

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790214
 研究課題名(和文) 生体防御に重要な NADPH オキシダーゼを構成する膜蛋白質間の相互作用機構
 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：食細胞 NADPH オキシダーゼ (gp91^{phox}) 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、これまで全く不明であった gp91^{phox} の安定化に必要な p22^{phox} との結合部位に関する新たな知見を得た。また、低分子量 G タンパク質 Rac に特異的なアミノ酸配列は、gp91^{phox} 活性に関与しないこと、さらに、gp91^{phox} の NADPH 結合ドメインが典型的な機構で NADPH を認識しているのではないことを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

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

食細胞のひとつである好中球は、生体に侵入してきた病原体を貪食し殺菌する。その際に、殺菌剤として活性酸素が用いられるが、その生成源が食細胞 NADPH オキシダーゼ (gp91^{phox}) である。gp91^{phox} 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特異的タンパク質である 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、gp91^{phox} と複合体を形成することにより起こる。この際に、細胞質因子を膜へ繋ぎとめるために必要なのが、gp91^{phox} と同じく膜タンパク質の p22^{phox} である。

gp91^{phox} 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 (p22^{phox} の細胞質ドメインは細胞質因子と結合する)。さらに、gp91^{phox} と p22^{phox} の会合のもう一つの重要な役割が、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 gp91^{phox} 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、gp91^{phox} がタンパク質レベルで検出されないことから、gp91^{phox} と p22^{phox} の会合が、gp91^{phox} 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 gp91^{phox} と p22^{phox} の結合部位に関する知見はまったくない。

2. 研究の目的

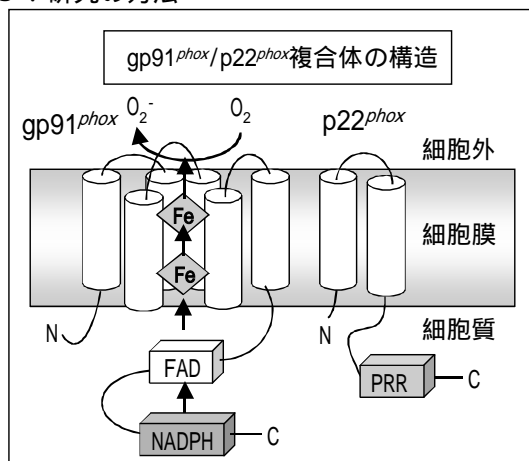
本研究では、食細胞 NADPH オキシダーゼの酵素本体である gp91^{phox} の p22^{phox} との相互作用機構や、活性化機構の解明を目的とする。

(1) gp91^{phox} は 6 つの膜貫通セグメントのいずれか（あるいは複数）で、p22^{phox} と結合していると考えられている。この結合により gp91^{phox} の膜貫通領域は安定化され、はじめてスーパーオキシド生成酵素として機能できる。そこで、本研究では、gp91^{phox} と p22^{phox} の会合に関わる膜貫通セグメントの特定、さらには、その結合により gp91^{phox} が安定化される仕組みを解明することを目指す。

(2) 低分子量 G タンパク質 Rac は、gp91^{phox} の活性化に必須の因子である。以前、Rac の insert region (Rho サブファミリー特異的なアミノ酸配列) の gp91^{phox} の活性化への関与が指摘されたが、その必要性は依然として不明なままである。そこで、gp91^{phox} の活性化における insert region の役割について検討する。

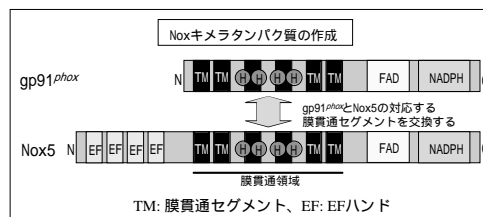
(3) gp91^{phox} には、活性酸素（スーパーオキシド）を生成するために必要な電子伝達系「NADPH FAD ヘム ヘム 酸素分子」のすべてが含まれている。gp91^{phox} の細胞質領域には、電子供与体である NADPH が結合する領域が存在するが、依然として不明な点が多い。そこで、この NADPH 結合ドメインに関する新しい知見を得ることを目指す。

3. 研究の方法



gp91^{phox} にはホモログが存在し、ヒトでは gp91^{phox} を含めて 5 種類が同定されている。これらホモログは、Nox (NADPH oxidase) ファミリーと呼ばれ、gp91^{phox} には別名として Nox2 が与えられている。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} 非依存的にスーパーオキシド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 gp91^{phox}/Nox2 膜貫通セグメントに関する知見を得ることにした。gp91^{phox}/Nox2 は 6 つの膜貫通セグメントのうち、いずれか、もしくは複数で p22^{phox} と結合していると考えられる。そこで、gp91^{phox}/Nox2 と Nox5 の 6 つの膜貫通セグメントをそれぞれ個別（あるいは複数）に交換し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、「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。さらに、培養細胞を用いて gp91^{phox}/Nox2 活性を再構成し、Nox キメラタンパク質のスーパーオキシド生成活性を測定した（この再構成の方法は、「Rac の insert region の役割」や「gp91^{phox} の細胞質領域の NADPH 結合ドメインの解析」でも用いた）。Nox キメラタンパク質を用いた解析法で、gp91^{phox}/Nox2 のアミノ酸置換によって引き起こされたタンパク質レベルでの発現量低下による慢性肉芽腫症の症例と照らし合わせつつ、p22^{phox} との相互作用に重要な各膜貫通セグメント内のアミノ酸の同定を行った。



