

平成 22 年 5 月 7 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790189
 研究課題名(和文) 電位依存性H⁺チャンネルと活性酸素産生酵素NADPHオキシダーゼとの共役機構の解明
 研究課題名(英文) Analysis of coupling mechanism of voltage-gated H⁺ channel and NADPH oxidase
 研究代表者
 大河内 善史 (OKOCHI YOSHIFUMI)
 大阪大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：90435818

研究成果の概要(和文)：電位依存性プロトンチャンネルVSOPが、病原菌を殺菌するために好中球によって作り出される活性酸素の産生を制御していることを明らかにした。さらに、VSOPとNADPHオキシダーゼが物理的に結合している可能性が高いこと、両者が好中球の顆粒において共に存在することを明らかにした。すなわち、VSOPはNADPHオキシダーゼと結合することで、細胞内外のプロトン濃度と膜電位を厳密に制御することができ、活性酸素の産生を制御することができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We found that voltage-gated proton channel, VSOP, regulates reactive oxygen species (ROS) generation in neutrophils, which have the ability of killing pathogens. We also found the possibility that VSOP and NADPH oxidase interact physically and that both molecules are present in same location of neutrophils. These results suggest that VSOP can regulate intracellular/extracellular proton and membrane potential properly by interaction with NADPH oxidase and then regulate ROS generation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：電位依存性プロトンチャンネル、好中球、活性酸素、NADPHオキシダーゼ

1. 研究開始当初の背景

好中球は、病原菌を殺菌・処理する酵素である。好中球による殺菌の重要な過程は、NADPHオキシダーゼの活性化から始まる一

連の活性酸素種(ROS)の産生である。電気生理学的解析から、電位依存性プロトンチャンネルは、NADPHオキシダーゼの活性制御を介して、活性酸素の産生を制御するのに必要な

因子と考えられてきたが、その分子実体は長い間不明だった。最近、当研究室において、マウス EST データベース上で発見された未知の遺伝子がコードするタンパクが、電位と細胞内外の pH に依存してプロトンを輸送する電位依存性プロトンチャネル(Voltage sensor only protein: VSOP)であることが明らかになった(Sasaki et al., 2005)。本研究者は、VSOP タンパクが脾臓、貪食細胞(好中球、マクロファージ、ミクログリア)において豊富に存在すること、VSOP ノックアウトマウスの好中球では、活性酸素の産生量が低下していることを見出した(Okochi et al., 2009)。すなわち、VSOP と NADPH オキシダーゼは協調して ROS 産生を制御している可能性が示唆された。以上の結果を踏まえ、本研究者は、VSOP と NADPH オキシダーゼの共役機構を明らかにする目的で以下の実験を行った。

2. 研究の目的

NADPH オキシダーゼは、基質である NADPH から電子をうばい、細胞外の酸素に電子を与える一方で、細胞内にプロトンを放出する。このプロトン濃度の上昇により細胞膜は脱分極し、電位依存性プロトンチャネルが活性化する。すなわち、細胞内のプロトン濃度と細胞膜の膜電位は、電位依存性プロトンチャネルによって制御されていると考えられるが、その詳細な機構は不明である。本研究では、電位依存性プロトンチャネル VSOP と NADPH オキシダーゼの共役機構を解明するために、(1) 両者の物理的な結合を免疫沈降法により解析した。(2) さらに、両タンパクが貪食細胞内において同じ場所に存在する可能性を検討するために免疫染色法を用いて解析した。

3. 研究の方法

(1) VSOP と NADPH オキシダーゼの物理的な結合の解析—免疫沈降法。

両者の物理的な結合を解析するために、以下の二つのサンプルを用いた。1 つは、NADPH オキシダーゼのサブユニットを安定発現する COS 細胞 (COS^{phox})、そして VSOP と NADPH オキシダーゼを発現する細胞集団が多数存在するマウス脾臓を用いて行った。COS^{phox} 細胞を用いた免疫沈降実験では、VSOPcDNA に Myc タグ配列を融合させたコンストラクト

VSOP-myc cDNA を発現させた後、免疫沈降実験を行った。抗体は、NADPH オキシダーゼを認識する抗体と VSOP を認識する抗体、Myc タグを認識する抗体を用いて行った。

(2) VSOP と NADPH オキシダーゼの共有の解析—免疫染色

VSOP と NADPH オキシダーゼの局在は、骨髓細胞から好中球を単離、固定し、それぞれに対する抗体を用いて行った。Percoll 密度勾配遠心法によって骨髓から単離された好中球を、4% パラホルムアルデヒドで固定し、VSOP 抗体、NADPH オキシダーゼ抗体を用いて免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) VSOP と NADPH オキシダーゼとの物理的な相互作用。

NADPH オキシダーゼサブユニットを安定発現する COS^{phox} 細胞に VSOP-myc タンパクを発現させ、p22 抗体を用いて免疫沈降し、得られたフラクションを myc 抗体でイムノブロットを行った結果、VSOP のバンドが検出され

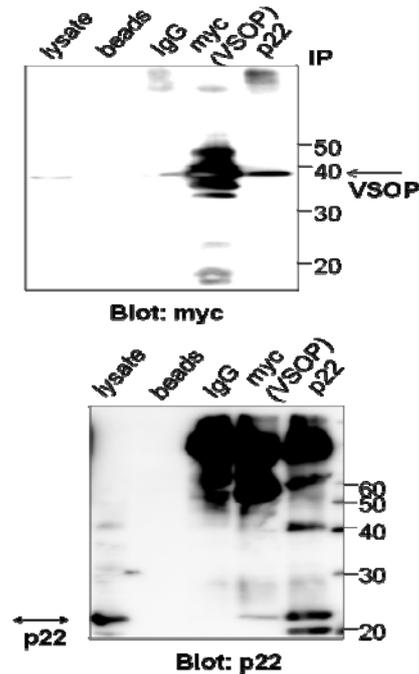


図1. COS^{phox} 細胞を用いた VSOP と NADPH オキシダーゼとの相互作用の解析

上：p22 抗体で免疫沈降したフラクションを myc 抗体でイムノブロットした結果。下：myc 抗体で免疫沈降したフラクションを p22 抗体でイムノブロットした結果。

た。さらに、myc 抗体で免役沈降したフラクションから p22 が検出された (図 1)。発現系で見られた VSOP と NADPH オキシダーゼの結合がネイティブの細胞でも見られる現象かどうかを調べた。マウス脾臓サンプルを NADPH オキシダーゼに対する抗体 p22 を用いて免役沈降し、得られたフラクションを VSOP 抗体でイムノブロットした結果、VSOP のバンドが検出された (図 2)。すなわち、VSOP と NADPH オキシダーゼが物理的に結合している可能性が示唆された。VSOP は、NADPH オキシダーゼと結合することで、NADPH オキシダーゼによって放出される細胞内プロトン濃度を厳密に制御することができると思われる。

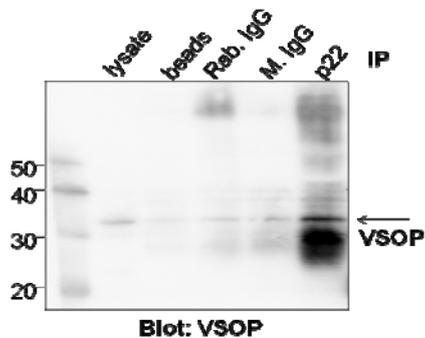


図 2. 脾臓を用いた VSOP と NADPH オキシダーゼとの相互作用の解析上: p22 抗体で免役沈降したフラクションを VSOP 抗体でイムノブロットした結果。

(2) 好中球における VSOP と NADPH オキシダーゼの共局在

細胞内における VSOP の局在を調べることは、活性化の機構を調べる上で重要である。マウス好中球における VSOP の局在を VSOP 抗体を用いて調べた。その結果、VSOP は主に細胞内の顆粒に存在することが分かった (図 3)。VSOP が存在する顆粒に NADPH オキシダーゼが存在するかどうか、NADPH オキシダーゼの抗体とともに共染色を行った結果、VSOP は NADPH オキシダーゼと同じ顆粒に存在することが明らかとなった (図 3)。すなわち、VSOP は、通常顆粒に蓄えられることで不必要な活性化を抑制されており、病原菌を貪食した際に活性化するように厳密に制御されていると考えられる。

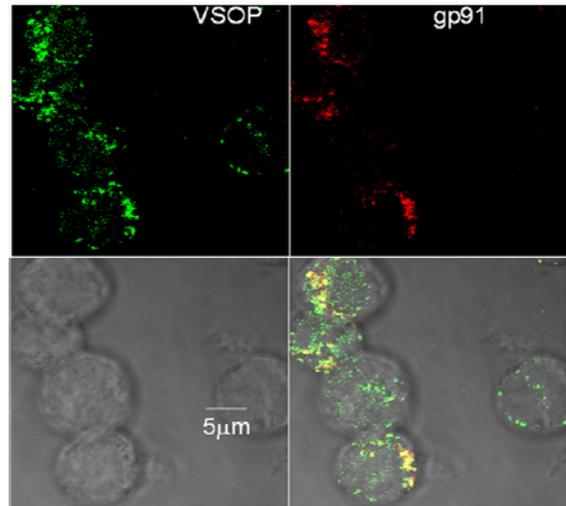


図 3. 好中球における VSOP と NADPH オキシダーゼの共局在

緑: VSOP 抗体に結合した 2 次抗体由来のシグナル、赤: NADPH オキシダーゼサブユニットの 1 つである gp91 抗体に結合した 2 次抗体由来のシグナル、黄色: 緑と赤が重なった部分を示す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① El Chemaly A, Okochi Y, Sasaki M, Arnaudeau S, Okamura Y, Demaurex N.
VSOP/Hv1 proton channels sustain calcium entry, neutrophil migration, and superoxide production by limiting cell depolarization and acidification.
Journal of experimental medicine, Vol.207, 2010, 129-139 査読有
- ② Sakata S, Kurokawa T, Nørholm MH, Takagi M, Okochi Y, von Heijne G, Okamura Y.
Functionality of the voltage-gated proton channel truncated in S4.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol.107, 2010, 2313-2318 査読有
- ③ Okochi Y, Sasaki M, Iwasaki H, Okamura Y.
Voltage-gated proton channel is expressed on phagosomes.
Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.382, 2009,

274-279 査読有

- ④ Koch HP, Kurokawa T, Okochi Y, Sasaki M, Okamura Y, Larsson HP
Multimeric nature of voltage-gated proton channels.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol.105, 2008, 9111-9116 査読有
- ⑤ Hossain MI, Iwasaki H, Okochi Y, Chahine M, Higashijima S, Nagayama K, Okamura Y.
Enzyme domain affects the movement of the voltage sensor in ascidian and zebrafish VSPs.
Journal of Biological Chemistry, Vol.283, 2008, 18248-18259 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① Yoshifumi Okochi, Mari Sasaki & Yasushi Okamura
Voltage-gated proton channel is expressed on phagosome.
第 32 回日本神経科学大会、2009 年 9 月 16 日、名古屋国際会議場 (名古屋)
- ② Y. Okochi, M. Sasaki & Y. Okamura
Analyses of voltage-gated proton channel, VSOP, in phagocytes.
The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS2009), 30 Jul., 2009, Kyoto International Conference Center (Kyoto)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/phys2/tougouseiri/menu.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大河内 善史 (OKOCHI YOSHIFUMI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号 : 90435818

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :