

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 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22790212

研究課題名（和文） 電位依存性プロトンチャネルによる NADPH オキシダーゼの活性制御の解明

研究課題名（英文） The analysis of voltage-gated proton channel regulating NADPH oxidase activity

研究代表者

大河内 善史 (OKOCHI YOSHIFUMI)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90435818

研究成果の概要（和文）：電位依存性プロトンチャネル VSOP は、貪食細胞などで活性酸素の産生を制御する分子である。我々は、VSOP ノックアウトマウスの好中球において、病原菌を除去するために細胞外に放出される活性酸素を作る酵素や分解酵素の分泌量が野生型よりも増えていることを見出した。この現象は、活性酸素を作る酵素である NADPH オキシダーゼの活性化に依存していた。すなわち、VSOP は活性酸素や分解酵素の量を抑制することで、生体の損傷を最小限に抑えていると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Voltage-gated proton channel VSOP regulates reactive oxygen species (ROS) in phagocytes. In this study, we found that VSOP deficient neutrophils release azurophilic granules excessively, which contain many kinds of degraded enzyme and myeloperoxidase (MPO) that catalyzes H₂O₂ to HOCl. The excessive release of azurophilic granules was dependent on the NADPH oxidase activity, which is enzyme to produce superoxide anion. These results suggest that VSOP negatively regulates the release of azurophilic granules to prevent tissue damage by degraded enzyme and HOCl.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：プロトンチャネル、活性酸素、NADPH オキシダーゼ、脱顆粒

1. 研究開始当初の背景

電位依存性プロトンチャネル VSOP は、上皮細胞、精子、免疫細胞で機能する分子である。

貪食細胞が産生する活性酸素は NADPH オキシダーゼによって作られ、この酵素の活性化時には細胞内にプロトンが放出されるため、こ

のプロトンを排出するのが VSOP の役割であると推定されていた。我々は、VSOP ノックアウトマウス (VSOP-KO) を用いた実験から、その好中球では、NADPH オキシダーゼが作る活性酸素の元となるスーパーオキシドアニオンの産生量、スーパーオキシドアニオンとプロトンの反応により作られる過酸化水素の産生量が低下していることを報告してきた。また、活性酸素の産生量の低下は、細胞内 pH、膜電位の異常によって引き起こされることが共同研究により明らかになった。すなわち、VSOP は NADPH オキシダーゼの活性化時に細胞内で増加するプロトンを細胞外に排出することによって正常な活性酸素の産生を助けられていると考えられる。

2. 研究の目的

過酸化水素はミエロパーオキシダーゼ (MPO) の働きにより次亜塩素酸に変換される。過酸化水素の産生量が低下している VSOP-KO マウスの好中球では、次亜塩素酸の産生量も低下していると予想された。

3. 研究の方法

マウス好中球は、骨髄から回収され、Percoll 密度遠心勾配法を用いて分離された。

(1) 次亜塩素酸の測定：モノクロロジメドン (MCD) を用いて細胞外で産生される次亜塩素酸の量を測定した。次亜塩素酸の産生は、NADPH オキシダーゼを活性化する薬剤として使用されているホルボールエステル (PMA) を加えることで誘導した。

(2) 各種酵素活性の測定：①ミエロパーオキシダーゼ活性は、ペルオキシダーゼ基質である *o*-ジアニシジンを用いて測定した。②エラスターゼ活性は、蛍光タンパクが融合したエラスターゼの基質エラスチンを用いて測定した。これらの酵素を細胞外に放出させるために、PMA、細菌から分泌されるペプチド f MLF、真菌によって作られる C5a を用いた。

(3) ラクトフェリンの測定：ラクトフェリン抗体を用いた ELISA 法により測定した。

4. 研究成果

野生型と VSOP-KO マウスの好中球を用いて、次亜塩素酸の産生量を比較した。その結果、次亜塩素酸の産生量が低下していると予想された VSOP ノックアウトマウスの好中球において、意外にもその産生量は野生型よりも高いことが分かった (図 1)。細胞外に MPO を過剰に加えた時、次亜塩素酸の産生量は MPO を加えない場合に比べて増加した (図 1)。この結果は、MPO に依存した次亜塩素酸の産生を測定していることを示している。また、VSOP ノックアウトマウスの好中球では、細胞外に放出される MPO が野生型よりも増加しているために次亜塩素酸の産生量が増えている可能性を示唆した。この可能性を検証するために、細胞内外における MPO 活性を測定した。まず、細胞を可溶化して、細胞内に含まれる MPO の活性を測定した結果、野生型と VSOP-KO マウス間で差がないことが分かった。つまり、細胞内に含まれる MPO の量に差はないことが分かった。一方で、細胞外液における MPO の活性は VSOP-KO マウスの好中球において有意に高いことが分かった (図 2)。すなわち、VSOP-KO マウスの好中球では、細胞外に分泌された MPO の量が野生型よりも多いため、次亜塩素酸の産生量が増えていると考えられる。MPO の分泌量が多いという事実は、MPO を含む顆粒 (アズール顆粒) の脱顆粒が亢進している可能性を示唆した。この顆粒に含まれる他の酵素エラスターゼの活性を調べた結果、VSOP-KO マウスの好中球では、野生型よりもエラスターゼ活性が高いことが分かった (図 3)。つまり、VSOP-KO マウスの好中球では、アズール顆粒の脱顆粒が亢進していると考えられる。これらの異常は、NADPH オキシダーゼが活性化したときにのみ見られることが分かった (図 2、図 3)。

