

氏名(国籍)	姜 文 一 (韓 国)
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	博 甲 第 3796 号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	<b>Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes.</b> (異物代謝第 2 相酵素群の発現誘導転写因子 Nrf2 を制御する Keap1 とアクチンの相互作用)
主 査	筑波大学教授 理学博士 岡 村 直 道
副 査	筑波大学教授 博士(医学) 榭 正 幸
副 査	筑波大学教授 医学博士 三 輪 正 直
副 査	筑波大学助教授 医学博士 竹 内 薫
副 査	筑波大学講師 博士(理学) 三 輪 佳 宏

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

Keap1-Nrf2 システムは、酸素や親電子性物質に対する生体防御機構を統一的に制御することで、細胞の恒常性維持に努めている。Keap1 は転写因子 Nrf2 を細胞質に局在化することで、その転写活性を抑制している。しかし酸化ストレスにさらされると、Keap1 は Nrf2 の活性を抑制できなくなり、核移行した Nrf2 が親電子試薬応答配列 (ARE) を介して第 2 相異物代謝酵素および抗酸化タンパク質などの生体防御因子の遺伝子発現を誘導する。このことより、Keap1 は酸素や親電子性物質に対するセンサーとして機能していると考えられる。

本研究では、Keap1 タンパク質の 5 つのドメイン、NTR, BTB, IVR, DGR, そして CTR の機能貢献を明らかにすることで、Keap1 と Nrf2 により形成される異物代謝の分子機構を包括的に理解することを目的とする。

### (対象と方法)

Keap1 の細胞内局在と、アクチン繊維との共局在を、Keap1 過剰発現マウス由来の胎児繊維芽細胞を用いて免疫染色法で解析した。また、Keap1 の各ドメインの機能貢献を明らかにするために、各ドメインの欠失変異体発現プラスミドを構築した。Keap1 欠失変異体と Nrf2 の細胞内動態を、培養細胞の過剰発現系を用いた免疫沈降法ないし免疫染色法で解析し、相互作用ドメインの同定を行った。さらに、Keap1 欠失変異体の機能を統合的に解析するために、ルシフェラーゼレポーター解析により Nrf2 転写活性の抑制能を調べた。

### (結果)

NIH3T3 細胞に過剰発現させた Keap1 は細胞質に局在する因子であることが確認された。また、Keap1 過

剰発現マウス由来の胎児繊維芽細胞における Keap1 の細胞内局在を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて詳細に検討したところ、Keap1 はアクチン繊維上に局在していることが示された。そこで、Keap1 とアクチン繊維の直接的な相互作用を免疫沈降法で確認した結果、Keap1 は DGR ドメインを介してアクチン繊維と相互作用することが明らかになった。次に、Nrf2 モデルタンパク質である緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合した Neh2-GFP と Keap1 を過剰発現させた細胞をアクチン重合阻害剤である cytochalasin-B や swinholide-A で処理しアクチン繊維を破壊したところ、Neh2-GFP の核へ移行が観察された。このことから Keap1 が Nrf2 を細胞質に局在化させるためには、アクチン繊維との相互作用が重要であることが示された。

Keap1 の Nrf2 との相互作用に必要なドメインを明らかにするために行った免疫染色解析とルシフェラーゼレポーター解析では DGR ドメインと CTR ドメインがともに重要であることが確認された。しかしながら、免疫沈降法による相互作用解析を行ったところ、Keap1 の DGR ドメインのみが Nrf2 との直接的な結合に重要であり、CTR ドメインは間接的にこの相互作用に寄与していることが示唆された。

### (考察)

本研究では、Keap1 による Nrf2 の活性制御機構の解明を試み、Keap1 がアクチン繊維上に局在し、DGR ドメインと CTR ドメインを介して Nrf2 と相互作用していることを明らかにした。また細胞骨格を形成するアクチン繊維が、異物代謝制御機構において Keap1 に重要な足場 (scaffold) を提供することで、Nrf2 を細胞質に局在化させているという新たなアクチン繊維の機能を提示した。最近の研究により、非ストレス下では Nrf2 は Keap1 によりユビキチン化を受け、速やかにプロテアソーム経路により分解されていることが報告されている。このことから Keap1 とプロテアソームがアクチン繊維上で近接することで、プロテアソームによる Nrf2 の分解に大きく貢献することが予想される。

また、Keap1 が主に核膜の周辺に存在していたことから、Keap1 は外来異物の第 1 相異物代謝酵素による代謝産物のセンサーとして働いているものと考えられる。また小胞体からの新生 Nrf2 を、Keap1 が速やかに捕らえて核移行を阻害するためにも、核膜周辺での局在は重要ではないかと考察される。

一方、Keap1 による Nrf2 の機能抑制に必要であるが直接的な相互作用には関係がなかった CTR は、DGR ドメインが形成する  $\beta$ -propeller 構造において重要な機能を持っていることが考えられる。

### (結論)

本研究により、アクチン繊維を介した Keap1 と Nrf2 により形成される新しいタイプのストレス応答システムを明らかにすることが出来た。アクチン繊維が、scaffold として Keap1 による Nrf2 の分解制御機構と異物探知機能に関与していることが示唆されたことは、極めて興味深いものと考えられる。

## 審査の結果の要旨

本研究は、分子細胞生物学および免疫学的手法を駆使して Keap1 による Nrf2 の活性制御機構を詳細に検討したものである。Keap1 の各ドメインの役割を明らかにすると共に、Keap1 による Nrf2 の細胞質への局在化にアクチン繊維が重要な役割を果たしていることを明快に示している。特に、アクチン繊維が Keap1 による Nrf2 の活性制御の場として直接関わっているという知見は、細胞骨格として知られるアクチン繊維の新しい機能を見出したものであり特筆に値する。今後更なる研究の発展が期待でき、異物代謝を通じた生体防御の分子機構の解明に大いに資する研究と評価できる。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。