学位論文題名

好中球活性酸素発生系細胞質因子 p 40^{p_{hex}},
p 47^{p_{hex}} の構造と機能

学位論文内容の要旨

好中球は白血球の約半数を占め、急性炎症などの場で細菌などの微生物の貪食を主に行う。貪食された微生物はファゴソーム内でNADPHオキシダーゼの発生する活性酸素によって殺菌される。活性酸素は好中球が微生物を殺菌する上で非常に重要であるが、一方で自己組織にも影響を与えるため、生体内でのNADPHオキシダーゼの活性化は厳密に制御されている。

NADPHオキシダーゼの酵素本体は膜タンパク質チトクロム *b₅₅₈* (gp91とp22のヘテロダイマー) であるが、自身のみでは活性酸素を発生することができない。活性化にはこの他に細胞質因子複合体(p40, p47, p67)および低分子量GTP結合タンパク質Racがチトクロム *b₅₅₈* と複合体を形成することが必要である。休止時においては細胞質因子複合体、Racは細胞質中に、チトクロム *b₅₅₈* は膜上に存在している。活性化時には(1)細胞質因子複合体が活性化され細胞膜直下へ移行する(2)Racが活性化されることにより細胞膜直下へ移行する(3)これらのタンパク質とチトクロム *b₅₅₈* とが複合体を形成する、という多段階のメカニズムが必要である。

細胞質因子p40, p47, p67はいずれも複数のドメインからなるマルチドメインタンパク質であり、ドメイン間の相互作用を巧みに使うことでNADPHオキシダーゼの活性化に深く関わっている。これまで細胞質因子については、ドメインおよび強固な相互作用を持つドメイン間の複合体といった、いわゆる最小単位での構造解析が数多く行われてきた。その一方で、細胞質因子全長あるいは細胞質因子複合体全体についての構造解析はほとんど行われていない。その理由としては、細胞質因子p40, p47, p67がマルチドメインタンパク質であるため、一つの決まった形状を取りづらく結晶化が困難であることが挙げられる。しかしながら、全長タンパク質の示す性質をドメイン単体で説明することは出来ない事例も多く、全長あるいは全長に近い構造体での構造解析が系をより深く理解する上で重要である。本研究ではNADPHオキシダーゼの制御機構における細胞質因子複合体の役割について理解を深めることを目的とした。まず溶液中における細胞質因子(複合体)の構造的な特徴を理解するために、超遠心分析およびX線小角散乱実験による解析を行った(1)。また、複数のドメインを含んだマルチドメインタンパク質である細胞質因子p40, p47の結晶構造解析を行うことで、分子内でのドメイン間相互作用についての情報を得ることを試みた。

(1)細胞質因子(複合体)の超遠心分析、X線小角散乱実験による解析

p40, p47, p67およびp47/p67, p67/p40, p47/p67/p47複合体の超遠心分析より、p40, p47, p67は溶液中で、単体で存在していることが示された。また、各複合体は1:1あるいは1:1:1の比率で結合していることが示された。小角散乱の実験から、p40, p47はやや球状から外れた形を、p67や各複合体は非常に伸びた形を有していることがわかった。小角散乱データから低分解能モデルの構築を行い、構造の比較を行ったところ、p67と各複合体の形状が良く似ていることがわかった。これにより、各複合体の伸びた形状は、p67のそれを反映していることが示唆された。

(2) p40の結晶構造解析

p40はN末端側からPXドメイン、SH3ドメイン、PB1ドメインをもつ。p40全長を大腸菌によ

り大量発現・精製し結晶化・回折データ収集・位相決定、構造モデルの構築を行った。

結晶中でp40は非対称単位中に二分子存在していた。この二分子で重ね合わせを行うと、PXドメインとPB1ドメインはほぼ同じ位置に重なるが、SH3ドメインは全く重ならない。このことから、PXドメインとPB1ドメインとの間に相互作用が存在することが示唆された。X線小角散乱実験から求めた溶液中での低分解能モデルと本結晶構造を重ね合わせたところ、両者は大きさ、形状共にほぼ一致し、結晶中で観察されたPXドメインとPB1ドメインとの相互作用が溶液中でも存在することが強く示唆された。

