

**科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)
研究成果報告書**

平成25年5月16日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011~2012

課題番号：23790338

研究課題名(和文) 殺菌に重要な食細胞 NADPH オキシダーゼを構成する膜蛋白質の相互作用機構の解析

研究課題名(英文) Mechanism for interaction between Nox2/gp91^{phox} and p22^{phox}: two membrane proteins of the phagocyte NADPH oxidase

研究代表者

宮野 佳 (MIYANO KEI)

九州大学・医学研究院・特任助教

研究者番号：60444783

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/gp91^{phox} の安定化に必要な p22^{phox} との結合部位に関して新たな知見を得た。また、全長型 Nox2 の高効率発現系と活性化状態複合体の融合タンパク質の発現系の構築に成功した。

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/gp91^{phox}, a membrane-spanning protein that forms a stable heterodimer with p22^{phox}. In this study, I found that both N- and C-terminal regions play a crucial role in Nox binding to p22^{phox}. Furthermore, I found that the addition of a specific region of nonphagocytic Nox (Nox5) to Nox2 leads to a large amount of Nox2 protein expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：NADPH オキシダーゼ、活性酸素、Nox2/gp91^{phox}、膜タンパク質

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、「真の産物」として活性酸素を生成する酵素系が存在し、その1つがスーパーオキシド生成酵素 NADPH オキシダーゼ

(Nox; NADPH oxidase) である。Nox はファミリーを形成しており(ヒトでは Nox1 から Nox5 まで存在)、その中でも食細胞に発現する Nox2 (別名として gp91^{phox}) は、もっともよく研究されており、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。本酵素の重要性

は、その遺伝的欠損症である慢性肉芽腫症で示される。慢性肉芽腫症とは、Nox2 による活性酸素の生成がまったく行われなため、食細胞である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^{phox}、p67^{phox} 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。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い。

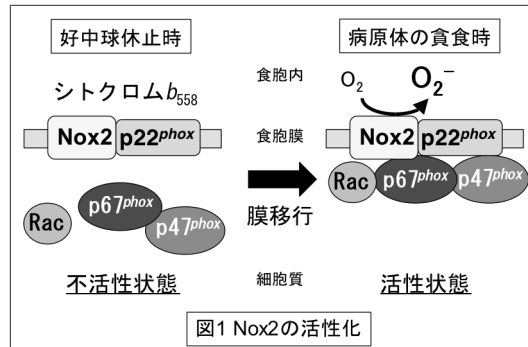
Nox2 は一次構造上、膜貫通領域と細胞質領域の 2 つに大きく分けられる。細胞質領域には NADPH と FAD の結合部位がある。膜貫通領域は 6 つの膜貫通セグメントで構成され、2 つのヘムの結合部位が存在する。そのため、Nox2 には O₂ を生成するために必要な電子伝達系「NADPH→FAD→ヘム→ヘム→O₂」のすべてが含まれていることになる。Nox2 は、同じく膜タンパク質の p22^{phox} と会合している。Nox2 と p22^{phox} の会合の重要性は、p22^{phox} の遺伝的欠損でも慢性肉芽腫症が引き起こされることから示される。遺伝的に p22^{phox} が欠損した食細胞では、Nox2 の mRNA は正常であるにもかかわらず、Nox2 がタンパク質レベルで検出されないことから、Nox2 と p22^{phox} の会合が、Nox2 をタンパク質レベルで安定化すると考えられている。ところが、この会合によりどのようなメカニズムで Nox2 が安定化されるのかは不明なままである。

以上のように、Nox2 の活性化タンパク質による作用機構はかなり明らかにされてきた。一方で、Nox2 本体についての研究は世界的にほとんど進んでいない。例えば、p22^{phox} による Nox2 の安定化のメカニズムや活性化タンパク質による Nox2 本体の構造変化の誘導についての知見はまったくない。また、Nox2 の遺伝子欠損ではなく点変異によるアミノ酸置換によって引き起こされる慢性肉芽腫症が報告されているが、これらの置換されたアミノ酸が Nox2 の活性化においてどのような役割を果たしているかはほとんど分かっていない（例えば、活性化タンパク質の作用部位や p22^{phox} の結合部位、または電子伝達系に必要なアミノ酸の可能性があ

