

## 特別講演 II

### 親電子性物質・活性酸素応答の分子メカニズム

山本 雅之

東北大学 大学院医学系研究科 医化学分野・教授  
戦略的創造研究推進事業 環境応答プロジェクト・研究統括

#### ◆はじめに◆

筆者は、長く「赤血球分化と遺伝子発現制御」の研究を続けているが、赤血球は酸素を運ぶ細胞であり、動物の“呼吸”，すなわち、エネルギー生産のために必須の細胞である。動物は基本的に、植物が光合成で作った糖を奪い、酸素を使ってそれを燃やして、エネルギーを生産している。一方、植物のほうは単純に食べられてくれるわけではない。植物は捕食者である動物に化学戦（chemical war）を挑む目的で、毒性のある産物を産生する。また、私たちの体は酸素の毒性・酸化ストレスを受けて錆びていくこともよく知られている。このような環境からのストレスの存在にもかかわらず、私たちが生きていくことができるのは、私たちの体に、そのような食物由来毒物や酸素が内包するストレスを感知して、それに応答する生体防御遺伝子の発現を誘導するようなメカニズムをもっていることによる。

私たちは、このような環境からのストレスを感知して、生体防御遺伝子の発現様式を変える仕組みを総称して「環境応答（environmental response）」と呼ぶことを提案しているが、この言葉と考え方は少しずつ市民権を得てきている。そこで、本稿では、環境毒物を感知して、解毒酵素系や酸化ストレス応答系遺伝子の誘導発現の引き金を引く生体センサーは何なのか、また、急激に変化する環境要因に対する非常に素早いレスポンスをする、すなわち、環境応答の即応性を支えているメカニズムは何なのか、さらに、環境応答研究の成果が今後どのように活かされていくのかについて議論したい。

#### ◆環境応答研究と化学発癌研究◆

環境応答と関連する研究として歴史を飾ってきたのは、化学発癌の研究である。化学発癌研究の記念碑的業績の1つは、ロンドンのPercival Pottが暖炉で薪の代わりに石炭を燃やすようになったことと煙突掃除人が非常に高率に陰嚢癌、陰嚢皮膚癌、包皮癌に罹患するということの関連性に気がついたことである。彼は職業と癌の関係を見抜き、職業病という新しい概念を提唱した。次の記念碑的業績は、東京大学の山極勝三郎による化学発癌の実証である。山際は、刺激が癌を作るのか、あるいは化学物質が癌を作るのかという当時の疑問に対して、ウサギの耳にコールドタールを塗って癌を実験的に作製し、化学物質が癌を作るのだということを世界に先駆けて実証した。今から考えてみれば、Pottと山際の観察した両事象ともに、ベンゾピレンが発癌物質として陰で働いたものと推量される。

#### ◆発癌物質は親電子性物質である◆

化学発癌について、3番目のすばらしい考察したのは、ウィスコンシン大学のMiller夫妻であった。Miller夫妻は、「発癌物質は親電子性の強い分子である」こと、換言すると「親電子性物質が発癌物質である」ことを提唱した。内部に電子が少ない部分をもった分子のことを親電子性物質（electrophiles）と呼ぶが、DNAや蛋白質のような生体高分子は電子を与える性質に溢れているので、親電子性物質はそれらと共有結合を作り、ある時には発癌、ある時には急性毒性を惹起する。