4. 研究成果

これまでの研究により、gp91^{phox} の活性化が細胞質因子の会合により引き起こされる仕組みが明らかにされてきたが、酵素本体である gp91^{phox} (及び他の Nox) 自体については多くのことが不明であった。本研究では、まず gp91^{phox} の安定化に必要な p22^{phox} との結合に関わる膜貫通セグメントの特定を目標とした。培養細胞を用いた再構成系で、作成した様々な Nox キメラのタンパク質レベルでの発現量やスーパーオキシド生成活性、さらに p22^{phox} との結合能を調べた。その結果、これまでまったく不明であった gp91^{phox} と p22^{phox} の結合部位に関する新たな知見を得ることができた。さらに、gp91^{phox} のアミノ酸置換によって引き起こされたタンパク質レベルでの発現低下による慢性肉芽腫症（幼少期より重篤な感染症を繰り返す遺伝疾患）のうち、いくつかの症例は p22^{phox} との結合が失われることが原因であることを見出した。本研究で得られた成果は、慢性肉芽腫症の病態を理解する上で重要な情報を提供するであろう。

gp91^{phox}は、細胞質に存在する特異的タンパク質および低分子量 G タンパク質 Rac により活性化される。以前、Rac の insert region (IR) の gp91^{phox} の活性化への関与が指摘されたが、その必要性は依然として不明なままであった。今回作成した IR を欠く様々な変異体は、いずれも野生型と同等に gp91^{phox} を活性化することができた。この結果から、IR が gp91^{phox} の活性化には必要ないことが分かった。

gp91^{phox}の細胞質領域には基質である NADPH の結合ドメインが存在する。私は、構造解析およびアミノ酸置換した gp91^{phox} 変異体のスーパーオキシド生成活性を指標として、これまで良く知られている NADPH 結合ドメインとは異なる様式でアミノ酸残基が NADPH を認識していることを明らかにした。

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7件)

Masahiko Taura, Kei Miyano, Reiko Minakami, Sachiko Kamakura, Ryu Takeya, Hideki Sumimoto

A region N-terminal to the tandem SH3 domain of p47^{phox} plays a crucial role in activation of the phagocyte NADPH oxidase
The Biochemical journal, 419, 329-338, 2009年, 査読有り

Yuichi Maehara, Kei Miyano, Hideki Sumimoto

Role for the first SH3 domain of p67^{phox} in activation of superoxide-producing NADPH oxidases

Biochemical and biophysical research communications, 379, 589-593, 2009年, 査読有り

宮野 佳, 住本 英樹

好中球による活性酸素産生の分子機構
感染炎症免疫, 38, 14-23, 2008年, 査読有り

前原 優一, 宮野 佳, 住本 英樹

Nox ファミリーメンバーの活性調節機構
Journal of Gastrointestinal Research, 16, 3-11, 2008年, 査読有り

Kei Miyano, Hideki Sumimoto

Role of the small GTPase Rac in p22^{phox}-dependent NADPH oxidases
Biochimie, 89, 1133-1144, 2007年, 査読有り

Minoru Tamura, Ichiro Shiozaki, Shohei Ono, Kei Miyano, Sachio Kunihiro, Takayuki Sasa

p40^{phox} as an alternative organizer to p47^{phox} in Nox2 activation: A new mechanism involving an interaction with p22^{phox}
FEBS Letters, 581, 4533-4538, 2007年, 査読有り

宮野 佳, 水上 令子, 住本 英樹

Nox ファミリーの調節機構
臨床検査, 51, 1111-1115, 2007年, 査読有り

[学会発表](計7件)

宮野 佳, 住本 英樹

活性酸素生成酵素 NADPH オキシダーゼの活性化における Rac の insert helix の役割
第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 2008年12月9日~12日, 神戸

前原 優一, 宮野 佳, 住本 英樹

p67^{phox} による活性酸素生成酵素 Nox2 の活性化機構
第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 2008年12月9日~12日, 神戸

住本 英樹, 宮野 佳, 武谷 立, 水上 令子

低分子量 G タンパク質による活性酸素生成型 NADPH オキシダーゼの調節機構
第30回薬学会九州支部コロキウム「生命機能をつかさどる G 蛋白質シグナリング」, 2008年10月25日, 福岡

宮野 佳, 住本 英樹

食細胞 NADPH オキシダーゼ gp91^{phox}/Nox2 と非食細胞 Nox1 と Nox3 の活性化における低分子量 G タンパク質 Rac の insert helix の役割
第19回日本生体防御学会学術総会, 2008年7月10日~12日, 札幌

住本 英樹, 宮野 佳, 水上 令子

活性酸素生成型 NADPH オキシダーゼの活性化の分子機構
第81回日本薬理学会年会, 2008年3月17日~19日, 横浜

宮野 佳, 住本 英樹

スーパーオキシド生成型 NADPH オキシダーゼ Nox1-Nox3 の活性化における低分子量 G タンパク質 Rac の役割
第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会, 2007年12月11~15日,

横浜

宮野 佳, 住本 英樹

スーパーオキシド生成酵素 Nox1-Nox3 の活性化における低分子量 G タンパク質 Rac の役割
第 18 回日本生体防学会学術総会, 2007 年 7 月 26 日 ~ 28 日, 福岡

〔図書〕(計 1 件)

住本 英樹, 前原 優一, 宮野 佳
活性酸素生成酵素 Nox/Duox の調節機構と酸化ストレス
診断と治療社, 酸化ストレスの医学, 2008 年, 12 22

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :