

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：16301
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2012～2015
 課題番号：24510299
 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の活性制御と情報伝達機構

 研究課題名(英文)Mechanisms of regulation and signaling of NADPH oxidase 1 involved in 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

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：大腸上皮細胞のスーパーオキシド生成酵素Nox1の制御にbetaPixが関わっていること、またその制御にbetaPix自身のリン酸化が関わっていることを見出した。betaPixはNox1の活性化因子Racの活性化を行う酵素であり、そのリン酸化によりRac活性化が亢進していることが明らかになった。さらにリン酸化の位置によっては、逆にNox1活性化能を失うことが判明した。betaPixの変異体や短縮型の分子/細胞レベルでの検討から、リン酸化による正負両方向の活性制御の機構を解明した。さらに放出されたO₂⁻が細胞へ与える影響を調べ、変換されて細胞へ入ったH₂O₂がアポトーシスを起こすことを見出した。

研究成果の概要(英文)：Nox1 produces superoxide (O₂⁻) in response to growth hormone such as EGF in colon epithelial cells. We found that betaPix is involved in the activation of Nox1, and EGF-induced phosphorylation at Ser-340 of betaPix enhanced its Nox1-activating ability. The phosphomimetic mutant of betaPix showed higher Rac-binding and GDP/GTP exchange ability which is required for Nox1 activation. In contrast, phosphorylation at Ser-525 eliminated its ability of Nox1 activation. Based on the results of in vivo and in vitro experiments with the phosphomimetic, unphosphorylatable, and truncated mutants, we proposed a mechanism of how phosphorylations at different sites caused opposite effects on Nox1-activating ability of betaPix. We also examined the effect of O₂⁻ on Caco-2 cells using an O₂⁻ generating device we have developed, and found that O₂⁻ exogenously added caused apoptosis in the cells, and also oxidation of several cytosolic proteins involved in cytoskeleton, glycolysis, and protein synthesis.

研究分野：生化学，細胞生物学

キーワード：superoxide Nox1 betaPix phosphorylation colon epithelial cells signaling

1. 研究開始当初の背景

O₂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、大腸や血管に発現し発生するO₂ (および派生するH₂O₂)によって細胞増殖、殺菌その他に関わっていると思われる。O₂は一方で活性酸素として細胞にダメージを与え、様々な病気の原因になる。したがって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O₂がどのようにして細胞内に入りシグナルとなるのか、その機構は謎であった。

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の活性化と制御のしくみを分子レベルと細胞レベルの両方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O₂が細胞に与える影響およびシグナル分子としての働きを細胞レベルで探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) βPix 発現プラスミドの構築

ヒトβPixのcDNAは、かずさDNA研究所の永瀬隆氏より譲り受け、pEF-BOSベクターに組み込んだ。また、Nox1の活性化因子Noxo1、Noxa1cDNAは九州大学医学部の住本英樹氏より譲り受け、同じ種類のベクターに組込んだ。またこれを元に、部位特異的変異によって各種変異体および短縮型のcDNAを作成した。

(2) 培養細胞への遺伝子導入

ヒト大腸上皮癌細胞Caco-2はMEM培地中10%ウシ胎児血清、5%CO₂存在下、37℃で培養した。70%コンフルエントの細胞を回収してPBS bufferに懸濁させ、電気穿孔によりβPixとNox1の活性化因子を組み込んだpEF-BOSプラスミドを同時に取り込ませ24穴ウェルプレートに播種し、1日間培養した。

(3) Nox1 活性(O₂生成)測定

細胞を剥がして回収し細胞数を測定したのち、HEPES bufferに懸濁させ、Diogenesを用いてO₂による化学発光を、ルミノメーターで測定した。一部の実験ではEGFある

いはNGFなどの成長因子を測定の直前に加えて影響を見た。

(4) βPix と変異体の調製

上記のβPixおよび変異体の遺伝子をpGEX-6Pベクターに組み込み、大腸菌に導入してタンパクを発現させ、イオン交換またはゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製した。各変異体も同様にして精製した。

(5) Pull-down assay

βPixとGST-Racを混合し4℃で30分置いたのち、G-Sepharoseを加え、さらに30分間攪拌した。遠心後上清を分けとり、沈殿はグルタチオン溶液で溶出させ遠心後、上清(溶出液)と沈殿を分けとった。各々のサンプルをSDS-PAGEにかけ、画像解析によりRacと結合したβPixの割合を算出した。

(6) O₂発生体 Device II の作成

ブタの好中球膜から精製したNox2に酸性リン脂質を加え、p67-p47、RacQ61Lと混ぜて無細胞活性化した後、タンパク架橋剤を用いて固定した¹⁾。

(7) 細胞へのO₂暴露実験

Caco-2細胞(またはHEK293細胞)を8×10⁴個24ウェルプレートに播種し24時間培養した。無血清培地と交換したのち、細胞にDeviceIIとNADPHを加え、O₂を発生させた。4時間後、細胞を剥がし回収後、トリパンブルーを加えて生細胞と死細胞をそれぞれカウントした。

