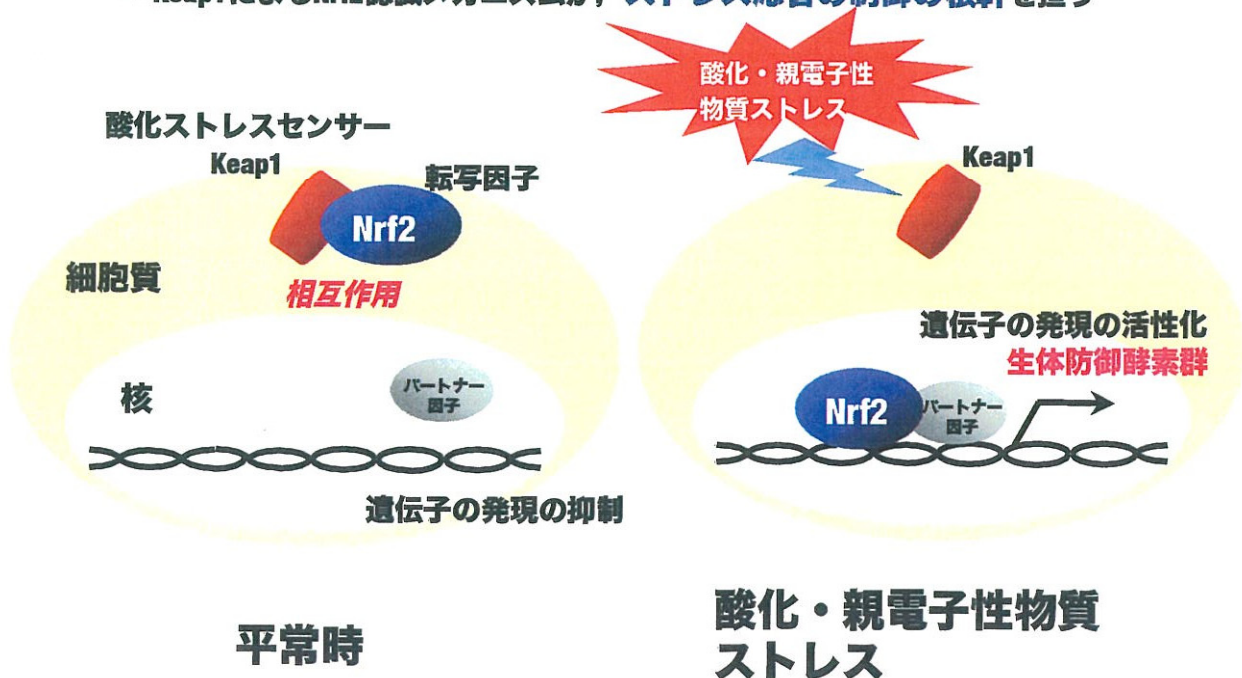


## 研究背景 2

Keap1-Nrf2システムによる酸化・環境ストレス応答の制御機構

ストレスセンサーであるKeap1は、ストレスのない平常時には転写因子Nrf2と直接相互作用することで、その核への移行を阻害し遺伝子発現をオフにしている

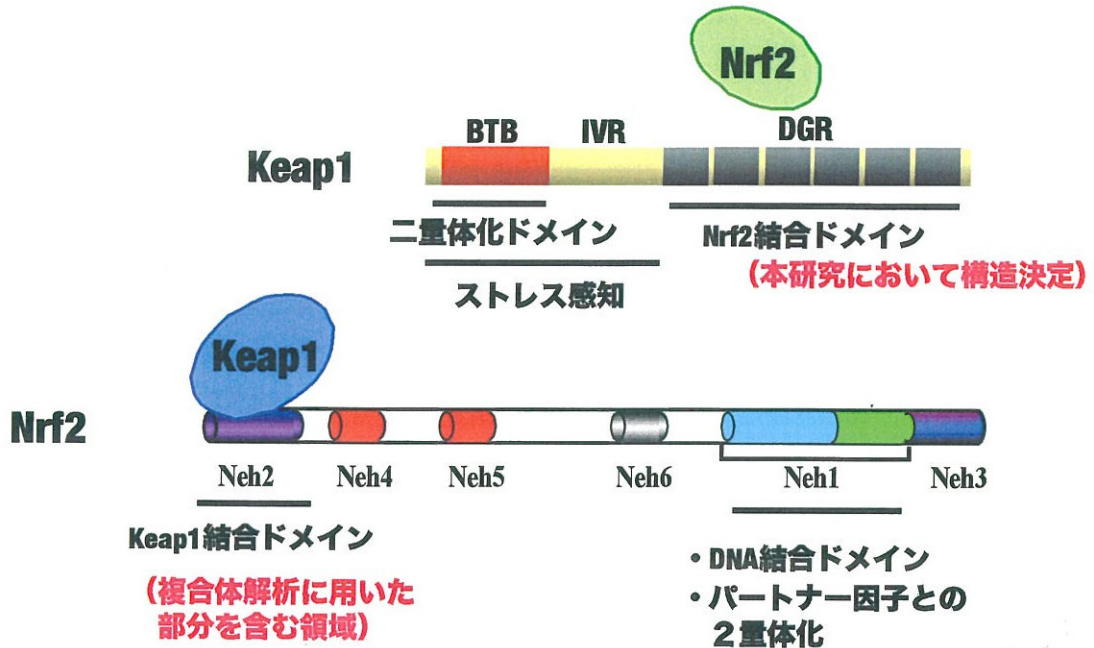
→ Keap1によるNrf2認識メカニズムが、ストレス応答の制御の根幹を担う





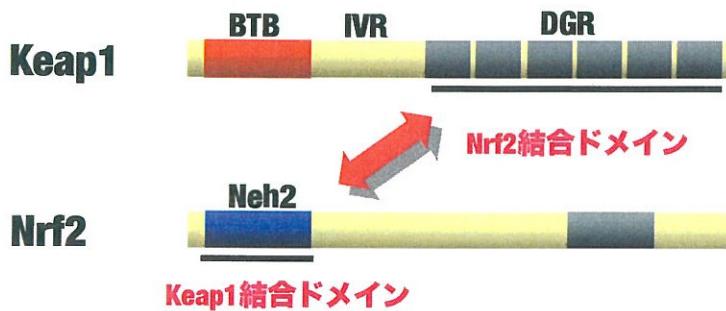
