

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19510219
 研究課題名 (和文) 細胞増殖に関わる O_2^- 生成型 NADPH oxidase の分子基盤と活性化機構
 研究課題名 (英文) Molecular basis and activation mechanism for O_2^- -generating NADPH oxidase involving cell proliferation
 研究代表者
 田村 実 (TAMURA MINORU)
 愛媛大学・理工学研究科・准教授
 研究者番号：00128349

研究成果の概要：

ヒト大腸癌細胞Caco-2の O_2^- 生成酵素Nox1を無細胞系で活性化することに成功した。培養したCaco-2から形質膜を分離し、遺伝子工学により創成した、2つの活性化因子の融合タンパク質 p51N-Racと混ぜ、FADとNADPHを加えると O_2^- が発生した。p51NとRacの相互作用を損なわせた変異体は活性化を起さなかった。細胞を予めTNF α で刺激しておくと O_2^- 生成活性は上昇した。一方血管平滑筋細胞A10についても形質膜を分離し、上述のやり方でNox1の O_2^- 生成活性を見ることに成功した。ここではp47を加えるとさらに活性化が見られた。A10を予めアンジオテンシンIIで刺激しておくと活性は40%ほど上昇した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：酵素, 生体生命情報学, 発生分化, シグナル伝達, 活性酸素

1. 研究開始当初の背景

O_2^- 生成型NADPH oxidase (Nox)は1970年代に食細胞に発見され、病原菌を貪食する際の殺菌剤としてこの活性酸素を発生する酵素として知られてきた。この酵素はそのままでは不活性であり、刺激に応じて複数の活性化因子が集まって形質膜に複合体を形成し、初めて活性を発現する。1999年になって、Noxのホモログがあいついで発見され、

その分布は様々な組織器官にわたることが明らかになってきた。このうちNox1は、発生する O_2^- (および派生する H_2O_2) によって細胞増殖に関わっていると思われる

一方で O_2^- の過剰な産生は様々な病気の原因になるため Nox1 の活性制御は厳密になさなければならない。しかし、そのしくみについてはいまだ不明な点が多い。また、細胞外へ放出される O_2^- がどのようにして細

胞内にシグナルとなるのか、その機構は謎である。(田村, 生化学 2008)

本研究では上述のように身体にとって極めて重要なが、不明な点の多い Nox1 の活性化のしくみについて、またシグナル分子としての O_2^- の生成の制御について解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 大腸癌細胞の培養

培地は MEM 用い、ウシ胎児血清 10 % と、抗生物質としてペニシリン、ストレプトマイシンを添加し、37 °C、CO₂ 濃度 5 % でディッシュ 30 枚分を培養した。コンフルエントになる前日に、半分の 15 枚のディッシュに腫瘍壊死因子 TNF- α を dish1 枚あたり 20ng/ml 加えて 24 時間刺激した。

(2) 血管平滑筋細胞の培養

ラット血管平滑筋細胞 A10 を培養し、形質膜画分をとってそれを酵素源とし、無細胞系でこれらの活性化因子を添加して Nox1 の活性化を試みた。培地と培養条件は上記と同じようにして行った。また、コンフルエントになる前日に、半分の 15 枚分に、Nox1 と p41 の発現が上昇するといわれている腫瘍壊死因子 TNF- α を dish1 枚あたり 20ng/ml 加えて 24 時間刺激した。

(3) 形質膜の分離

培養したヒト大腸上皮細胞 Caco-2 細胞およびラット血管平滑筋細胞 A10 からショ糖密度勾配法により形質膜画分を取った。

(4) 活性化因子からなる融合タンパク質の発現と生成

遺伝子工学により 2 つの活性化因子 Rac と p51^{Nox} の短縮型 (1-211) の融合タンパク質 p51N-Rac を創成した。pGEX ベクターを用い大腸菌 BL21 で発現後、G-Sepharose、および CM Sepharose を用いて精製した。

(5) O_2^- 生成活性測定

形質膜に上記の融合タンパク p51N-Rac と補酵素 FAD を加え、電子供与体 NADPH (または NADH) を添加してシトクロム還元法によりスーパーオキシド O_2^- の発生を測定した。

