

---

## Original Article

---

# 慢性肉芽腫症におけるNADPHオキシダーゼ構成成分 p67<sup>phox</sup>の細胞内不安定性と分解酵素について

長谷部武<sup>1)</sup>, 染谷明正<sup>1)</sup>, 岩渕和久<sup>1)</sup>,  
藤田宏夫<sup>2)</sup>, 布井博幸<sup>3)</sup>, 長岡 功<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>順天堂大学医学部生化学・生体防御学

<sup>2)</sup>順天堂大学医学部小児科

<sup>3)</sup>宮崎医科大学小児科

*Proteolysis of the missense mutants of p67<sup>phox</sup>, a component of NADPH oxidase, in chronic granulomatous disease*

Chronic granulomatous disease (CGD) is characterized by the failure of phagocytes to kill certain bacteria and fungi. This is caused by deficiencies in one of the components of NADPH oxidase, a superoxide-producing enzyme in phagocytic leukocytes. In some cases with missense mutations in the p67<sup>phox</sup> gene, mRNA for p67<sup>phox</sup> is present in normal amounts; however, p67<sup>phox</sup> protein is missing, suggesting that the missense p67<sup>phox</sup> protein is labile in the cytosol of phagocytic cells in CGD. In this study, we evaluated the degradation of missense mutants of p67<sup>phox</sup> using p67<sup>phox</sup> G78E (78Gly → Glu) and A128Val (128Ala → Val) as target molecules. By incubation with the cytosol fractions of human peripheral blood neutrophils and promyelocytic HL-60 cells, G78E and A128V were time-dependently degraded, whereas wild-type p67<sup>phox</sup> was not degraded. Importantly, the degradation of missense mutant G78E was completely abolished by inhibitors for serine proteases such as DFP, PMSF and soybean trypsin inhibitor, but was not affected by proteasome inhibitor MG-132 and calpain inhibitor ALLN. These observations suggest that missense mutants of p67<sup>phox</sup> are labile and likely to be degraded in CGD by cytosolic serine protease(s) in phagocytic cells, and proteasome and calpain are unlikely to be involved in the degradation.

Rec.9/17/2003, Acc.12/1/2003, pp47-54

Takeshi Hasebe<sup>1)</sup>, Akimasa Someya<sup>1)</sup>, Kazuhisa Iwabuchi<sup>1)</sup>, Hiro-o Fujita<sup>2)</sup>, Hiroyuki Nunoi<sup>3)</sup>, and Isao Nagaoka<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Host Defense and Biochemical Research,

<sup>2)</sup>Department of Pediatrics, Juntendo University, School of Medicine

<sup>3)</sup>Department of Pediatrics, Miyazaki Medical College

**Key words** chronic granulomatous disease, NADPH oxidase, p67<sup>phox</sup>, serine protease, proteolysis

## はじめに

慢性肉芽腫症(chronic granulomatous disease; CGD)は、白血球の活性酸素生成酵素であるNADPHオキシダーゼの活性が低下することによって殺菌能が障害され、重篤な微生物感染を繰り返す遺伝性疾患である<sup>1-3)</sup>。その頻度は出生25万人あたり1人と推定されている。NADPHオキシダーゼは、細胞膜成分のシトクロムb<sub>558</sub>(gp91<sup>phox</sup>とp22<sup>phox</sup>からなる)と細胞質成分のp47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, Rac1/2からなる複合酵素系であり、白血球が刺激を受けると、膜上でこれら構成成分が会合し、NADPHオキシ

ダーゼ複合体が形成されスーパーオキシドを生成する<sup>4-6)</sup>(図1)。

近年,CGDの原因が,NADPHオキシダーゼ構成タンパク質の遺伝子異常に基づくことが明らかにされ,これまでにgp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>の遺伝子変異が発見されている<sup>1-3)</sup>。その中で, gp91<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>の欠損例では,ミスセンス変異によってアミノ酸が一残基だけ置換するものが比較的多く見出されている。そして興味深いことに, p67<sup>phox</sup>の欠損例ではmRNAの発現が観察されるものの,タンパク質の発現がほとんど認められない

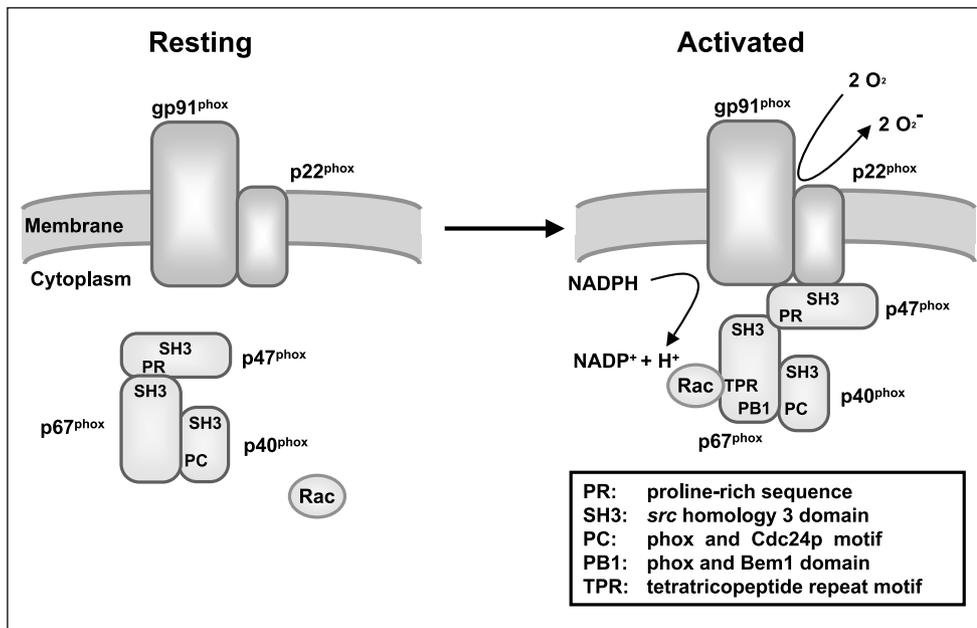


図1 食細胞NADPHオキシダーゼの構成成分とオキシダーゼの活性化

NADPHオキシダーゼは細胞膜成分のシトクロムb<sub>558</sub>(gp91<sup>phox</sup>とp22<sup>phox</sup>からなる)と細胞質成分のp47<sup>phox</sup> p67<sup>phox</sup> p40<sup>phox</sup> , Rac1/2からなる複合酵素系であり、白血球が刺激を受けると膜上でこれら構成成分が会合し、NADPHオキシダーゼ複合体が形成されスーパーオキシドを生成する。PR~TPRはNADPHオキシダーゼ構成成分のタンパク質-タンパク質相互作用に関わる領域を示す。

