

ケミカルセンサーとしての Keap1 の立体構造と機能

黒河博文

私たちの生活環境には細胞に毒性を与える様々な化学物質が存在する。ある種の毒性化学物質は食品や呼吸により体内に取り込まれ、がんや生活習慣病などの様々な疾患の原因となっている。一方、細胞はこれらの毒性化学物質を感知して解毒することができる。センサー分子 Keap1 は毒性化学物質を感知して転写因子 Nrf2 を活性化する。活性化した Nrf2 は生体防御遺伝子群の発現誘導を介して毒性化学物質を解毒・排出する。Keap1 はドメイン構造を有しており、Nrf2 との複合体構造解析が報告されている。しかし、センサードメインの立体構造情報は乏しく、Keap1 が多様な化学物質を感知する仕組みはいまだ不明な点が多い。Keap1 の化合物認識は従来の分子認識の概念とは異なる新しい分子機構によるものと考えられる。本稿では Keap1 のケミカルセンサーとしての構造と機能について最近の知見を概説する。

1. 化学物質に対する生体防御機構

私たちは日常生活の中で、知らず知らずのうちに環境汚染物質、薬物、食品添加物、生理活性物質などの化学物質を食事や呼吸によって体内に取り込んでいる。これらの中にはタンパク質分子や DNA 分子を損傷させ、化学発がんを引き起こす化学物質も含まれる。一方、細胞は生体防御機構を有しており、これらの化学物質を解毒、排出することが知られている (図 1)。体内に取り込まれた化合物は、いわゆる I 相反応と呼ばれる反応で、水酸化、還元、加水分解を受ける。代表的な例としては、シトクロム P450 による酸化反応がよく知られている。続いて II 相反応と呼ばれるグルタチオン、硫酸、酢酸、グルクロン酸などの分子が付加される反応 (抱合と呼ばれる) が起こる。I 相反応、II 相反応に関わる酵素群は、それぞれ反応特異性や基質特異性を有しており、多様な化合物への代謝、抱合を可能にしている。抱合後の化合物は輸送体 (ABC 輸送体など) によって排出 (III 相反応と呼ぶこともある) される。胆嚢で

は胆汁として、腎臓では尿に排出される。

また、基質となる化合物の中には、I 相反応を経ないで直接 II 相反応によって解毒されるものも存在する。ある種の化合物を投与すると II 相反応・排出に関わる酵素・輸送体をコードした一連の遺伝子群が発現誘導されることが知られている。つまり、細胞には有毒な化合物を「感知」し「転写制御」とリンクして解毒・排出をする生体防御系が存在するのである。

2. II 相酵素群の遺伝子発現を制御する
抗酸化剤応答性配列

抗酸化剤と呼ばれる化学物質群 (ブチルヒドロキシアニソール等) は、II 相反応に関わる酵素を含む一連の生体防御遺伝子群の発現を統一的に誘導し、化学発がんを抑制することが知られている。また、抗酸化剤によって活性化される酵素群は、抗酸化剤応答性配列 (ARE; 5'-A/GTGAC/GNNGCA/G-3') と呼ばれる共通の遺伝子発現制御領域を有している。この事象は、ある特定の転写因子が抗酸化剤依存的に活性化して ARE 配列に結合し、標的遺伝子群の発現を促している可能性を示唆するものであった (図 2)。また抗酸化剤は転写因子に直接作用するのではなく、センサータンパク質を介して細胞情報が転写因子に伝達することが明らかとなった。このセンサータンパク質は E3

東北大学大学院医学系研究科 (〒980-8575 宮城県仙台市青葉区星陵町 2-1)

Structure function relationship of Keap1 as chemical sensor
Hirofumi Kurokawa (Tohoku University Graduate School of Medicine, 2-1 Seiryō-cho, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan)