(8) Flow cytometer による解析

細胞がアポトーシスを起こしている可能性を検討するため、Caspase-3の活性化とフォスファチジルセリンの露出を検出した。Caspase-3の活性化は、細胞を回収後PBS中でNucViewとpropidium iodideを加えFACSで測定した。PS露出の検出は、Annexinを用いて行った。

(9) 蛍光顕微鏡による観察

底面がガラスのプレートに細胞を播種し24時間培養した。無血清培地に交換後、DeviceIIとNADPHを加えて4時間後、propidium iodide、NucViewまたはAnnexin誘導体を加え、細胞が底面に接着したままの状態に蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(10) カルボニル化タンパク質の検出

細胞をDeviceIIで一定時間処理後、すみやかにライゼートを調製しSDS-PAGE電気泳動後、バンドをPVDF膜に転写し、タンパク質を2,4-ジニトロフェニルヒドラジンと反応させたのちこれを同試薬の抗体と反応させ、さらにペルオキシダーゼ標識した二次抗体と反応させてカルボニル化タンパク質を

検出した。検出は化学発光により行なった。
(11)カルボニル化タンパク質の同定

上記で確認したカルボニル化タンパク質の主なものを元のゲルのバンドから抽出し、MALDI-TOF-MASでタンパク分子種を同定した。

4. 研究成果

(1) Nox1の活性化機構

大腸上皮細胞のスーパーオキシド生成酵素 Nox1 の制御にβPix が関わっていること、またその制御にβPix 自身のリン酸化が関わっていることを見出した。βPix は Nox1 の活性化因子 Rac の活性化を行う酵素であり、βPix のリン酸化により Rac 活性化が亢進していることが推定された。EGF 刺激によりβPix の Ser-340 がリン酸化されることから、Ser340Glu (疑似リン酸化) 変異体を作成し、分子レベルでの検討を行った結果、βPix のリン酸化模倣により Rac の結合能が上がること、また GDP/GTP 交換活性が上昇することを見出した³⁾。

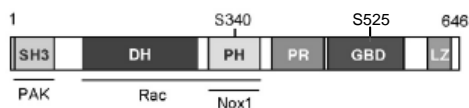


図1 ヒトβPixのドメイン構造とリン酸化部位

さらにリン酸化の位置によっては逆にβPix の Nox1 活性化を抑制することを見出した。すなわちβPix の Ser-525 変異体はβPix の Nox1 活性化能を失わせた。Rac 結合活性、GDP/GTP 交換活性などの検討、さらに短縮型の調製と性質の検討から、Ser-525 変異による Nox1 活性可能の喪失は Rac 結合サイトのシフトによることを突き止めた。

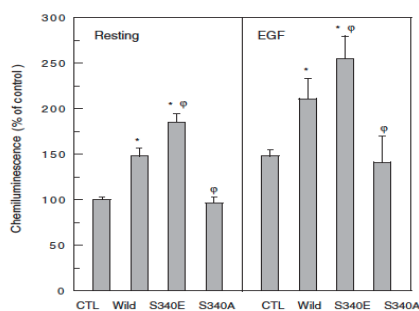


図2 疑似リン酸化変異体による Nox1 活性化

Ser-525 のリン酸化は NGF の刺激で起こることから、βPix は EGF 刺激では Nox1 活性化の方向へ、NGF 刺激では抑制の方向に働くことが明らかになった。EGF は炎症を促進し、NGF は抑制(収束)することから、βPix は異なるアゴニスト刺激による異なる部位へのリ

ン酸化で炎症が正逆両方向に制御しているという興味深い結果が得られた。

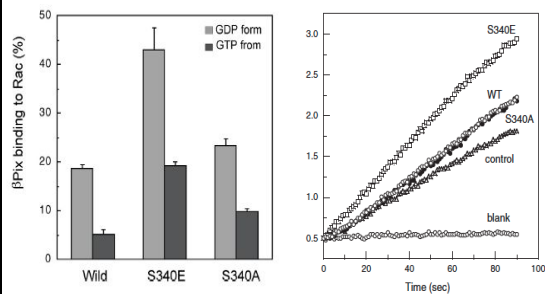


図3 Ser340Glu 変異体の Rac 結合と GEF 活性

(2) O₂の大腸細胞への影響

体内で Nox の発生する O₂ は一旦細胞の外に出て H₂O₂ に変換してから再び細胞内に入る。この状態を実現するために、細胞外で O₂ を発生させ、細胞への影響を見た。O₂ 発生デバイスを添加した Caco-2 は、24 時間で 80% の細胞が細胞死を起こした。生存率は SOD により回復せず、カタラーゼにより回復した。デバイスで 4 時間処理した細胞について検討したところ、細胞膜外へのフォスファチジルセリンの露出とカスパーゼ-3 の活性化が認められた。以上の結果から、外から加えた O₂ は H₂O₂ を経て、Caco-2 にアポトーシスを起こすことが明らかになった²⁾。

