

氏名(国籍)	キッド イェン トン (カナダ)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第4409号		
学位授与年月日	平成19年3月23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>Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system : a hinge and latch mechanism in oxidative stress response</b> (Keap1-Nrf2 システムにおける2つの部位基質認識モデル：酸化ストレス応答の蝶番と掛け金メカニズム)		
主査	筑波大学教授	薬学博士	金保安則
副査	筑波大学教授	薬学博士	熊谷嘉人
副査	筑波大学教授	博士(理学)	入江賢児
副査	筑波大学助教授(連携大学院) (理化学研究所前任研究員)	理学博士	野村照明

## 論文の内容の要旨

### 目的：

酸化ストレスは悪性腫瘍や神経変性疾患、心疾患、老化などの原因となる。酸化ストレスに対する細胞応答の制御において中心的な役割を果たしているのは、転写因子の Nrf2 とそれを負に制御する Keap1 から成る Keap1-Nrf2 システムである。定常状態では Keap1 は Nrf2 を捕捉しているが、酸化ストレスに反応して核内での Nrf2 の蓄積が増大して遺伝子の活性化が促進されると推察されている。しかしながら、そのメカニズムの詳細は明らかにされていない。そこで、本研究では、Keap1-Nrf2 システムの構造活性相関を解析し、Keap1-Nrf2 システムによる酸化ストレス応答の制御機構を解明することを目的とした。

### 対象と方法：

Keap1 と Nrf2 のドメイン構造や相互作用様式を、各磁気共鳴、X線結晶構造解析、isothermal calorimetry などの生物物理学的手法を用いて解析した。また、上記2種類の分子の相互作用は、生化学的および分子生物学的手法も用いて解析した。

### 結果：

Keap1 は BTB (Broad complex, Tramtrack and Bric-a-Brac), IVR (intervening region), DGR (double glycine repeat or Kelch repeat) および CTR (C-terminal region) の4つのドメインをもち、Nrf2 は Neh1-6 の6つのドメインをもつ。この2つの分子は、Keap1 の DRG/CTR (この2つのドメインを keap1-DC と呼ぶ) と Nrf2 の C 末端側のドメイン Neh2 を介して相互作用することが知られている。Keap1-DC ドメインの Neh2 との結合は、2:1 であることが明らかとなった。さらに、Keap1-DC ドメインは、Neh2 ドメイン内に存在する DLG と ETGF モチーフの2つの領域に結合することが判明した。さらに、ETGE モ

モチーフは高親和性であり、一方、DLGモチーフは低親和性であった。また、溶液中で Keap1 はホモダイマーとして存在し、Nrf2 は単量体として存在した。これらの結果から、Keap1 ダイマーは Nrf2 の ETGE および DLG モチーフを介して Nrf2 一分子を捕捉していることが示唆された。

#### 考 察：

以上の結果から、Keap1 ホモダイマーは高親和性の ETGE モチーフと低親和性の DLG モチーフを介して一分子の Nrf2 と結合するという、E3 リガーゼアダプター蛋白質の新奇な基質認識機構「2つの部位基質認識モデル」が提唱された。この新奇な基質認識機構は、生体が酸化ストレスシグナルを認識した後に効率よくユビキチン化を促進すること、および Nrf2 のタンパク分解を解除するタイミングに非常に重要であると考えられる。この新奇な2つの部位基質認識モデルにより、Nrf2 の ETGA 領域は Keap1 を結合したままにしておく蝶番として機能し、Nrf2 の DLG モチーフは Keap1 依存的な Nrf2 のユビキチン化をロックあるいはアンロックする掛け金として機能するものと考えられる。

#### 結 論：

本研究において、Keap1-Nrf2 システムによる酸化ストレス応答の制御機構を解明するために、Keap1-Nrf2 システムの構造活性相関を解析した。その結果、Keap1-DC ドメインの Neh2 との結合は、2:1 であること、Keap1-DC ドメインは、Neh2 ドメイン内に存在する DLG と ETGF モチーフの2つの領域に結合すること、ETGE モチーフは高親和性であり、一方、DLG モチーフは低親和性であること、および溶液中で Keap1 はホモダイマーとして存在し、Nrf2 は単量体として存在することが明らかとなった。これらの結果から、Keap1 ダイマーは Nrf2 の ETGE および DLG モチーフを介して Nrf2 一分子を捕捉していることが示唆され、このことから、E3 リガーゼアダプター蛋白質の新奇な基質認識機構「2つの部位基質認識モデル」が提唱された。この新奇な2つの部位基質認識モデルにより、Nrf2 の ETGA 領域は Keap1 を結合したままにしておく蝶番として機能し、Nrf2 の DLG モチーフは Keap1 依存的な Nrf2 のユビキチン化をロックあるいはアンロックする掛け金として機能するものと考えられる。このように、本研究で提唱された新奇な基質認識機構は、生体が酸化ストレスシグナルを認識した後に効率よくユビキチン化を促進すること、および Nrf2 のタンパク分解を解除するタイミングを非常によく説明するものである。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、Keap1-Nrf2 システムによる酸化ストレス応答の制御機構を解明するために、Keap1-Nrf2 システムの構造活性相関を解析している。その結果、Keap1 はダイマーとして存在しており、Nrf2 の高親和性の ETGE および低親和性の DLG モチーフを介して Nrf2 一分子を捕捉していることを明らかにしている。このことから、E3 リガーゼアダプター蛋白質の新奇な基質認識機構「2つの部位基質認識モデル」を提唱している。この新奇な2つの部位基質認識モデルにより、Nrf2 の ETGA 領域は Keap1 を結合したままにしておく蝶番として機能し、Nrf2 の DLG モチーフは Keap1 依存的な Nrf2 のユビキチン化をロックあるいはアンロックする掛け金として機能する機構を推定している。この新奇な基質認識機構は、生体が酸化ストレスシグナルを認識した後に効率よくユビキチン化を促進すること、および Nrf2 のタンパク分解を解除するタイミングを非常によく説明するものであり、新奇性の高い研究成果であると評価できる。また、著者の基礎学力や研究遂行能力は極めて優れたものであると評価できる。

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。