

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08637

研究課題名(和文) 殺菌やレドックスシグナルに関わる活性酸素生成型NADPHオキシダーゼ成熟機構解明

研究課題名(英文) The molecular mechanism for the generation of ROS through Nox

研究代表者

宮野 佳 (Miyano, Kei)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：60444783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：活性酸素生成酵素であるNoxは、ヒトではNox1～Nox5の5分子が存在する。Noxの中でも消化管上皮細胞に発現するNox1は、局所における生体防御に関わっていることが知られている。今回の研究で、Nox1の活性化制御機構について、Nox1活性が自身の生成物である活性酸素により正のフィードバック調節を受けていることを明らかにした。さらに、正のフィードバックにより促進されたNox1活性が上皮細胞の遊走を抑制していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性酸素は基本的に生体に有害であるため、Nox1の制御機構の破綻は、消化管上皮の疾患を引き起こす可能性がある。実際に、大腸がんの増悪とNox1の過剰な活性化の関連が指摘されており、どのようなメカニズムでNox1活性が調節を受けるのか、また、活性酸素がどのような分子メカニズムで遊走を制御しているのかを明らかにすることは重要な課題であった。今回の研究成果は、酸化ストレスにより引き起こされる様々な疾患の原因を明らかにする上で役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Superoxide producing NADPH oxidase 1 (Nox1) that expresses abundantly in colon epithelium plays a crucial role in mucosal host defense. Previous studies have shown that Nox1 participates in epithelial migration which is an important process in mucosal wound healing. In this study, we investigated the effect of ROS scavenger's pre-treatment on migration of human colon cancer HCT116 cells, which express Nox1. We found that Nox1 activity is positively feedbacked by its product itself, then the increased products depend on the regulation of migration ability of the cells.

研究分野：生化学

キーワード：Nox 活性酸素 細胞遊走 上皮細胞 殺菌

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ROS 生成酵素である Nox は、ヒトでは Nox1~Nox5 の 5 分子が存在する（図 1）。最もよく知られているのが食細胞に発現する Nox2 で、生成されたスーパーオキシド (O_2^-) は、種々の ROS へと派生し、それらが強力な殺菌剤として機能する。Nox2 の重要性は、その遺伝的欠損が幼少期より重篤な感染症を引き起こす慢性肉芽腫症 (CGD, chronic granulomatous disease) を引き起こすことから示される。

Noxファミリー	遺伝子座	アミノ酸数	発現の多い組織・細胞	機能の一例
Nox1	Xq22	564	大腸、血管平滑筋細胞	生体防御
Nox2	Xp21.1	570	食細胞(好中球など)	生体防御
Nox3	6q25.1-26	568	内耳、胎児腎臓	耳石形成
Nox4	11q14.2-21	578	腎臓、血管内皮細胞	シグナル伝達
Nox5	15q22.31	737	脾臓、精子、血管平滑筋	シグナル伝達
Duox1	15q21	1551	甲状腺、唾液腺、肺	生体防御
Duox2	15q21	1548	甲状腺、大腸	甲状腺ホルモン合成

図1 Noxファミリー

Nox2 が細胞外に O_2^- を生成するためには、3 つのステップを経たタンパク質成熟化が必要である。

「1. Nox2 の細胞膜への輸送」: Nox2 は、ER において high mannose 型糖鎖を持つ膜タンパク質として翻訳される (N-glycosylation)。N 末端膜貫通領域にヘムが取り込まれ、膜タンパク質であるパートナー分子 p22^{phox} とヘテロ 2 量体を形成する (2 量体化は、互いのタンパク質レベルでの安定化に必要)。ER におけるこれらのプロセスがすべて完了すると、はじめて Nox2-p22^{phox} は Golgi 体を経由して、細胞膜に輸送される。

「2. 細胞膜局在 Nox2 の活性化」: 細胞膜に局在した Nox2 は、それだけでは活性を持たない (無秩序な ROS 生成による宿主損傷を防ぐため)。その活性化には、細胞質の特異的な活性化タンパク質 (p47^{phox} と p67^{phox}) と低分子量 G タンパク質 Rac が細胞刺激に応じて膜移行し、膜上で Nox2-p22^{phox} と会合することが必要である。

「3. Nox2 による O_2^- の生成」: Nox2 の C 末端細胞質領域には、NADPH 結合サイトと FAD 結合サイトが存在する。活性化された Nox2 は、NADPH (電子供与体) から電子を受け取り、FAD と膜貫通領域の 2 つのヘムを介して細胞外の分子状酸素に与えることにより O_2^- を生成する

