

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440107

研究課題名(和文) 活性酸素産生経路をモデルとしたテトラスパニンの分子機能の探索

研究課題名(英文) Investigation of molecular roles of tetraspanin in dual oxidase activation

研究代表者

森部 弘樹 (MORIBE, Hiroki)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：90423102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：活性酸素種(ROS)を生理的に産生するDual oxidase(DUOX;線虫BLI-3)の働きには細胞膜タンパク質テトラスパニンTSP-15との相互作用が必要である。DUOX/BLI-3の活性化機構およびTSP-15の分子的作用は不明である。今回の研究により以下のことを明らかにした。DUOX/BLI-3の活性化には複合体形成に機能するTSP-15の細胞外領域、およびTSP-15の細胞内C末端領域に未知の重要な役割がある。DUOX/BLI-3は補酵素ピロロキノリンキノン(PQQ)によって活性化される。

研究成果の概要(英文)：Reactive oxygen species (ROS) are considered deleterious by-products of aerobic metabolism that inflict oxidative damage in organisms, and have been associated with diseases and aging. However, ROS are physiologically produced by the NADPH oxidase (NOX) family of enzymes and are crucial for multiple biological processes. Dual oxidases (DUOX, BLI-3 in *C. elegans*) produce ROS H₂O₂, and requires tetraspanin TSP-15 for proper ROS production. It is still unknown regulatory mechanisms of DUOX/BLI-3 activation, and the molecular role of TSP-15 in DUOX/BLI-3-ROS production system remains elusive. In this study, first, functional domains of TSP-15 were determined in DUOX/BLI-3-mediated ROS production; extracellular domain for direct association with DUOX/BLI-3 and C-terminal cytoplasmic region. Second, redox co-factor pyrroloquinoline quinone (PQQ) catalytically activates DUOX/BLI-3, which may result in enhancement of anti-stress network.

研究分野：細胞生物学

キーワード：テトラスパニン Dual oxidase 活性酸素種(ROS) ピロロキノリンキノン(PQQ)

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)テトラスパニン (tetraspanin) は、4回膜貫通領域をもつ分子量 30kDa 前後の分子群であり、ヒトには 33 種類が存在する。テトラスパニンは細胞接着・細胞遊走・細胞膜融合・免疫シナプス形成など多細胞生物における細胞間相互作用、癌の転移・腫瘍の悪化・慢性炎症などの病理学的過程、さらにマラリア原虫やウイルスの感染にも関わっている。テトラスパニンはインテグリンファミリー・Notch リガンド・ γ セクレターゼ・ADAM10・MHC などの様々な細胞膜タンパク質をパートナー分子として複合体を形成する。さらにテトラスパニン同士や種々の細胞内タンパク質とも二次的に結合する。

(2)本研究代表者は過去に線虫 *C. elegans* を用いた遺伝学的解析から線虫テトラスパニン TSP-15 が活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) を産生する NADPH オキシダーゼファミリーのひとつである Dual oxidase (DUOX; 線虫 BLI-3) の機能に必要な分子であることを証明した。ROS は好気呼吸の有害な副産物とされ、その制御機構の慢性的な破綻は老化や疾病の原因となる一方で、ROS は NADPH オキシダーゼファミリーによって生理的に産生され、生体にとって有益な役割を持つシグナル分子であることも分かっている。

2. 研究の目的

(1)テトラスパニンは様々なパートナー分子と相互作用し、多彩な生理・病理現象に関与する。本課題では DUOX/BLI-3 による ROS 産生システムにおけるテトラスパニン TSP-15 の必須要求性をテトラスパニンの機能解析の有効な評価系として用いる。この系によってテトラスパニンがパートナー分子へ与える修飾・構造・細胞膜環境の変化などの分子制御の実体を探索することで、テトラスパニンの分子的役割の解明に繋げることを目的とする。

(2)ROS はその高い酸化能力で生体分子を不可逆的に変性させるために、その産生と利用には厳密な制御機構が必要である。本研究対象である DUOX/BLI-3 を生理的 ROS 産生システムのモデルとし、その制御メカニズムの包括的な理解を目指す。ROS 産生システムの適切な制御と活性化によって生体へもたらされる利益の応用の可能性を模索する。

3. 研究の方法

(1)テトラスパニンの機能ドメイン解析：DUOX/BLI-3 による ROS 産生システムは DUOX/BLI-3 とその活性化因子である TSP-15 および DUOX activator (DUOXA; 線虫 DOXA-1) を細胞に共発現することで再構

