

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15047

研究課題名(和文) 活性酸素生成酵素NADPHオキシダーゼの上皮細胞内局在化制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms for directing subcellular localization of reactive oxygen-producing NADPH oxidases in epithelial cells

研究代表者

神田 朗 (Kohda, Akira)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：10814650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膜タンパク質NADPHオキシダーゼ(NADPH oxidase; Nox)ファミリーは、消化管や肺、甲状腺などの上皮細胞において、活性酸素の生成を通じて宿主防御やホルモンの生合成などの生体機能に役割を果たす。一方で、反応性の高い活性酸素の無秩序な生成は細胞や組織に有害であるため、Noxは細胞内の適切な場所で働く必要がある。ところが、Noxを上皮細胞内の適切な場所に局在化させる分子機構は未解明なままであった。本研究では、Noxに結合するタンパク質の1つが、Noxファミリーの上皮細胞内局在制御に必須であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性酸素は宿主防御やホルモンの生合成などの生体機能に用いられる一方で、その反応性の高さ故、無秩序な生成は細胞や組織に有害である。実際に、活性酸素の過剰生成は、多くの疾患の病因に関与することが知られる。本研究では、Noxファミリーが細胞内の「適切な場所」で活性酸素を生成するための仕組みの一端を明らかにした。本研究を通じて、生体が厳密に制御された活性酸素生成を行うための新たな分子機構が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Transmembrane proteins of the NADPH oxidase (Nox) family exist in various epithelial cells, such as digestive tract, lung, and thyroid, and play a role in host defense and hormone synthesis by producing reactive oxygen species (ROS). Since unregulated production of highly reactive ROS often damage tissues and cells, Nox proteins should function at the specific site in cells. However, the mechanisms for targeting Nox to the precise cellular location have been less understood. In the present study, we showed that one of the Nox binding proteins is essential for determining the subcellular localization of Nox proteins in epithelial cells.

研究分野：生化学、細胞生物学

キーワード：NADPHオキシダーゼ 上皮細胞内局在制御

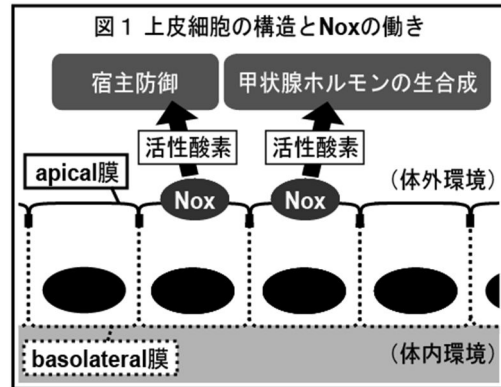
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質 NADPH オキシダーゼ (NADPH oxidase ; Nox) ファミリーは、Nox1~Nox5 と Dual oxidase 1 (Duox1) および Duox2 の 7 つのメンバーからなる一群の活性酸素生成酵素である。食細胞における Nox2 の働き (食細胞が貪食した病原体の殺菌に寄与する) が最もよく知られているが、Nox ファミリーは消化管や肺、甲状腺、内耳などの多くの上皮組織 (細胞) にも発現が認められ、活性酸素の生成を通じて宿主防御や甲状腺ホルモンの生合成、耳石の形成などの生体機能に役割を果たす。

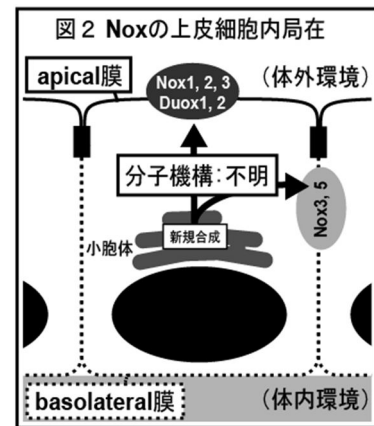
Nox ファミリーが生成する活性酸素は上記のように様々な生体機能に用いられる一方で、反応性の高い活性酸素の無秩序な生成は組織・細胞を傷害してしまう。そのため、Nox は適切な「タイミング」に、細胞内の適切な「場所」で働く必要がある。ところが、活性酸素生成の「タイミング」を規定する「Nox の活性化制御機構」に比べて、「場所」を規定する「Nox の細胞内局在化制御機構」はあまり検討されていなかった。