このように、Nox2 の活性化の成熟機構は、かなり明らかにされてきた。一方、Nox2 と同じく細胞膜に輸送され活性化因子により活性化される Nox1 の成熟化機構については、不明な点が多く残されたままである。

2. 研究の目的

本研究では、まず Nox1 の成熟化の各ステップにおける分子メカニズムを明らかにしつつ、最終的には Nox ファミリーの ROS 生成に至る成熟化過程の全容解明を目指す。

「1. 細胞膜局在 Nox1 の活性化」: 申請者は、活性化タンパク質の膜移行メカニズムを明らかにしてきたが、Nox と会合した後の過程は不明なままである。活性化タンパク質が Nox1 の構造変化も含めてどのように作用するのかを明らかにする。

「2. Nox1 由来の活性酸素による生理的機能」: 上皮細胞に豊富に発現する Nox1 の細胞遊走における生理的機能を明らかにする。

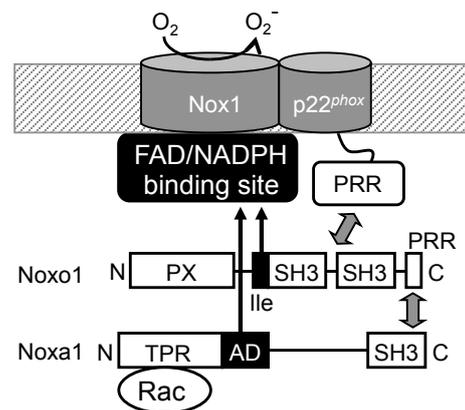


図2 Nox1の活性化

3. 研究の方法

「1. 細胞膜局在 Nox1 の活性化」: Nox1 と Nox2 は、似た様な制御システムにより活性化されるが (活性化タンパク質の膜移行に依存する) (図 2)、前者は細胞刺激非依存性に活性を有するのに対して、後者は細胞刺激に応答して初めて活性化される。培養細胞を用いて異所性に Nox1 活性の再構成を行い、種々の生化学的な手法を用いて細胞刺激非依存性の活性化メカニズムを調べた。また、恒常的に Nox1 から生成される O_2^- の Nox1 自身の酵素活性に対する役割 (フィードバック制御) について、抗酸化剤 edaravone を使用して検討した。

「2. Nox1 由来の活性酸素による生理的機能」: 細胞刺激非依存性の Nox1 活性が上皮細胞遊走においてどのような役割を果たしているか、走化性因子に向かって水平方向に移動する細胞をリアルタイムで観察できる細胞動態測定装置 (TAXIScan) を用いて測定した。その際、用い

た上皮細胞を抗酸化剤 edaravone や Nox の阻害剤 DPI 処理や、Nox1 遺伝子のノックダウン操作を行った。

4. 研究成果

「1. 細胞膜局在 Nox の活性化」:

(1) Nox1 由来の活性酸素の除去

Nox1 は、特異的な細胞質タンパク質因子 Noxa1 と Noxo1 の存在下で、細胞刺激非依存性に細胞外に恒常的に O_2^- を生成する酵素である (図 2)。生成された活性酸素は、消化管の局所における殺菌において重要な役割を果たしている。一方、活性酸素は基本的に生体にとって有害である。私は、Nox1 由来の O_2^- が、Nox1 を発現している細胞自身を障害して、Nox1 活性を低下させる (フィードバック阻害) ののではないかと考えた。そこで、Nox1 を発現する細胞を活性酸素スカベンジャーで前処理し、Nox1 活性に与える影響を検討した。