4. 研究成果

(1) 大腸癌細胞の Nox1 の性質

ヒト大腸癌の培養細胞である Caco-2 の Nox1 を無細胞系で活性化することに世界で初めて成功した。Caco-2 細胞から分画した形質膜画分を p51N-Rac と混ぜ、FAD と電子供与体を添加すると O_2^- が発生した。電子供与体としては、NADPH が親和性においても、反応速度においても NADH にまさっていた。活性化には SDS など両親媒性アニオンの存在は不要であった。活性化はフラビン酵素阻害剤である diphenylene iodonium で阻害された。この系にもうひとつの活性化因子である p41 の短縮型を加えたと

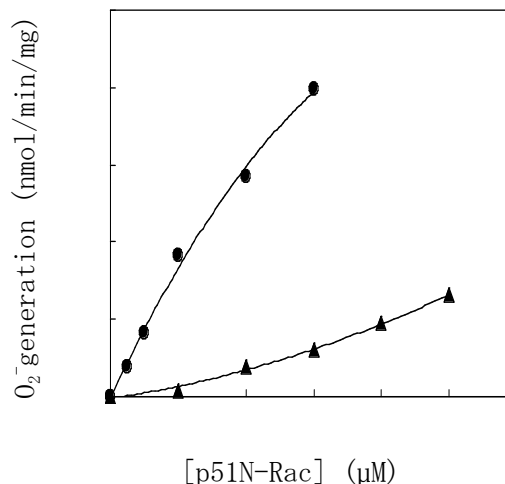


図 1 ヒト大腸癌細胞の形質膜による O_2^- 生成活性—無細胞系での Nox1 活性化—

ころ、 V_{max} はいくらか増加したが、 EC_{50} は変わらなかった。至適条件でのスーパーオキシド生成の V_{max} はおよそ 1,100 (nmol/min/mg 形質膜タンパク質) であった。

一方、p51N と Rac の分子内相互作用が損なわれた変異体 p51N-Rac (A27K) を用いたところ。ほとんど活性化を起さなかった。さらに p51N-Rac は、好中球の O_2^- 生成酵素である Nox2 も活性化することが見いだされた。このことは p51^{Nox} が Nox1 のみならず他の Nox も活性化する多目的な活性化因子であることを示した。その後 p41^{Nox} 全長は短縮型より高い活性化能をもっていることも明らかになった。

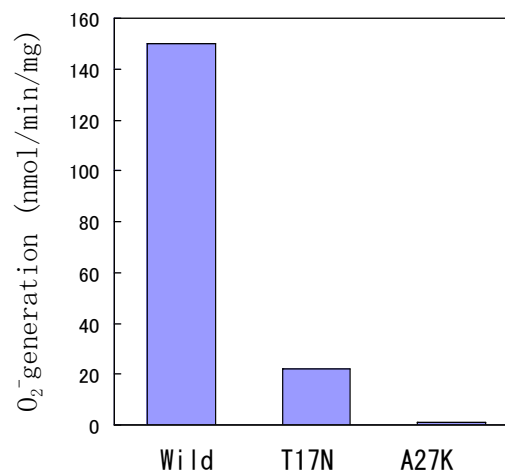


図 2 活性化因子 p51N-Rac の変異と O_2^- による影響

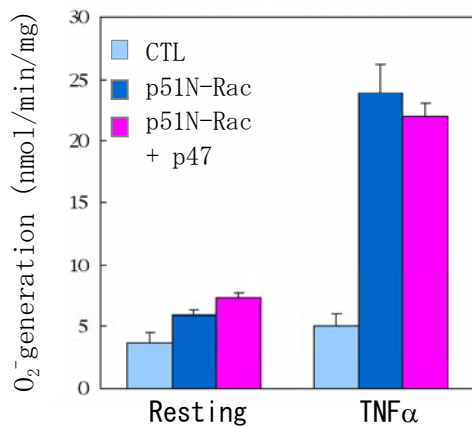


図3 大腸癌細胞の形質膜による O_2^- 生成活性とTNF α 刺激による活性化

(2)大腸癌細胞Nox1の活性化

Caco-2を予め腫瘍壊死因子TNF α で刺激しておく、分画した形質膜は上記の無細胞系での測定でスーパーオキシド生成活性が4倍以上を昇することを見いだした。

(3) 血管平滑筋細胞のNox1一活性化と性質

血管平滑筋細胞A10について、形質膜を分画し、上述のNox1-Racを加えて無細胞系でNox1の活性を見ることに成功した。この場合血管平滑筋における活性化因子と目されるp47による活性化が見られた。 O_2^- 生成活性はA10を予めアンジオテンシンIIで刺激しておく、と40%ほど上昇した。

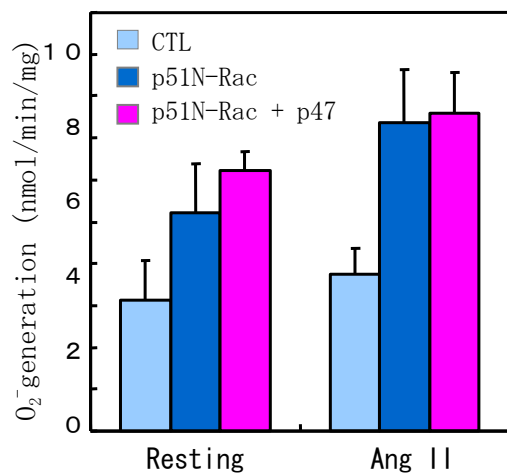


図4 血管平滑筋細胞形質膜の Nox 活性に与えるアンジオテンシン II の影響

(4) 新たな活性化因子の検索

β -Pix を大腸菌で発現させ精製を試みた。今後この β -Pix を用いて、Nox1 活性化への関わりとシグナル伝達における役割について細胞と無細胞系両方を用いて検討してゆき

たい。その他安定化因子と思われる β -アクチンについてこれを簡便に得る方法を確立した。

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3件)

1. Yukio Nisimoto, Ryoko Tsubouchi, Diebold Becky A. Shanlou Qiao, Hisamitsu Ogawa, Takuya Ohara, and Minoru Tamura.

Activation of NADPH oxidase1 in tumor colon epithelial cell, *Biochem. J.*, 415, 57-65, 2008 査読有

2. 田村 実

外に出た O_2^- はどのようにして細胞内シグナルとなるのか? 蛋白質・核酸・酵素 53, 1797, 2008 査読無

3. Minoru Tamura, Ichiro Shiozaki, Shohei Ono, Kei Miyano, Sachio Kunihiro, Takayuki Sasaki,

p40^{phox} as an alternative organizer to p47^{phox} in Nox2 activation, *FEBS Lettes* 581, 4533-4538, 2007 査読有

[学会発表] (計6件)

1. 田村 実、伊藤 克法、國廣 幸雄、秋田宏、原垣内 美保子

大腸菌を用いたヒト β -アクチンの調製法、*BMB* 2008, H. 20. 12. 12, 神戸ポートアイランド

2. 塩崎 猪一郎、佐々木 孝幸、水木 一洋、國廣 幸雄、宮野 佳、田村 実

p47^{phox} の代替因子としてのp40^{phox}の再発見—食細胞NADPH oxidase 活性化において—, *BMB* 2007, H. 19. 12. 13, パシフィコ横浜

3. 吉成 光市、宮本 和浩、坪内 涼子、西本 行男、田村 実、

NADPH oxidase1 (Nox1) の無細胞活性化系の確立、*BMB* 2007, H. 19. 12. 13, パシフィコ横浜

4. 水木 一洋、木綱 崇之、菅 裕未佳、堀弘幸、田村 実、

NADPH oxidase成分タンパク質gp91^{phox} およびRacの無細胞タンパク質合成の試み、*BMB* 2007, H. 19. 12. 13, パシフィコ横浜

5. 楠野 太郎、吉成 光市、水木 一洋、坪内涼子、西本 行男、田村 実

ヒト大腸 NADPH oxidase1 (Nox1) の活性化機構, 日本生化学会中国・四国支部会,
H. 19. 5. 20, 高知市文化プラザ

6. 塩崎 猪一郎, 佐々木 孝幸、小野 征平、
國廣 幸雄、田村 実

p40^{phox} : p47^{phox} のalternative factorとしての再発見—食細胞NADPH oxidase活性化において, 日本生化学会中国・四国支部会,
H. 19. 5. 20, 高知市文化プラザ

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.adm.ehime-u.ac.jp/~achem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 実 (TAMURA MINORU)

愛媛大学・理工学研究科・准教授

研究者番号 : 00128349

(2) 研究分担者

住本英樹 (SUMIMOTO HIDEKI)

九州大学・医学研究科・教授

研究者番号 : 30179303

(平成 19 年度)

(3) 連携研究者

住本英樹 (SUMIMOTO HIDEKI)

九州大学・医学研究科・教授

研究者番号 : 30179303

(平成 20 年度)