現在では、Miller夫妻の考えをもう少し敷衍し

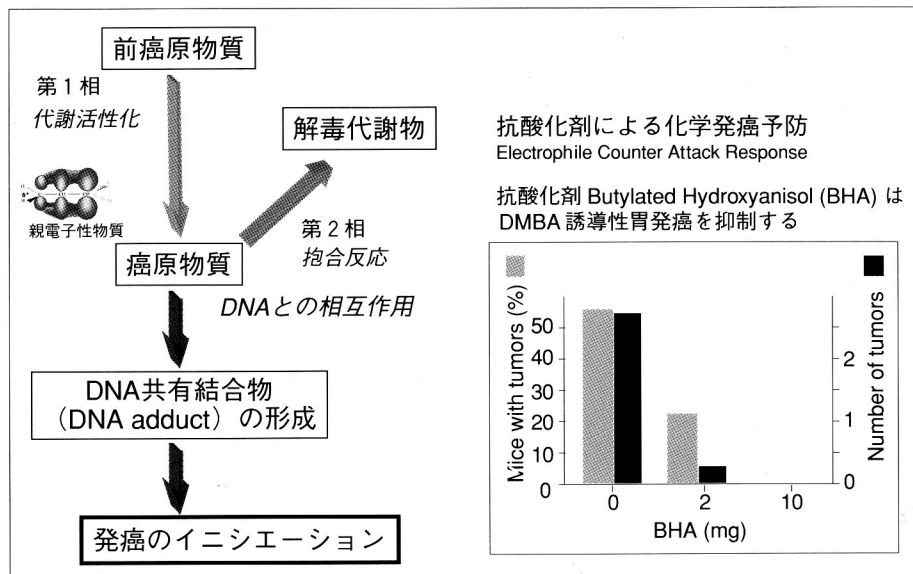


図1. 親電子性物質による発癌と化学発癌予防

て、通常環境中のベンゾピレンやアフラトキシンなどは「前癌原物質」であり、これらは体内に取り込まれた後で第1相解毒酵素による代謝活性化を受け、親電子性物質となって初めて、「癌原物質」になると考えられている。通常、これらの親電子性代謝物はすぐに、第2相解毒酵素群によりグルタチオンやグルクロン酸抱合を受けて、水溶性解毒代謝物になり、体外に容易に排泄される。したがって、たとえ前癌原物質を多少摂取しても、私たちの体は簡単には癌にならない。しかし、何かの加減で第2相反応が障害される、もしくは、癌原物質の量が第2相解毒酵素群の能力をオーバーフローしてしまうと、親電子性物質はDNA共有結合物を作り、発癌のイニシエーションに働く(図1)。

ところで、1972年にWattenbergは、ジメチルベンゾアントラセンを使ったマウスの発癌実験を行い、このマウス発癌が食品添加剤である抗酸化剤ブチルヒドロキシアニソール(BHA)の同時投与により予防できること、すなわち、化学発癌予防(cancer chemoprevention)という概念を新しく打ち立てた。しかし、このすばらしい仕事はこれ以上進まなかった。その一番の理由は、彼はBHAが体内で直接ラジカルスカベンジに働くと考えて

いた点にある。一方、Talalayは、癌原物質がグルタチオンS-転移酵素(GST)やグルクロン酸転移酵素(UGT)により解毒代謝物になる点に着目し、第2相解毒酵素群の誘導発現こそが化学発癌予防の本体であると提唱した。実際に、BHAは第2相抱合酵素群を20倍から50倍で誘導するので、細胞中に一般的に存在するグルタチオンやチオレドキシニンなど還元物質が増加し、これらが癌原物質の解毒代謝にあたっていると考えると理解しやすい。

## 第2相解毒酵素群遺伝子の ◆発現制御機構解明につながった◆ 2つの潮流

Talalayの、化学発癌予防には第2相解毒酵素誘導が大切なのだとする考えは大変明解であった。また、程なくして抗酸化剤応答性配列(略してARE配列)が、第2相解毒酵素誘導に重要という分子生物学的な成果もあった。しかし、残念ながら、その後また研究は停滞してしまった。ARE配列に結合する転写因子の同定が困難を極め、最も深刻な障壁として立ち塞がったためである。

一方、私たちは赤血球分化を制御する転写因子を長く研究していたが、1994年に赤血球の運命を

決める転写因子NF-E2は、CNC群とMaf群の転写因子が作るヘテロ二量体であることを発見した。この知見を基盤にして、1997年にAREを介して第2相解毒酵素群の誘導に働くのは、CNC群に属するNrf2とMaf群の小Maf因子のヘテロ二量体であることを発見した。さらに、1999年に親電子性物質や毒物のセンサーになるKeap1を同定した。ここで、NF-E2の研究が、細胞応答を制御する転写因子(Nrf2-Maf)の研究につながり、2つの研究潮流が合流した。

### ◆Nrf2による生体防御酵素群の誘導発現制御◆

筆者らは、Nrf2による第2相解毒酵素群の遺伝子発現制御が生理的に働いていることを証明するために、Nrf2遺伝子のノックアウトマウスを作製した。幸いなことに、Nrf2ノックアウトマウスはホモ変異でも致死ではなかったので、ヘテロとホモノックアウトマウスに対してTalalayが行ったようなBHA誘導実験を行った。その結果、肝臓でNrf2遺伝子が1個あればBHA処理により多くの第2相解毒酵素群が共通して強く誘導されるのに対して、Nrf2遺伝子を破壊するとそれらの誘導が全くかからなくなった。すなわち、転写因子Nrf2により、第2相解毒酵素の誘導が統一的に制御されていることが明らかになった。