好中球はアズール顆粒を含めて少なくとも 3 種類の顆粒が存在することが知られている。VSOP ノックアウトマウスの好中球では、アズール顆粒以外の顆粒の脱顆粒が異常になっているのかどうか検証した。NADPH オキシダーゼと同じ顆粒 (特殊顆粒) に存在する

ラクトフェリンの量を調べたところ、その量は VSOP ノックアウトマウスと野生型の好中球の間で有意な差は見られなかった(図4)。以上の結果より、(1) VSOP はアズール顆粒の脱顆粒を抑制する、(2) その抑制機能は、NADPH オキシダーゼ活性依存的に作動することが明らかになった。この VSOP の機能は、活性酸素の産生を抑えることで、活性酸素による生体の不必要な損傷を防いでいると考えられる。

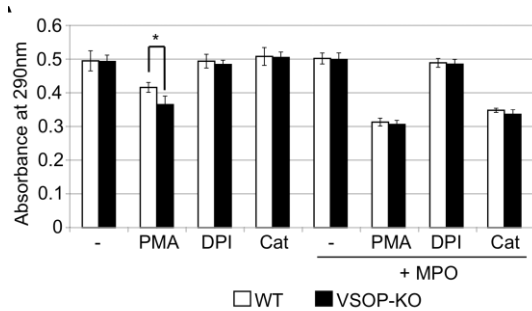


図1 次亜塩素酸の測定。縦軸は、MCD の吸収を示している。次亜塩素酸が MCD に反応すると MCD の吸収が低下する。- は刺激なし、DPI は NADPH オキシダーゼの阻害剤で PMA とともに加えた。Cat は過酸化水素を水と酸素に変換する酵素カタラーゼを示しており、PMA とともに加えた。MPO は、PMA 刺激時に加えた。

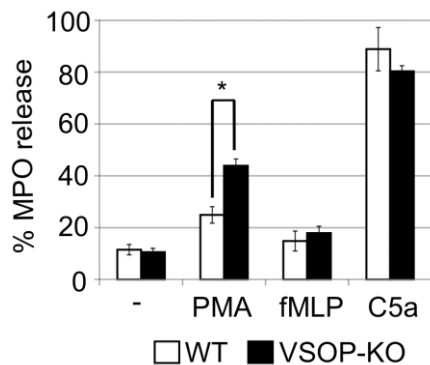


図2 MPO 活性の測定。縦軸の% MPO release は、細胞内に含まれる総 MPO 量をもとに細胞外に放出された MPO の割合を求めた。

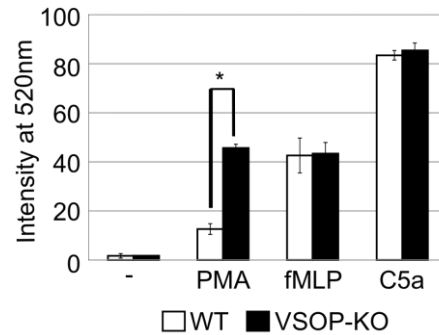


図3 エラスターゼ活性の測定。縦軸は、蛍光強度を示している。エラスターゼ活性が高い程、蛍光が強くなる。

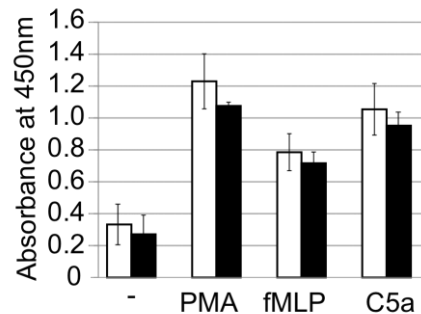


図4 ラクトフェリン量の測定。縦軸は発色剤 TMB の吸収を示している。

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. Novel and conserved protein macoilin is required for diverse neuronal functions in *Caenorhabditis elegans*.

Miyara A, Ohta A, Okochi Y, Tsukada Y, Kuhara A, Mori I.

PLoS Genet. 2011 May;7(5):e1001384

査読あり

2. Bidirectional regulation of thermotaxis by glutamate transmissions in *Caenorhabditis elegans*.

Ohnishi N, Kuhara A, Nakamura F, Okochi Y,
Mori I.

EMBO J. 2011 Apr 6;30(7):1376-88

査読あり

3. Reversal of Salt Preference is Directed
by the Insulin/PI3K and Gq/PKC Signaling
in *Caenorhabditis elegans*.

Adachi T, Kunitomo H, Tomioka M, Ohno H,
Okochi Y, Mori I, *Iino Y.

Genetics. 2010 Dec;186(4):1309-19.

査読あり

[学会発表] (計 3 件)

1. Yoshifumi Okochi, Yasuaki Aratani,
Kazuo Suzuki, Nana Miyawaki, Mari
Sasaki, Yasushi Okamura, The role of
voltage-gated proton channel VSOP in
host defense against pathogen、第 8 9
回日本生理学会大会、2012. 3. 29、松本
2. Yoshifumi Okochi, Tsukasa Kawahara、
Yasushi Okamura、 Regulation of ROS
production by VSOP is a voltage-gated
proton channel that functions in
phagocytes、第 8 8 回日本生理学会大会、
2011. 3. 28、横浜
3. Yoshifumi Okochi, Tsukasa Kawahara and
Yasushi Okamura, The role of VSOP is a
voltage-gated proton channel that
functions in phagocytes、第 8 7 回日本
生理学会大会、2010. 5. 20、盛岡

[その他]

ホームページ等

[http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/phys2/
okamura/index.html](http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/phys2/okamura/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大河内 善史 (OKOCHI YOSHIFUMI)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90435818