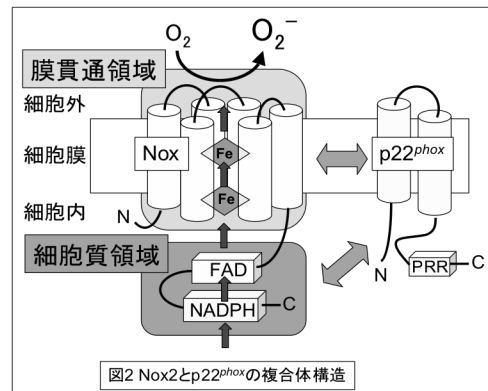
る)。さらに、Nox2 本体の生化学的解析や構造解析が進んでいない理由の 1 つにその大量発現系がないことがあげられる。

2. 研究の目的

本研究では、まず Nox2 と p22^{phox} 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 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（図 1）、実際に酵素本体



である Nox2 の電子伝達に必要な構造変化についてはまったく分かっていない（図 2）。そ



こで、Nox2 の細胞質領域（FAD/NADPH 結合ドメイン）と活性化タンパク質との複合体や Nox2 の全長の構造解析や詳細な生化学的解析を行うための試料を得るための大量発現系の構築を目指す。Nox2 は p22^{phox} との会合に依存して安定に存在する性質のため、大量発現系の確立は困難であると予想されるが、上記の Nox2 の安定化されるメカニズムに関する知見が得られれば、その情報は大量発現系の構築にも多いに役立つと考えられる。

3. 研究の方法

Nox2 のタンパク質レベルでの安定化に必要な p22^{phox} との結合様式や、活性化タンパク質が作用した Nox2（他の Nox ファミリーを含め）の構造変化については全く分かっていない。そこで、本研究では、(1) Nox2 と

p22^{phox}の会合に関わる領域の同定、(2) Nox2の細胞質領域と活性化タンパク質との複合体の大量発現系の構築、(3) Nox2の全長型の大量発現系の構築を行ない、Nox2本体の機能を解明することを目指す。

(1) Nox2 と p22^{phox}の会合に関わる領域の同定

Nox2 と p22^{phox}の会合の重要な役割は、Nox2をタンパク質レベルで安定に存在させることである。Nox2 と p22^{phox}は膜タンパク質であることから、互いに膜貫通領域を介して会合していると想像されているが、その詳細は明らかにされていない。NoxファミリーのうちNox5は、p22^{phox}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。また、Nox5はp22^{phox}非依存的にO₂を生成する活性も有している。そこで、この性質を利用して、Nox2とNox5の膜貫通領域または細胞質領域を入れ換えたキメラタンパク質を作成し、p22^{phox}との結合能を調べた。さらに、p22^{phox}との会合に関わっているNox2膜貫通セグメントを明らかにすることを試みた。

Nox2は6つの膜貫通セグメントのうち、いずれか、もしくは複数でp22^{phox}と結合していると考えられる。そこで、Nox2とNox5の6つの膜貫通セグメントをそれぞれ個別（あるいは複数）

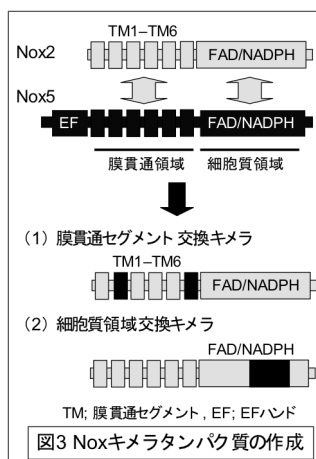


図3 Noxキメラタンパク質の作成

に交換したキメラタンパク質を作成した（図3）。これらのNoxキメラタンパク質とp22^{phox}との結合は、研究代表者がすでに確立している「膜タンパク質Noxとp22^{phox}の免疫沈降法」や「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」を用いて検討した。また、細胞質領域に関しても同様の実験手法を用いて、p22^{phox}との結合に必要な領域を同定を行った。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慢性肉芽腫症の症例と照らし合わせつつ、p22^{phox}との相互作用に重要なアミノ酸の同定や、p22^{phox}に非依存的にNox5のタンパク質レベルでの安定化に関わっている領域およびアミノ酸の同定を行った。

(2) Nox2の細胞質領域と活性化タンパク質の大量発現系の構築

以前、研究代表者はNox2の細胞質領域

(FAD/NA DPH 結合ドメイン)に活性化タンパク質

(p67^{phox})が結合することを見出

した。活性化タンパク質はNox2の細胞質領域に結合することにより、Nox2の構造変化を引き起こしNADPHから酸素への電子伝達のスイッチをオンにすると考えられている。しかしながら、Nox2本体の活性化状態に関する知見はまったくない（図4）。そこで、Nox2と活性化タンパク質の複合体の生化学的解析を行うための大量発現系の構築を行った。Nox2の細胞質領域とp67^{phox}とRacを遺伝子工学的に融合させた一連鎖融合タンパク質を作成し、融合タンパク質の発現系を構築した。さらに、各タンパク質間のリンカーの長さの検討や、p67^{phox}の高い活性を示すアミノ酸置換を導入することにより、より高品質の融合タンパク質の作製を試みた。