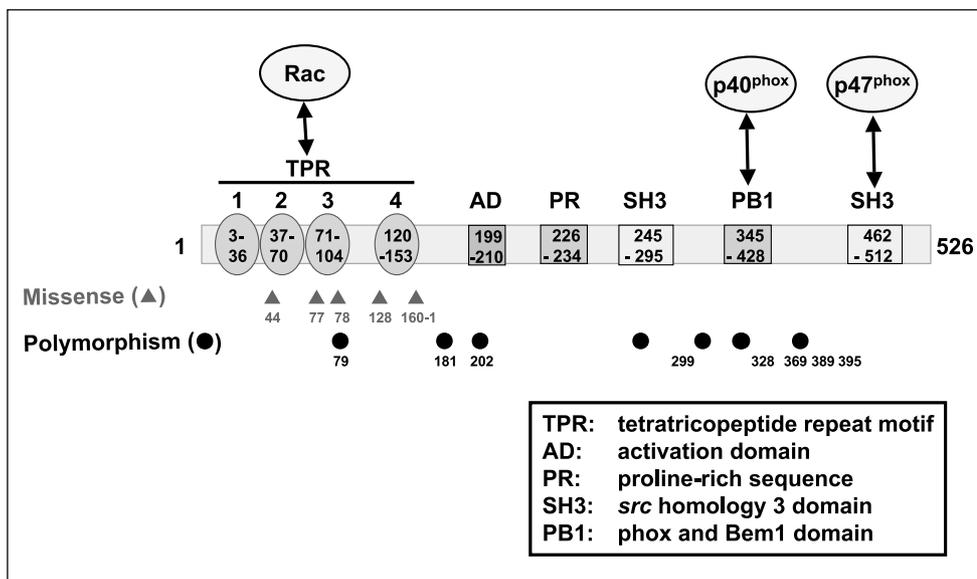


図2 p67<sup>phox</sup>の機能ドメインと変異

p67<sup>phox</sup>は526アミノ酸からなるタンパク質であり、分子内にタンパク質-タンパク質相互作用に関与するTPR、SH3、PB1などの機能ドメインを持っている。p67<sup>phox</sup>欠損のCGDでは、ミスセンス変異がTPRモチーフ内に集中している。

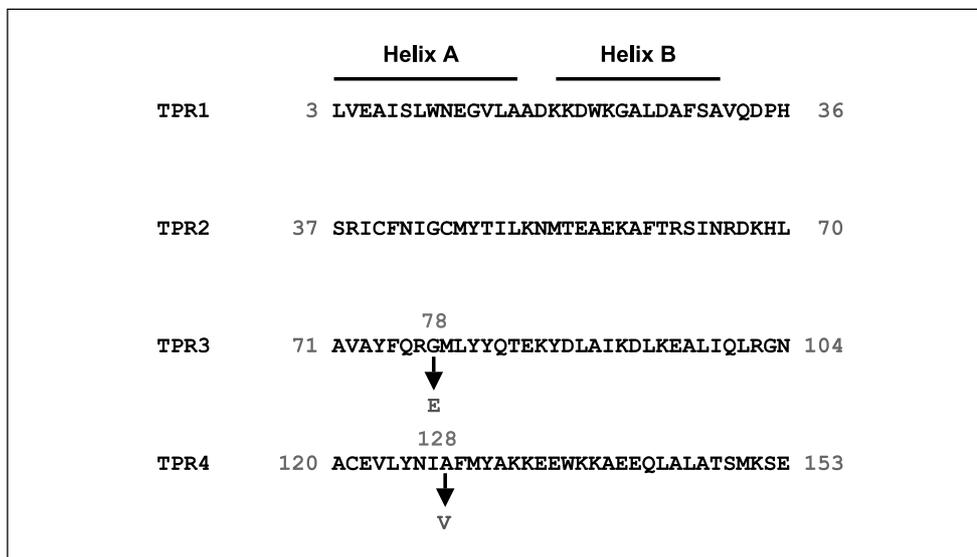


図3 p67<sup>phox</sup>のTPRモチーフのアミノ酸配列

TPRモチーフは、それぞれアミノ酸34個からなる繰り返し配列であり、その中で2つのヘリックスが形成される。本研究では、78番目のグリシンがグルタミン酸に置換された変異体(G78E)と128番目のアラニンがバリンに置換された変異体(A128V)を用いた。

例があり、この異常例では p67<sup>phox</sup> が細胞内で不安定になっている可能性が考えられる<sup>7,8)</sup>。しかし、NADPH オキシダーゼ構成タンパク質の不安定化に関する研究は全く行われていない。

p67<sup>phox</sup> は、526 アミノ酸からなるタンパク質であり、分子内にタンパク質-タンパク質相互作用に関与する機能ドメインを持っている<sup>9-13)</sup>(図2)。すなわち、Rac と相互作用する TPR (tetra-ricopeptide repeat) モチーフや p47<sup>phox</sup> と相互作用する SH3 (src homology 3) ドメイン、p40<sup>phox</sup> と相互反応する PB1 などがある。そして、p67<sup>phox</sup> 欠損の CGD では、ミスセンス変異が TPR モチーフ内に集中している(図2)。TPR モチーフは、それぞれアミノ酸 34 個からなる繰り返し配列であり、その中で 2 つの  $\alpha$ -ヘリックスが形成される(図3)。