相互作用によりPXドメインの機能が自己阻害されているのではと考え、実験を行った。p40のPXドメインは、初期エンドソームに集積するPI(3)Pに特異的に強く結合することが知られている。そこで、p40全長、PXドメインのみ、PB1ドメイン欠失体、SH3ドメイン欠失体とGFPとの融合タンパク質をそれぞれ作製し、HeLa細胞を用いて初期エンドソームへの局在を調べた結果、PB1ドメインを持たないコンストラクトの局在は初期エンドソームと一致していたのに対し、PB1ドメインを有するコンストラクトでは細胞質に均等に分布し初期エンドソームに局在しなかった。また、PXドメインとPB1ドメインとの相互作用に関わるPB1ドメイン上の残基を点変異させたコンストラクトについて同様の実験を行ったところ、PB1ドメインを有するにもかかわらず初期エンドソームに局在が見られた。以上の結果より、PXドメインとPI(3)Pとの結合が結晶中で見られるPXドメインとPB1ドメインとの相互作用により自己阻害されていることが示唆された。PI(3)Pはファゴソーム膜に多く存在していることから、p40のPXドメインとPI(3)Pとの相互作用はNADPHオキシダーゼの機能に重要であり、PB1ドメインによる自己阻害はNADPHオキシダーゼの制御機構の一つであると考えられる。

(3) p47の結晶構造解析

p47はN末端側からPXドメイン、タンデムSH3ドメイン、PBR(poly basic resion)、PRR(proline rich region)をもつ。p47の構造解析には、C末端のPRRを除いたコンストラクト、p47(1-340)を用いた。p47(1-340)を大腸菌により大量発現・精製し結晶化・回折データ収集・位相決定、構造モデルの構築を行った。

結晶中でp47(1-340)は非対称単位中に二分子存在していた。本構造では、同一分子内のタンデムSH3ドメインと相互作用すべきPBRが、隣接する分子と互いに入れ違い、相手側のタンデムSH3ドメインと相互作用する構造をとっていた。超遠心分析では、p47(1-340)は常温では単量体であることから、本構造でのPBRの入れ違いは結晶化に由来するものであると考えられる。

これまでの研究により、PXドメインと脂質との相互作用がタンデムSH3ドメインにより自己阻害されていることが示されていた。しかし、本構造中でのPXドメインとタンデムSH3ドメインとの相互作用は、PXドメインの脂質結合部位に影響を与えるようなものではなく、脂質との結合能の変化を説明することはできなかった。p47(1-340)は4℃で二量体を形成すること、結晶化条件が4℃であることから、本構造が二量体化に伴いドメイン配置の変化した状態の構造を示している、という可能性が考えられる。

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

好中球活性酸素発生系細胞質因子 p 40^{phex}, p 47^{phex} の構造と機能

好中球は白血球の約半数を占め、急性炎症などの場で細菌などの病原微生物の貪食を主に行う。貪食された病原微生物はファゴソーム内で好中球NADPHオキシダーゼの発生する活性酸素により殺菌される。活性酸素は好中球が微生物を殺菌する上で重要であるが、一方で自己の組織にも重大な損傷を与えるため、生体内の好中球NADPHオキシダーゼの活性化は厳密に制御されている必要がある。本学位論文は好中球NADPH酸化酵素を取り上げ、活性酸素発生の制御機構を明らかにすることを目的としている。

NADPHオキシダーゼの酵素本体は膜タンパク質cytochrome b_{558} (gp91とp22のヘテロダイマー)であるが、自身のみでは活性酸素を発生することができない。活性化にはこの他に細胞質因子複合体(p40, p47, p67)および低分子量GTP結合タンパク質Racがcytochrome b_{558} と複合体を形成することが必要である。休止時には細胞質因子複合体、Racは細胞質中に、cytochrome b_{558} は膜上に存在している。活性化には(1)細胞質因子複合体の活性化 (2)Racの活性化 (3)活性化されたタンパク質の膜直下への移行(4)cytochrome b_{558} との複合体形成という多段階のメカニズムが必要である。