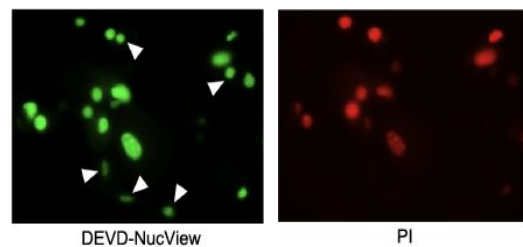


図4 O₂による大腸由来細胞のアポトーシス

(3) O₂による細胞内タンパク質の酸化

活性酸素により細胞内のタンパク質が酸化され、それがアポトーシスの引き金になりうることが報告されている。そこで上記の行程の際に細胞内のタンパク質がどの程度酸化されるか、またどのタンパク質が酸化されるかを知るために、タンパク質のカルボニル化を検出した。O₂ の添加により多数のタンパク質がカルボニル化されること、そのパターンは H₂O₂ を直接加えた時と一部異なっていることを見いだした。これは O₂ 添加により細胞表面に出ている膜タンパク質が酸化された可能性を示した。主な酸化タンパク質の TOF- MAS 分析の結果から、Caco-2 細胞内ではフィラミン、ミオシンなど細胞骨格タンパ

ク質に加え、解糖系の GAPDH さらにタンパク質合成系の EF-2 が酸化されていることが判明した。このうち GAPDH の酸化は従来からアポトーシスとの関連が示唆されており、特に興味深く思われる。また EF-2 の酸化は細胞へのダメージという点で重要であろう。

これらのタンパク質はいずれもサイトソルに存在するものであり、 O_2 から変化した H_2O_2 が細胞膜を通過して作用したと考えられる。しかし、細胞外には放出された O_2 自身も存在することから、今後は O_2 による細胞膜のチャネルや受容体への影響にも注目してゆきたい。

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) Tamura M., Kunihiro S., Hamashima Y., Yoshioka Y., Tone S., Kameda K. (2015) An improved superoxide-generating nano-device for oxidative stress studies in cultured cells. **Biotech.Reports**, 6, 45-50 (査読あり)

2) Yoshioka Y., Fujibayashi H., Kameda K., Kan D., Tone S., Tamura M. (2015) Induction of apoptosis in Caco-2 cells by exogenously added O_2^- produced by a nano-device. **Exp.Cell Res.**, 331, 408-415 (査読あり)

3) Kaito Y., Kataoka R., Takechi K., Mihara T., Tamura M. (2014) Nox1 activation by bPix and the role of Ser-340 phosphorylation **FEBS Letters**, 588, 1997-2002 (査読あり)

4) Kawano M., Ishii R., Yoshioka Y., Fukuda T., Tamura M. (2013) C-terminal truncation of Noxa1 greatly enhances its ability to activate Nox2 in a pure reconstitution system **Arch.Biochem.Biophys.** 538, 164-170 (査読あり)

[学会発表](計6件)

1) 田村 実、吉岡裕樹、藤林弘之輔、菅大二郎、亀田健治、刀禰重信
スーパーオキシドにより誘導される Caco-2 細胞のアポトーシスとタンパク質酸化
日本分子生物学会・日本生化学会合同大会 (BMB2015)、2015年12月3日
神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

2) 吉岡裕樹、藤林弘之輔、亀田健治、刀禰重信、田村 実

細胞外から加えた O_2^- により誘導される Caco-2 の細胞死
日本生化学会大会, 2014年12月17日
横浜国際展示場(神奈川県横浜市)

3) 三原達也、階戸悠貴、片岡良介、武智健斗、田村 実
bPix による Nox1 の活性化と Ser-340 リン酸化の役割
日本生化学会中国・四国支部会, 2014年6月6日, 愛媛大学南加ホール(愛媛県松山市)

4) 藤林弘之輔、吉岡裕樹、亀田健治、刀禰重信、田村 実
細胞外から加えた O_2^- により誘導される Caco-2 の細胞死
日本生化学会中国・四国支部会, 2014年6月6日, 愛媛大学南加ホール(愛媛県松山市)

5) 階戸悠貴、片岡良介、田村 実
bPix による Caco-2 細胞 Nox1 の活性化ーリン酸化による制御ー
日本分子生物学会年会, 2013年12月3日
神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

6) 河野真仁、石井 麗、吉岡裕樹、福田武仁、田村 実
Noxa1C 末端の削除による Nox2 活性化の亢進
日本生化学会大会, 2013年9月12日,
パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等
www.ach.ehime-u.ac.jp/biotec/

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
なし

(3)連携研究者
なし