本研究では、TPR モチーフのヘリックス形成領域にミスセンス変異を持つタンパク質として、78 番目のグリシンがグルタミン酸に置換された変異体 (G78E) と 128 番目のアラニンがバリンに置換された変異体 (A128V) に着目し<sup>8,14)</sup>、これら変異タンパク質の細胞内不安定性ならびにその分解に関わる酵素について検討した。

## 材料と方法

### 1. ヒト好中球および HL-60 細胞の調製と細胞成分分析法

末梢血好中球は、ヘパリン添加ヒト静脈血から Polymorphprep (Nycomed Pharma 社) を用いて分離し、2 mM EDTA を含む phosphate-buffered saline (PBS) に懸濁した。また、ヒト前骨髄球性白血病細胞株 HL-60 は 10% ウシ胎児血清、100 U/ml penicillin、0.1 mg/ml streptomycin を含む RPMI1640 培地で維持した。

ヒト末梢血好中球、あるいはヒト前骨髄球性白血病細胞株 HL-60 を relaxation buffer (100 mM KCl, 3 mM NaCl, 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM PIPES, pH7.2) に懸濁した後、N<sub>2</sub>-cavitation にて細胞を破砕し、分画遠心法により顆粒画分と細胞質画分を調製した<sup>15)</sup>。

### 2. p67<sup>phox</sup> および p67<sup>phox</sup> 変異タンパク質の調製

野生型 p67<sup>phox</sup> の cDNA は、ジメチルスルホキシド処理した HL-60 細胞から単離した total RNA を鋳型として Titan™ One Tube RT-PCR キット (Roche Diagnostics 社) を用いて RT-PCR 法により調製した。その際、コード領域を含む cDNA を増幅するために、すでに報告されている p67<sup>phox</sup> の cDNA 塩基配列 (accession number M32011.1)<sup>16)</sup> を基にセンスプライマー、アンチセンスプライマーとして p67-S1 (nt 27-46; 5'-ttggctgaagctctcttg-3') と p67-AS1 (nt 1730-1711; 5'-cagtatacagcagaagggtg-3') をそれぞれ用いた。その後、合成された野生型 p67<sup>phox</sup>cDNA を pBluescript

SK/-ベクターにサブクローニングした (pBluescript/p67<sup>phox</sup>WT)。

p67<sup>phox</sup> のミスセンス変異タンパク質を発現するための cDNA は、overlapping PCR 法により作成した<sup>17)</sup>。すなわち、p67<sup>phox</sup>G78E の cDNA を合成するために、p67<sup>phox</sup>WT の cDNA を鋳型として、p67-S1 とアンチセンスプライマー p67-AS2 (nt 310-291; 5'-gtagagcatctctctgttgg-3') を、またセンスプライマー p67-S2 (nt 290-313; 5'-ttccaacgagagatgctctactac-3') と p67-AS1 を用いてそれぞれ PCR を行った (下線は変異を導入するために置換したヌクレオチドを示す)。その後、それぞれの PCR 産物を混合し、p67-S1 と p67-AS1 を用いて再び PCR を行い、p67<sup>phox</sup>G78E cDNA を合成した。一方、p67<sup>phox</sup>A128V を合成するために、p67<sup>phox</sup>WT の cDNA を鋳型として、p67-S1 とアンチセンスプライマー p67-AS3 (nt 460-437; 5'-atacatgaaacaatgttatataa-3') を、またセンスプライマー p67-S3 (nt 440-463; 5'-tataacattgtttcatgatgcc-3') と p67-AS1 を用いてそれぞれ PCR を行った。その後、それぞれの PCR 産物を混合し、p67-S と p67-AS を用いて再び PCR を行い、p67<sup>phox</sup>A128V cDNA を合成した。それぞれの cDNA は最終的に pBluescript SK/-ベクターにサブクローニングした (pBluescript/p67<sup>phox</sup>G78E および pBluescript/p67<sup>phox</sup>A128V)。

その後、pBluescript/p67<sup>phox</sup>WT、pBluescript/p67<sup>phox</sup>G78E および pBluescript/p67<sup>phox</sup>A128V を制限酵素 XbaI で切断することで直鎖にした後、T7 RNA polymerase (Stratagene 社) を用いてそれぞれの cRNA を合成した。そして、合成した cRNA をウサギ網状赤血球の lysate (*in vitro* 翻訳システム, Promega 社) とインキュベーションすることにより野生型 p67<sup>phox</sup> および変異 p67<sup>phox</sup> (G78E と A128V) を *in vitro* で合成した。

### 3. ウエスタンブロット法による p67<sup>phox</sup> および p67<sup>phox</sup> 変異タンパク質の安定性の検討

好中球あるいは HL-60 細胞の細胞質画分 (2 × 10<sup>4</sup> 細胞相当分) と、*in vitro* 翻訳して合成した野生型 p67<sup>phox</sup>、または変異 p67<sup>phox</sup> を relaxation buffer 中で、30 分で一定時間インキュベートした後に、各サンプルを 10% SDS-PAGE で電気泳動を行った。その後、泳動されたタンパク質をニトロセルロース膜に転写し、抗 p67<sup>phox</sup> マウス単クローン抗体と horseradish peroxidase 標識-ヤギ抗マウス-IgG を用いて残存している p67<sup>phox</sup> を検出し、分解の程度を調べた。

なお、p67<sup>phox</sup> 変異タンパク質の分解に関わる酵素の性質を調べるために、以下に示す濃度の酵素阻害剤とともに変異 p67<sup>phox</sup> を、好中球あるいは HL-60 細胞の細胞質画分と 30 分で 2 時間反応させて、酵素阻害剤の影響を検討した: 1 mM DFP (diisopropyl fluorophosphates, セリンプロ

