

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 26 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21510227

研究課題名（和文） 細胞増殖のシグナル伝達に関わる NADPH オキシダーゼ 1 の活性化と
情報伝達機構研究課題名（英文） Mechanisms for activation and signaling of NADPH oxidase 1 involved
in cell proliferation

研究代表者

田村 実 (TAMURA MINORU)

愛媛大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：00128349

研究成果の概要（和文）：

Nox1 の活性化因子 Noxa1 を大腸菌で発現、精製する方法を確立した。また活性化に影響を与えると思われる β Pix および β アクチンが大腸菌で発現する方法を確立した。Nox1 の酵素源として大腸癌 Caco-2 細胞の形質膜を分画し、他の因子と会合させて無細胞系での Nox1 の活性化法を確立し、活性化の基本的な性質を明らかにした。さらに Nox2 をブタ好中球から精製し、純粋無細胞系で Noxa1 および Noxo1, Rac を用いて活性化し、Noxa1 の Nox2 活性化能およびキネティクスを明らかにした。Nox1 を発現するモデル細胞を構築し、活性化因子と共発現することにより Nox1 を細胞系で活性化し、 O_2^- の発生を見た。 β Pix の Nox 酵素活性化に与える影響を細胞系、無細胞系で検討した。

研究成果の概要（英文）：

We established the method for production of Noxa1, an essential activating factor for Nox1 using *E.coli*. We also succeeded to express and purify β Pix and β -actin, which may influence the activation of Nox1. We examined the cell-free activation of Nox1 using Caco-2 plasma membrane as an enzyme source. We also clarified the kinetic properties of Noxa1 in a pure cell-free activation system containing Nox2 purified from porcine neutrophils. The model cell system of Nox1 was established using HEK293 cells transfected with Nox1 cDNA as well as cDNAs for Noxa1 and Noxo1. The effect of β Pix, a putative GEF for Rac, on the activation of Nox enzymes was examined in cell and cell-free system.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2010年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

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、スーパーオキシド

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のホモログがいくつか発見され、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細胞内にシグナルとなるのか、その機構は謎であった。(田村, 生化学 2008)

2. 研究の目的

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の活性化のしくみを分子レベルと細胞レベルで明らかにすることを目的とした。またこの酵素が発生する O_2^- のシグナル分子としての生成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) 活性化タンパク質Noxa1の発現と精製
大腸菌を用いてNox1の3つの活性化因子Noxa1, Noxo1, Racを発現し、精製した。さらにNoxa1の短縮型(1-211)の融合タンパク質Noxa1N-Racを創成した。それぞれpGEXベクターを用いて大腸菌で発現G-Sepharose、およびイオン交換カラムを用いて精製した。

(2) 大腸癌細胞の培養

ヒト大腸上皮癌細胞Caco-2をMEM培地中10%ウシ胎児血清、5% CO_2 存在下、37℃で培養した。コンフルエントになる前日に、ディッシュにTNF α をディッシュ1枚あたり20 ng/ml加えて24時間刺激した。

(3) 形質膜の分離

培養したCaco-2細胞から我々の方法によりNox1を含む形質膜を分画した。またNox2を含む形質膜はブタ好中球からすでに確立した方法を用いて分画した。

(4) 好中球Nox2の精製

ブタ好中球形質膜から可溶化し、イオン交換カラム、アフィニティーカラムなどを用いて、Nox2をp22との会合体(シトクロム b_{558})として精製した。脂質化して本来の高次構造をとらせ、無細胞活性化実験に用いた。

(5) O_2^- 生成活性測定

形質膜または精製Nox2に上記のNoxa1, Rac, (またはp51N-Rac)とNoxo1, さらに補酵素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。

(6) Nox1のモデル細胞での発現

HEK293細胞にヒトNox1の遺伝子をpEF-BOSベクターのかたちで電気穿孔により導入し、さらにNoxa1, Rac, Noxo1の遺伝子も導入して24時間培養し、その後ルミノールに基づく化学発光試薬により、 O_2^- の発生を検出した。いくつかの実験ではさらに β Pixの遺伝子も導入して行った。