### 研究背景3

## Keap1 (センサー) とNrf2 (転写因子) のタンパク質構造と機能

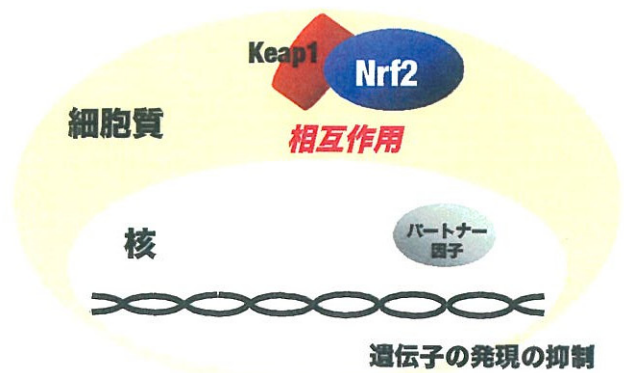


### 研究目的

## 1. Keap1とNrf2の相互作用メカニズムの解明



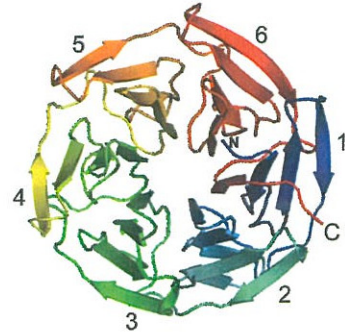
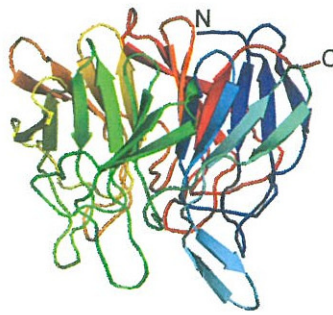
## 2. Keap1-Nrf2システムによるストレス防御機構の破綻と疾患の関係



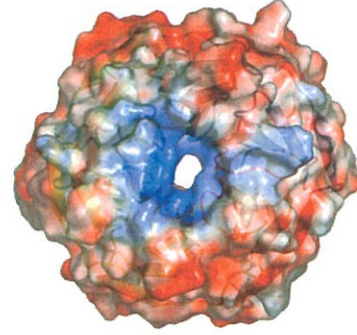
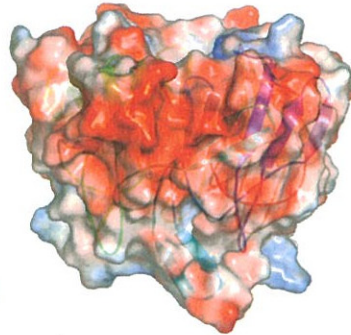
# Keap1のDGRドメインの立体構造