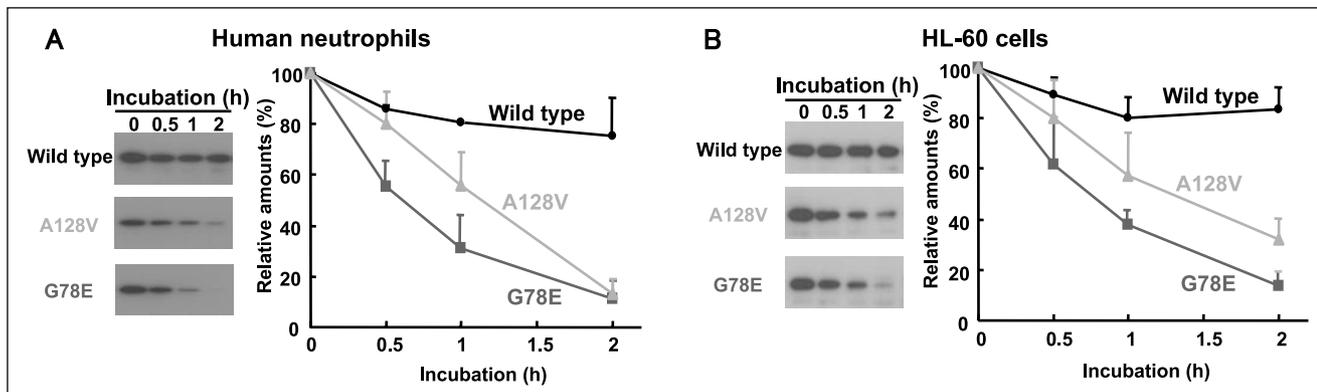


図4 ヒト好中球およびHL-60細胞から調製した細胞質画分による変異p67<sup>phox</sup>の分解  
好中球(A)あるいはHL-60細胞(B)の細胞質画分と野生型p67<sup>phox</sup>あるいは変異p67<sup>phox</sup>(G78E, A128V)を30℃で一定時間インキュベートした後にp67<sup>phox</sup>の分解をウエスタンブロット法で測定した。右のグラフは、ウエスタンブロットの結果をスキャンして定量的に示したものである。

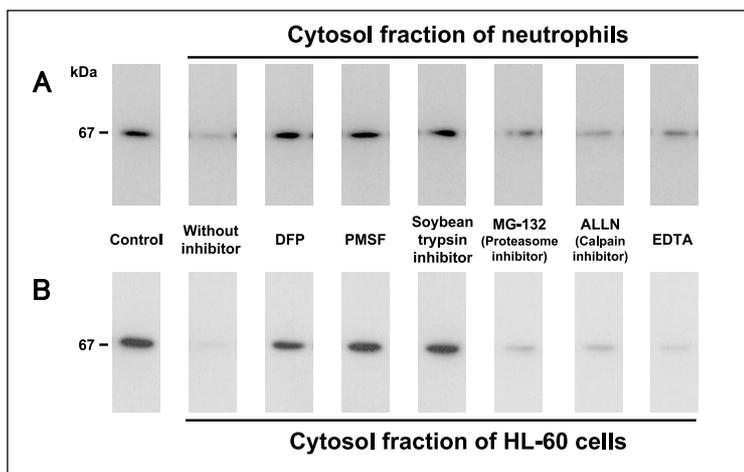


図5 p67<sup>phox</sup>G78Eの分解に及ぼすプロテアーゼインヒビターの影響

好中球(A)あるいはHL-60細胞(B)の細胞質画分と変異p67<sup>phox</sup>G78Eをプロテアーゼインヒビター(1 mM DFP, 1 mM PMSF, 100 μg/ml soybean trypsin inhibitor, 50 μM MG-132, 5 μM ALLN, 2 mM EDTA)非存在下(Without)あるいは存在下で30℃で2時間インキュベートした後にp67<sup>phox</sup>の分解をウエスタンブロット法で測定した。Controlは細胞質画分とインキュベーションしないp67<sup>phox</sup>G78Eを示す。

テアーゼ阻害剤), 1 mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride, セリンプロテアーゼ阻害剤), 100 μg/ml soybean trypsin inhibitor(トリプシン様セリンプロテアーゼ阻害剤), 50 μM MG-132(Z-Leu-Leu-Leu-CHO, プロテアソーム阻害剤), 5 μM ALLN(N-acetyl-Leu-Leu-norleucinal, カルパイン阻害剤), 2 mM EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid, 金属プロテアーゼ阻害剤), 3 mM Z-Gly-Pro(プロリンエンドペプチダーゼ阻害剤), 1 μM S17092-1(プロリンエンドペプチダーゼ阻害剤)。

#### 4. 変異p67<sup>phox</sup>の分解酵素の精製

HL-60細胞の細胞質画分(1 × 10<sup>9</sup>細胞相当分)を20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)で平衡化したQ-Sepharose Fast Flowイオン交換カラム(容積24 ml)を用いて, 0 ~ 1 M NaClの濃度勾配でタンパク質を溶出し, 3.5 mlずつ分取した。クロマトグラフィーで得られた各フラクション2 μlを*in vitro*翻訳した変異p67<sup>phox</sup>とrelaxation buffer中で, 30℃で一定時間インキュベーションした後, 反応液をウエスタンブロット法で解析することで分解活性を測定した。

さらに, 分解活性を持つ画分を50 mMリン酸-0.15M NaCl溶液(pH 7.2)で平衡化したSuperose 6HR10/30ゲルろ過カラム(容積24ml)を用いて分離し0.25 mlずつ分取した。そして, 得られたフラクション(2 μl)を用いて変異p67<sup>phox</sup>の分解酵素の活性を測定した。

#### 5. 好中球プロテアーゼの検出および活性測定

プロテアソームのβ-サブユニット, カテプシンG, proteinase 3はそれぞれの特異的抗体(マウス抗プロテアソームβ-サブユニット抗体MCP231, Affiniti Research Products社;ウサギ抗カテプシンG抗体, Athens Research Technology社;マウス抗proteinase 3抗体MCP3-2, NeoMarkers社)を用いてウエスタンブロット法で調べた。

プロテアソームの酵素活性は, 3種類の蛍光基質[キモトリプシン様酵素の基質LLVY, Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA(4-methylcoumaryl-7-amide);トリプシン様酵素の基質LRR, Boc-Leu-Arg-Arg-MCA;ペプチジルグルタミルペプチダーゼ様酵素の基質LLE, Z-Leu-Leu-Glu-MCA]を用いて調べた。すなわち, それぞれの基質とクロマトグ

ラフィーで得られた各フラクション一定量を100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 中で37℃, 1時間インキュベーション後, 0.5% SDSを加えることで反応を停止し, 遊離された AMC (7-amino-4-methyl-coumarin) の蛍光を励起波長360 nm 蛍光波長460 nmで測定することにより酵素活性を調べた. そして3種類の基質すべてを分解するフラクションをプロテアソーム画分とした.

