

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460372

研究課題名(和文) 殺菌に重要な活性酸素生成型NADPHオキシダーゼを構成する膜蛋白質の活性化機構

研究課題名(英文) Mechanism for interaction between Nox2 and p22phox: two membrane integrated proteins of the phagocytic oxidase

研究代表者

宮野 佳 (Miyano, Kei)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60444783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

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の安定化に必要な p22phox との結合部位に関して新たな知見を得た。また、活性化タンパク質依存と非依存性のNox1～Nox4の酵素活性化メカニズム、及びタンパク質成熟化に必要な翻訳後修飾の役割を明らかにした。

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, a membrane-spanning protein that forms a stable heterodimer with p22phox. In this study, I found that both N- and C-terminal regions play a crucial role in Nox binding to p22phox. Furthermore, I showed that the C-terminal part of Nox1, Nox2 and Nox4 play a role in activation of activator proteins-dependent or -independent activation of Nox family. I also found that the posttranslational modification plays a crucial role for the protein maturation of Nox.

研究分野：医歯薬学

キーワード：NADPHオキシダーゼ 活性酸素 Nox2 膜タンパク質 レドックスシグナル

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、生体内には反応性の高い活性酸素を積極的に利用している系も存在する。その1つが、食細胞である好中球による生体防御である。好中球は、生体内に侵入した病原体を貪食し、多量の活性酸素を生成し殺菌する。この活性酸素の生成源として働くのが「殺菌に重要な食細胞 NADPH オキシダーゼ」である。食細胞 NADPH オキシダーゼの酵素本体は、細胞膜貫通型タンパク質の Nox2 (Nox; NADPH oxidase) である (Nox2 の別名は gp91<sup>phox</sup>)。Nox2 の重要性は、その遺伝的欠損症である慢性肉芽腫症 (CGD; chronic granulomatous disease) で示される。CGD とは、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、幼少期より重篤な感染症を繰り返す遺伝疾患である。一方、無秩序な活性酸素の生成は、周辺組織の炎症を引き起こすため、Nox2 の活性は厳密に制御されていなくてはならない。実際に、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<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup> 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 (図 1)。しかしながら、活性化タンパク質の作用により、活性化に必要な Nox2 本体の構造変化 (すなわちスイッチのオン) がどのように引き起こされるかは、まったく分かっていなかった。また、Nox2 は同じく膜タンパク質のパートナー分子 p22<sup>phox</sup> と会合している (図 2)。p22<sup>phox</sup> の遺伝的欠損でも CGD が引き起こされることから、p22<sup>phox</sup> が Nox2 に会合することにより、Nox2 をタンパク質レベルで安定化すると考えられているが、そのメカニズムは不明なままであった。Nox2 のホモログであり、非食細胞に発現する Nox ファミリーメンバー (ヒトでは Nox1 から Nox5 までの 5 分子種) から生成される活性酸素は、血圧調節、平衡感覚に必須の耳石の形成、さらにはシグナル伝達分子と機能している。Nox2 と同様に、Nox1 や Nox3 も p22<sup>phox</sup> と会合している

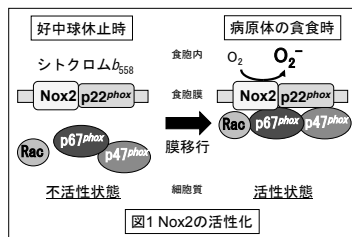


図1 Nox2の活性化

こと、可溶性の活性化タンパク質により酵素活性の制御を受けていることが知られている。一方、多様な発現パターンを示し、レドックスシグナル伝達の多くに関わっていると考えられている Nox4 は、p22<sup>phox</sup> と結合するものの、どのようなメカニズムで酵素活性を制御しているかどうかは不明なままであった。

2. 研究の目的

(1) Nox ファミリーのタンパク質成熟化におけるパートナー分子と翻訳後修飾の役割

本研究では、まず Nox2 と p22<sup>phox</sup> の会合に関わっている領域およびアミノ酸を同定し、Nox2 が安定化されるメカニズムを解明する。また、Nox2 は翻訳後修飾の1つであるグリコシル化を受けることが知られているが、その役割は不明なままであった。そこで、Nox2 (他の Nox ファミリーについても) のタンパク質の成熟化と安定化におけるグリコシル化の役割を明らかにすることを目的とした。