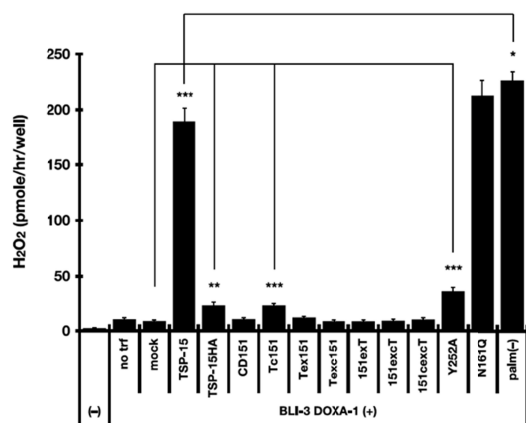
築できる。DUOX/BLI-3 による ROS 産生過程において、TSP-15 の必要な分子領域を探索した。他のテトラスパニン分子(ヒト CD151)とのキメラ TSP-15 および点変異を導入した TSP-15 を作製し、DUOX/BLI-3 による ROS 産生システムに対する影響 (DUOX/BLI-3 との結合・細胞内局在・ROS 産生再構成能) および線虫 *tsp-15* 変異体のレスキュー効果を比較し評価した。

(2)プロテオーム解析による探索：

DUOX/BLI-3 による ROS 産生にはテトラスパニン TSP-15 との相互作用が必須である。テトラスパニンの具体的な分子的役割を探索するために、培養細胞を用いて DUOX/BLI-3 タンパク質複合体や翻訳後修飾の動態の変化を TSP-15 有り・無し条件下において比較し探索した。第 1 に共免疫沈降法を用い DUOX/BLI-3 複合体に含まれる因子の動態変化を検証した。第 2 に総細胞抽出液を用い二次元電気泳動を用いたプロテオーム解析を行い、網羅的にタンパク質の動態を解析した。

4. 研究成果

(1)キメラ TSP-15 および点変異 TSP-15 を作製し、DUOX/BLI-3 による ROS 産生過程に必要な TSP-15 の機能ドメインを検討した。(下グラフ)



TSP-15 の細胞外領域をスワップしたキメラ TSP-15 (Tex151, Texc151) では DUOX/BLI-3 による ROS 産生が見られず、さらに *tsp-15* 線虫変異体もレスキューできなかった。これらのキメラ分子は DUOX/BLI-3 と複合体の形成が出来なかったことから、TSP-15 との直接的相互作用が DUOX/BLI-3 の機能に必要なことが分かった。一方で細胞外領域以外をスワップしたキメラ TSP-15 (151exT) は DUOX/BLI-3 とは相互作用するものの、ROS 産生および変異体レスキューともに見られなかったことから、TSP-15 と DUOX/BLI-3 との相互作用だけでは ROS 産生の機能再構成には十分ではないことも分かった。

TSP-15 に対する N 型糖鎖付加 (N161Q) およびパルミチン酸修飾 (palm(-)) 部位へ

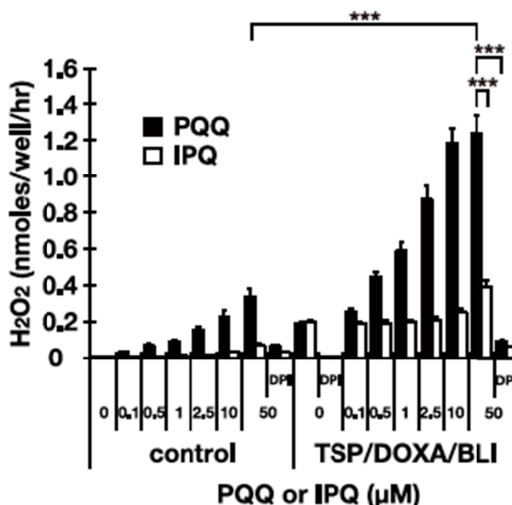
の変異導入は、DUOX/BLI-3 による ROS 産生に影響せず、また *tsp-15* 線虫変異体もレスキューしたことから、TSP-15 におけるこれらの翻訳後修飾は少なくとも DUOX/BLI-3 の ROS 産生過程においては重要ではないことが分かった。