一方, 好中球エラスターゼ活性は蛍光基質 Suc-Ala-Ala-Pro-Val-MCA とクロマトグラフィーで得られた各フラクションを25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) 中で25℃, 1時間インキュベーション後, 0.1 mg/ml soybean trypsin inhibitorを加えることで反応を停止し, 遊離された AMC の蛍光を測定することにより調べた.

## 結 果

### 1. 好中球とHL-60細胞の細胞質画分による変異p67<sup>phox</sup>の分解

今回用いた, 78番目のグリシンをグルタミン酸に置換した p67<sup>phox</sup>G78E と, 128番目のアラニンバリリンに置換した p67<sup>phox</sup>A128V の変異症例のうち, 特に p67<sup>phox</sup>G78E では細胞内に正常レベルの mRNA の発現が認められるにも関わらず, タンパク質の発現がほとんどないことが示されており<sup>8)</sup>, アミノ酸の変異によってタンパク質の安定性が著しく低下している可能性が考えられる.

そこでまず, 野生型 p67<sup>phox</sup> と変異 p67<sup>phox</sup> (G78E, A128V) の安定性を好中球および HL-60 細胞の細胞質画分を用いて調べた. その結果, 野生型 p67<sup>phox</sup> は好中球の細胞質画分 (図4A) あるいは HL-60 細胞の細胞質画分 (図4B) と反応させてもほとんど分解されないことがわかった. それに対して, 変異 p67<sup>phox</sup> の G78E と A128V は, 好中球, HL-60 細胞いずれの細胞質画分を用いても, 野生型 p67<sup>phox</sup> と比べて早く分解された. これらの結果から, 好中球および HL-60 細胞の細胞質画分には, 変異 p67<sup>phox</sup> を分解する酵素が存在することがわかった. そして, p67<sup>phox</sup>G78E と p67<sup>phox</sup>A128V の分解を比べると, G78E の方がより分解されやすかった. そこで, 以下の実験では, 分解されやすい p67<sup>phox</sup>G78E を用いて検討を行った.

### 2. p67<sup>phox</sup>G78E の分解酵素の性質

次に, 変異 p67<sup>phox</sup>G78E の分解酵素の性質を調べるために, 種々のプロテアーゼ阻害剤の効果を検討した. 好中球 (図5A) および HL-60 細胞 (図5B) の細胞質画分の p67<sup>phox</sup>G78E に対する分解活性は, セリンプロテアーゼ阻害剤である DFP, PMSF, soybean trypsin inhibitor によって完全に阻害された. 一方, プロテアソーム阻害剤の MG-132, カルパイン阻害剤の ALLN, 金属酵素阻害剤の EDTA

では分解はほとんど保護されなかった.

これらの結果から, 変異 p67<sup>phox</sup>G78E の分解には, 好中球および HL-60 細胞の細胞質画分に存在するセリンプロテアーゼが関与する可能性が考えられた. それに対して, プロテアソーム, カルパイン, 金属プロテアーゼはほとんど関与しないものと考えられた.

### 3. p67<sup>phox</sup>G78E の分解酵素の精製

変異 p67<sup>phox</sup> の分解酵素を精製するため, HL-60 細胞より調製した細胞質画分を用いて Q-Sepharose FastFlow クロマトグラフィーで酵素を分画した. その結果, 分解活性は大きく3つの分画 A~C に分かれた (図6A). フラクション A には, 活性測定により好中球エラスターゼが, またウエスタンブロット法で proteinase 3 が見出されたが, カテプシン G は検出されなかった (図6B). これらの結果から, フラクション A には, 顆粒酵素の一部が混入していることが考えられた. 一方, フラクション B には好中球エラスターゼ, proteinase 3, カテプシン G などの顆粒酵素やプロテアソームは検出されなかった (図6B). また, フラクション C には, 顆粒酵素は含まれていなかったが, ウエスタンブロット法によりプロテアソームの  $\beta$ -サブユニットが含まれることがわかった. さらに, このフラクションには, キモトリプシン様酵素の基質 (LLVY), トリプシン様酵素の基質 (LRR), ペプチジルグルタミルペプチダーゼ様酵素の基質 (LLE) の3種類の基質すべてを分解する活性が含まれていたことから (図6C), フラクション C はプロテアソームを含むことがわかった.

さらに, Q-Sepharose FastFlow クロマトグラフィーで得られた各活性フラクションを, Superose 6 ゲルろ過クロマトグラフィーで分画した (図7). その結果, フラクション A では, G78E の分解活性が好中球エラスターゼ活性とほぼ一致して, 分子量約 40kDa の大きさに溶出されたことから, フラクション A では混入した顆粒酵素のエラスターゼが G78E の分解に関与する可能性が考えられた. 一方, フラクション B では好中球エラスターゼ活性やプロテアソーム活性が検出されずに, 分子量約 60kDa の大きさに G78E の分解活性が溶出された. そして, 興味深いことにフラクション C ではプロテアソーム活性のピークとは異なるフラクションに分子量約 350kDa の大きさに G78E の分解活性が溶出された.

## 考 察

今回, CGD で見出された変異 p67<sup>phox</sup> の細胞内不安定性と, その分解に関わる酵素について検討した. その結果, 野生型 p67<sup>phox</sup> はヒト末梢血好中球および HL-60 細胞の細胞質によってほとんど分解されなかったが, 変異 p67<sup>phox</sup>

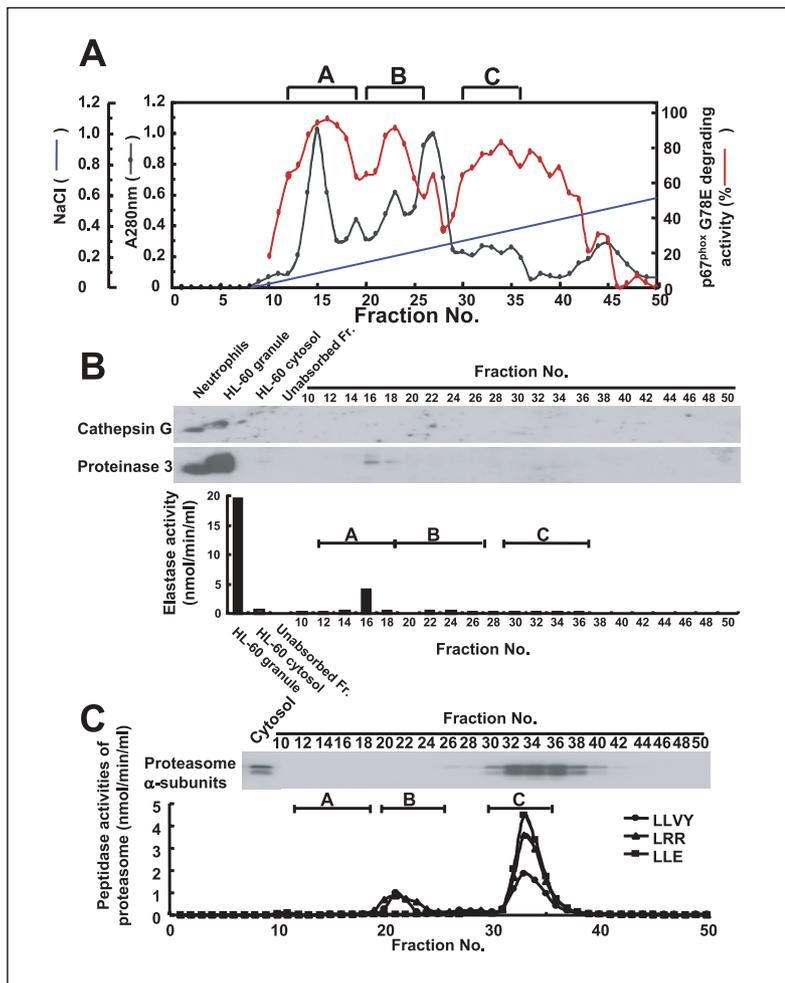


図6 Q-Sepharose イオン交換クロマトグラフィーによる p67<sup>phox</sup>G78E 分解酵素の分離

A: HL60細胞質画分をQ-Sepharoseイオン交換クロマトグラフィーで分画し、各フラクションの変異p67<sup>phox</sup>G78Eの分解作用を調べた。B: 各フラクションについてカテプシンGとproteinase 3の存在を特異抗体を用いたウエスタンブロット法で、また好中球エラスターゼ活性を蛍光基質を用いた酵素活性で調べた。図中のNeutrophilsは好中球lysateを、HL-60 granuleとcytosolはHL-60細胞の顆粒画分と細胞質画分を、またUnabsorbed Fr.はHL-60細胞の細胞質画分のQ-Sepharoseイオン交換カラムへの非吸着フラクションを示す。C: プロテアソームのα-サブユニットの存在を特異抗体を用いたウエスタンブロット法で、またプロテアソームの酵素活性を3種類の蛍光基質(LLVY, LRR, LLE)を用いて調べた。

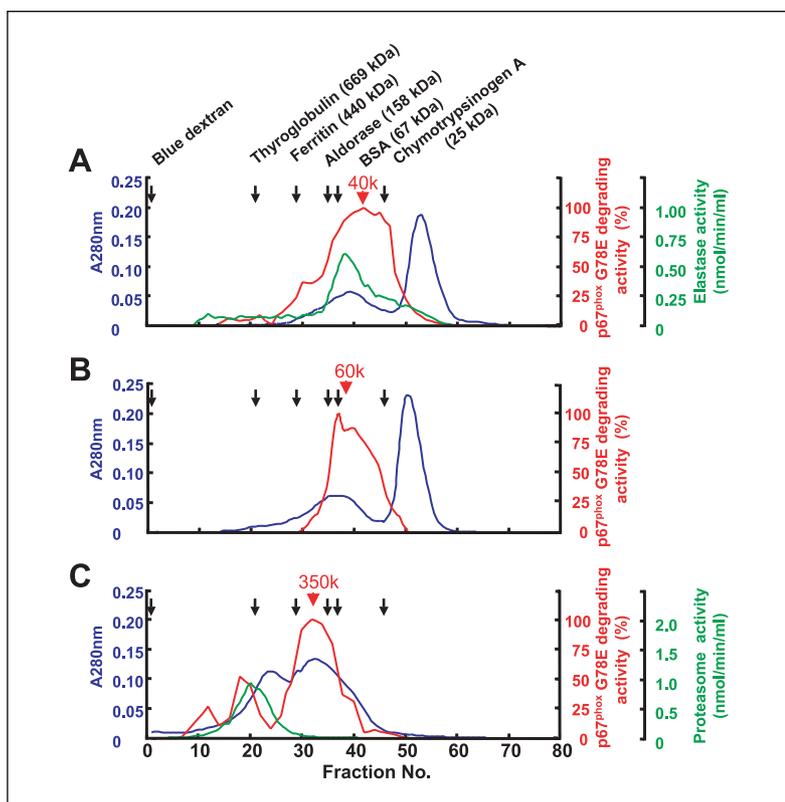


図7 Superose 6 ゲルろ過クロマトグラフィーによる p67<sup>phox</sup>G78E 分解酵素の分離

図6で分離したフラクションA, B, CをそれぞれSuperose 6ゲルろ過クロマトグラフィーで分画し、各フラクションのp67<sup>phox</sup>G78Eの分解作用を調べた。また、フラクションAとCについては、分画したフラクションの好中球エラスターゼ活性とプロテアソーム活性をそれぞれの蛍光基質を用いて測定した。Thyroglobulin ~ Chymotrypsinogen Aは分子量マーカーを示す。

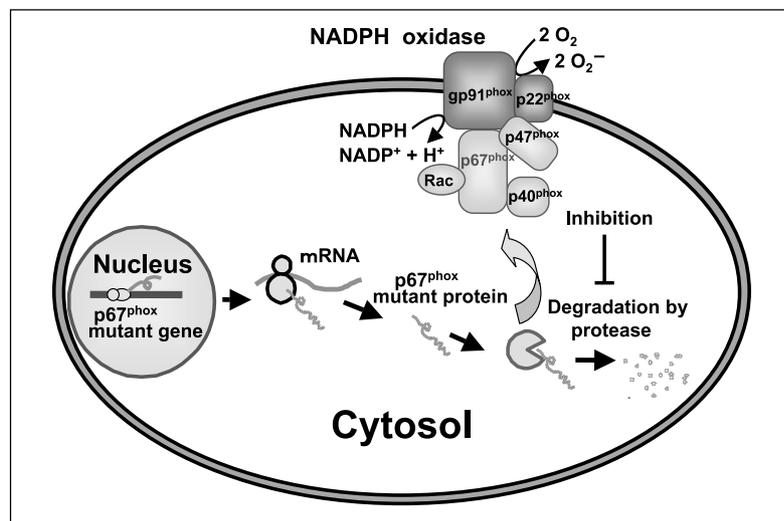


図8 変異p67<sup>phox</sup>の細胞内における分解とその安定化によるNADPHオキシダーゼ活性の回復

p67<sup>phox</sup>の欠損例ではタンパク質の発現がほとんど認められないもののmRNAの発現が観察される例がある。アミノ酸置換がタンパク質機能に大きな障害を与えない場合に、変異タンパク質の分解活性を抑制することによって、それらを細胞内で安定化・機能させてNADPHオキシダーゼ活性を回復させることが期待される。

が分解されたことから、これらの細胞の細胞質に変異p67<sup>phox</sup>を分解する酵素が存在することがわかった。

変異p67<sup>phox</sup>の中で、今回用いたG78EとA128Vは、TPRモチーフ/β-ヘリックス内の類似した部位にアミノ酸置換を持ち、そのためTPR構造の積み重なり(stacking)が上手くいかず、不安定化し、その結果、プロテアーゼによって認識・分解されやすくなる可能性が考えられる<sup>9,18)</sup>。実際、アミノ酸置換による二次構造変化をコンピュータ解析したところ<sup>19)</sup>、野生型に比べてG78EではTPRにおいてβ-ヘリックスを形成する傾向が強くなる一方、A128Vではその傾向が弱くなることが予測された。さらに、A128Vが野生型p67<sup>phox</sup>よりもトリプシンのようなプロテアーゼに分解されやすくなることがリコンビナントタンパク質を用いた実験で示されている<sup>18)</sup>。

そして、プロテアーゼ阻害剤の効果から、変異p67<sup>phox</sup>分解に関わる細胞質画分の酵素は、セリンプロテアーゼであることが考えられた。また、HL-60細胞の細胞質から変異p67<sup>phox</sup>分解酵素をQ-Sepharoseクロマトグラフィーによって分画したところ、分解活性は3つのフラクションに分かれて得られ、さらにゲルろ過クロマトグラフィーにより、それぞれ約40 kDa、60 kDaおよび350 kDa付近に溶出されることがわかった。これらの結果から、変異p67<sup>phox</sup>の分解には、分子量の異なる複数種の酵素が関与している可能性が考えられる。しかし、単一の酵素、あるいは複数種の酵素分子が複合体を形成することにより分子量の異なる分解ピークとして溶出される可能性も考えられる。

また、阻害剤の効果から、プロテアソーム、カルパインや金属プロテアーゼとは異なる細胞質酵素が変異p67<sup>phox</sup>の分解に関与している可能性が考えられた。さらに、ゲルろ過クロマトグラフィーの結果からも、プロテアソーム

は変異p67<sup>phox</sup>の分解に関与していないと考えられた。我々は、以前、p40<sup>phox</sup>にsplice variantタンパク質が存在することを見出した<sup>20)</sup>。そして、このタンパク質が細胞内で不安定であり、細胞質に存在するセリンプロテアーゼの1つであるプロリンエンドペプチダーゼによって分解されることを明らかにした<sup>15)</sup>。しかし、今回、プロリンエンドペプチダーゼ阻害剤であるZ-Gly-ProおよびS17092-1を用いても<sup>15)</sup>、変異p67<sup>phox</sup>の分解が阻害されなかったことから(data not shown)、プロリンエンドペプチダーゼは変異p67<sup>phox</sup>の分解に関与していないと考えられた。今後、変異p67<sup>phox</sup>の分解に関わる酵素を精製し、さらに同定することにより、単一の酵素が分子量の異なる複数の複合体を形成するのか、あるいは複数種の酵素分子が複合体を形成するのかという問題を解決できると考えている。

CGDではミスセンス変異を持つタンパク質が比較的多く見出されているが、p67<sup>phox</sup>の欠損例ではmRNAの発現が観察されるものの、タンパク質の発現がほとんど認められない例があり、このような症例では変異タンパク質が細胞内で不安定になっている可能性が考えられる<sup>7,8)</sup>。したがって、mRNAの発現が認められ、かつアミノ酸置換がタンパク質機能に大きな障害を与えない場合に、それら変異タンパク質の分解活性を抑制することによって、それらを細胞内で安定化・機能させて、NADPHオキシダーゼ活性を回復させることが期待される(図8)。今回用いた変異p67<sup>phox</sup>のG78EとA128Vは、細胞内で不安定であるが、これらのアミノ酸置換がTPRモチーフ内のRac反応部位とは離れて位置しているため、Racとの反応性は保たれている<sup>9)</sup>。実際、A128Vが野生型p67<sup>phox</sup>と同様にRacと反応してNADPHオキシダーゼを活性化することが無細胞系で示されている<sup>18)</sup>。

今までCGDの研究では、NADPHオキシダーゼ構成タ

ンパク質の遺伝子異常を明らかにすることが中心に行われ、変異タンパク質の分解機構についてはほとんど調べられていなかった。また、CGDに対する治療として骨髄移植や遺伝子治療が現在行われているが、生着率や発現効率が低いといった問題や遺伝子導入法など検討すべき点も多く残されている<sup>21, 22</sup>。今後、本研究のようなアプローチにより、CGDにおけるNADPHオキシダーゼ構成成分の分解機構を解明し、さらに分解酵素の活性を制御することによって細胞内で変異タンパク質を安定化し、NADPHオキシダーゼ活性を回復させるという新たな治療戦略が生み出される可能性も考えられる。

## 文 献

- 1) Roos D, de Boer M, Kuribayashi F, Meischl C, Weening RS, Segal AW, Åhlin A, Nemet K, Hossle JP, Bernatowska-Matuszkiewicz E, Middleton-Price H: Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood*, 87: 1663-1681, 1996.
- 2) Goldblatt D, Thrasher AJ: Chronic granulomatous disease. *Clin Exp Immunol*, 122: 1-9, 2000.
- 3) Cross AR, Noack D, Rae J, Curnutte JT, Heyworth PG: Hematologically important mutations: the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease (first update). *Blood Cells Mol Dis*, 26: 561-565, 2000.
- 4) Babior BM: NADPH oxidase. *Blood*, 93: 1464-1476, 1999.
- 5) Clark RA: Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J Infect Dis*, 179: S309-S317, 1999.
- 6) Leusen JHW, Verhoeven AJ, Roos D: Interactions between the components of the human NADPH oxidase: intrigues in the *phox* family. *J Lab Clin Med*, 128: 461-476, 1996.
- 7) Bonizzato A, Russo MP, Donini M, Dusi S: Identification of a double mutation (D160V-K161E) in the p67<sup>phox</sup> gene of a chronic granulomatous disease patient. *Biochem Biophys Res Commun*, 231 (3): 861-863, 1997.
- 8) de Boer M, Hilarius-Stokman PM, Hossle JP, Verhoeven AJ, Graf N, Kenney RT, Seger R, Roos D: Autosomal recessive chronic granulomatous disease with absence of the 67-kD cytosolic NADPH oxidase component: identification of mutation and detection of carriers. *Blood*, 83: 531-536, 1994.
- 9) Lapouge K, Smith SJM, Walker PA, Gamblin SJ, Smerdon SJ, Rittinger K: Structure of the TPR domain of p67<sup>phox</sup> in complex with Rac-GTP. *Mol Cell*, 6: 899-907, 2000.
- 10) Koga H, Terasawa H, Nunoi, H, Takeshige K, Inagaki, F, Sumimoto H: Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67<sup>phox</sup> participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem*, 274: 25051-25060, 1999.
- 11) Han CH, Freeman JLR, Lee T, Motalebi SA, Lambeth JD: Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67<sup>phox</sup>. *J Biol Chem*, 273: 16663-16668, 1998.
- 12) Ito, T, Matsui Y, Ago T, Ota K, Sumimoto H: Novel modular domain PB1 recognizes PC motif to mediate functional protein-protein interactions. *EMBO J*, 20: 3938-3946, 2001.
- 13) 寺沢宏明, 稲垣冬彦: PB1 ドメインとPCモチーフ含有領域: タンパク質間相互作用を担う新しい構造ドメイン. *細胞工学*, 20: 1338-1344, 2001.
- 14) Noack D, Rae J, Cross AR, Munoz J, Salmen S, Mendoza JA, Rossi N, Curnutte JT, Heyworth PG: Autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by novel mutations in *NCF-2*, the gene encoding the p67-*phox* component of phagocyte NADPH oxidase. *Hum Genet*, 105: 460-467, 1999.
- 15) Hasebe T, Hua J, Someya A, Morain P, Checler F, Nagaoka I: Involvement of cytosolic prolyl endopeptidase in degradation of p40-phox splice variant protein in myeloid cells. *J Leukoc Biol*, 69: 963-968, 2001.
- 16) Leto TL, Lomax KJ, Volpp BD, Nunoi H, Sechler JMG, Nauseef WM, Clark RA, Gallin JI, Malech HL: Cloning of a 67-kD neutrophil oxidase factor with similarity to a noncatalytic region of p60<sup>src</sup>. *Science*, 248: 727-730, 1990.
- 17) Horton RM, Ho SN, Pullen JK, Hunt HD, Cai Z, Pease LR. Gene splicing by overlap extension. *Methods Enzymol*, 217: 270-279, 1993.
- 18) Grizot S, Fieschi F, Dagher MC, Pebay-Peyroula E: The active N-terminal region of p67<sup>phox</sup>. Structure at 1.8Å resolution and biochemical characterizations of the A128V mutant implicated in chronic granulomatous disease. *J Biol Chem*, 276: 21627-21631, 2001.
- 19) Geourjon C, Deleage G: SOPM: a self-potimized method for protein secondary structure prediction. *Protein Eng*, 7: 157-164, 1994.
- 20) Hasebe T, Someya A, Nagaoka I: Identification of a splice variant mRNA of p40<sup>phox</sup>, an NADPH oxidase component of phagocytes. *FEBS Lett*, 455: 257-261, 1999.
- 21) 布井博幸, 石橋史成: 日本の慢性肉芽腫症の現状と将来. *臨床病理*, 47: 658-664, 1999.
- 22) Kume A, Dinauer MC: Gene therapy for chronic granulomatous disease. *J Lab Clin Med*, 135: 122-128, 2000.