この事象をベンゾピレン曝露の観点からみると、ベンゾピレンは体内に入るとシトクロムP450(CYP)1A1とエポキシドヒドラーゼによって、ベンゾピレンジオールエポキシドとなる。これは非常に親電子性の強い物質なので、強力なDNAアダクト形成能力を保持しているが、実際にはGSTが迅速にグルタチオン抱合を行い、水溶性を増して体外に排出するので、大事には至らない。しかし、Nrf2ノックアウトマウスではこのパスウェイがつぶれているので、このマウスは癌になりやすいことが予想される。

実際に、Kenslerと協力して、ベンツピレンを経口的に胃に入れてベンツピレン発癌を試みたところ、Nrf2ノックアウトマウスと野生型マウスの

両方に胃癌が形成された。そこで、抗酸化剤オルティプラッツの同時投与を行ったところ、野生型では見事に胃発癌が予防され、Wattenbergの観察は見事に支持されたが、一方、Nrf2ノックアウトマウスでは胃発癌は全く軽減しなかった。すなわち、ここで化学発癌予防に働いていたシステムは、Nrf2により制御されていた解毒酵素群であることが結論される。

### ◆Nrf2制御系は生体防御に重要◆

Nrf2ノックアウトマウスは生体防御能力が弱いことが予想されたので、世界の多くの研究拠点到本マウスを送って、共同研究を実施した。その結果、本マウスはアセトアミノフェン毒性に非常に感受性が高いこと、また、ディーゼル排気粒子による肺障害にも感受性が高く、さらに、プレオマイシン肺障害を受けやすいことが明らかになった。自己免疫性腎炎にもなりやすく、また、胃癌、膀胱癌にもなりやすかった。さらに、タバコ煙に対しても非常に弱かった。このことは、逆にNrf2がこれらのストレスに対して、強力な生体防御系を形成していることを示している。

ここまで、親電子性物質がNrf2を活性化して第2相解毒酵素群を誘導することを紹介したが、その後の研究から、活性酸素のシグナルもこのシステムに入り、ヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)やペルオキシレドキシシン1(Prx1)などの抗酸化応答酵素群の遺伝子発現誘導をすることが明らかになった。第2相解毒酵素群と抗酸化酵素群がNrf2経路を共通利用して誘導されることは大変興味深い。実際にNrf2の標的遺伝子には、解毒酵素群、抗酸化酵素・蛋白質群、グルタチオン合成酵素群、NADPH合成酵素群、さらにABCトランスポーターなどが含まれる。

### ◆Keap1の発見◆

さて、Nrf2活性化制御のメカニズムを探るうちに、新しい分子Keap1を発見した。Keap1は細胞質に存在し、Nrf2をトラップし、Nrf2の核移行を阻害する(図2)。すなわち、Nrf2は転写因子なの

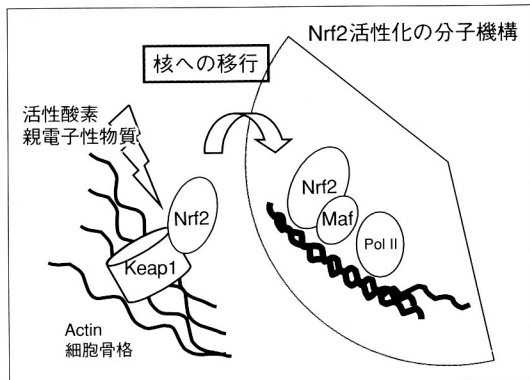


図2. Nrf2の誘導は Keap1による抑制からの脱抑制過程である

でKeap1はNrf2を恒常的に抑制しているということになる。この状態に対して、活性酸素や親電子性物質が来ると、インターフェースをアタックしてNrf2の核移行を促進する。これがNrf2活性化の分子機構と考えている。1999年に提案したこの仮説は、大筋はこれで大丈夫であるが、若干の修正も求められているので、本稿の最後にこの点に触れたい。