上皮細胞は体外環境に接する apical 膜と体内環境に接する basolateral 膜という性質の異なる膜ドメインを持ち (図 1)、上皮細胞に発現するいくつかの膜タンパク質は、いずれかの膜ドメインに選択的に局在する。Nox も、宿主防御やホルモン合成の場など必要な場所にだけ活性酸素を供給するために (図 1)、上皮細胞内で厳密な局在制御を受けなければならない。実際に、Nox1 と Duox1、Duox2 は、大腸や肺、甲状腺の上皮組織において apical 膜に局在することが報告されている。さらに私は、上皮モデル細胞株 MDCKII 細胞を用いた細胞レベルの実験系 (免疫蛍光細胞染色法と Domain-selective cell surface biotinylation 法による Nox の局在解析) を確立して、Nox1 と Nox2、Duox1、Duox2 を上皮細胞に発現させると選択的に apical 膜に局在することを示した (研究代表者の未発表データ)。しかしながら、これらの Nox がどのようにして apical 膜に選択的に局在するのか、その局在制御の分子機構はまったく明らかにされていなかった (図 2)。一方で、Nox3 は apical 膜に加えて basolateral 膜に、Nox5 は選択的に basolateral 膜に局在したが (研究代表者の未発表データ) これらの Nox の basolateral 膜への局在化を決める分子機構もまったく未解明なままであった (図 2)。



2. 研究の目的

本研究の目的は、Nox ファミリーの上皮細胞内での局在制御を担う分子機構を明らかにすることである。Nox が小胞体で新規に合成された後、目的地に局在ようになるための仕組みを解明する (図 2)。特に、Nox が apical 膜に局在することは、細胞外の標的 (細菌や甲状腺ホルモンの前駆体など) に活性酸素を容易に作用させる一方で、反応性が高く組織・細胞に有害な活性酸素の体内環境への生成を最小限にとどめるために重要であると考えられる。そこで、Nox の apical 膜局在を規定する分子機構を重点的に解析した。



3. 研究の方法

本研究では、「Nox が持つどのような特徴が局在を規定するのか」、「Nox の局在はどのような因子の働きによって制御されるのか」、「Nox はどのような輸送経路を介して目的地に運ばれるのか」を明らかにした。すべての研究計画は、上皮モデル細胞株 MDCKII 細胞および内在性に Nox を発現することが知られるヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞などを用いた細胞レベルの実験系 (免疫蛍光細胞染色法と Domain-selective cell surface biotinylation 法による Nox の局在解析) を用いて行った。

(1) 研究方法 : Nox が持つ局在化シグナルの同定

上皮細胞において特定の膜ドメインに局在する膜タンパク質は、その局在を規定するシグナル (局在化シグナル ; 自身の特定のアミノ酸配列や糖鎖修飾など) を持ち、そのシグナルを目印に目的地へと運ばれる。そこで、Nox が持つ局在化シグナルの解明を行った。具体的には、Nox ファミリーの様々な欠失変異体 (アミノ酸配列が局在化シグナルである可能性を検証) や糖鎖修飾されるアミノ酸残基の点変異体 (糖鎖修飾が局在化シグナルである可能性を検証) を作製し、MDCKII 細胞に発現させて局在を検討した。また、Nox1 および Nox2、Duox2 には、疾患に繋がる遺伝子異常が報告されている。そこで遺伝子異常が認められるアミノ酸残基に変異を導入し、

上皮細胞内局在への影響を検討した。

(2) 研究方法：Nox の局在制御に必要な因子の探索

Nox ファミリーに結合する（結合することが予想される）タンパク質が、Nox の局在制御に必要であるかどうかを検討した。具体的には、候補タンパク質の変異体を作製し、MDCKII 細胞に発現させて、Nox ファミリーの局在に変化があるかどうかを検討した。