C 末端細胞内領域を改変した TSP-15 (TSP-15HA, Tc151, Y252A) では ROS 産生は著しく減弱していたものの有意に認められた。さらにこれらの中で Y252A は線虫 *tsp-15* 変異体をレスキューすることができた。これらの分子も DUOX/BLI-3 との複合体形成は影響されていなかったことから、TSP-15 と DUOX/BLI-3 の直接的相互作用が DUOX/BLI-3 活性化の必要十分条件ではないこと、さらに TSP-15 の C 末端領域に DUOX/BLI-3 による ROS 産生システムの再構築に重要な役割があることが示唆された。

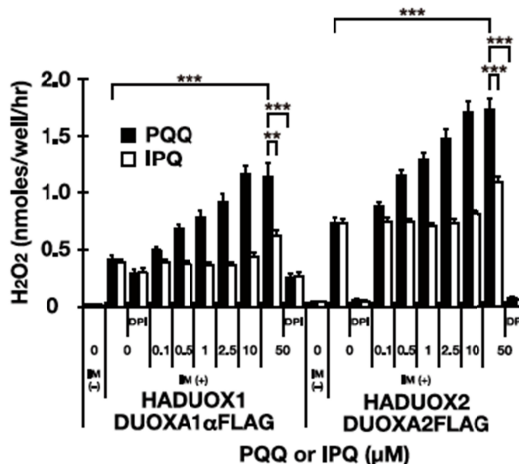
(2) テトラスパニン TSP-15 が DUOX/BLI-3 活性化に果たす分子的作用を探索するために、TSP-15 の有無で変動する DUOX/BLI-3 複合体分子や翻訳後修飾を探索した。DUOX/BLI-3 複合体として共免疫沈降してくる分子群において大きな差は認められなかったが、二次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析によって、TSP-15 の有無で異なる挙動を示すタンパク質を複数確認した。今後これらの因子を同定し、DUOX/BLI-3 活性化との機能的関連を検証していく予定である。

(3) ROS の持つ新たな生理的役割の探索：“好気呼吸の有害な副産物” という ROS に対する一方向的な見方は近年修正されつつあり、その生理的役割が注目されている。特に ROS は酸化ストレス因子として個体の老化や疾病の原因と考えられてきたが、近年ではミトコンドリアから放出される ROS (mtROS) が寿命延長などの効果をもたらすことも明らかとなり、ROS が生体にとって一方的な悪玉因子であるという見方は修正されつつある。一方これまでに複数の健康有効性が報告されていた補酵素ピロロキノリンキノン (PQQ) がストレス応答経路を活性化する事で線虫の寿命を延長する効果を示すことが発見された。そこで PQQ の DUOX/BLI-3 に対する効果を DUOX/BLI-3 システムを再構成した培養細胞にて検証した。その結果、添加 PQQ の濃度依存的に DUOX/BLI-3 から産生される ROS が増大することが明らかとなった(右上グラフ)。さらにヒトの DUOX1/2 もまた PQQ によって活性化されることが明らかとなった(右下グラフ)。すなわち PQQ の効果は DUOX/BLI-3 の ROS 産生を抑え酸化ストレスを減弱させるのではなく、逆に DUOX/BLI-3 の ROS 産生を活性化し、生体のストレス応答経路を誘導することによってもたらされるものであることが分かった。PQQ の DUOX/BLI-3 に対する活性化効果は添

加後ただちに現れること、DUOX/BLI-3 複合体を形成するタンパク質の発現や細胞膜局



在は影響されないこと、PQQ 濃度依存的に ROS 濃度が指数関数的に増大することから、



PQQ は DUOX/BLI-3 の活性を触媒的に増強すると考えられた。

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)

[学会発表] (計 2 件)

足立将大、坂東里美、平本和也、加嶋紀彦、森部弘樹、柴田幸政、西脇清二、線虫 *C. elegans* における ROS を介した咽頭サイズ制御機構の解析、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日、横浜
 森部弘樹、小中央良二、目加田英輔、線虫における Dual Oxidase/BLI-3 の役割、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 2 日、神戸

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

名称：新規な NADPH 酸化酵素活性化剤及び
その製造方法、並びに NADPH 酸化酵素の活
性化方法

発明者：森郁恵、笹倉寛之、森部弘樹、池
本一人

権利者：国立大学法人名古屋大学、学校法
人久留米大学、三菱瓦斯化学株式会社

種類：特許願

番号：特願 2015-185913

出願年月日：2015 年 9 月 18 日

国内外の別：国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

森部 弘樹 (MORIBE, Hiroki)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：90423102

(2)連携研究者

目加田 英輔 (MEKADA, Eisuke)

大阪大学・微生物病研究所・招聘教授

研究者番号：20135742