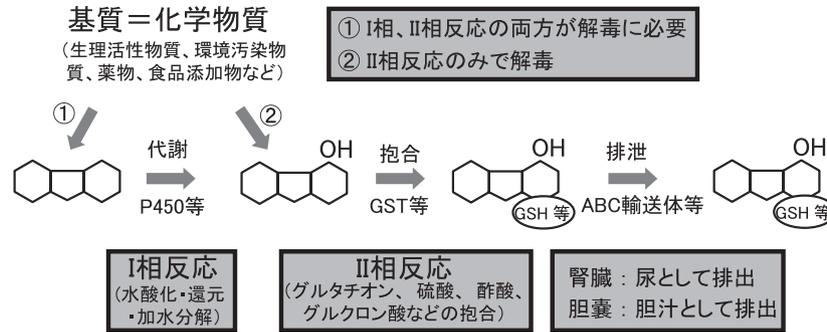


図1 化学物質に対する生体防御機構

体内に取り込まれた様々な化学物質 (①で示す) はまずI相反応による代謝 (水酸化, 還元, 加水分解) を受け, 続いてII相反応 (グルタチオンなどの抱合) を経て, 最後に輸送体 (ABC輸送体など) によって細胞外へ排出される. ある種の化学物質 (②で示す) はI相反応を経ないで, 直接, II相反応による抱合を受ける.

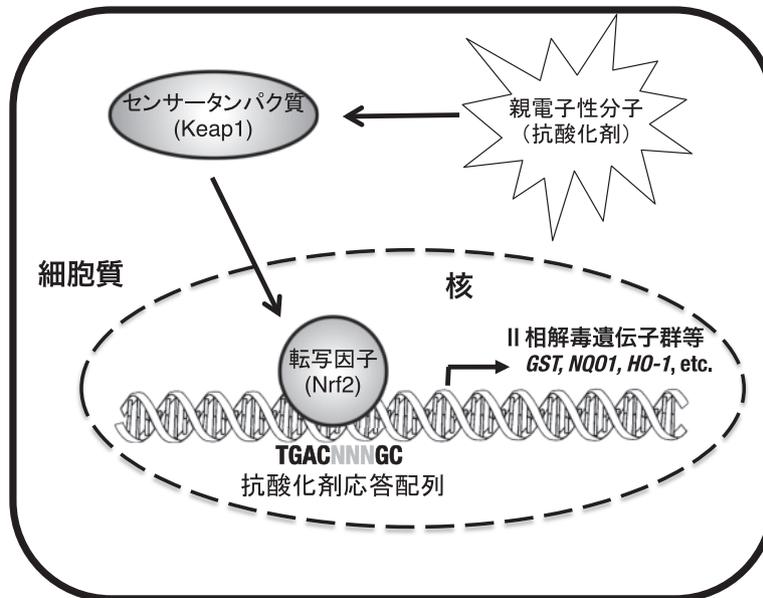


図2 毒性化学物質による生体防御酵素群の発現誘導

酵素複合体のアダプタータンパク質として機能する Keap1¹⁾であり, 転写因子は Nrf2²⁾であることが明らかとなった. Keap1 が感知する化学物質群が後に数多く同定され, その多くは親電子性分子と総称されるものであることが明らかとなった (後述).

ARE は赤血球分化に関わる NF-E2 配列に類似している. NF-E2 は Cap 'n' Collar (CNC) ファミリーの一つである p45 転写因子と転写活性化領域を持たない小 Maf 群転写因子とが形成するヘテロ二量体によって認識される³⁾. この NF-E2 配列に結合する新規因子の解析が進む過程で, 転写因子 Nrf2 が II 相酵素群の遺伝子発現を統一的に制御することが明らかとなった²⁾. この Nrf2 の標的遺伝子群の解明がその後の化学物質や酸化ストレスに対する生体防御機構解明に大きく貢献した.

Nrf2-Maf ヘテロ二量体が認識する ARE 配列 (5'-TGACNNNGC-3', 図 3A) は, 他の塩基性領域-ロイシンジッパー (bZip) 型転写因子の認識配列と類似しているが, その標的遺伝子群は Jun-Fos や CREB/ATF 転写因子の標的遺伝子群とは異なっていた. Nrf2-Maf は特に小 Maf 因子による GC (上記配列の下線部) の認識によって認識配列の特異性を生み出している. このユニークな分子認識の構造的基盤を解明するために小 Maf 転写因子の構造生物学的解析を行った.