(3) 研究方法：輸送経路の解明

上皮細胞に発現する膜タンパク質は、一般に、小胞体で合成された後、まずはゴルジ体に運ばれる。その後、apical 膜に局在する膜タンパク質は apical recycling endosome (ARE) を、basolateral 膜に局在する膜タンパク質は common recycling endosome (CRE) を経由して目的地へ運ばれる。小胞体で新規合成された Nox は、どのような経路を通して目的地に至るのか（既存の経路を通るのか、それとも新規な輸送経路を通るのか）の解明を試みた。具体的には、低分子量 G タンパク質 Rab11 の変異体を発現させて ARE を通る経路を阻害し、Nox の apical 膜局在への影響を検討した。さらに、新規合成された Nox の小胞体から目的地への輸送過程の継時変化を観察した。

4. 研究成果

(1) 研究成果：Nox が持つ局在化シグナルの同定

Nox ファミリーの上皮細胞内局在を規定する局在化シグナルを同定するために、前述のように様々な Nox の変異体を作製して局在解析を行った。特に、他の多くの膜タンパク質において局在化シグナルとなることが報告されている細胞質領域のアミノ酸配列や糖鎖修飾に注目して検討を行った。その結果、いくつかの変異が（おそらく Nox の立体構造に影響を与えることによって）Nox のタンパク質レベルを減少させたが、今回検討を行った変異はどれも Nox の細胞内局在には影響を与えなかった。従って、Nox の細胞質領域のアミノ酸配列や糖鎖修飾は、局在化シグナルとならない可能性が考えられた。

また、Nox1 および Nox2、Duox2 で知られる疾患の原因となる遺伝子変異もまた、これらの Nox の局在に影響を与えなかった。これらの遺伝子変異は、Nox ファミリーの細胞内局在以外の性質・機能に必要であることが考えられた。

(2) 研究成果：Nox の局在制御に必要な因子の同定

Apical 膜に局在する Nox1 および Nox2 は、共に Nox 結合タンパク質 NoxBP (Nox-binding protein) と複合体を形成して細胞内に存在する。その一方で、basolateral 膜に局在する Nox5 は NoxBP と複合体を形成しない。そこで、NoxBP が Nox ファミリーの apical 膜局在を制御する可能性を検討した。その結果、Nox1 および Nox2 は、NoxBP の欠失変異体と共発現すると、apical 膜に局在することができず、basolateral 膜に局在ようになることが明らかになった。この結果から、NoxBP のアミノ酸配列が局在化シグナルとして働き、Nox1 や Nox2 を apical 膜に局在させる可能性が考えられた。

研究成果(1)と併せて、Nox ファミリーは、自身は局在化シグナルを持たないが、NoxBP と複合体を形成することにより、apical 膜に局在できるようになることが示唆された。反対に、Nox ファミリーの basolateral 膜局在は、NoxBP と複合体を形成できないことによって規定されると考えられる。Nox ファミリーの上皮細胞内局在を制御するという NoxBP が持つ新しい機能が明らかになった。

(3) 研究成果：輸送経路の解明

Nox の apical 膜への輸送の継時変化を観察した結果、Nox は小胞体で新規に合成された後、ゴルジ体を経て apical 膜へと運ばれることがわかった。さらに、Rab11 の変異体を発現させた MDCKII 細胞では、Nox は apical 膜へ輸送されなくなった。従って、新規合成された Nox は、ゴルジ体へ運ばれた後、ARE を介した輸送経路で目的地へと運ばれることが考えられた。

その一方で、Nox1 の一部は、ゴルジ体での修飾を受けずに apical 膜へ輸送されたことから、ゴルジ体を経由しない非典型的な輸送経路を介して運ばれる可能性が示唆された。近年、いくつかの膜タンパク質がゴルジ体を経由しない輸送経路で細胞膜へ輸送されることが報告されているが、その輸送経路の詳細な分子機構は未だ未解明なままである。今後、Nox ファミリーの輸送機構のさらなる解析を通じて、この経路の分子機構が明らかになることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 神田 朗, 住本 英樹	4. 巻 72
2. 論文標題 活性酸素生成酵素NADPHオキシダーゼ（Nox）による感染防御	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 14-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----