4. 研究成果

(1) 活性化因子の大腸菌による発現と精製
Nox1の活性化因子と目されるNoxa1(p51^{Nox})とNoxo1(p41^{Nox})を組換え体として得る方法を確立した。大腸菌で発現させ、アフィニティーやイオン交換カラムなどにより精製した、それぞれ比較的よい収率で純粋なタンパク質を得た。

(2) 大腸癌細胞のNox1の無細胞活性化

ヒト大腸癌細胞Caco-2の O_2^- 生成酵素Nox1を上記の活性化因子により無細胞系で活性化することに成功した。すなわち培養したCaco-2から形質膜を分画し、Noxa1とNoxo1をRacと共に加え、NADPHを添加すると O_2^- が発生した。細胞を予めTNF α で処理しておくことで O_2^- の発生は上昇した。この系を用い、以下のことを見いだした。i) 電子供与体はNADPHであり、補酵素としてFADが必要である、ii) Noxa1(V205A)およびNoxo1(W197R)では殆ど活性化が起きない、iii) Noxa1N-Rac融合タンパク質はNoxa1とRacを個別に加えた場合より低い活性を示す、などである。

(3) Nox1のモデル細胞での発現

Nox1精製のための酵素源としてHEK293細胞にNox1をトランスフェクトし、発現させる系を確立した。Noxa1, Noxo1を共発現させることにより、HEK細胞は O_2^- を発生した。ここでRacの共発現は活性化を促進せず、むしろ阻害した。HEK細胞は元々Racを発現しているが、外から加えたRacが阻害的に働く理由は今のところ不明である。

(4) Nox2の純粋無細胞活性化

Noxa1は無細胞系で精製したNox2を活性化することを見いだした。Noxa1はNoxo1と低濃度のSDSの存在化で、Nox2を活性化した。ただしその効率はNoxa1ホモログのp67^{phox}よりはるかに低く(図1)、 EC_{50} は20倍の高さであった。また V_{max} はNoxa1/Noxo1ペアーの場合、p67^{phox}/p47^{phox}のペアーに対し3分の1程度であった。またNoxa1を用いた時、Racの酵素複合体に対する親和性も著しく低下した。

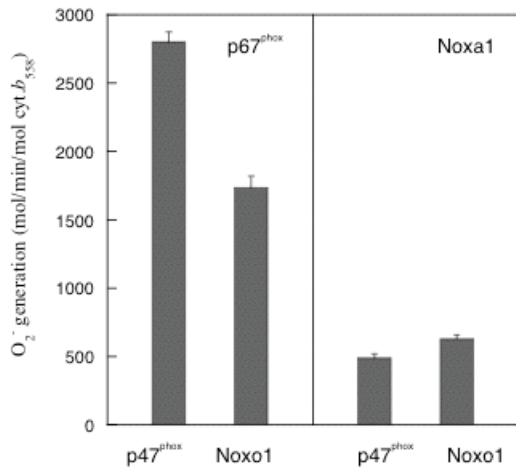


図1 Noxa1によるNox2の活性化

さらに、Noxa1/Noxo1ペアではNox2酵素に対するFADの親和性(表1)や複合体の安定性がp67^{phox}/p47^{phox}にくらべ著しく低下していることが判明した。複合体の安定性はNoxa1とRac(Q61L)を融合させても改善されなかった。

表1 Nox2複合体に対するFADの親和性

| Activating factors ^o | EC ₅₀ (nM) ^o | V _{max} ^o |
|--|------------------------------------|-------------------------------|
| Noxa1, Noxo1 ^o | 87.8 ± 15 ^o | 675 ± 21 ^o |
| p67 ^{phox} , p47 ^{phox} ^o | 2.8 ± 0.8 ^o | 2,570 ± 74 ^o |

これらのことから、Noxa1はp67^{phox}とはかなり異なる性質をもつことが明らかになった。これらの結果は、Noxa1が細胞内でNox1の穏やかな活性化因子として働くことを示唆した。なお、Noxa1の変異体V205AやR103Eでは活性化能は見られなかった。