筆者らは小 Maf 群転写因子の一つである MafG ホモ二量体と Maf recognition element 25 (MARE25, 図 3B) と呼ばれる ARE と類似配列を有する DNA との複合体結晶解析に成功した⁴⁾. 得られた小 Maf 因子-DNA 複合体の全体構造図をリボン図で示す (図 3C, D). MafG は三つのヘリッ

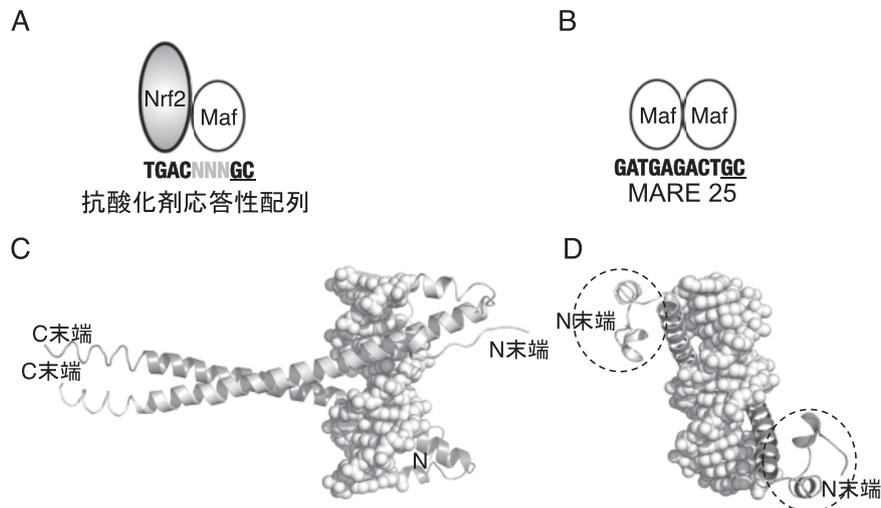


図3 抗酸化剤応答性配列と小 Maf 転写因子の結晶構造

(A) Nrf2-小 Maf 転写因子ヘテロ二量体が認識する抗酸化剤応答性配列。(B) 小 Maf 転写因子ホモ二量体が認識する MARE25 配列。(C) 小 Maf 転写因子ホモ二量体-DNA 複合体構造。(D) C を 90 度回転させた図。EHR 領域を点線で囲む。

クス (H1, H2, H3) からなり, extended homology region (EHR) と呼ばれる MafG に特異的な領域は H1, H2 及び H3 のアミノ末端部分 (図 3D の点線で囲った部分), H3 は DNA 結合に関わる塩基性領域, 二量体形成に関わるロイシンジッパー領域からなっていた。EHR は Maf 群因子において高度に保存された領域であるため, GC 配列の認識に直接関わっていると予想された。しかし, EHR は DNA と直接相互作用をしておらず (図 3D), GC 配列の認識には 57 番目のアルギニン残基 (Arg57) と 61 番目のアスパラギン残基 (Asn61) が直接関わっていることが明らかとなった。意外にもこれら二つのアミノ酸残基は多くの bZip 転写因子に保存されていた。Maf の Arg57 と Asn61 は他の bZip 転写因子と異なる特異的な側鎖配向をとることによって, GC 配列を直接認識していた。MafG 転写因子と DNA との複合体結晶構造解析によって, 予想外の DNA 認識機構が解明された。

3. Keap1 は Nrf2 を制御する

Nrf2 と相互作用する因子の探索から Keap1 が同定された¹⁾。図 4 に示した通り, Keap1 は細胞質で Cullin 3 (Cul3) タンパク質と会合してプロテアソーム分解系 E3 酵素複合体を形成するアダプタータンパク質として機能する。ストレスのない状態では, Nrf2 を迅速にユビキチン化して分解する抑制因子として機能する⁹⁾。一方, 酸化ストレスや親電子性分子が存在すると, Keap1 は不活性化し Nrf2 の抑制を解除する。その結果, Nrf2 は安定化して核に移行し, 小 Maf 因子とヘテロ二量体を形成して ARE に結合し, II 相酵素群を含む生体防御酵素群の遺伝子発現を活性化する (図 4)。つまり, Keap1 による Nrf2 の抑制制御の

本質は分解制御にあり, 逆に, 親電子性分子や酸化ストレスによる Nrf2 活性化は, 抑制状態からの「脱抑制」メカニズムによる。常に Nrf2 の合成と分解を繰り返す機構は無駄も多いが, ストレスによる細胞障害に対して極めて短時間で応答できるという点で優れた機構といえる。