Keap1という新しい分子を見つけたので、それが真にNrf2の生理的な抑制因子であることを証明するために、Keap1のノックアウトマウスを作製した。Keap1はNrf2を普段は抑え込んでいるので、Keap1ノックアウトマウスはNrf2からみるとgain of functionであり、元気のないマウスであることを期待したが、ホモ変異のKeap1ノックアウトマウスは生後3週間ほどで死亡した。ヘテロ変異マウスは元気に育っていくのに対して、Keap1ホモノックアウトマウスは育たずに死んでいくので、このKeap1ホモノックアウトマウスでは、Nrf2が過剰に増えて悪さをしている手先になっているのではないかと考えて、Nrf2との重複変異ノックアウトマウスを作製し、60日間の観察を行った。その結果、Keap1とNrf2のダブルノックアウトマウスは、観察期間中、野生型マウスと全く変わりなく成長した。すなわち、Nrf2の過剰発現がKeap1の異常な表現型を招来していたと結論される。

Keap1ホモ変異マウスとこの重複変異マウスの食道を比べてみると、Keap1変異マウスでは、食

道上皮上にケラチンがたくさん出ていて、食道扁平上皮の過角化が観察された。食道が鉛の管のようになり、マウスはミルクが飲めずに餓死していたのであるが、一方、Nrf2を同時に欠失するとミルクが飲める状態の食道に復帰していた。すなわち、Nrf2はKeap1によって制御された形で核に行くことが大切であり、Keap1を欠失してしまうと、Nrf2ができたそばからみんな核へ行って蓄積してしまうので、望ましくない遺伝子の転写まで起きており、その1つがケラチンだったということになる。実際にKeap1欠失マウス胎児から線維芽細胞を作り、親電子性物質を投与すると、野生型Keap1マウス由来の細胞では第2相解毒酵素や酸化酵素群が誘導的に発現する。一方、Keap1欠失マウス由来の細胞では、最初から恒常的にこれらの生体防御遺伝子が発現していた。この結果から、Keap1がNrf2を抑制していることは本当に生理的な現象であって、普段私たちの体の中で働いていることなのだということが理解できる。そうだとすると、それでは親電子性物質や酸化ストレスを感知しているセンサーは何なのか、どういうメカニズムで感知しているのか、そこが次なる疑問となる。

#### ◆Keap1はストレスセンサーとして働く◆

Nrf2誘導剤としては、第1相解毒酵素シトクロムP450によって代謝活性化を受けた親電子性物質が最もよくみるものであるが、その他にイソシアネート、スルフォラフェン、重金属、ヒ素などがある(図3)。これをみると、このセンサーは形を認識するのではなく、親電子性が強い分子がNrf2の誘導剤になるので、おそらくレドックスを認識するのだろうと考えられる。そこで、Keap1は25個もシステイン残基をもっているので、Keap1がこれらの誘導剤によって修飾されてNrf2をリリースし、Nrf2が核移行して、生体防御酵素を誘導しているのだろうと考えた。

