

食細胞 NADPH オキシダーゼの機能解析と人為的制御

学位論文内容の要旨

1 はじめに

感染特にその初期の宿主応答には好中球が不可欠であり、好中球による殺菌には食細胞NADPHオキシダーゼという酵素が重要な役割を果たしている。休止時には不活性型であった本酵素は、微生物等の貪食時に特異的に活性化され、その結果生成された活性酸素が強力な殺菌剤として働く。本酵素の遺伝的欠損症(慢性肉芽腫症; Chronic Granulomatous Disease, CGD)の患者は重篤な感染症を反復ししばしば死に至ることからも、その重要性は十分理解されるだろう。本研究では、本酵素の活性化機構について新しい知見が得られ、さらにこの酵素活性を自由に制御する系を確立した。以下食細胞NADPHオキシダーゼについて説明する。

2 食細胞NADPHオキシダーゼ

白血球の中には、好中球、好酸球、好塩基球、単球(およびその組織型であるマクロファージ)、リンパ球などの細胞があり、特に好中球、好酸球、単球のことを食細胞とも呼ぶ。食細胞は、普段は休止状態にあるが、病原性微生物が生体内に侵入してくると、そこへすみやかに遊走して、微生物を認識して貪食、殺菌を行う。食細胞が働いているときは、血管の透過性の昇進や血球および血漿の局所への集積など、組織反応を伴う複雑な現象が起きて、結果的に炎症となる。つまり食細胞による生体防御は炎症の本態といえる。食細胞による殺菌は主に、病原性微生物を取り込んで形成された食胞内で行われる。食胞内での殺菌においては、NADPHオキシダーゼによって生成された O_2^- (スーパーオキシド、活性酸素)が重要な役割を果たしている。すなわちNADPHオキシダーゼから生じた O_2^- は非酵素的に過酸化水素(H_2O_2)やヒドロキシラジカル($OH\cdot$)となり、ヒドロキシラジカルはさらにミエロペルオキシダーゼによって次亜塩素酸($HOCl$)となって、強力な殺菌作用を発揮する。

NADPH oxidaseは細胞質のNADPHから電子を受け取り、それを酸素分子に渡して O_2^- を生成する酵素である。この酵素は、電子伝達を担う細胞膜貫通型タンパク質cytochrome b_{558} ($cyt\ b_{558}$)と、細胞質因子と呼ばれる

$p67^{phox}$ 、 $p47^{phox}$ 、 $p40^{phox}$ 、および低分子GTP結合タンパク質Racとから成る多成分酵素である(肩文字の $phox$ はphagocyte oxidaseを、数字は分子量(kDa)を意味する)。 $cyt\ b_{558}$ は $gp91^{phox}$ と $p22^{phox}$ の2つのサブユニットから成り、 $gp91^{phox}$ は2つのヘムと1つのフラビン(FAD)を持ち、 $NADPH \rightarrow FAD \rightarrow$ ヘム→酸素分子というoxidase活性(O_2^- 生成)に必要な電子伝達経路をすべて含んでいる。一方の $p22^{phox}$ は $gp91^{phox}$ の安定化に必要であり、後述のように細胞質因子と結合して、anchorとしての役割を持つ。

休止状態の細胞では上記の電子伝達は全く行われず、 O_2^- は生成されない。 $cyt\ b_{558}$ を活性化して、 O_2^- 生成の電子伝達を引き起こすためには、一群の細胞質因子が細胞質から膜へと移行し、 $cyt\ b_{558}$ と相互作用することが必要である。この活性化には主に2つのスイッチがあるといわれている。1つはRacの活性化(GDP型からGTP型への変換)である。Racは細胞休止時にはGDP型として細胞質に存在するが、活性化してGTP型になると、 $p67^{phox}$ のTPR(tetratricopeptide repeat)ドメインを認識して結合し、細胞膜へと移行する。もう1つのスイッチは $p47^{phox}$ の構造変化で、 $p47^{phox}$ のSH3(src homology 3)ドメインが2つ並列に並んだ領域(タンデムSH3ドメイン)が $p22^{phox}$ のPRR(proline rich region)と結合することが知られている。細胞休止時には、N末端側にあるPXドメイン、およびC末端側poly basic regionが分子内相互作用によって、タンデムSH3ドメインは覆い隠された状態となっており、