さらに, この事象は Keap1 が酸化ストレスや親電子性分子群を認識し, その三次元構造を変化させることで E3 酵素複合体不活性化させる「ケミカルセンサー」として機能していることを示している。特に, Keap1 が多様な外部からの物理化学的な信号 (酸化ストレスや様々な有毒化学物質) を認識・感知し, Nrf2 の脱抑制という生物学的な信号へと変換する分子機構は大変興味深い。しかし, その分子レベルの機構はいまだ不明な点が多く, 特に構造生物学的な研究の進展が待たれる (後述)。

4. Keap1 の二量体構造と Nrf2 結合機構

Nrf2 と Keap1 は複数の機能ドメインから構成されている (図 5A, B)。Nrf2 は六つの進化的に保存された Neh (Nrf2-ECH homology) ドメインを有する (図 5A)。それぞれのドメインの役割は, Neh2 は酸化ストレス依存的なデグロン (タンパク質分解調節領域), Neh4, Ne5, Neh3 は転写活性化, Neh6 は酸化ストレス非依存的デグロン, Neh1 は DNA 結合及び小 Maf 因子とのヘテロ二量体形成, である。特に Neh2 は Keap1 と結合する DLG モチーフと ETGE モチーフの二つの領域を含んでおり, 酸化ストレス依存的な Nrf2 抑制における鍵となる領域であり, 構造解析も進められている (後述)。

Keap1 のドメイン構成を図 5B に示す。BTB/POZ (Broad-complex, Tramtrack, Bric-a-Brac/Poxvirus and Zinc finger)

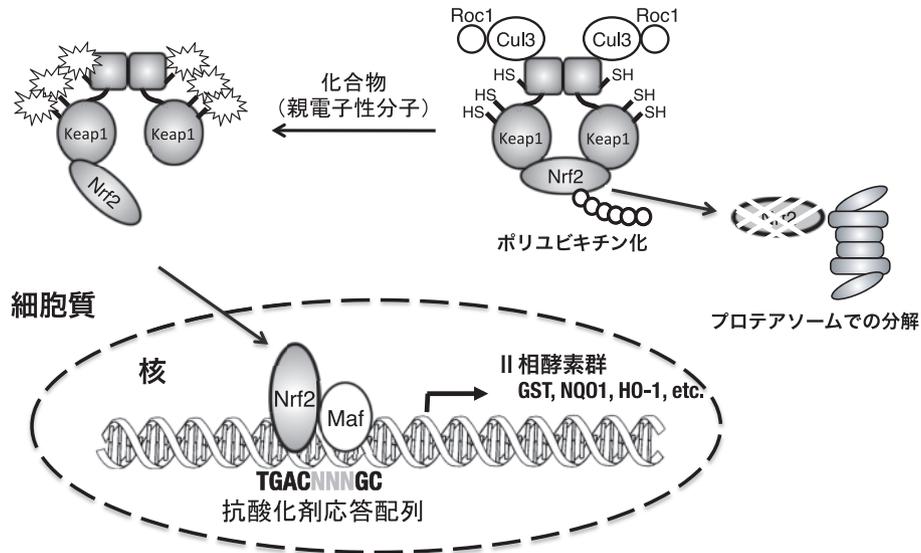


図4 Keap1によるストレス感知とNrf2活性化機構

Keap1はCul3とE3酵素複合体を形成し、Nrf2をポリユビキチン化し、プロテアソームでの分解を促進する。親電子性分子と称される化学物質や酸化ストレス存在下では不活性化する。その結果、分解を逃れたNrf2は核内で小Maf因子とヘテロ二量体を形成し、II相解毒酵素群などの生体防御遺伝子群を活性化し、これらの親電子性分子によるストレスは速やかに除去される。

ドメインはCul3との相互作用とKeap1のホモ二量体形成の両方に関わっている。IVR (intervening region) はセンサー機能に関わっている。Keap1のC末端領域には、KelchまたはDGR (double-glycine repeat) リピートと呼ばれる6回繰り返しモチーフからなるDGRドメインを有する。Nrf2の結合にはDGRドメインとC末端領域(CTR)を含むDCドメインが関与しており、複数の複合体結晶構造が報告されている(後述)。BTBドメイン、IVRドメインははまだ結晶構造が解明されていない。二つのセンサードメインの詳細な三次元構造が未解明であることが、Keap1センサー機能解明の障害となっており今後の解析が待たれる。

