

機関番号：17102
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790283
 研究課題名 (和文) 殺菌に重要な食細胞 NADPH オキシダーゼを構成する膜蛋白質間の相互作用機構の解明
 研究課題名 (英文) Mechanism for interaction between gp91^{phox} and p22^{phox}: two membrane-integrated proteins of the phagocyte NADPH oxidase
 研究代表者
 宮野 佳 (MIYANO KEI)
 九州大学・医学研究院・学術研究員
 研究者番号：60444783

研究成果の概要 (和文)：好中球等の食細胞に発現する食細胞 NADPH オキシダーゼは、生成する活性酸素が殺菌剤として機能することで、生体防御上重要な役割を果たしている。本研究では、オキシダーゼの酵素本体である Nox2/gp91^{phox} の安定化に必要な p22^{phox} との結合部位に関して、また、オキシダーゼの活性化タンパク質である p67^{phox} による酵素活性の制御メカニズムについての新たな知見を得た。

研究成果の概要 (英文)：The phagocyte NADPH oxidase, dormant in resting cells, is activated during phagocytosis to produce superoxide, a precursor of microbicidal oxidants. The catalytic core of the phagocyte oxidase is Nox2/gp91^{phox}, a membrane-spanning protein that forms a stable heterodimer with p22^{phox}. In this study, I found that both N- and C-terminal regions play a crucial role in Nox binding to p22^{phox}. Furthermore, I showed that a short region between the TPR and activation domains in p67^{phox} is crucial for activation of Nox2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

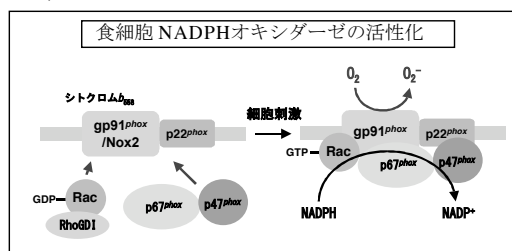
科研費の分科・細目：基礎医学

キーワード：NADPH オキシダーゼ, 活性酸素, Nox2/gp91^{phox}, 膜タンパク質

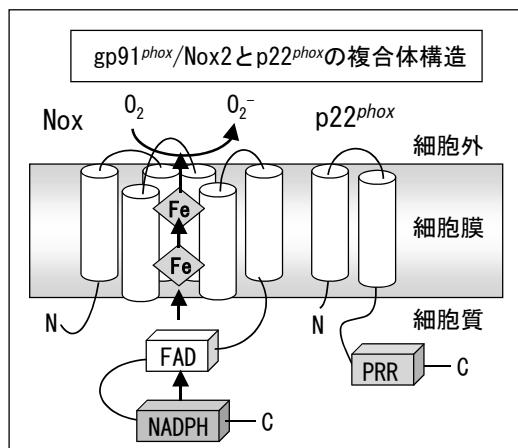
1. 研究開始当初の背景

細胞内の代謝系の副産物として生成される活性酸素は、細胞および組織の障害を引き起こすため、一般には有害なものとされている。一方で、「真の産物」として活性酸素を生成する酵素系が存在し、その1つがスーパーオキシド生成酵素 Nox (NADPH oxidase) である。Nox はファミリーを形成しており (ヒトでは Nox1 から Nox5 まで存在)、その中でも食細胞に発現する Nox2 (別名として gp91^{phox}) は、もっともよく研究されており、生成する