しかし細胞活性化時には、リン酸化と脂肪酸のアラキドン酸によって分子内相互作用が壊され、タンデムSH3ドメインがさらされるので、 $p47^{phox}$ は $p22^{phox}$ のPRRと結合できるようになり、細胞質因子は膜へと移行する。以上のように本酵素の活性化機構についていろいろなことがわかってきてはいるがいまだにわからない点も多い。その1つとして、 $cyt\ b_{558}$ とFADの結合について研究した。

3 $cyt\ b_{558}$ とFADの結合によるNADPHオキシダーゼ活性の制御

3-1 背景

本酵素のレドックス中心の1つであるFADは、cyt b₅₅₈のFAD結合部位に結合するといわれている。FADは本酵素の電子伝達に重要な役割を担っているが、cyt b₅₅₈を好中球細胞から精製すると、精製度が高いほどFADは抜け落ちてしまう。FADが抜け落ちたcyt b₅₅₈は、それと細胞質因子で再構成したNADPH oxidase活性は低いが、FADを添加してから活性を測定すると活性は回復する。これをreflavinationと呼ぶが、これについて詳細な研究はなされていなかった。そこで本研究では、cyt b₅₅₈のreflavinationに関する定量的解析を行った。

3-2 実験と考察

ブタ抹消血から好中球を調製し、その膜面分から精製cyt b₅₅₈を得た。細胞質因子として、フリーのFADを含まない組換え体を作成し、p47-p67-p40^{phox} ternary complex (TC)とRac (dominant active)を調製した。得られた精製cyt b₅₅₈、TC、およびRacとで再構成したNADPHオキシダーゼは脂肪酸で活性化させ、その活性をSOD-inhibitable cytochrome c reduction methodによって測定した。この系にFADを添加すると、O₂⁻生成活性が増加し、活性が最大に達するFAD量は細胞質因子濃度に依存しなかった。さらに詳細にプロットしたグラフから、精製cyt b₅₅₈とFADのK_d値を計算すると、0.94 nMという非常に強い結合力を示す数値となった。

活性化前にFADを加えると活性は増大するが、活性化後に加えても活性はほとんど増大しなかった。すなわちFAD存在下で活性化させると、FADはNADPH オキシダーゼに取り込まれてK_dが0.94 nMという強固な結合を示すが、FAD非存在下でNADPHオキシダーゼを活性化させると、その後FADを添加しても取り込まれないことがわかった。NADPHオキシダーゼは一度複合体を形成してしまうと、それが強固な構造体であるため、FADがアクセスできなくなってしまう、もしくはFAD結合部位が何らかの構造変化を受けてFADを取り込めなくなることが考えられる。今回、cyt b₅₅₈はFADが存在しても普段は結合しないが、活性化というイベントが起こると強く結合することが明らかとなった。このcyt b₅₅₈とFADの結合力の変化は、休止状態に電子伝達が起こらないようにする制御の1つだと考えられる。

4 食細胞NADPHオキシダーゼの活性酸素発生系の人為的制御

4-1 背景

生体のシグナル伝達をタンパク質ドメインレベルで制御する系の確立を目的とし、その一例として食細胞NADPHオキシダーゼの活性酸素発生系について検討した。

4-2 実験と考察

食細胞NADPHオキシダーゼは、精製cyt b₅₅₈とp67^{phox}のTPRDメインとp47^{phox}のタンデムSH3ドメイン、およびRacだけで活性を有する。TPRDメインとタンデムSH3ドメインをつなげ、かつリンカー部分にVPPペプチド、テール部分にRHYペプチドを含む融合タンパク質 (TVSRタンパク質と呼ぶ)を作成した。VPPペプチドとは、Grb2と呼ばれるシグナル伝達に関わるアダプタータンパク質、Grb2のN末端SH3ドメインと結合するペプチドである。RHYペプチドはGrb2のC末端側SH3ドメインと結合する。したがってGrb2はTVSRタンパク質に結合し、タンデムSH3ドメインとp22^{phox}のPRRとの結合を阻害することで、NADPHオキシダーゼ活性を抑制することが期待される。TVSRタンパク質を組換え体として大腸菌で発現・精製したあと、精製およびRacとでNADPHオキシダーゼ活性を再構成したところ、天然の細胞質因子のおよそ倍の60 (mol/sec/mol of heme)という活性を示した。これにGrb2を加えたところ、TVSRに対して約20倍加えると8割以上の活性を阻害した。TVSRタンパク質のVPPペプチドとRHYペプチドをアラニンで置き換えた変異体では、Grb2によって活性は阻害されなかった。また阻害されたNADPHオキシダーゼ活性は、Grb2との結合力が強いVPP-RHY2価ペプチドを添加することで、ほとんど活性を回復することができた。タンパク質の改変は、酵素の活性や安定性の改善などがほとんどであったが、今回のようにシグナル伝達をタンパク質分子レベルで制御する試みははじめてだと思われる。また、この手法は他の様々なシグナル伝達系にも応用可能である。このような学術的価値のみならず、この制御系には、過剰な炎症を抑えるといった医学的応用も期待できるであろう。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 稲 垣 冬 彦