研究成果1

リボン表記



電荷表記



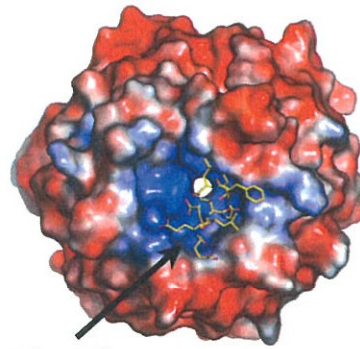
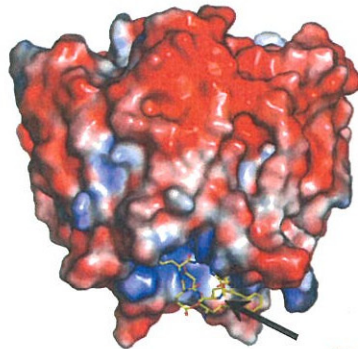
青：塩基性（正電荷）アミノ酸  
赤：酸性（負電荷）アミノ酸  
白：中性アミノ酸

側面図

底面図

# Keap1 DGRドメインとNrf2部分アミノ酸の複合体構造

研究成果2

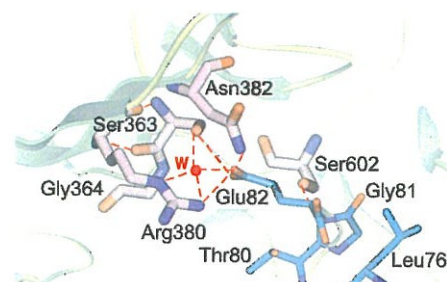
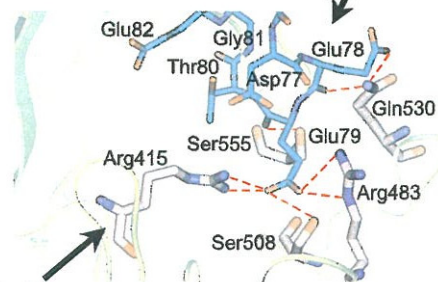


側面図

底面図

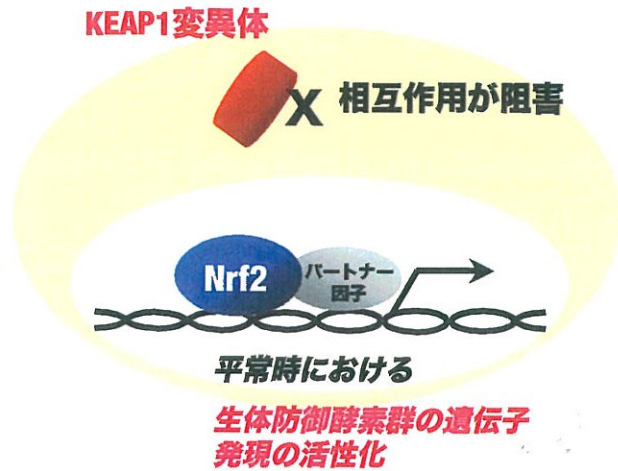
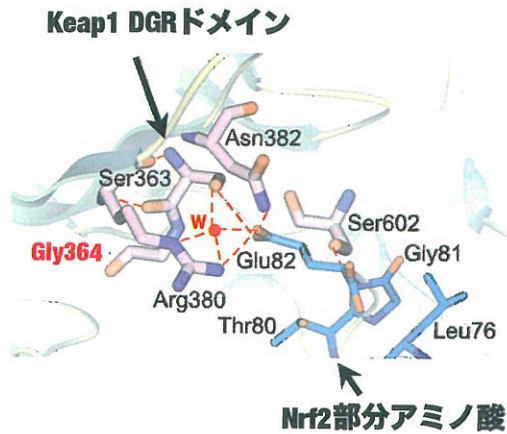
Nrf2部分アミノ酸

棒表記



Keap1 DGRドメイン

各アミノ酸の静電的相互作用による結合（赤点線）



研究成果の意義

酸化・親電子性物質ストレスがもたらす疾患に対する創薬への重要な知見

Keap1-Nrf2間の相互作用を阻害する物質・ペプチド

➡ 酸化・親電子性物質ストレス防御メカニズムの活性化