活性酸素が殺菌剤として機能することで、生体防御上重要な役割を果たしている。Nox2 は、それだけではまったく活性を持たない。

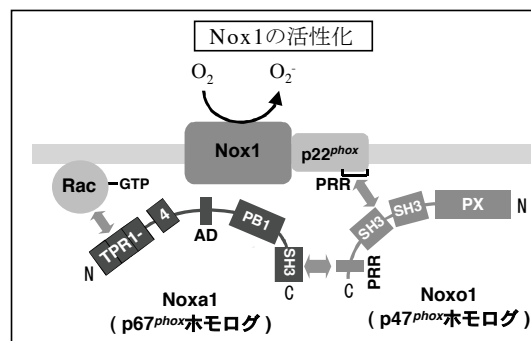


その活性化は、細胞休止時には細胞質に存在する活性化タンパク質である $p47^{phox}$ 、 $p67^{phox}$ および低分子量 G タンパク質である Rac が、細胞刺激に応じて膜に移行し、Nox2 と複合体を形成することにより起こる。Nox2 は、一次構造上で膜貫通領域と細胞質領域の2つに大きく分けられる。細胞質領域には NADPH と FAD の結合部位がある。膜貫通領域は 6 つの膜貫通セグメントで構成され、2 つのヘムの結合部位が存在する。そのため、Nox2 には O_2 を生成するために必要な電子伝達系「NADPH→FAD→ヘム→ヘム→ O_2 」のすべてが含まれていることになる。Nox2 の O_2 生成活性を引き起こす活性化タンパク質



を膜へ繋ぎとめるために必要なのが、Nox2 と同じく膜タンパク質の $p22^{phox}$ である。Nox2 と $p22^{phox}$ は互いの膜貫通領域で会合していると考えられている。さらに、Nox2 と $p22^{phox}$ の会合のもう 1 つの重要な役割が、 $p22^{phox}$ の遺伝的欠損症である慢性肉芽腫症で示されている。慢性肉芽腫症とは、食細胞に発現する Nox2 による活性酸素の生成がまったく行われなため、好中球の殺菌能が著しく低下し、重篤な感染症を繰り返す遺伝疾患である。遺伝的に $p22^{phox}$ が欠損した食細胞では、Nox2 の mRNA は正常であるにもかかわらず、Nox2 がタンパク質レベルで検出されないことから、Nox2 と $p22^{phox}$ の会合が、Nox2 をタンパク質レベルで安定化すると考えられている。しかしながら、これほど重要な Nox2 と $p22^{phox}$ の結合部位に関する知見はまったくない。

Nox ファミリーの中で、Nox1 や Nox3 は Nox2 と同様に $p22^{phox}$ と複合体を形成することによりタンパク質レベルで安定化されている。Nox1 は、種々の非食細胞に発現しており、大腸上皮細胞による局所の感染防御や、血管平滑筋細胞の増殖に関与すると考えられている。Nox1 は、その活性化には活性化タンパク質である Noxo1 (Nox organizer 1: $p47^{phox}$ のホモログ) および Noxa1 (Nox activator 1: $p67^{phox}$ のホモログ)、さらに Rac が必要である。また、Nox3 も活性化タンパク質により O_2 生成活性の制御を受けている。



一方、Nox4 は恒常的に O_2 を生成しており、活性化タンパク質や Rac による活性制御は受けていないようである。Nox4 も、 $p22^{phox}$ と結合できるが、Nox4 のタンパク質レベルでの安定化には必須ではない ($p22^{phox}$ の存在により活性は促進される)。Nox5 は、他の Nox と異なり $p22^{phox}$ と結合せず、単独で安定なタンパク質として存在することができる。

Nox 本体についての研究は世界的にほとんど進んでいない。例えば、Nox1 から Nox3 までは、同じく膜タンパク質である $p22^{phox}$ と会合に依存してタンパク質レベルで安定化されるのだが、その仕組みは全く分かっていない。また、活性化タンパク質による Nox の活性化機構は、未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、Nox1~Nox4 のタンパク質レベルでの安定化や活性化に必要な $p22^{phox}$ との結合様式や、活性化タンパク質による Nox の活性化機構に関する新たな知見を得ることを目的とする。

(1) Nox1~Nox4 は $p22^{phox}$ と結合することにより、タンパク質レベルで安定化され、はじめて活性酸素生成酵素として機能できる。そこで、本研究では Nox1~Nox4 と $p22^{phox}$ の会合に関わる領域の特定、さらにはその結合により Nox1~Nox4 が安定化される仕組みを解明することを目指す。