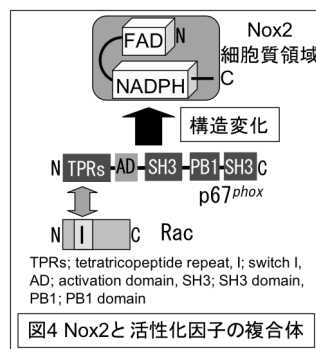


図4 Nox2と活性化因子の複合体

(3) 全長型Nox2の大量発現系の構築

研究代表者は、Nox5が他のNoxに比べてタンパク質レベルでの安定性の高さや、発現量が極めて多いことに着目し、この性質をNox2に応用できないかと考えた。そこでまず、Nox5自身の発現を促進するアミノ酸配列の同定を試みた。さらに、この配列をNox2に融合させ、培養細胞を用いてNox2のタンパク質レベルでの発現量が増加するかどうかを検討した。また、この高発現Nox2を発現させた培養細胞の膜画分を回収して、活性化に必要な因子と組み合わせ、cell-free系（Nox2活性をNox2が発現する細胞膜と精製した活性化タンパク質で再構成する）でNox2活性が再構成できるかどうかを試みた。

4. 研究成果

(1) Nox2 と p22^{phox}の会合に関わる領域の同定

Nox2 と p22^{phox}は膜タンパク質であることから、互いに膜貫通領域を介して会合していると想像されている。Nox2 と Nox5の膜貫通領域または細胞質領域を入れ換えたキメラタンパク質を作成し、p22^{phox}との結合能を調べた。その結果、Nox2の膜貫通領域だけでなく驚いたことに細胞質領域もp22^{phox}との結合に関わっていることが

分かった。さらに、Nox2 と Nox5 の6つの膜貫通セグメントをそれぞれ個別（あるいは複数）に交換したキメラタンパク質と細胞質領域を複数箇所入れ換えたキメラタンパク質を作成し、p22^{phox}との結合能を調べた。その結果、p22^{phox}との会合に関わっている Nox2 膜貫通セグメントと細胞質領域を特定することができた。また、その領域内でアミノ酸置換が起こると、p22^{phox}との結合能が低下することを見出した。得られた成果から、Nox2 のアミノ酸置換によって引き起こされる慢性肉芽腫症が、p22^{phox}との結合能が低下したことが原因に成り得るといふ新しい知見を得ることができた。

(2) Nox2 の細胞質領域と活性化タンパク質の大量発現系の構築

Nox2 の細胞質領域と p67^{phox} と Rac を遺伝子工学的に融合させた一連鎖融合タンパク質を作成した。これらの融合タンパク質の性質は、リンカーの長さや、リンカーに用いるアミノ酸の種類により大きく変わりうることを見出した。最適化したリンカーを持つ融合タンパク質は、個々にタンパク質を発現させた時に比べ、高純度に精製することが可能で、さらに高効率に酵素活性を示すことを見出した。この融合タンパク質は、今後の活性化状態の Nox2 複合体の生化学的解析や、構造解析において非常に有用な試料に成り得ると考えられる。

(3) 全長型 Nox2 の大量発現系の構築

Nox5 の自己発現促進配列を融合させた全長型 Nox2 は、野性型の Nox2 に比べて著しく発現が増加することを見出した。さらに、この高発現 Nox2 を発現させた培養細胞の膜画分を回収して、活性化に必要な因子と組み合わせることにより、完全に Nox2 活性を cell-free 系で再構成することに成功した。これまで好中球膜を用いた cell-free 系では、Nox2 本体のアミノ酸残基の役割を検討することは不可能であったが、この新規の cell-free 系を用いることにより、Nox2 本体の、(1) 活性化タンパク質が作用する Nox2 のアミノ酸の同定、(2) 様々なスペクトル測定によるタンパク質フォールディングの確認などより詳細な生化学的解析が可能になるであろう。

本研究で得られた成果は、国内外の学会や学術誌で報告を行い、高い評価を得られた。今後は、これらの成果を基にさらなる Nox2 本体の機能解析が進められることが期待される。

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 4 件)

(1) Nishikimi A., Uruno T., Duan X., Cao Q., Okamura Y., Saitoh T., Saito N., Sakaoka S., Du Y., Suenaga A., Kukimoto-Niino M., Miyano K., Gotoh K., Okabe T., Sanematsu F., Tanaka Y., Sumimoto H., Honma T., Yokoyama S., Nagano T., Kohda D., Kanai M., Fukui Y. Blockade of Inflammatory Responses by a Small-Molecule Inhibitor of the Rac Activator DOCK2.

