

氏名(本籍)	わた い より こ (東京都) 渡 井 順 子 (東京都)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 乙 第 2329 号		
学位授与年月日	平成 19 年 12 月 31 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	<b>Subcellular Localization and Cytoplasmic Complex Status of Endogenous Keap1</b> (内在性 Keap1 の細胞内局在と複合体形成)		
主 査	筑波大学教授	理学博士	石 井 哲 郎
副 査	筑波大学教授	理学博士	岡 村 直 道
副 査	筑波大学教授	薬学博士	熊 谷 嘉 人
副 査	筑波大学講師	博士(理学)	小 林 麻己人
副 査	筑波大学講師	博士(農学)	蕨 栄 治

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

目的：酸化ストレスや親電子試薬に対し、細胞は抗酸化酵素や異物代謝酵素を発現誘導して、生体防御を行っている。これらの遺伝子の発現誘導には、転写因子 Nrf2 が必須であり、制御領域の EpRE/ARE (electrophile/anti oxidant response element) 配列を介して遺伝子発現を誘導している。Nrf2 の活性化／蓄積は、センサー機能を持つ Keap1 によって制御されている。非ストレス下では、Keap1 は Nrf2 を細胞質に留め、ユビキチン化とプロテアソームに依存したタンパク質分解に導く。一方、細胞が酸化ストレスに曝されると、Keap1 による抑制機構が解除され、安定化した Nrf2 が蓄積し核移行して酸化ストレス応答遺伝子を発現誘導する。しかし、Nrf2 活性化機構における Keap1 の局在の変化や役割については、核移行モデルをはじめとする様々な説が提唱されており、まだ未解明となっている。この原因として、内在性 Keap1 を検出する特異性と反応性が高い抗体が存在しないため、細胞内での Keap1 の正確な局在を捉えられていないことが考えられた。そこで本研究では、内在性 Keap1 を認識できるモノクローナル抗体を作製し、Keap1 の詳細な細胞内局在解析を行うことを目的とした。

対象と方法：大腸菌で発現・精製した Keap1 組換えタンパク質を抗原として、Keap1 ラットモノクローナル抗体を作製した。この抗体を用いて、野生型ないし Keap1 遺伝子破壊マウス胎児由来線維芽細胞 (MEF-WT, 及び MEF-KO) の多重免疫蛍光染色を行い、非ストレス下での Keap1 の細胞内局在を同定した。また、この親電子性試薬あるいは核外移行阻害剤レプトマイシン B 処理による Keap1 の細胞内局在変動について解析した。さらに、親電子性物質 BHA 処理による Keap1 のオルガネラ局在変動を、マウス肝臓のオルガネラ画分を行い免疫ブロット法により解析し、細胞での結果と比較検討した。一方、親電子性物質投与前後での Keap1 複合体の変動について、シヨ糖密度勾配遠心法で解析した。

結果：免疫蛍光染色で、内在性 Keap1 は主として細胞質の核膜周辺部に存在し、一部は小胞体と共局在し

ていることを明らかにした。また、Keap1 の局在は、親電子性試薬ならびに核外移行阻害剤処理で変化しなかった。マウス個体で Keap1 の局在を肝臓のオルガネラ画分を用いて検討したところ、線維芽細胞同様に Keap1 は主として細胞質に存在し、一部は小胞体・核に存在することを明らかにした。また、この細胞内局在は、親電子性物質 BHA を経口投与したマウスにおいて変化は見られなかった。以上の結果から、親電子性物質による Nrf2 の核移行には、Keap1 の局在変動が必要でないことを証明した。一方、細胞質内での Keap1 の存在様式をシュークローズ密度勾配遠心法で調べたが、Keap1 は Nrf2 や Cul3 を含む多様な分子サイズの複合体として存在しており、親電子性物質処理後も大きく変動することはなかった。

考察：本研究では、内在性 Keap1 を認識出来るモノクローナル抗体を作成し、Keap1 の細胞内局在と存在様式について信頼出来る実験結果を得ることが出来た。Keap1 は、核周辺に多く局在していたが、一部の Keap1 は小胞体や核にも存在していることが明らかになった。本研究の結果は、これまで提唱されていた Keap1 核移行モデルなどを明確に否定し、Keap1 の作用機構についてより深く研究する基礎的な成果をもたらした。これまで考えられていた Keap1 のアクチン線維との結合は証明されなかった。ただし、本モノクローナル抗体分子が認識する抗原決定基にアクチンなど他のタンパク質が競合する可能性があり、アクチンに結合した Keap1 には本抗体分子が結合しにくい可能性も残されている。Keap1 の細胞内局在について他の抗体で確認することも必要と思われる。Keap1 の一部が Nrf2 や Cul3 などと結合している可能性が示されたが、どのようなタンパク質と結合してどんな構造体を形成して細胞内で存在しているのかさらなる研究が必要である。

結論：内在性 Keap1 を検出できる新しいモノクローナル抗体を作成し、Keap1 の細胞内局在と Nrf2 活性化における Keap1 の動態について調べた。その結果、Keap1 は核周辺に多く局在して、一部は小胞体や核にも存在していることを明らかにした。Nrf2 の活性化にともない Keap1 の細胞内局在は変化せず、Keap1 が核へ移行するという説を否定した。酸化ストレスや親電子性物質のセンサーとして機能する Keap1 は、細胞質中で複合体を形成し、Nrf2 活性化を制御していることを明らかにした。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

博士（医学）学位論文審査委員会において審査委員全員出席のもとに学力の確認を行い、論文について説明をもとめ、関連事項について質疑応答を行った結果、審査委員全員によって合格と判定された。

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。