

令和元年6月7日現在

機関番号：17102

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26111009

研究課題名(和文) 活性酸素生成の時空間的制御と細胞機能調節

研究課題名(英文) Spatiotemporal control of reactive oxygen production and regulation of cellular functions

研究代表者

住本 英樹 (Sumimoto, Hideki)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：30179303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 88,700,000円

研究成果の概要(和文)：活性酸素生成酵素NADPHオキシダーゼ(Nox)の時空間的制御機構を解明するために、高解像度の共焦点レーザー顕微鏡および生化学的な種々の方法を駆使して、以下のようなことを明らかにした。(1) Noxファミリーの中でNox2とNox5は異なる経路で細胞膜に輸送される。(2) Nox2の活性化には、低分子量Gタンパク質Racが結合したp67phoxが、そのactivation domainを介してNox2と直接相互作用することが必要である。(3) Noxが生成するROSは、他のタンパク質の成熟化(正確なジスルフィド結合形成)に重要な働きをもつ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸素分子に由来する活性酸素は、その高い反応性のために、時として細胞を傷つけることが知られている。一方、しかるべき場所で生成された適量の活性酸素は生体機能の維持に必要であり、そのために活性酸素を生成するために特化した一群の酵素NADPHオキシダーゼ(Nox)が存在する。本研究では、Noxが細胞内のしかるべき場所に輸送されるための経路、そこでNoxが活性化されて活性酸素を生成できるようになるための分子メカニズム、その結果引き起こされる現象のひとつとしてタンパク質の成熟化があること等を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To clarify spatiotemporal control of the reactive oxygen-producing NADPH oxidase (Nox), we have performed biochemical and microscopic experiments and obtained many findings including the following results: (1) among the Nox family, Nox2 and Nox5 are recruited to the plasma membrane in different manners; (2) activation of Nox2 requires its interaction with the activation domain of p67phox bound to the small GTPase Rac; and (3) Nox plays a crucial role in maturation of other proteins, especially correct formation of disulfide bonds.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：活性酸素 シグナル伝達 タンパク質 NADPHオキシダーゼ Nox

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類から微生物に至るまで、酸素分子に由来する活性酸素種 (ROS) は細胞内外のシグナル分子として機能するが、その生成は適切な量が適切な部位でなされる必要がある。ROS は極めて高い反応性を持ち、過剰なあるいは不適切な部位での ROS 生成は細胞傷害・組織傷害の原因となるからである。しかし、細胞内における ROS の生成制御機構には不明な点が多い。また、ROS 生成系が ROS センサー分子の機能調節にどのようにカップリングしているのかもよく分かっていない。

(2) ROS の生成制御には、種々の刺激に応答して、基質である酸素分子濃度に応じて ROS を生成する酵素 Nox が重要であると考えられてきた。ヒト Nox ファミリーには、Nox1-Nox5 と Duox1/Duox2 の 7 分子種が存在し、それぞれ異なる機構で活性化され ROS を生成するようになる。例えば、Nox2 の活性化には、低分子量 G タンパク質 Rac と p47^{phox} (Nox2 活性化タンパク質で p67^{phox} や p40^{phox} と恒常的に結合) が活性型となり Nox2 と直接相互作用することが必須である。また、Nox1 の活性化には Rac に加えて Nox1 と Nox1 (ともに住本らが同定・クローニングしたタンパク質) が必要であり、Nox5 は Ca²⁺により直接活性化される。一方、住本らが同定・クローニングした Nox4 は、恒常的に活性をもつと考えられており、Nox4 タンパク質の量的調節が ROS 生成制御に直結すると思われる。

(3) 一方、大腸菌などの原核生物および真核生物の一部(出芽酵母を含む)には、Nox は存在しないが、酸素シグナリングにおいてそれぞれに特有のシステムを発達させている。例えば、分担研究者の高木が明らかにしたように、出芽酵母のゲノム上には哺乳類 NO 合成酵素のオルソログが存在しないが、高温処理などの ROS レベルが上昇する酸化ストレス下で、フラボタンパク質 Tah18 がアルギニンから NO を合成し、細胞の酸化ストレス耐性に寄与する。また、同様に高木は、大腸菌や酵母のイオウ同化経路の一つであるチオ硫酸経路から生じる亜硫酸イオンが、シグナル分子として作用しイオウ同化を制御している可能性を見出していた。