Chem. Biol. (2012), **19**, 488–497, 査読有り
doi: 10.1016/j.chembiol.2012.03.008.

(2) Stampoulis P., Ueda T., Matsumoto M., Terasawa H., Miyano K., Sumimoto H., Shimada I.

Atypical membrane-embedded PI(3,4)P2 binding site on p47^{phox} PX domain revealed by NMR.

J. Biol. Chem. (2012), **287**, 17848–17859, 査読有り
doi: 10.1074/jbc.M111.332874

(3) Miyano K., and Sumimoto H.

Assessment of the Role for Rho Family GTPases in NADPH Oxidase Activation.

Methods Mol. Biol. (2012), **827**, 195–212, 査読有り
doi: 10.1007/978-1-61779-442-1_14

(4) Tabuchi T., Che X.-F., Hiraiishi K., Adachi M., Miyano K., Sumimoto H., Tabuchi T., Miyazawa K., and Tomoda A.

Selectively induced apoptosis in human neutrophils in the presence of oxidative phenoxazines, 2-amino-4, 4 α -dihydro-4 α -7H-phenoxazine-3-one and 2-aminophenoxazine-3-one preceded by decrease of intracellular pH, depolarization of the mitochondria and inhibition of superoxide generation.

J. Pharmacol. Sci. (2011), **117**, 139–48, 査読有り

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/117/3/117_11134FP/_article

[学会発表] (計 8 件)

(1) Hideki Sumimoto, Kei Miyano.
Nox family NADPH oxidases and redox

signaling.

第 85 回日本生化学会大会:シンポジウム
「Frontiers in redox signaling and oxidative stress research」, 福岡,
(12/14-12/16, 2012 年)

(2) 的野 る美, 宮野 佳, 住本 英樹.

アラキドン酸は、p47^{phox}の構造変化に加えて p67^{phox}-Nox2 間の相互作用を誘導することにより食細胞 NADPH オキシダーゼを活性化する. Arachidonic acid induces not only a conformational change of p47^{phox} but also interaction of p67^{phox} with Nox2 to activate the phagocyte NADPH oxidase.

第 85 回日本生化学会大会, 福岡,
(12/14-12/16, 2012 年)

(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 5 (Nox5) の細胞膜への局在化と酵素活性化に必要な N 末端細胞質領域の同定. A region N-terminal to the transmembrane domain of NADPH oxidase5 (Nox5) is required for the plasma membrane localization of Nox5 and the oxidase activation.

第 85 回日本生化学会大会, 福岡,
(12/14-12/16, 2012 年)

(4) 住本 英樹, 宮野 佳

活性酸素シグナル生成の制御と遺伝学.
日本遺伝学会第 84 回大会: 公開シンポジウム「活性酸素シグナル伝達制御の遺伝学」,
福岡, (9/24-9/26, 2012 年)

(5) Sumimoto, H., and Miyano, K.

The Nox family NADPH oxidases involved in host defense and signal transduction [invited speaker]

The 13th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology: Symposium “ROS signaling in host-bacteria stress responses”. Sapporo, Japan, (9/6-9/10, 2011 年)

(6) Sumimoto, H., and Miyano, K.

Structure and regulation of Nox family NADPH oxidases that deliberately produce reactive oxygen species [invited speaker]

The 17th International Symposium on Flavins and Flavoproteins. Berkeley, USA, (7/24- 7/29, 2011 年)

(7) 宮野 佳, 住本 英樹.

食細胞と非食細胞 NADPH オキシダーゼの活性酸素生成活性の制御領域について
第 22 回日本生体防御学会学術総会, 那覇,

(6/29-7/1, 2011)

(8) 宮野 佳, 住本 英樹.

活性酸素生成酵素 NADPH オキシダーゼの活性調節領域について

平成 23 年度日本生化学会九州支部例会, 久留米, (5/21-5/22, 2011 年)

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・特任助教

研究者番号: 60444783