筆者らは全長Keap1二量体構造を電子線単粒子解析法によって明らかにした⁶⁾。Keap1は二つの房をもつサクランボ様の二量体構造をとっていた(図5C)。二つの房をつなぐ幹の部分は二量体BTBドメインに相当し、二つの房の部分はNrf2結合能を有するDCドメインに相当する。Keap1DCの結晶構造を房の部分に重ね合わせて示している。Nrf2のDLGモチーフ、ETGEモチーフとそれぞれ結合する部位を2本の矢印でそれぞれ示している。

図5DはKeap1-Nrf2複合体を模式的に示したものである。IVRに相当する部分はKeap1DCを含む大きな房の部分に含まれると考えられているが、ここでは示していない。Nrf2のDLGとETGEモチーフの二つの領域が、Keap1の二つの房の部分(DCドメイン)の底面に2:1の比で結合すると考えられる。また、Nrf2のDLGとETGEモ

チーフに挟まれた領域は、リシンを多く含む α ヘリックス構造をとっており、この領域がポリユビキチン化されると考えられる。E3リガーゼ複合体(Keap1-Cul3-Roc1)がこの α ヘリックス上のリシンをポリユビキチン化する際に、最適な空間配置をとるためにKeap1とNrf2の2:1結合が重要なであろう。

ヒトがん症例ではDLG及びETGEモチーフに集中して、点変異が起こっていることが報告されている⁷⁾。図5Dに点変異の例を示す。これらの点変異によってDLG及びETGEモチーフのどちらか一方がKeap1と結合することができなくなり、ポリユビキチン化の効率が著しく低下すると予想される。その結果、Nrf2はプロテアソームにおける分解を免れ、核内に移行して抗がん剤を解毒・排出する遺伝子群を恒常的に活性化する。このNrf2の恒常的な活性化はがん細胞を抗がん剤から守ることにつながり、がんを悪性化するものと考えられている。

5. Keap1DC複合体結晶構造

Keap1DCドメインはNrf2のDLG及びETGEモチーフと結合する。Keap1とCul3からなるE3酵素複合体の基質特異性を決定する重要な領域であり、その構造生物学的な検討は重要である。さらにKeap1DCは選択的オートファジー基質p62と結合することも後の研究から明らかとなった。筆者らはKeap1DCドメインとp62のKeap1相互作用領域(p62-KIR)との複合体結晶構造解析を実施した。Keap1DCは一次構造上、DGRモチーフが6回繰り返す配