25個のシステイン残基のうち反応性が強い、実際に働いているシステインを決めるために、デキサメタゾンメシレートラベリング法を利用した。

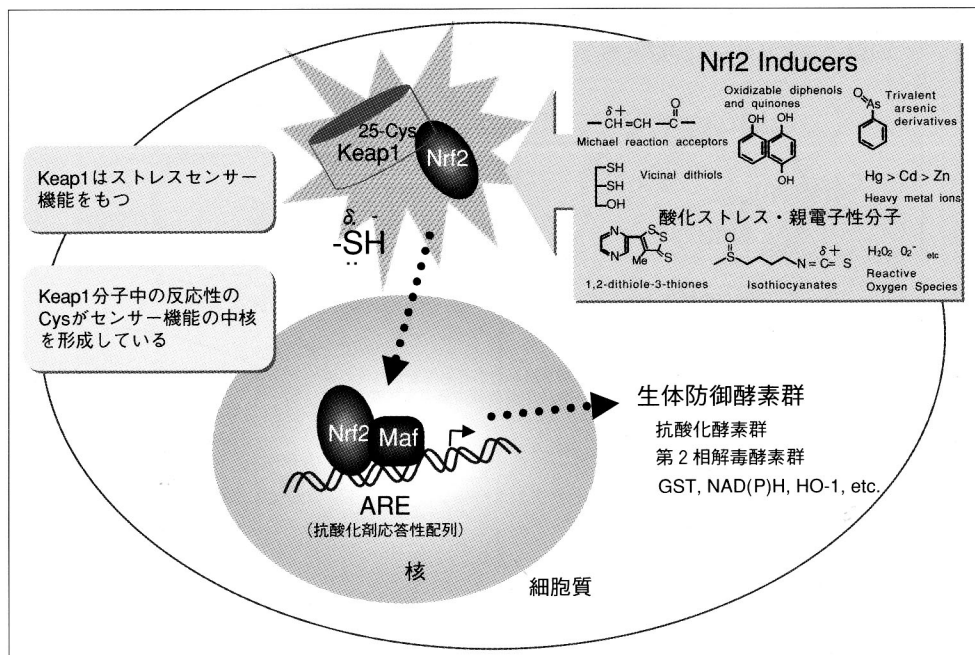


図3. Keap1-Nrf2 制御系

最初は、Keap1にBTBとDGRというよく知られている2つのドメインがあるので、おそらく鍵となるシステインはどちらかに存在するのだろうと想像していたが、実際には2つのドメインを結ぶIVR領域のシステインがデキサメタゾンメシレートによりラベルされた。そこで、もう少し実験を進めたところ、Keap1中の273番と288番の2つのシステインがセンサー機能に重要な働きをしていることが明らかになった。さらに、151番のシステインの重要性も見つかったので、おそらくこれら3つのシステインがセンサー機能に重要な貢献を果たしているのだろうと考えられる。

◆Keap1はNrf2分解に働く酵素である◆

このセンサー機能を考えるときにわかってきたことでもう1つ重要なことは、Nrf2がプロテアソーム系によって非常に急速に分解されるということである。細胞にサイクロヘキシミドを投与して、Nrf2が半分分解するまでの時間を測定すると18.5分であった。一方、そこに親電子性物質を入れると、分解スピードが2分の1ぐらいになるので、この結果からデグロンはNrf2がKeap1と相互作用

するNeh2領域ではないかということが予想される。

実際に、Keap1はNrf2をユビキチン化してプロテアソームに導くE3分解酵素としての役割をしている(図4)。簡単にスキームを示すと、Keap1はCullin3(Cul3)というアダプター蛋白質と結合して、ユビキチンE3リガーゼを作る。そしてCul3はユビキチン結合酵素(E2)をリクルートし、一方、Keap1は基質であるNrf2をリクルートしてきて、ここでNrf2をユビキチン化する。酸化ストレスがない通常の条件では、Cul3とKeap1が作るE3リガーゼがNrf2をユビキチン化して、迅速にプロテアソームで分解している。一方、酸化・親電子性ストレス下では、Keap1のシステイン修飾が起きて、Keap1とCul3とNrf2の三者複合体は存在するが、ユビキチンを結合できるようなコンフォメーションにならない。そうすると、新しくできたNrf2がKeap1による補足・分解を逃れて核に行くことができる。すなわち、この誘導というのは、普段分解されるという形で抑制されていて、その抑制からの脱抑制の形で起きることが理解される。