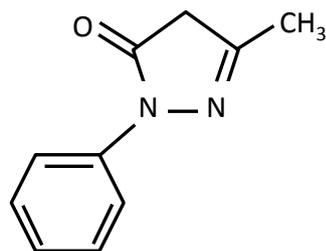


図3 edaravone

O_2^- は、速やかに不均化され H_2O_2 に変換される。 O_2^- は、極性を持つため細胞膜を横切ることにはできないが、 H_2O_2 は比較的自由に細胞内へと拡散する。従って、Nox1 由来の O_2^- の細胞への影響を調べるためには、活性酸素の両者を効率良く除去できるスカベンジャーを選択する必要がある。私は、HeLa 細胞に外来性に Nox1-Noxa1-Noxo1 を発現させ、Nox1 の O_2^- 生成活性を再構成した。生成される O_2^- は、化学発光法で測定した。Nox1 由来の O_2^- は、 H_2O_2 除去酵素の catalase では除去できず、 O_2^- の除去酵素である SOD (superoxide dismutase) で完全に除去できた。フリーラジカルスカベンジャーで、酵素系ではなく化合物である edaravone は、Nox1 由来の O_2^- を SOD と同様に除去できた (図 3 と 4)。次に、標準 H_2O_2 を除去できるかどうかを検討した。スカベンジャーの能力は、残存 H_2O_2 依存性に強まるホモバニリン酸の蛍光強度により見積もった。edaravone は、catalase と同様に H_2O_2 を完全に除去することができた。以上の結果より、edaravone は、Nox1 由来の O_2^- に対する効率的なスカベンジャーであることが分かった。

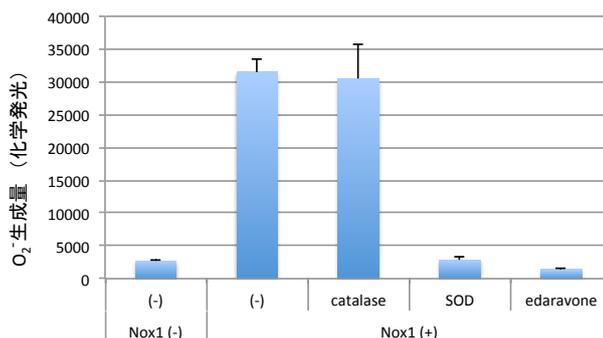


図4 スカベンジャーの評価

(2) Nox1 活性の正のフィードバック調整

続いて、Nox1 を発現させた HeLa 細胞を edaravone で前処理した。Nox1-Noxa1-Noxo1 の cDNA を含むプラスミドを遺伝子導入し、24 時間後に様々な濃度の edaravone を培養液に加えた。edaravone 存在下でさらに 24 時間培養し、edaravone の洗い出しを行い、生成される O_2^- を測定した。興味深いことに、edaravone で前処理した細胞は、 O_2^- の生成量が減少した。これは、Nox1 活性が、フィードバック阻害ではな

