氏　　名	福富（ふくとみ）　俊明（としあき）
学位の種類	博士（医学）
学位授与年月日	平成25年3月27日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科（博士課程）医科学専攻
学位論文題目	生体防御転写因子Nrf2制御にかかわる分子メカニズム及び構造基盤の解明
論文審査委員	主査　教授　大内　憲明　　教授　山本　雅之 教授　五十嵐和彦　　教授　宮田　敏男

論文内容要旨

Nrf2（nuclear factor-erythroid 2-related factor 2）は抗酸化にはたらく転写因子であり、ストレスセンサーとして機能するKeap1（Kelch-like ECH-associating protein 1）はその抑制因子である。Keap1はホモ2量体を形成し、Nrf2の2つの結合サイト、ETGEモチーフ（高親和性）とDLGモチーフ（低親和性）を介して2:1で結合することによりNrf2をユビキチン化し、そのプロテアソームにおける分解を促進する。酸化ストレスによりKeap1が修飾されると低親和性のKeap1-DLG結合が解離し、分解を免れたNrf2が蓄積すると考えられている。Keap1-DLG結合は酸化ストレス応答に極めて重要であるが、その構造や物理化学的性質に関しては不明な点が多い。最近、ヒト癌における*NRF2*遺伝子の体性変異がNrf2を恒常的に活性化して癌を悪性化に導くことが明らかにされた。しかし、これらの体性変異がもたらすDLGモチーフ周辺のアミノ酸置換が、Nrf2の機能や構造に及ぼす影響にも不明な点が多い。今回、Nrf2-DLGの構造、機能解析を中心に、広くNrf2の機能制御にかかわる分子メカニズムの解析を行った。

まず、Nrf2-DLGのKeap1結合最小領域（DLG+；Met17-Tyr46）を決定し、DLG+ペプチドとKeap1-DC（Keap1のNrf2結合ドメイン）の共結晶を作成しX線構造解析を行った。DLG+ペプチドは、3つのヘリックス（ヘリックス1-3）からなる2次構造を形成し、Keap1-DC底面の塩基性領域を中心に結合していた。また、ヘリックス1とヘリックス3は3つの分子内水素結合によって束ねられていた。

DLG+とKeap1の結合界面は、ETGEの結合界面とは異なり、Keap1のBlade 3の方向に突出しておりC434に近接していた。C434は8-nitro-cGMPにより特異的に修飾を受けることが示されており、その結果Keap1によるNrf2のユビキチン化が停止すると理解されている。そこで、8-nitro-cGMPによるC434の修飾がKeap1-DLG結合を特異的に阻害すると予想し、検証を行ったが8-nitro-cGMPによるKeap1-DLG結合の阻害は検出できなかった。

さらに、SPR（Surface Plasmon Resonance）による速度論解析を行い、Keap1-ETGE結合とKeap1-DLG結合の比較を行った。ETGEが速い結合の後にゆっくりとより安定な結合に変化する2段階結合様式を示すのに対して、DLGは速い結合解離を示すことが観察された。Keap1-DLG結合のこのような性質は、迅速な酸化ストレス応答に有利であると考えられた。

一方、ヒトがん症例で報告されているDLG周囲のアミノ酸置換の多くが、Keap1との結合を失わせることを示した。結晶構造解析の結果に照らしてみると、これらの変異が分子間相互作用だけでなく、分子内相互作用を失わせる変異も存在することが分かった。この解析から、Keap1-DLG結合における分子内相互作用の重要性も明らかになった。