(2) 活性化タンパク質による Nox2 の活性化メカニズム

これまで、Nox2 が活性化タンパク質と複合体を形成することにより活性化されることが明らかにされてきたが、実際に酵素本体である Nox2 活性のスイッチをオンにする仕組みは、まったく分かっていなかった。活性化タンパク質は、Nox2 の細胞質領域 (活性酸素を生成するために必要な電子供与体の NADPH が結合する領域) に結合すると考えられている (図 3)。そこで、Nox2 の細胞質領域と活性化タンパク質との詳細な結合実験を行い、どのようにして Nox2 活性のスイッチをオンにするのか、そのメカニズムを明らかにすることを目指した。

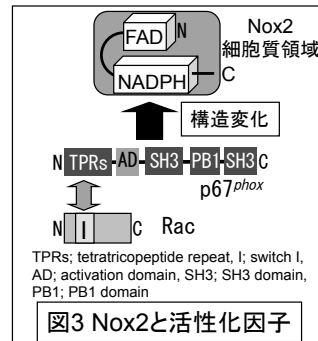


図3 Nox2と活性化因子

(3) Nox ファミリーの活性化メカニズム

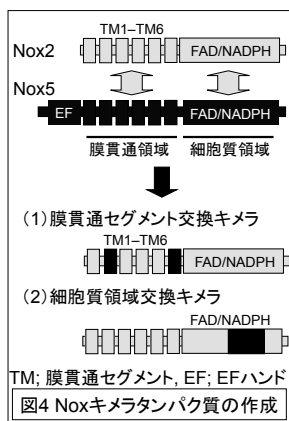
Nox2 に加え、その他の Nox の活性化メカニズムを検討した。Nox1 は、Nox2 と同様に可溶性の活性化タンパク質により酵素活性が制御されている。一方で、Nox4 は恒常的に活性酸素を生成していることが知られている。また、Nox5 は自身の N 末端細胞質領域に EF ハンド存在することから想像されるように細胞内カルシウム濃度により酵素活性が制御されている。本研究では、これらの Nox ファミリーの活性化メカニズムを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) Nox ファミリーのタンパク質成熟化におけるパートナー分子と翻訳後修飾の役割

#### ① Nox2 と p22<sup>phox</sup> の会合に関わる領域の同定

Nox5 は p22<sup>phox</sup> 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。この性質を利用して、Nox2 と Nox5 の6つの膜貫通セグメントを交換したキメラタンパク質を作成し(図4)、これらのNoxキメラ



タンパク質と p22<sup>phox</sup> との結合能を調べた。私が研究期間開始前までに確立した結合能を検討するための「培養細胞を用いた膜タンパク質 Nox ファミリーの発現・再構成法」、「膜タンパク質 Nox と p22<sup>phox</sup> の免疫沈降法」、「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」を用いた。また、細胞質領域についても同様の実験手法を用いて、p22<sup>phox</sup> との結合に必要な領域の同定を目指した。さらに、同定した領域内で報告されている 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 CGD の症例と照らし合わせつつ、p22<sup>phox</sup> との相互作用に重要なアミノ酸の同定を行い、Nox2 のタンパク質レベルでの安定化メカニズムを明らかにすることを試みた。本研究で得られた成果は、Nox2 のみならず p22<sup>phox</sup> と結合する Nox ファミリーが酵素活性を示すための最も重要なメカニズムを明らかにする上で貴重な情報をもたらすと考えられる。

#### ② Nox ファミリーの成熟化におけるグリコシル化の役割

タンパク質のグリコシル化は、多くの膜タンパク質の輸送の促進やタンパク質レベルでの安定化に寄与することが知られている。私は、研究期間開始までに、Nox ファミリーがグリコシル化の修飾を受けることを見出していた。そこでグリコシル化コンセンサス配列 (Asn-X-Ser/Thr) のアミノ酸置換した変異体を作成し、「安定性」、「p22<sup>phox</sup> との結合能」、「細胞表面への局在」(研究開始当初に、細胞表面タンパク質をビオチン標識して検出する方法を確立した)におけるグリコシル化の役割を調べた。

#### (2) 活性化タンパク質による Nox2 の活性化メカニズム

Nox2 の細胞質領域 (FAD/NADPH 結合ドメイン) に活性化タンパク質の p67<sup>phox</sup> が直接結合することにより Nox2 のスイッチをオンにすると考えられているが、その実態は不明なままであった。そこで、Nox2 の特に基質 (NADPH) 結合部位と p67<sup>phox</sup> の直接的な結合様式の詳細を *in vitro* 結合実験により調べた。

#### (3) Nox ファミリーの活性化メカニズム

Nox 間の細胞質領域と膜貫通領域を入れ替えたキメラタンパク質を作成し、「培養細胞を

用いた膜タンパク質 Nox ファミリーの発現・再構成法」、「膜タンパク質 Nox と p22<sup>phox</sup> の免疫沈降法」、「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」により、Nox1 と Nox2 の活性化に必要な活性化タンパク質がどの領域に作用しているのか、また活性化タンパク質に非依存性の恒常的な Nox4 活性がどの領域に依存しているのかどうかを検討した。

#### 4. 研究成果

(1) Nox ファミリーのタンパク質成熟化におけるパートナー分子と翻訳後修飾の役割

#### ① Nox2 と p22<sup>phox</sup> の会合に関わる領域の同定

Nox の特定の膜貫通セグメントと細胞質領域の一部が p22<sup>phox</sup> との結合に関わっていることを見出した。また、そのセグメント内のアミノ酸置換により CGD が引き起こされることが報告されており、実際にそのアミノ酸を置換すると、p22<sup>phox</sup> との結合能が失われた。これらの結果は、CGD の症例で報告されていた「これまで原因が不明であったアミノ酸置換による Nox2 タンパク質レベルの低下」が、Nox2-p22<sup>phox</sup> 間の相互作用の喪失により引き起こされていることを示した。

#### ② Nox ファミリーの成熟化におけるグリコシル化の役割

Nox1 は、Nox2 と同様に ER において p22<sup>phox</sup> と結合し、Golgi 体を経由し、コンプレックス型の N 型糖鎖を持つ Nox1 が細胞表面に局在する。興味深いことに、Nox1 は p22<sup>phox</sup> の非存在下でも細胞膜に局在し、それはハイマンノース型の持つものであった。しかしながら、細胞膜に到達したハイマンノース型糖鎖を持つ Nox1 は酵素活性を示さないことから、Nox1 のタンパク質レベルでの成熟化には p22<sup>phox</sup> との結合が重要であることが分かった。

#### (2) 活性化タンパク質による Nox2 の活性化メカニズム

活性化タンパク質の p67<sup>phox</sup> のいわゆる「活性化ドメイン」が Nox2 の活性化に重要であることは知られていたが、Rac-p67<sup>phox</sup>-Nox2 間の親和性は極めて低く、*in vitro* の結合実験などによる詳細な解析はなされないままであった。そこで私は、Rac と p67<sup>phox</sup> の融合タンパク質を作成し、Nox2 との結合を調べたところ、p67<sup>phox</sup> の活性化ドメインを介して直接的に Nox2 の基質 (NADPH) 結合部位に結合すること、またその結合が Nox2 の活性化剤であるアラキドン酸に依存することを見出した。これまでに、アラキドン酸は2つのスイッチである Rac と p47<sup>phox</sup> の活性化に必要であることは知られていた。本研究により p67<sup>phox</sup> と Nox2 の相互作用、すなわち第三のスイッチが存在すること、それをアラキドン酸がオンにすることを明らかにした。

#### (3) Nox ファミリーの活性化メカニズム

Nox 間の細胞質領域と膜貫通領域を入れ替えたキメラタンパク質の酵素活性を評価することにより、Nox2 と Nox1 の C 末端細胞質領

域がその活性化に必要とする活性化タンパク質因子の種類を決定していること、Nox4の恒常的な活性がC末端細胞質領域に依存していることを見出した。

以上の研究成果は、「5. 主な発表論文等」の項目の[雑誌論文]にある複数の原著論文と日本語総説(①~⑦)、及び[学会発表]にある複数の学会のシンポジウム等(①~⑥)にて発表した。

#### 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)

① 宮野 佳, 住本 英樹  
活性酸素生成型 NADPH オキシダーゼ (Nox) の活性化機構  
別冊 医学のあゆみ「レドックス UPDATE-ストレス制御の臨床医学・健康科学」, (2015) pp15-20, 査読あり

② 宮野 佳, 住本 英樹  
活性酸素によるチオール基の酸化と細胞調節  
細胞工学 (2015) **34**, pp377-378, 査読あり

③ Mayuki Watanabe, Masao Terasawa, Kei Miyano, Toyoshi Yanagihara, Takehito Uruno, Fumiyuki Sanematsu, Akihiko Nishikimi, Jean-François Côté, Hideki Sumimoto, Yoshinori Fukui  
DOCK2 and DOCK5 Act Additively in Neutrophils To Regulate Chemotaxis, Superoxide Production, and Extracellular Trap Formation.  
*J. Immunol.* (2014) **193**, pp5660-5667  
DOI 10.4049/jimmunol.1400885, 査読あり

④ Rumi Matono, Kei Miyano, Takuya Kiyohara, Hideki Sumimoto  
Arachidonic Acid Induces Direct Interaction of the p67<sup>phox</sup>-Rac Complex with the Phagocyte Oxidase Nox2, Leading to Superoxide Production.  
*J. Biol. Chem.*, (2014) **289**, pp24874-24884  
DOI 10.1074/jbc.M114.581785, 査読あり

⑤ Masahiro Abo, Reiko Minakami, Kei Miyano, Mako Kamiya, Tetsuo Nagano, Yasuteru Urano, Hideki Sumimoto  
Visualization of phagosomal hydrogen peroxide production by a novel fluorescent probe that is localized via SNAP-tag labeling.  
*Anal. Chem.*, (2014) **86**, pp5983-5990  
DOI 10.1021/ac501041w, 査読あり

⑥ Kei Miyano, Hideki Sumimoto  
N-linked glycosylation of the

superoxide-producing NADPH oxidase Nox1.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2014) **443**, pp1060-1065  
DOI 10.1016/j.bbrc.2013.12.086, 査読あり

⑦ 宮野 佳, 住本 英樹  
Noxによる活性酸素産生機構  
医学のあゆみ (2013) **247**, pp739-745, 査読あり

[学会発表] (計 6 件)

① 住本 英樹, 宮野 佳  
活性酸素生成型 NADPH oxidase の進化と動物における調節機構  
第 38 回 日本分子生物学会年会、第 88 回 日本生化学会大会 合同大会: ワークショップ [2W2-p] NADPH oxidase による活性酸素種の積極的生成と動物・植物・菌類の高次生命機能, 神戸, 2015 年 12 月 1 日~4 日

② 宮野 佳, 住本 英樹  
活性酸素生成型 NADPH オキシダーゼ 1 (Nox1) の細胞膜輸送と活性化におけるパートナー分子 p22<sup>phox</sup> の役割  
第 26 回 日本生体防御学会学術総会, 浅草, 2015 年 7 月 10 日~12 日

③ 宮野 佳, 住本 英樹  
スーパーオキシド生成酵素 NADPH オキシダーゼ 1 (Nox1) の N 結合型糖鎖修飾  
第 87 回 日本生化学会大会, 京都, 2014 年 10 月 15 日~18 日

④ Kei Miyano, Hideki Sumimoto  
Role for a conserved region of the superoxide-producing NADPH oxidase 5 (Nox5)  
第 36 回 日本分子生物学会年会, 神戸, 2013 年 12 月 3 日~6 日

⑤ 宮野 佳, 住本 英樹  
細胞刺激に応じた活性酸素生成型 NADPH オキシダーゼ 5 (Nox5) の活性化における N 末端細胞質領域の役割  
第 86 回 日本生化学会大会, 横浜, 2013 年 9 月 11 日~13 日

⑥ 宮野 佳, 住本 英樹  
活性酸素生成酵素 NADPH オキシダーゼ 5 (Nox5) の活性化における N 末端機能領域の役割  
第 24 回 日本生体防御学会学術総会, 熊本, 2013 年 7 月 10 日~12 日

[図書] (計 1 件)

① 住本 英樹, 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  
酸化ストレスの医学 (吉川敏一監修, 内藤裕二・豊国伸哉編) 第二版 pp. 10-20

診断と治療社，東京，2014年9月1日

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・助教  
研究者番号：60444783