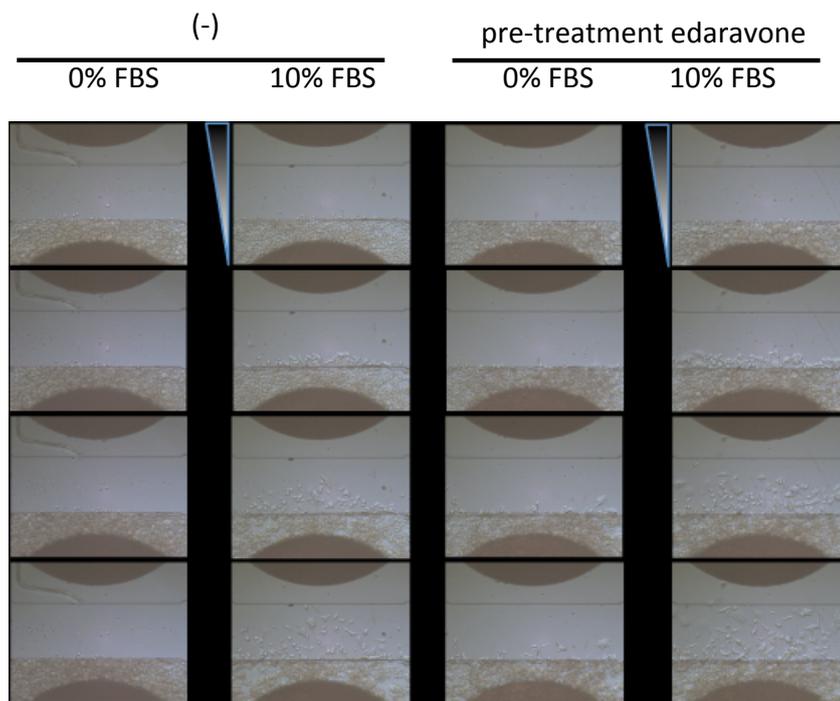


図5 TAXIScanの結果

く、自身の生成物により正のフィードバック調節を受けていることを示唆する。

「2. Nox1 由来の活性酸素による生理的機能」

edaravone の前処理により、Nox1 活性が低下したことが、上皮細胞の遊走にどのような影響を与えるかを検討した。大腸上皮細胞株として Nox1 を発現しているところが知られるヒト結腸腺癌細胞 (HCT-116 細胞) を遊走測定の実験に用いた。細胞の遊走能は、走化性因子に向かって水平方向に移動する細胞をリアルタイムで観察できる細胞動態測定装置 (TAXIScan) を用いて測定した (図 5)。遊走能は、走化性因子に対する細胞遊走の“方向性”と“速度”で定義した。また、走化性因子は、10% ウシ胎児血清を用いた。edaravone 未処理の HCT-116 細胞は、走化性因子の非存在下ではほとんど遊走能を示さない。一方、走化性因子が存在すると、濃度勾配に従って、遊走の方向性と速度が上昇する。興味深いことに、edaravone で前処理した細胞は、未処理の細胞に比べて、方向性と速度が共に上昇していた (図 6 と 7)。この結果は、Nox1 由来の O_2^- が、上皮細胞の遊走を抑制していることを示す。

今回の研究で、(1) Nox1 活性が自身の生成物である O_2^- により正のフィードバック調節を受けていること、(2) 正のフィードバックにより促進された Nox1 活性が上皮細胞の遊走を抑制していることが分かった (図 8)。これらの結果は、Nox1 活性のオン・オフにより粘膜損傷の修復における重要な過程である上皮細胞の遊走能を制御していることを示唆する。

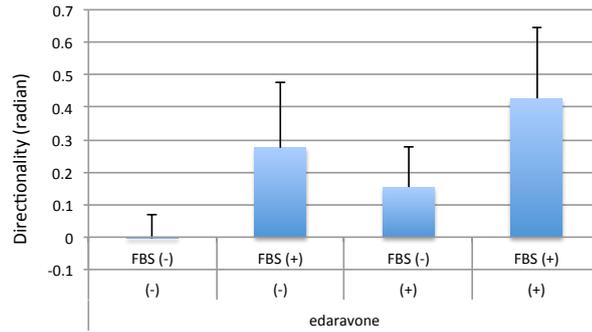


図6 遊走の方向性

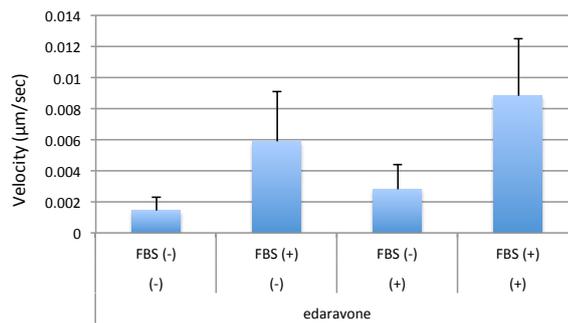


図7 遊走の速度

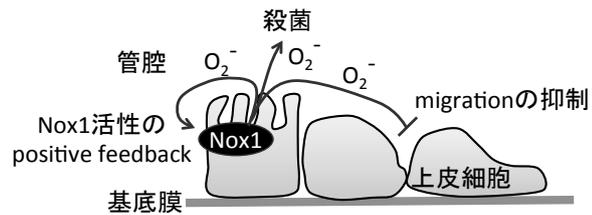


図8 Nox1の役割

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hiroki Takayanagi, Junya Hayase, Sachiko Kamakura, Kei Miyano, Kanako Chishiki, Satoru Yuzawa, Hideki Sumimoto	4. 巻 294
2. 論文標題 Intramolecular interaction in LGN, an adaptor protein that regulates mitotic spindle orientation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 19655-19666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.011457	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takuya Kiyohara, Kei Miyano, Sachiko Kamakura, Junya Hayase, Kanako Chishiki, Akira Kohda, Hideki Sumimoto	4. 巻 23
2. 論文標題 Differential cell surface recruitment of the superoxide-producing NADPH oxidases Nox1, Nox2 and Nox5: The role of the small GTPase Sar1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 480 ~ 493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12590	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山内明、岡本秀一郎、宮野佳、板谷益美、川井千景、栗林太
2. 発表標題 高尿酸血症の免疫機能への影響：尿酸は敵か味方か？
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内明、岡本秀一郎、宮野佳、板谷益美、川井千景、栗林太
2. 発表標題 高尿酸状態の免疫細胞機能への影響 ~ 尿酸に善玉作用はあるのか ~
3. 学会等名 第53回日本痛風・尿酸核酸学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室HP

<https://m.kawasaki-m.ac.jp/classroom/course.php?id=203>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----