副 査 教 授 横 沢 英 良

副 査 助 教 授 川 原 裕 之

副 査 助 教 授 森 岡 弘 志

学 位 論 文 題 名

食細胞 NADPH オキシダーゼの機能解析と人為的制御

好中球活性酸素発生系は貪食した微生物を活性酸素を発生して殺菌するシステムである。膜タンパク質である Cyt. b₅₅₈ と細胞質成分である p40^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} より構成される NADPH 酸化酵素が活性酸素発生の本体である。活性酸素は生体にとって有害であるため、その産生は厳密に制御されていることが必要であり、貪食に伴い細胞質成分が膜成分と結合することにより活性酸素発生のスイッチが入る。橋田修吉は好中球 NADPH 酸化酵素を対象として、①NADPH 酸化酵素の活性化機構の解明および②好中球活性酸素発生系を対象としたシグナル伝達の人為的制御の二つの課題について研究を行った。

① NADPH 酸化酵素の活性化機構の解明

NADPH 参加酵素については再構成系が確立されているが、フルの活性を得るには、活性化剤であるミリスチン酸とともに FAD を新たに加える必要性 (reflavination と呼ぶ) が指摘されていた。橋田修吉は再構成系を用いて reflation の機構を解明することを目的とした。FAD の添加を活性化剤添加の前後に行ない、その効果を検討した。活性化前に FAD を加えるとフルの活性を示すが、活性化後に FAD を加えると、活性は非活性時と変わらないことを示した。この結果は、活性化剤による Cyt b₅₅₈ の構造変化の誘起とそれに伴う FAD 結合部位の形成、さらに細胞質因子の結合により FAD の結合ポケットが覆われ、結合が安定化されることを示している。橋田修吉は丁寧な生化学実験を行い reflation の意義を明らかにした。

② 好中球活性酸素発生の人為的制御

生体内においてシグナル伝達の直接の担い手であるシグナル伝達タンパク質は、特定のアミノ酸配列相同領域 (ドメイン) が複数組み合わせられた構成となっている。ドメインは単独で立体構造とそれに基づく機能を有し、ドメイン同士の分子内および分子間相互作用を介して高度なシグナル伝達ネットワークを構築している。したがって、タンパク質ドメインを自由に組み合わせることで、生体のシグナル伝達を人為的に制御することが可能となる。

例として好中球活性酸素発生系を取り上げた。すでに述べたように、好中球の活性酸素発生系は NADPH 酸化酵素と呼ばれる複合酵素が担っている。橋田修吉は複合酵素の異なる細胞質因子サブユニットに含まれる機能ドメインのうち、Cyt b₅₅₈ への結合ドメインであるトリコペプチドリピートとタンデム SH3 ドメインを連結したタンパク質を創生した。この融合タンパク質はミリスチン酸刺激によりフルの活性酸素発生能を発揮した。この系に細胞増殖活性にかかわる Grb2 の結合部位をタンデム SH3 をはさんで加えることにより、Grb2 の添加により活性酸素発生を 80% 以上抑制することが出来た。さらに、より結合能の強い Grb2 結合ペプチドを添加することにより、活性酸素の発生を回復させることを示した。シグナル伝達を人為的に制御した初めての例である。この技術は汎用性の高いものであり、ドメインを用いた新しいタンパク質の創生が可能であること、人為的な制御機構を加えることにより、シグナル伝達を制御できることを

示した点で評価される。

以上、橋田修吉の業績は北海道大学大学院薬学博士としてふさわしいものである。なお、第1の業績についてはJ. Biol. Chem. に投稿し現在修正版を作成中である。第2の業績については「シグナル伝達活性を有する細胞質タンパク質の活性制御方法」および「NADPH オキシダーゼ活性を阻害するポリペプチド」の2件として特許出願をおこなった。