(2) Nox2 は、細胞質に存在する活性化タンパク質 ($p67^{phox}$ と $p47^{phox}$) および低分子量 G タンパク質 Rac により活性化される。 $p67^{phox}$ は、一次構造上 N 末端側から TPR ドメイン、2 つの SH3 ドメインに挟まれた PB1 ドメインから構成される。Nox2 の活性化には、Rac が $p67^{phox}$ の TPR ドメインに結合する必要がある。しかしながら、Rac が結合した $p67^{phox}$ が Nox2 にどのように作用するかほとんど分かっていない。そこで、Nox2 の活性化に必要な $p67^{phox}$ の作用機構について、新たな知見を得ることを目指す。

3. 研究の方法

(1) Nox2 と $p22^{phox}$ の会合の重要な役割は、Nox2 をタンパク質レベルで安定に存在させることである。ところが、Nox2 と $p22^{phox}$ がどの領域で会合しているかはまったく分か

っていない。そこで、結合に関わる Nox2 の領域の同定を行った。Nox ファミリーのうち Nox5 は、p22^{phox} と会合せず、Nox5 単独でタンパク質として安定に存在することができる。また、Nox5 は p22^{phox} 非依存的に O₂ を生成する活性も有している。以上の性質を利用して、p22^{phox} との会合に関わっている Nox2 の領域を明らかにした。Nox2 の膜貫通領域または細胞質領域を Nox5 と入れ換えたキメラタンパク質を作成した。これらの Nox キメラタンパク質と p22^{phox} との結合は、研究代表者がすでに確立している「膜タンパク質 Nox と p22^{phox} の免疫沈降法」や「調製した膜画分のウェスタンブロット法による検出方法」を用いて検討した。

(2) Nox2 の活性化に必要な p67^{phox} のアミノ酸残基を同定するために、様々な p67^{phox} の変異体を作製した。作製した p67^{phox} 変異体の Nox2 活性化能は、培養細胞を用いた Nox2 の再構成系と好中球膜を Nox2 のソースとして用いる無細胞での再構成系で評価した。

4. 研究成果

(1) Nox1 から Nox4 は、Nox の安定化や活性化に必要な膜タンパク質 p22^{phox} と会合しているが、Nox5 は p22^{phox} と会合せず単独で安定に存在する。Nox2 と p22^{phox} の会合は互いの膜貫通領域を介した結合によるものと想像されているが、その詳細は不明なままであった。実際、Nox2 の膜貫通領域を Nox5 と入れ換えて作成したキメラタンパク質は p22^{phox} と結合できなかつた。さらに、驚いたことに、Nox2 の細胞質領域を Nox5 と入れ換えたキメラタンパク質も p22^{phox} と結合できなかつた。これらの結果から、膜貫通領域のみでなく細胞質領域も p22^{phox} との会合に必要であると考えられた。さらに私は、Nox1 や Nox4 の細胞質領域を Nox2 と入れ換えたキメラタンパク質が、Nox2 の活性化に必要な活性化タンパク質 p47^{phox} と p67^{phox} によって活性化されることを見出した。一方、Nox1 の細胞質領域を持つキメラタンパク質の活性は、Nox1 の活性化に必要な Nox1 と Nox1 を必要としたが、p47^{phox} や p67^{phox} では活性化されなかつた。さらに、Nox4 の細胞質領域を持つキメラは、Nox4 と同様に活性化タンパク質を必要とせず恒常的な活性を示した。以上の結果から、Nox の細胞質領域は、活性化タンパク質に依存するか否か、さらに依存するならばどのタイプの活性化タンパク質を必要としているかを決定していると考えられた。

(2) p67^{phox} の TPR ドメイン (Rac が結合する) の C 末端側に存在する進化的に保存されている領域が、Nox2 の活性化に関わっていることを見出した。この領域の中でも特に 198 番目のトリプシン残基、199 番目のロイシン残基、204 番目のバリン残基は、Nox2 を活性