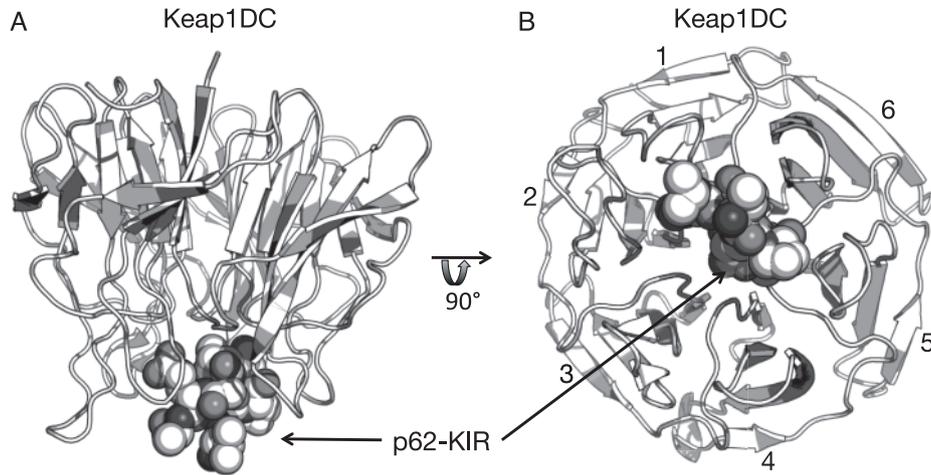


図6 Keap1DC-p62 複合体結晶構造

(A) Keap1DCをリボン、p62-KIRを球で示す。(B)は(A)を90度回転させた図。六つのDGRリピートを番号で示す。

がんを悪性化する点は興味深い。

6. Keap1を阻害する分子群

Keap1を阻害しNrf2誘導を導く化合物の例を図7に示す。ブロッコリースプラウトに含まれているスルホラファン(図7A)、ワサビの辛み成分であるアリルイソチオシアネート、ローズマリーに含まれるカーノソール(図7B)、タマネギやソバなどに含まれるケルセチン(図7C)などはKeap1に作用してNrf2を活性化することが知られている。内因性の親電子性プロスタグランジン15-デオキシ- $\Delta^{12,14}$ -プロスタグランジン J_2^{11} (図8D)や一酸化窒素とサイクリックGMPとの反応生成物である8-ニトロcGMP¹²⁾(図8E)やニトロ化脂肪酸もNrf2を活性化することが報告されている。ビールの原材料であるホップに含まれるキサントフモール(図8F)などもARE誘導剤として知られている。これらのKeap1阻害分子を比較すると、分子サイズや構造も多様である。Keap1はこれらの分子をどのように認識しているのだろうか？これらの化学物質の多くは、親電子性分子と呼ばれるものが多く、この親電子性分子の化学的性質をヒントに次に示すようなKeap1のセンサー機能に関する研究が進められている。

7. Keap1はシステインセンサー

Keap1を阻害する親電子性分子は、化学結合を生成する反応において電子を受け取る側の化学種を有していることに特徴がある。一方、システイン残基は求核性が非常に高いチオール基を持つため、親電子性分子と容易に化学結合を形成することができる。以上から、Keap1のシステイン残基と親電子性分子との化学結合形成がセンサー機能に重要であることが理解できる。通常、酵素が基質を認識する際、分子表面の形状の、電子的な相補性によって基質特異

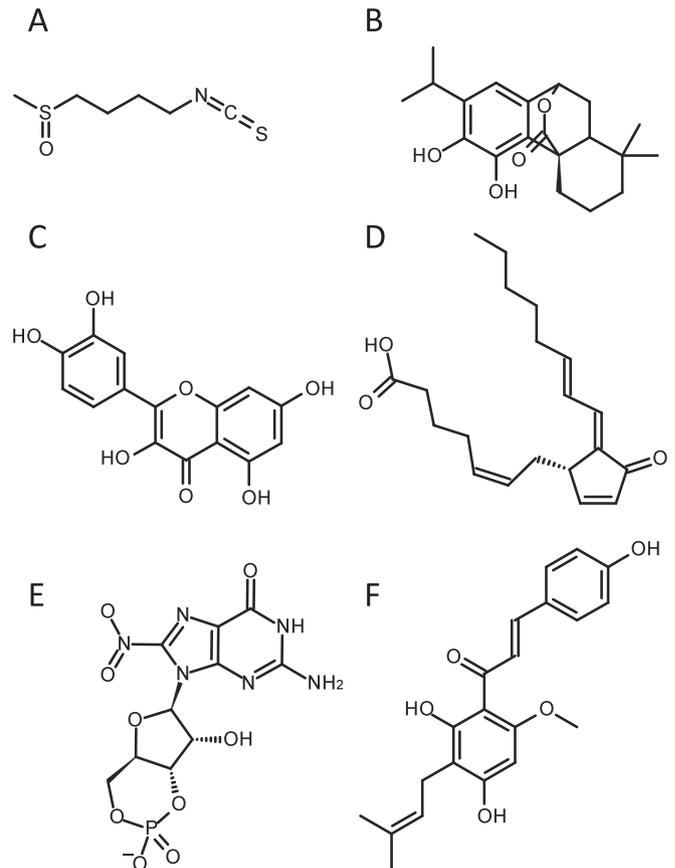


図7 様々なKeap1阻害化合物

(A) スルホラファン(ブロッコリー新芽由来)。(B) カーノソール(ローズマリー由来)。(C) ケルセチン(タマネギやソバ由来)。(D) 親電子性プロスタグランジン(15-デオキシ- $\Delta^{12,14}$ -プロスタグランジン J_2 (内因性の因子)。(E) 8-ニトロサイクリックGMP(内因性の因子)。(F) キサントフモール(ビールの原材料ホップ由来)。

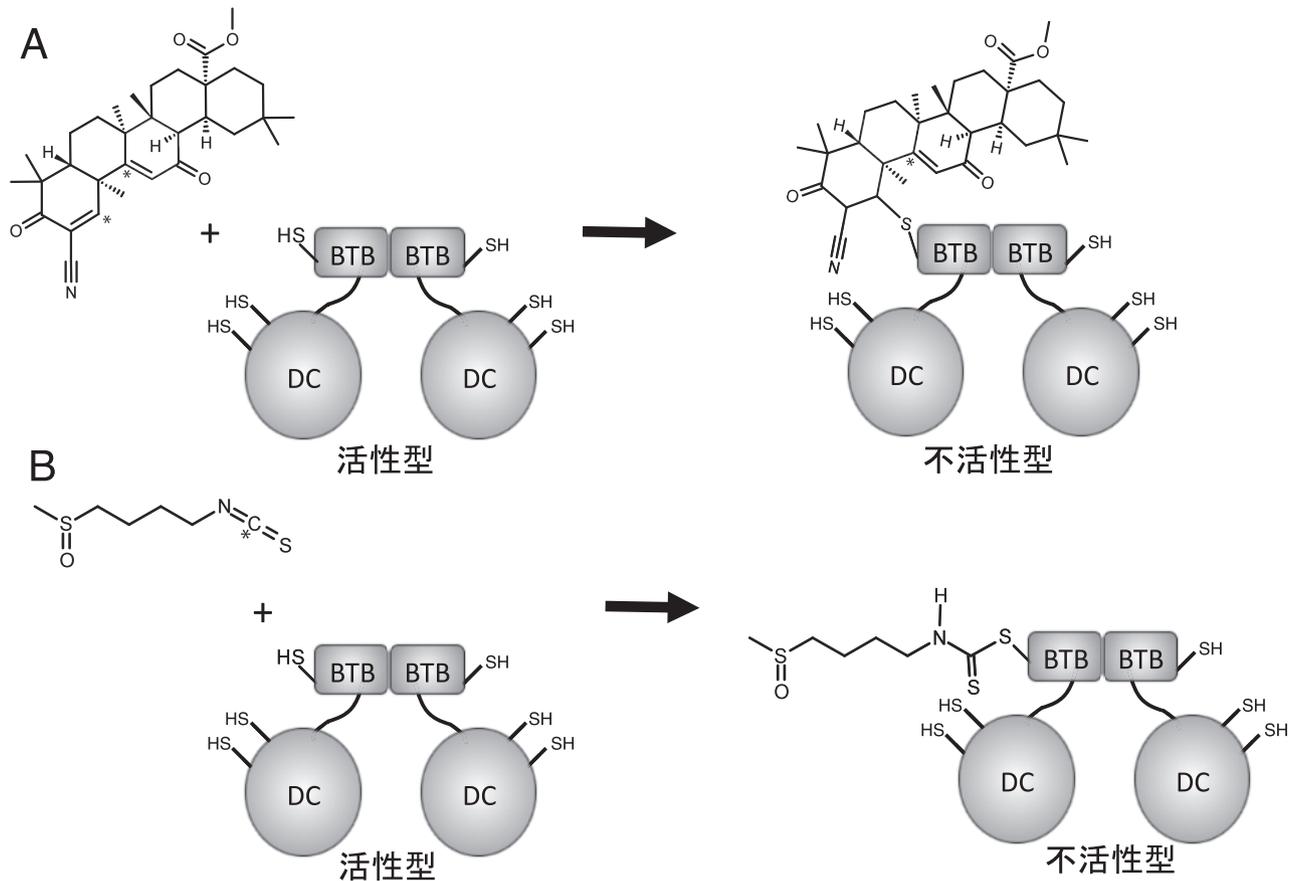


図8 親電子性分子による Keap1 システインの化学修飾

(A) パルドキソロンメチル、及び (B) スルフォラファンによる Keap1 システインの化学修飾モデル。*はシステインが反応するであろう原子を示している。

性を生み出している。一方、Keap1のシステインセンサーモデルは化学結合を形成しやすいかどうかが重要であり、Keap1と標的となる化合物との間に分子表面の形状的な相補性を必ずしも必要としない。このためシステインセンサーモデルはKeap1が多様な化学物質をセンスすることをうまく説明できるモデルといえる。

実際、ヒト KEAP1は27残基、マウス Keap1は25残基と多数のシステインを有している。センサーシステインを同定するため、特定の親電子性分子とKeap1の個々のシステインとの反応性を網羅的に解析した研究が進められてきた。これらの研究から、Keap1のセンサーシステインはCys151, Cys273, Cys288の三つであると考えられている(図5B)。Cys151はBTBドメインに、Cys273およびCys288はIVRドメインに位置している。また、BTBとIVRのセンサーシステインはそれぞれ、異なるタイプの親電子性分子を認識することから、Keap1は複数のセンサー領域を有していると考えられる。いずれにせよ、これらのシステイン残基のチオール基が親電子性分子と化学結合を形成することでKeap1-Cul3複合体に何らかの構造変化が起こ

り、その結果、Nrf2のポリユビキチン化が抑制されることが重要なのであろう¹³⁾。図8にパルドキソロンメチル及びスルフォラファンによるKeap1システインの化学修飾を模式的に示す。この共有結合の形成がKeap1 BTBの二量体構造に何らかの変化を及ぼし、Keap1を不活性型のコンホメーションへと変化させるものと考えられる。

8. ま と め

最近の全長Keap1の電子線単粒子解析、Keap1DCとNrf2及びp62との複合体結晶構造解析などからKeap1の構造的基盤が部分的に明らかとなってきた。一方、ケミカルセンサーとしてのKeap1の構造・機能相関はまだまだ不明な点が多い。Keap1が親電子性分子を感知する機構は、Keap1のシステイン残基が化学修飾を受けることによるコンホメーション変化がトリガーとなっている。今後はKeap1センサードメインについて、活性型であるシステイン非修飾型と不活性型のシステイン修飾型との両方について構造解析を進め、両者を比較することが重要であろう。結晶構造解析が進んでいないKeap1 BTB及びIVRドメ

ンの構造解析の進展が期待される。また、細胞質中にはグルタチオンなど多くのチオール基が存在する。これらのチオール基と化学結合を形成することなく、親電子性分子がKeap1と特異的に化学結合を形成するためには、Keap1のセンサーシステインの反応性を高める何らかの仕組みが存在すると考えられる。その詳細は不明であり、様々な手法を駆使した複合的な研究の展開が期待される。

文 献

- 1) Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., & Yamamoto, M. (1999) *Genes Dev.*, **13**, 76–86.
- 2) Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., & Nabeshima, Y. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **236**, 313–322.
- 3) Igarashi, K., Kataoka, K., Itoh, K., Hayashi, N., Nishizawa, M., & Yamamoto, M. (1994) *Nature*, **367**, 568–572.
- 4) Kurokawa, H., Motohashi, H., Sueno, S., Kimura, M., Takagawa, H., Kanno, Y., Yamamoto, M., & Tanaka, T. (2009) *Mol. Cell Biol.*, **29**, 6232–6244.
- 5) Kobayashi, A., Kang, M.I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., & Yamamoto, M. (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 7130–7139.
- 6) Ogura, T., Tong, K.I., Mio, K., Maruyama, Y., Kurokawa, H., Sato, C., & Yamamoto, M. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 2842–2847.
- 7) Shibata, T., Ohta, T., Tong, K.I., Kokubu, A., Odogawa, R., Tsuta, K., Asamura, H., Yamamoto, M., & Hirohashi, S. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 13568–13573.
- 8) Padmanabhan, B., Tong, K.I., Ohta, T., Nakamura, Y., Scharlock, M., Ohtsuji, M., Kang, M.I., Kobayashi, A., Yokoyama, S., & Yamamoto, M. (2006) *Mol. Cell*, **21**, 689–700.
- 9) Lo, S.C., Li, X., Henzl, M.T., Beamer, L.J., & Hannink, M. (2006) *EMBO J.*, **25**, 3605–3617.
- 10) Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y.S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K.I., Kim, M., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., Tanaka, K., & Yamamoto, M. (2010) *Nat. Cell Biol.*, **12**, 213–223.
- 11) Itoh, K., Mochizuki, M., Ishii, Y., Ishii, T., Shibata, T., Kawamoto, Y., Kelly, V., Sekizawa, K., Uchida, K., & Yamamoto, M. (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 36–45.
- 12) Sawa, T., Zaki, M.H., Okamoto, T., Akuta, T., Tokutomi, Y., Kim-Mitsuyama, S., Ihara, H., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Fujii, S., Arimoto, H., & Akaike, T. (2007) *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 727–735.
- 13) Zhang, D.D. & Hannink, M. (2003) *Mol. Cell Biol.*, **23**, 8137–8151.