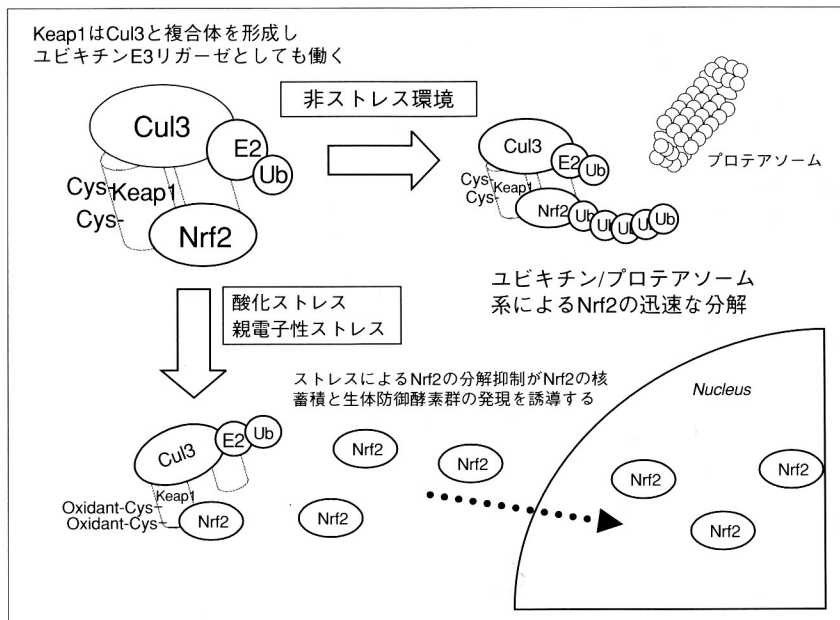


図4. Nrf2蛋白質分解の抑制によるストレス感知機構

(Kobayashi A, et al: MCB, 2006)

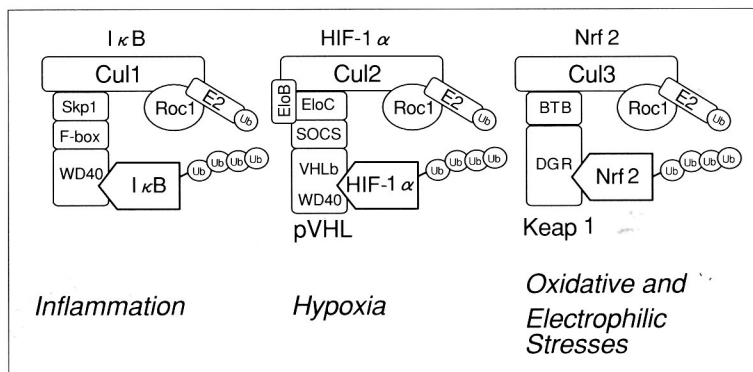


図5. 環境応答転写因子群

環境応答転写因子の活性は通常は抑制されているが、環境からストレスを受けると誘導されてストレスに応答する。このようにして環境応答転写因子は即応性を獲得している。

### ◆環境応答転写因子群の存在◆

酸化ストレスや親電子性物質ストレスが来ると、Keap1とCul3が作るE3リガーゼによるNrf2のユビキチン化が止まり、脱抑制されて、Nrf2が蓄積する。興味深いことに、HIF-1αによる低酸素応答でも似たようなシステムを使っている。この場合にはHIF-1αという低酸素応答転写因子が、

このVHL因子とCul2が作るE3リガーゼによって普段からどんどん壊されているが、低酸素になるとこのユビキチン化が起きなくなって、HIF-1αが蓄積する。コンテキストは違うが、炎症の時はCul1が使われる。

こうみると、一群の環境応答転写因子群が存在していて、経済性を犠牲にして即効性を獲得していることが理解できる(図5)。環境応答転写因子

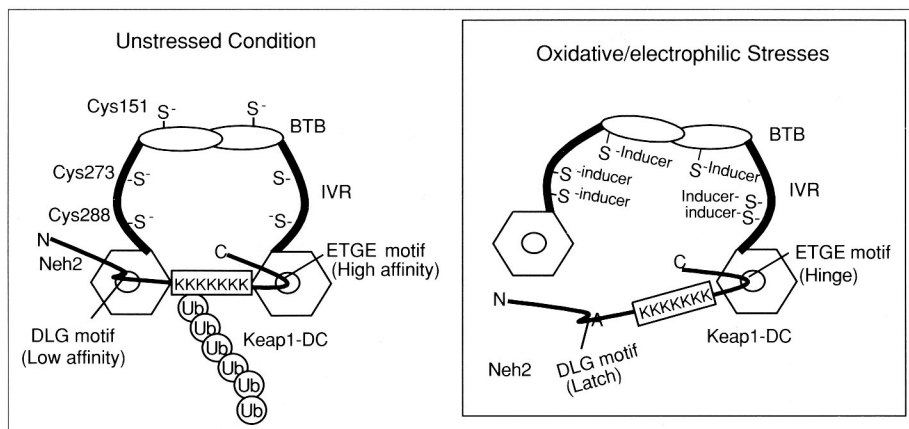


図6. 門と蝶番メカニズム

弱いDLG結合サイトは親電子性物質のストレスによりはずれる

の活性は通常抑制されているが、ストレスが来ると分解（すなわち抑制）が止まり、脱抑制を受けて、そしてストレスに即応する。

#### ◆Keap1センサー機能の分子メカニズム◆

システイン残基の修飾がどのようにKeap1のセンサー機能と関連するのかを、構造生物学の視点から検討したが、その成果として「門と蝶番メカニズム」(Hinge and latch mechanism)が明らかになった(図6)。Nrf2のドメイン構造をみると、N末端のNeh2ドメインにDLGモチーフとETGEモチーフが存在し、それらに挟まる形で棒状の中央 $\alpha$ ヘリックス構造が存在する。後者の領域に7個のリジン残基があり、これらがユビキチン化される。一方、前述のようにKeap1にはDGRドメインがあるが、これはC末端ドメインと協力して正六面体のパレル構造を作っているの、両者を合わせてDCドメインと呼んでいる。Keap1とNrf2の結合を詳細に調べてみると、Keap1はBTBドメインを利用してホモ2量体を作るので、そのストイキオメトリーはNrf2が1に対してKeap1が2であった。さらに、結合定数を調べてみると、ETGEは $10^8$ 、DLGは $10^6$ のオーダーであり、ETGEがKeap1に100倍ほど強く結合する。したがって、この結合は、おそらくKeap1ホモ二量体に対してETGEが先に結合し、その後にDLGが結合して、効率の

良いユビキチン化反応が起きるのだろうと考えられる。これを“Two-site substrate recognition model”と呼んでいる。

ETGEモチーフもDLGモチーフもKeap1の正六面体の底面にある全く同じポケットに結合する。システイン修飾のない状態では、両モチーフがそれぞれKeap1に結合し、そうすると中央のリジンがユビキチン化される。一方、システイン修飾が起きたときには、両方のKeap1のシステインが平等に修飾されるので、分子内にゆがみが生ずる。この時に、100倍強いETGEのほうが相変わらず結合しているので、ドアをモデルに考えると、こちらは蝶番にあたる。一方、DLGのほうはドアの門にあたり、弱い結合なので簡単に離れてしまう。そうすると、ユビキチンリガーゼはうまくここにユビキチンを結合することができない。このような形で、ドアが開くとユビキチン化が起きないという蝶番と門(Hinge and latch)モデルが、現在の結論である。

#### ◆Nrf2-Keap1システムとヒトの病気◆

Nrf2-Keap1システムはストレスに対する防衛系を制御するので、Nrf2が誘導されると、私たちの体の酸化障害を防ぎ、ストレスに対する抵抗力をもつようになる(図7)。たとえば、タバコ煙をNrf2欠失マウスに吸わせると、非常に厳しい肺炎

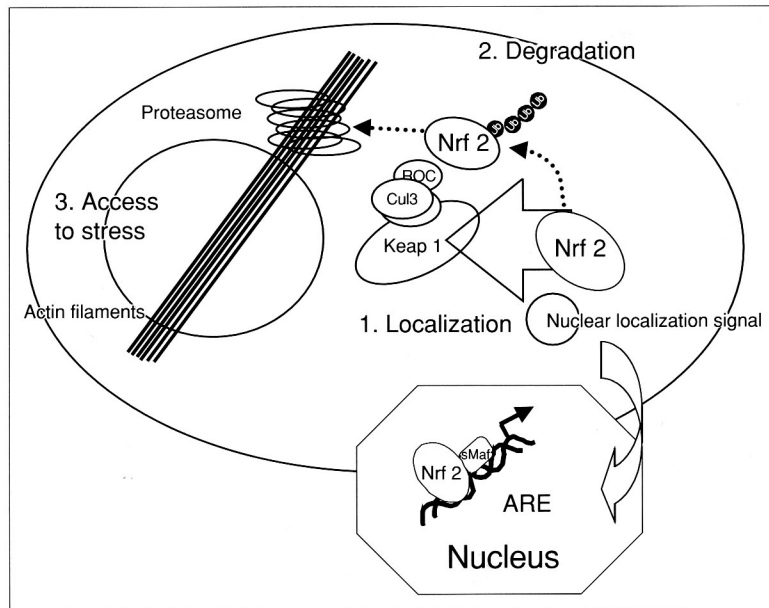


図 7. Nrf2-Keap1制御系の概要

腫が起きる。また、カラゲニンを入れて急性肺炎を惹起すると、Nrf2欠失マウスでは炎症が遷延する。この炎症を詳細に調べると、マクロファージが誘導され、そこで15-デオキシ-プロスタグランジン (PG) J2という炎症時に特有のプロスタグランジンが産生されるが、PGJ2にあるシクロペンテンン環の親電子性が非常に高いので、PGJ2はNrf2を誘導し、そのNrf2がHO-1やPrx1のような抗酸化物質を誘導して、炎症の収束 (resolution) に向かっていることが理解された。このように、Nrf2-Keap1システムは外から親電子性物質に反応しているだけではなく、内因性にもKeap1を修飾するような分子が存在する。実際にPGJ2にビオチン化してKeap1と混ぜてみると、しっかりとKeap1のシステイン残基と共有結合を作っている。

ところで、普通、大動脈や大きな血管の中では層流 (laminar flow) によっていつも摩擦応力・引っぱり応力が掛かっている。一方、渦流 (oscillatory flow) が起こると摩擦応力はなくなる。この摩擦応力が酸化ストレス応答系の酵素群に誘導をかけることが知られているが、実際に実験系を組んで層流と渦流を比較してみると、たとえば

NQO1やHO-1などのNrf2の標的遺伝子が層流で強烈に誘導される。一方、siRNAでNrf2の活性を阻害すると、同じように層流で誘導をかけても、NQO1やHO-1の誘導が抑制される。すなわち、メカニカルストレスもNrf2-Keap1系の制御下にあることが理解される。まとめると、炎症の際にはPGJ2が出てきて、HO-1やPrx1の発現を誘導し、炎症の終結または抑制に働く。この際のメインプレイヤーはマクロファージである。また、層流の時にも血管内皮細胞は同じような経路を利用して、大血管を流れる血流の抗炎症作用を促進している。

### ◆Nrf2-Keap1システムと発癌◆

Talalayは健康を増進するためには食事の改善が良いという強い信念をもっており、ブロッコリーの新芽 (スプラウト) に含まれるスルフォラファンに強烈なNrf2の誘導作用があるので、これを食べることを推奨している。これは怪しいテレビ番組で言っていることではなく、本当に科学的な証拠に支えられた主張である。

一方、Nrf2を抑制する化学物質が薬になる可能性がある。ヒトの肺癌細胞をたくさん調べると、



Keap1遺伝子に高頻度に突然変異が存在した。この突然変異はNrf2の活性化につながるような変異であった。肺癌細胞は微小環境の酸化ストレスに抵抗していかなければいけないので、Keap1変異体でNrf2が誘導発現するようになった肺癌細胞は強い、癌を抑制する化学発癌予防に働いているものを上手に癌が使っているのだということが理解された。すなわち、Nrf2の活性化は「両刃の剣」である。

実際に、ジョンズ・ホプキンス大学のチームから、たくさんの肺の非小細胞癌(non small cell lung carcinoma)の解析の結果、細胞株では50%、患者では19%にKeap1の変異があったこと報告された。おそらく、このKeap1変異をもつことによって、癌細胞は周りに対する抵抗性、さらには抗癌剤に対する抵抗性を獲得したものと思われる。

ところで、多剤耐性・抗癌剤耐性のメカニズムは抗癌剤のABCトランスポーターによる汲み出しであるが、Maherらが実際に実験してみると、多剤耐性ポンプ(multi-drug resistance pump)であるMrp3やMrp4がNrf2欠失マウスでは誘導がかからない。すなわち、Nrf2は抗癌剤の排出を制御して

いることが理解される。まとめると、結局Nrf2は両刃の剣であり、癌細胞はNrf2経路をハイジャックし、解毒代謝系と多剤耐性ポンプを誘導して、自らの増殖を助けている。すなわちNrf2を抑制する薬は新しい癌化学療法へのアプローチにつながるものと考えられる。

#### ◆まとめ◆

最初、私たちはKeap1というのは単純にNrf2を細胞質にキープしていると思っていたが、その後の解析から、Keap1はユビキチンリガーゼ活性をもっており、Nrf2を絶えず分解していること、さらに、Keap1は酸化・親電子性ストレスのセンサーとして機能することを見い出した。転写因子を捕まえるのは比較的簡単だが、このような細胞外から来るシグナルに対するセンサーを捕まえるのは非常に難しいので、Keap1が次なる研究につながるのではないかと考えている。

本研究は多くの共同研究者の方々の努力の賜である。筆者は東北大学に移ったが、これからも変わらぬご指導をお願いしたい。