細胞質因子p40, p47, p67はいずれも複数のドメインからなるマルチドメインタンパク質であり、ドメイン間の相互作用を巧みに使うことでNADPHオキシダーゼの活性化に深く関わっている。休止時には、p47のPRR(Proline Rich Region)とp67のC末側SH3ドメインとの相互作用、p40とp67とのPB1ドメイン間の相互作用により、p67を中心に細胞質因子複合体が形成される。また、p47のN末側SH3ドメイン、C末側SH3ドメイン(合わせてタンデムSH3ドメインと表記)はp47自身の持つPBR(Poly Basic Region)により自己阻害状態にある。活性化時にはまず、PBRがリン酸化を受けることによりタンデムSH3ドメインが自己阻害から開放される。結果タンデムSH3ドメインは結合相手であるcytochrome b_{558} の構成成分p22と相互作用することが可能になり、p47に引かれる形で

細胞質因子複合体が膜直下へ移動し、NADPHオキシダーゼは活性化状態となる。

これまで細胞質因子については、ドメイン単位あるいは強固な相互作用を持つドメイン間の複合体を対象として構造解析が行われてきたが、細胞質因子全長あるいは細胞質因子複合体全体についての構造解析はまったく行われていない。その理由としては、細胞質因子p40, p47, p67がマルチドメインタンパク質であるため、一つの決まった形状を取りづらく結晶化が困難であることが挙げられる。しかしながら、分子内ドメインの相互作用に起因する制御機構の解明には、全長あるいは全長に近い大きな構造フレームでの構造解析が不可欠である。申請者は細胞質因子の構造を、出来るだけ全長に近い形で構造解析を行い、ドメイン間相互作用に基づく活性制御の機構を解明することを目的としてX線結晶構造解析を進めた。マルチドメインのタンパク質は結晶のパッキングの影響を受けやすいこともあり、溶液中でのタンパク質分子の形状解析ならびに変異体解析は不可欠である。このために申請者はX線小角散乱、超遠心分析をおこない、結晶構造解析より明らかにされた形状との比較をおこなうとともに、相互作用の有無を変異体解析により確かめた。

申請者の最大の研究成果は、p40全長の結晶構造解析と分子内相互作用の存在を明らかにした点である。p40はPX-SH3-PB1のドメインより構成されるが、最近の細胞を用いた実験より、p40は活性酸素発生には直接関与しないが、活性化に伴い膜へ移行し、20倍程度活性酸素の発生を亢進することが明らかにされた。P40の結晶構造解析の結果、PXドメインとPB1ドメイン間には相互作用がみられるのに対し、SH3ドメインは電子密度が薄く、比較的自由度が高いことが示された。X線小角散乱実験から求めた溶液中での三次元構造モデルと本結晶構造を重ね合わせたところ、両者は大きさ、形状共にほぼ一致したことから、結晶中で観察されたPXドメインとPB1ドメインとの相互作用は溶液中でも存在し、ドメインの配置を規定していることがわかった。結合界面にはPI(3)P結合部位が一部含まれており、PB1ドメインとの相互作用によりPXドメインのPI(3)P結合部位はマスクされていることを示した。実際、ドメイン間の相互作用に關与する残基に変異を加えたところ、p40はPI(3)Pを多く含む初期エンドソームに局在した。PI(3)Pはファゴソーム膜に多く存在していることから、p40のPXドメインとPI(3)Pとの相互作用はNADPHオキシダーゼの機能に重要であり、PB1ドメインによるp40の自己阻害はNADPHオキシダーゼの制御機構の一つであることを明らかにした。

申請者は修士課程において家族性パーキンソン病の原因タンパク質であるDJ-1の構造を決定した。この論文は国際的にも高い評価を受けている。博士課程進学後は、好中球活性酸素発生系の制御機構の解明を研究テーマに変更したため、参考論文としてあげた。

以上、申請者の業績は薬学博士としてふさわしいものである。