最後に、Keap1結合タンパク質であるp62がNrf2の安定化をもたらすメカニズムの検討を行った。選択的オートファジー基質p62は、Keap1-DLG結合に競合してNrf2を安定化することが示されている。p62のKeap1結合サイトであるKIR（Keap1-interacting region）のコンセンサス配列 ^{351}STGE^{354} のS351がリン酸化されるとETGEに類似した構造をとることから、S351のリン酸化がp62とKeap1との親和性を高めることを予想して、p62のリン酸化ペプチドを用いてITC（Isothermal Titration Calorimetry）による解析を行った。予想どおり、p62 S351のリン酸化はKeap1との親和性を高めることが示され、このリン酸化によりp62がより効果的にKeap1-DLG結合と競合しNrf2が安定化する可能性が示された。また、LC3-p62-Keap1の３者複合体解析から、p62がKeap1と結合した状態でオートファゴゾーム上のLC3と結合しうることを示した。これは、Keap1がp62依存的にオートファジーにより分解されることを支持する結果である。

これらの研究成果は、Keap1-DLG結合の構造とその物理化学的な性質を明らかにしたものであり、ストレス感知機構の分子基盤の一端を解明したものである。今後、Keap1-Nrf2を標的とした創薬研究にも有用な情報を提供すると期待される。

【所定様式⑬No.1】大学院の課程による者（課程博･医学）

審　査　結　果　の　要　旨

博士論文題目　生体防御転写因子 Nrf2 制御にかかわる分子メカニズム及び構造基盤の解明

所属専攻・分野名　医科学専攻　・　先進外科学　分野

学籍番号　　氏名　福富俊明

Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) は抗酸化にはたらく転写因子であり、ストレスセンサーとして機能する Keap1 (Kelch-like ECH-associating protein 1) はその抑制因子である。Nrf2 は異なる親和性をもつ２つの結合サイト、すなわち ETGE(高親和性)、DLG(低親和性)サイトを介して Keap1 と結合することにより、ポリユビキチン化を受けてプロテアソームで分解受けている。酸化ストレスが Keap1 のシステイン残基を修飾すると、Keap1 と DLG の結合が外れることで、Nrf2 のユビキチン化が停止して Nrf2 が活性化すると考えられている。即ち、Keap1 と DLG の結合は酸化ストレス応答に重要であるが、構造基盤や機能に関して不明な点が多い。また、Nrf2 の活性化に寄与すると報告されている修飾や因子に関しても詳細については不明な点が少なくない。

そこで、筆者はまず Keap1 と DLG の結合に関して、物理化学的な解析や生化学的な解析を行った。まず、DLG の Keap1 結合最小領域は 17-46 と予想より長い結合領域を必要とすることを明らかにした。そして、結合領域を含むペプチドを用いて Keap1-DC との複合体結晶構造解析を行い、結合に重要な DLG の 2 次構造や分子内水素結合を明らかにした。そして、癌の悪性化に関わる DLG 領域の体性変異はこの分子内水素結合に関与するアミノ酸にも存在しており、これらの変異は Keap1 との結合を失わせることを明らかにした。さらに、ETGE 及び DLG と Keap1 の結合を ITC (Isothemal titration calorimetry) で解析を行い、ETGE と DLG が熱力学的に全く異なる結合様式を取ることを明らかにした。そして、SPR (Surface Plasmon Resonance) を用いた解析では酸化ストレス応答に重要なこれらの結合の性質を明らかにした。また、Nrf2 の活性化に寄与することが報告された選択的オートファジー基質 p62 に関しては、p62 の Ser351 のリン酸化が Keap1 との親和性を高めることを示し、Nrf2 の活性化に貢献する可能性を示した。そして、Keap1 のオートファジーによる分解に重要であると考えられる Keap1-LC3-p62 の 3 者複合体の存在を示した。

本研究では、Keap1 と Nrf2 の DLG 領域を介した結合の構造、Keap1 と Nrf2-DLG 及び ETGE の結合の物理化学的な性質とその違いを明らかにし、Keap1-Nrf2 による酸化ストレス応答の分子基盤の一端を明らかにしたものである。また、様々な観点から Nrf2 制御に関して検討されており、学位に相応し研究である。よって、本論文は博士(医学)の学位論文として合格と認める。