2. 研究の目的

細胞の種類毎に、発現する Nox 分子種は異なる。例えば、好中球などの食細胞には Nox2 が、大腸上皮細胞には Nox1 が、腎臓遠位尿細管上皮細胞や血管内皮細胞には Nox4 が、それぞれ主な Nox として存在している。Nox は膜タンパク質であるが、Nox がそれぞれの細胞においてどの膜コンパートメントに局在するのか、その局在がどのように調節されるのか、細胞内局所における Nox の ROS 生成はどのように制御されるのか (Nox 調節分子による制御、基質である酸素濃度の効果など)、さらには哺乳類細胞の機能調節に Nox がどのようにカップルしているのか等については不明な点が多い。本研究では、「ROS が仲介する酸素によるシグナル制御」の観点から、上記の課題に取り組む。また、分担研究者の高木により、微生物の酸素シグナル制御の解明を行う。これは、生物多様性の理解にも寄与し、哺乳類細胞では未だ見出されていない制御系 (Nox の存在の為に一見隠されていた制御系) の発見の緒となることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 刺激応答型 ROS 生成酵素 Nox の時空間的制御機構:

種々の Nox の細胞内局在を規定する因子 (翻訳後修飾や Nox 結合タンパク質など) を同定するとともに、局所での ROS 生成の詳細な制御機構 (Nox 活性調節分子の役割・作用機構など) を、高解像度の共焦点レーザー顕微鏡および生化学的細胞分画法などを用いて明らかにする。また、種々の Nox が細胞膜や種々の細胞内コンパートメントのどこでどのように活性化されるかを解

明するため、細胞内局所で空間特異的に ROS を検出し time lapse 測定が可能な蛍光プローブを浦野 (A03 班) と共同開発する。

(2) Nox 活性化とカップルした哺乳類細胞の機能調節 :

西田 (A02 班)、森 (A01 班) らと共同して、ROS センサーとして働く TRP タンパク質 (例えば Ca^{2+} チャンネルである TRPC3 など) と Nox の関連について明らかにする。また、住本らは、Nox4 が小胞体 (endoplasmic reticulum; ER) での ROS 生成に関与することを見出しており、ER での Nox4 の役割を解明する。

(3) 酵母の NO 合成制御機構 :

高木らは、酸化ストレス下で Tah18 タンパク質依存的に NO を合成し、それが抗酸化に寄与することを見出しており、Tah18 と複合体を形成する Dre2 タンパク質が ROS センサーとして応答し、Tah18 から解離することで NO 合成を誘導する機構を解明する。

(4) 微生物のイオウ同化制御機構 :

また、チオ硫酸経路から生じる亜硫酸イオンがシグナルとしてイオウ同化制御に関わる可能性があり、スルホ化タンパク質の同定とその活性制御および ROS との関連を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 「刺激応答型 ROS 生成酵素 Nox の時空間的制御機構」に関して :

① Nox1、Nox2、および Nox5 は細胞膜に移行してそこで ROS 生成を行うが、それぞれの輸送経路については殆ど知られていなかった。Nox2 は、小胞体 (ER) から COPII 小胞としてゴルジ体に輸送され最終的に細胞膜に至る古典的経路 (低分子量 G タンパク質 Sar1 および t-SNARE タンパク質 Stx5 に依存) で細胞膜へ輸送されること、この輸送には Nox2 の N 型糖鎖修飾が必須であることを明らかにした。一方、N 型糖鎖修飾を受けない Nox5 は、主として小胞体からゴルジ体を経ない (Sar1 にも Stx5 にも依存しない) 新規な経路で細胞膜に輸送されることを示した。さらに、Nox1 は N 型糖鎖修飾の有無に関わらずの細胞膜への輸送は、従来型経路と新規経路の両者の経路を用いることを示した (*Genes Cells* 23, 480–493, 2018)。

② Nox2 および Nox3 は膜タンパク質 p22^{phox} と 2 量体を形成して安定化され細胞膜に輸送されるが、一方、Nox5 は p22^{phox} とは全く相互作用しない。p22^{phox} とのヘテロ 2 量体形成に必要な Nox2 の領域を決定し、その領域のアミノ酸変異により引き起こされる慢性肉芽腫症 (Nox2 の欠損により起こる遺伝性疾患 ; 好中球による ROS 生成ができないため、病原性微生物に対する殺菌能が著しく低下し、しばしば死に至る重篤な感染症を繰り返す疾患) のメカニズムを明らかにした。さらに、Nox5 の安定化に重要な領域を明らかにし、この領域が他の Nox も安定化できることを示した (論文投稿中)。

③ アラキドン酸は最も強力な Nox2 活性化作用を持つことが知られていたが、その作用機構は不明であった。アラキドン酸が、細胞レベルで低分子量 G タンパク質 Rac の強い活性化作用を持つことを示すとともに、活性化型 Rac が結合すると p67^{phox} (Nox2 活性化タンパク質) が自身の activation domain を介して Nox2 の直接相互作用することで、スーパーオキシド (ROS の 1 種) の生成を誘導することを明らかにした (*J. Biol. Chem.* 289, 24874–24884, 2014)。

④ ROS 生成の細胞内部位特異的検出を行うために、新規な蛍光プローブ NBzF-BG を用いた過酸化水素 (ROS の 1 つ) の測定法を開発し、これを用いて好中球の食作用時における食胞内での ROS 生成を継時的に測定することに成功した (*Anal. Chem.* 86, 5983–5990, 2014)。

⑤ 上皮細胞においては、Nox1、Nox2、Duox1、Duox2 は apical 側の細胞膜に局在する。このそれぞれの apical 膜局在に必要な領域とそれに必要な相互作用するタンパク質を同定した (論文投

稿中)。

(2) 「Nox 活性とカップルした哺乳類細胞の機能調節」に関して：

① Nox2 は、心筋細胞において ROS 感受性 Ca²⁺チャンネルである TRPC3 タンパク質と複合体を形成することを示し、この複合体形成により、TRPC3 は安定化されて Ca²⁺チャンネル活性が上昇すること、一方 Nox2 の ROS 生成も正に制御されることを明らかにした (*Sci. Rep.* 6, 37001, 2016 ; *Sci. Rep.* 6, 39383, 2016)。また、doxorubicin 等の薬剤による心筋萎縮に TRPC3-Nox2 複合体が関与することを示した (*JCI Insight* 2, e93358, 2017)。

② 細胞内において Nox4 は主として小胞体に局在するが、この Nox4 が小胞体に retention するメカニズムを明らかにするとともに、Nox4 タンパク質量の増加が小胞体における ROS 生成に直結することを示した。さらに、Nox4 が、小胞体における他のタンパク質の成熟化 (正確なジスルフィド結合形成、すなわち「正確なタンパク質の酸化的フォールディング」) において重要な役割を果たすことを明らかにした (論文投稿中)。この結果は、Nox が生成する ROS が「正確なタンパク質の酸化的フォールディング」に直接関与することを示した世界で初めての例である。

(3) 「酵母の NO 合成制御機構」に関して

① Dre2 が Tah18 依存的な NO 合成酵素活性を阻害すること、酸化ストレス (過酸化水素、高温など) に応答し、Tah18-Dre2 複合体が解離することから、新規な NO 合成制御機構を提唱した (*Nitric Oxide* 57, 85–91, 2016)。また、両者の哺乳類オルソログ (Ndor1, Ciapin1) の機能を解析し、この NO 合成制御機構が哺乳類にも保存されている可能性を見出している (論文投稿中)。

② NO は、高温・酸化ストレスから酵母を保護すること (*PLoS One* 9, e113788, 2014; *Nitric Oxide* 52, 29–40, 2016)、高濃度の過酸化水素処理条件で合成される過剰量の NO は細胞死を誘導することを示し (*Nitric Oxide* 57, 85–91, 2016)、酵母における NO の正負二面性を明らかにした (*Appl. Microbiol. Biotech.* 100, 9483–9497, 2016; *Adv. Microb. Physiol.* 72, 29–63, 2018)。

(4) 「微生物のイオウ同化制御機構」に関して：

チオ硫酸塩からのシステイン合成経路の存在が示唆された酵母を用いた解析により、酵母においてもチオ硫酸イオンを単一硫黄源に用いると、細胞内に亜硫酸イオンや硫化物イオンが増加すること、チオ硫酸硫黄転移酵素を介した経路によってチオ硫酸イオンが亜硫酸イオンおよび硫化物イオンへ変換され、硫酸イオンの同化経路へ合流することを明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 57 件)

① [Sumimoto H](#), Minakami R & Miyano K. Soluble regulatory proteins for activation of NOX family NADPH oxidases. *Methods Mol. Biol.*, in press (2019) (査読有)

② Kiyohara T, Miyano K, Kamakura S, Hayase J, Chishiki K, Kohda A & [Sumimoto H](#). Differential cell surface recruitment of the superoxide-producing NADPH oxidases Nox1, Nox2, and Nox5: the role of the small GTPase Sar1. *Genes Cells* 23, 480–493 (2018) (査読有)

DOI: 10.1111/gtc.12590

③ Matsuyama S, Kage Y, Fujimoto N, Ushijima T, Tsuruda T, Kitamura K, Shiose S, Asada Y, [Sumimoto H](#) & Takeya R. Interaction between cardiac myosin-binding protein C and formin Fhod3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, E4386–E4395 (2018) (査読有)

DOI: 10.1073/pnas.1716498115

④ Ushijima T, Fujimoto N, Matsuyama S, Kan-o M, Kiyonari H, Shioi G, Kage Y, Yamasaki S, Takeya R & [Sumimoto H](#). The actin-organizing formin protein Fhod3 is required for postnatal development and functional maintenance of the adult heart in mice. *J. Biol. Chem.* 293, 148–162 (2018) (査読有)

DOI: 10.1074/jbc.M117.813931

⑤ Astuti RI, Nasuno R & [Takagi, H](#). Nitric oxide signaling in yeast. *Adv. Microb. Physiol.* 72, 29–63 (2018) (査読有)

DOI: 10.1016/bs.ampbs.2018.01.003

⑥ Yamazaki S, Tanaka Y, Araki H, Kohda A, Sanematsu F, Arasaki T, Duan X, Miura F, Katagiri T, Shindo R, Nakano H, Ito T, Fukui Y, Endo S & [Sumimoto H](#). The AP-1 transcription factor JunB is required for Th17 cell differentiation. *Sci. Rep.* 7, 17402 (2017) (査読有)

DOI: 10.1038/s41598-017-17597-3

⑦ Shimauchi T, Numaga-Tomita T, Ito T, Nishimura A, Matsukane R, Oda S, Hoka S, Ide T, Koitabashi N, Uchida K, [Sumimoto H](#), Mori Y & Nishida M. TRPC3-Nox2 complex mediates doxorubicin-induced myocardial atrophy. *JCI Insight* 2, e93358 (2017) (査読有)

DOI: 10.1172/jci.insight.93358

⑧ Chishiki K, Kamakura S, Hayase J & [Sumimoto H](#). Ric-8A, an activator protein of Gai, controls mammalian epithelial cell polarity for tight junction assembly and cystogenesis. *Genes Cells* 22, 293–309 (2017) (査読有)

DOI: 10.1111/gtc.12477

⑨ Numaga-Tomita T, Kitajima N, Kuroda T, Nishimura A, Miyano K, Yasuda S, Kuwahara K, Sato Y, Ide T, Birnbaumer L, [Sumimoto H](#), Mori Y & Nishida M. Microtubule-localized TRPC3-GEF-H1 axis underlies pressure overload-induced cardiac fibrosis. *Sci. Rep.* 6, 39383 (2016) (査読有)

DOI: 10.1038/srep39383

⑩ Chishiki K, Kamakura S, Hayase J, Yuzawa S & [Sumimoto H](#). Ric-8A-mediated stabilization of the trimeric G protein subunit Gai is inhibited by pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 483, 941–945 (2017) (査読有)

DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.01.036

⑪ Kohda A, Yamazaki S & [Sumimoto H](#). The nuclear protein I κ B ζ forms a transcriptionally active complex with nuclear factor- κ B (NF- κ B) p50 and *Lcn2* promoter via the N- and C-terminal ankyrin repeat motifs. *J. Biol. Chem.* 291, 20739–20752 (2016) (査読有)

DOI: 10.1074/jbc.M116.719302

⑫ Kitajima N, Numaga-Tomita T, Watanabe M, Kuroda T, Nishimura A, Miyano K, Yasuda S, Kuwahara K, Sato Y, Ide T, Birnbaumer L, [Sumimoto H](#), Mori Y & Nishida, M. TRPC3 positively regulates reactive oxygen species driving maladaptive cardiac remodeling. *Sci. Rep.* 6, 37001 (2016) (査読有)

DOI: 10.1038/srep37001

⑬ Astuti RI, Nasuno R & [Takagi H](#). Nitric oxide signaling in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 9483–9497 (2016) (査読有)

PMID: 27722918

⑭ Yoshikawa Y, Nasuno R, Kawahara N, Nishimura A, Watanabe D & [Takagi H](#). Regulatory mechanism of the flavoprotein Tah18-dependent nitric oxide synthesis and cell death in yeast. *Nitric Oxide* 57, 85–91 (2016) (査読有)

DOI: 10.1016/j.niox.2016.04.003

⑮ Nasuno R, Hirase S, Norifune S, Watanabe D & [Takagi H](#). Structure-based molecular design for thermostabilization of *N*-acetyltransferase Mpr1 involved in a novel pathway of L-arginine synthesis in yeast. *J. Biochem.* 159, 271–277 (2016) (査読有)

DOI: 10.1093/jb/mvv101

⑯ Yuzawa S, Kamakura S, Hayase J & [Sumimoto H](#). Structural basis of cofactor-mediated stabilization and substrate recognition of the α -tubulin acetyltransferase α TAT1. *Biochem. J.* 467, 103–113 (2015) (査読有)

DOI: 10.1042/BJ20141193

⑰ Yamazaki S, Akira S & [Sumimoto H](#). Glucocorticoid augments lipopolysaccharide-induced activation of the I κ B ζ -dependent genes encoding the anti-microbial glycoproteins lipocalin 2 and pentraxin 3. *J. Biochem.* 157, 399–410 (2015) (査読有)

DOI: 10.1093/jb/mvu086

⑱ Matono R, Miyano K, Kiyohara T & [Sumimoto H](#). Arachidonic acid induces direct interaction of the p67^{phox}-Rac complex with the phagocyte oxidase Nox2, leading to superoxide production. *J. Biol. Chem.* 289, 24874–24884 (2014) (査読有)

DOI: 10.1074/jbc.M114.581785

⑲ Abo M, Minakami R, Miyano K, Kamiya M, Nagano T, Urano Y & [Sumimoto H](#). Visualization of

phagosomal hydrogen peroxide production by a novel fluorescent probe that is localized via SNAP-tag labeling. *Anal. Chem.* 86, 5983–5990 (2014) (査読有)

DOI: 10.1021/ac501041w

② Nasuno R, Aitoku M, Manago Y, Nishimura A, Sasano Y & Takagi H. Nitric oxide-mediated antioxidative mechanism in yeast through the activation of the transcription factor Mac1. *PLoS One* 9, e113788 (2014) (査読有)

DOI: 10.1371/journal.pone.0113788

〔学会発表〕(計 113 件)

① Hideki Sumimoto. Localization, Regulation and Function of NOX family Oxidases; Gordon Research Conference on NOX Family NADPH Oxidases, Les Diablerets, Switzerland, May-June, 2018 (招待講演)

② 住本英樹. 細胞のストレス応答とその生体反応; 平成 29 年度日本生化学会九州支部例会, 宮崎市, 2017 年 5 月 (招待講演)

③ 住本英樹. Regulatory mechanism for the superoxide-producing neutrophil NADPH oxidase in host defense; 第 90 回日本細菌学会総会 国際シンポジウム「Redox signaling in host defense and oxidative stress」, 仙台市, 2017 年 3 月 (招待講演)

④ Hiroshi Takagi. Synthetic Mechanism and Physiological Role of Nitric Oxide in Yeast. Gordon Research Conference on Nitric Oxide, Ventura, CA, USA, February, 2017 (招待講演)

⑤ 住本英樹. レドックスシグナルに関与する活性酸素生成型 NADPH オキシダーゼ(Nox)の細胞内局在化機構; 第 89 回日本生化学会大会 シンポジウム「オルガネラ環境を制御するレドックスシグナル」, 仙台市, 2016 年 9 月 (招待講演)

⑥ 住本英樹. 活性酸素生成型 NADPH オキシダーゼ(Nox)の構造と調節機構; 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会, 仙台市, 2016 年 8 月 (特別講演)

⑦ 宮野佳, 住本英樹. 哺乳類の生体防御に重要な食細胞 NADPH オキシダーゼの活性酸素生成機構; 第 27 回日本生体防御学会学術総会 シンポジウム「活性酸素が支える生体防御力」, 福岡市, 2016 年 6 月 (招待講演)

⑧ 住本英樹. 活性酸素生成酵素 NADPH オキシダーゼ (Nox) ファミリーの調節機構; 第 16 回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ「蛋白質の機能修飾から読み解く酸素生物学」, 福岡市, 2016 年 6 月 (招待講演)

⑨ 住本英樹. 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 (招待講演), 神戸市, 2015 年 12 月 (招待講演)

⑩ 住本英樹. 好中球の機能とレドックス制御; レドックスシンポジウム 酸素生物学の誕生, 名古屋市, 2014 年 10 月 (招待講演)

〔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; 酸化ストレスの医学 改訂第 2 版 (吉川敏一監修, 内藤裕二・豊國伸哉編集), pp. 10–20, 診断と治療社 (2014)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 高木 博史

ローマ字氏名: (TAKAGI, hiroshi)

所属研究機関名: 奈良先端科学技術大学院大学

部局名: バイオサイエンス研究科

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 50275088