に重要なアミノ酸残基であった。また、この領域が Nox2 の C 末細胞質領域に存在する NADPH 結合ドメインに直接結合することで Nox2 を活性化することを示した。

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 6 件)

① Miyano K, Sumimoto H

Assessment of the role for Rho family GTPase in NADPH oxidase activation
Methods Mol. Biol. (2011) *in press*, 査読有り

② Maehara Y, Miyano K, Yuzawa S, Akimoto R, Takeya R, Sumimoto H

A conserved region between the TPR and activation domains of p67^{phox} participates in activation of the phagocyte NADPH oxidase
J Biol Chem. (2010), 285, 31435–31445, 査読有り

③ Minakami R, Maehara Y, Kamakura S, Kumano O, Miyano K, Sumimoto H

Membrane phospholipid metabolism during phagocytosis in human neutrophils
Genes Cells. (2010), 15, 409–424, 査読有り

④ 宮野 佳, 住本 英樹

酸化ストレス応答と Nox ファミリー
生物資料分析, (2009), 32, 289–296, 査読有り

⑤ Miyano K, Koga H, Minakami R, Sumimoto H

The insert region of the Rac GTPases is dispensable for activation of superoxide-producing NADPH oxidases.
Biochem J. (2009), 422, 373–382, 査読有り

⑥ Yuzawa S, Miyano K, Honbou K, Inagaki F, Sumimoto H

The domain organization of p67^{phox}, a protein required for activation of the superoxide-producing NADPH oxidase in phagocytes.
J Innate Immun. (2009), 1, 543–555, 査読有り

[学会発表] (計 8 件)

① 宮野 佳, 住本 英樹

活性酸素生成型 NADPH オキシダーゼ (Nox) ファミリーの活性化における膜貫通領域と細胞質領域の役割
第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会, 2010 年 12 月 7–10 日, 神戸

② 宮野 佳, 住本 英樹

生体防御に重要な活性酸素生成酵素 NADPH オキシダーゼの活性化機構
第 21 回日本生体防御学会学術総会, 2010 年 7 月 22–24 日, 仙台

③ Miyano K, Sumimoto H

Roles for the N-terminal transmembrane and

C-terminal cytosolic moieties of Nox-family NADPH oxidases

Gordon Research Conference (Nox family NADPH oxidases), 2010年6月6-11日, Les Diablerets, the Switzerland

④ 湯澤 聡, 宮野 佳, 本坊 和也, 稲垣 冬彦, 住本 英樹

The domain organization of p67^{phox}, a protein required for activation of the superoxide-producing NADPH oxidase in phagocytes

第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月9-12日, 横浜

⑤ 宮野 佳, 古賀 博文, 水上 令子, 住本 英樹

Rac-dependent activation of superoxide-producing NADPH oxidases does not require its insert region

第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月9-12日, 横浜

⑥ 湯澤 聡, 宮野 佳, 本坊 和也, 稲垣 冬彦, 住本 英樹

Nox2 活性化における p67^{phox} のドメイン配置と作用機構

第82回日本生化学会大会, 2009年10月21-24日

⑦ 宮野 佳, 古賀 博文, 水上 令子, 住本 英樹

Rac の insert region は活性酸素生成酵素 NADPH オキシダーゼ活性化に必要な

第82回日本生化学会大会, 2009年10月21-24日

⑧ 宮野 佳, 前原 優一, 湯澤 聡, 住本 英樹

スーパーオキシド生成酵素 NADPH オキシダーゼの活性化因子 p67^{phox} の作用機構の解明

平成21年度日本生化学会九州支部例会, 2009年, 5月16-17日

[図書] (計1件)

① Sumimoto H, Minakami R, Miyano K
The Nox Family of NADPH oxidases that Deliberately Produce Reactive Oxygen Species

S. Karger, In free radical biology in digestive diseases, Front. Gastrointest. Res, 2011年, 23-34

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮野 佳 (MIYANO KEI)

九州大学・医学研究院・学術研究員

研究者番号: 60444783