(5) その他の活性化因子の発現と調製

本酵素の安定化因子と思われる細胞骨格タンパク質β-アクチンについて、これを大腸菌で発現させ精製する簡便な方法を確立した。またその変異体を作成することに成功した。変異体は自らの重合能が低下していた。

(6) スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)とNoxとの関わり

Nox1とNox2の共通の活性化因子であるRacとSODが相互作用することを見いだした。Blot-binding assayで検討した結果、SODとRacのタンパク間相互作用が検出された。RacはGTP型/GDP型に拘らずSODに結合した。この相互作用はRacをH₂O₂で酸化すると弱まった。Rac変異体C189Sでは酸化による相互作用の低下がやや抑えられたことからCys189が酸化される残基の1つであることが示された。この場合一部2量化が起こることも明らかになった。

(7) Rac活性化因子βPixの調製

ヒトβPix遺伝子を大腸菌で発現させ、アフィニティー精製、イオン交換クロマトなどを経て均一にまで精製した。精製タンパク質はWestern blottingやTOF-MS質量分析により全長βPixであることを確認した

(8) βPixのNox活性化との関わり

精製βPixを用いてNoxの活性化因子Racとの相互作用をDot-bindingにより検討した。RacはGDP型、GTP型ともにβPixと相互作用した。モデル細胞を用いてNox1の活性化に対する影響を、また無細胞系を用いてNox2への影響を検討したが、いずれも活性化というよりむしろ阻害的に働く結果となった。これはβPixがそのままでは不活性であることに起因すると思われる。活性化にすべく数種の変異体を作製した。現在これらのβPix変異体を用いてNoxの活性化への関与を検討している。

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 Masahito Kawano, Kazuaki Miyamoto, Yuki Kaito, Hideki Sumimoto, and Minoru Tamura
Noxa1 as a moderate activator of Nox2-based NADPH oxidase
Arch. Biochem. Biophys., 査読有, Vol. 519, No. 1, 2012, pp. 1-7

② Minoru Tamura, Katsunori Ito, Sachio Kunihiro, Chihoko Yamasaki, and Mihoko Haragauchi
Production of human β-actin and a mutant using a bacterial expression system with a cold shock vector
Prot. Expr. Purifi., 査読有, Vol. 78, No. 1, 2011, pp. 1-5

③ 田村 実
TNF受容体シグナル伝達の新しいかたち、蛋白質・核酸・酵素、査読なし、54巻、2009、1878

[学会発表] (計5件)

① 階戸 悠貴、河野 真仁、原垣内 美保子、田村 実
NADPH oxidase 活性化におけるβ-Pix の役割、日本生化学会、H. 23. 9. 22、京都国際会議場

② 河野 真仁、濱島 侑紀、中島 舞子、竹内一弘、田村 実
Nox1 活性化因子 NoxA1 の精製と性質-2 量体形成の可能性-、日本生化学会・分子生物学会合同大会、H. 22. 12. 8、神戸国際会議場

③ 濱島 侑紀、階戸 悠貴、竹内一弘、田村 実、

HEK293 細胞に対する ROS の影響-高性能 O_2^- 発生ツールを用いて、日本生化学会・分子生物学合同大会、H. 22. 12. 8、神戸国際会議場

④田村 実、宮本 和浩、濱島 侑紀、森岡 絵梨奈、重松 隆、全長 Noxa1 および Nox1 の大量発現精製と NADPH oxidase 活性化能、日本分子生物学会、H21. 12. 10、パシフィコ横浜

⑤宮本 和浩、重松 隆、濱島 侑紀、森岡 絵梨奈、田村 実
NoxA1 の大腸菌による発現精製と Nox1 活性化能、日本生化学会、H21. 10. 22、神戸国際会議場

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：アクチンの製造方法、それに用いるベクターおよび原核宿主細胞

発明者：田村実、伊藤克法

権利者：国立大学法人愛媛大学

種類：特願

番号：2006-108276

出願年月日：平成 23 年 12 月 28 日

(補正書提出)

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

www.ehime-u.ac.jp/~achem/biotec/index.html/index.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 実 (TAMURA MINORU)

愛媛大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：00128349

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

住本 英樹 (SUMOMOTO HIDEKI)

九州大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30179303