

Mini Review

好中球による活性酸素生成の分子メカニズム

宮野 佳¹⁾, 田村 実²⁾, 住本英樹¹⁾

¹⁾九州大学生体防御医学研究所 増殖分化制御学分野

²⁾愛媛大学工学部応用化学科

Molecular mechanism for production of reactive oxygen species by neutrophils

Neutrophils, a member of leukocytes, phagocytose and kill pathogenic organisms, thereby playing a crucial role in host defense. During phagocytosis, an enzyme called the phagocyte NADPH oxidase becomes activated to produce reactive oxygen species (ROS) that act as microbicidal agents. Activation of the oxidase must be strictly regulated, since ROS have a high reactivity and thus their overproduction causes inflammatory responses. The oxidase activation involves assembly of the cytosolic regulatory proteins p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}, and small GTPase Rac with the membrane-integrated cytochrome b558, the catalytic core of the enzyme. Because the assembly requires a variety of protein-protein interactions mediated via modular domains, the knowledge of regulation of these interactions is important for our understanding of the molecular mechanism for the NADPH oxidase activation. On the basis of our current findings, here we discuss the activation mechanism with special attention to the induction and maintenance of the interactions between the oxidase factors.

Rec.10/29/2004, Acc.12/5/2004, pp113-117

Kei Miyano¹⁾, Minoru Tamura²⁾, Hideki Sumimoto¹⁾

¹⁾Medical institute of bioregulation, Kyushu university

²⁾Department of applied chemistry, Faculty of engineering, Ehime university

Key words NADPH oxidase, reactive oxygen species, neutrophil

はじめに

好中球をはじめとする食細胞は、体内の病原体が侵入した部位へ速やかに遊走し、それを貪食する(食胞の形成)。こうして食胞内に取り込んだ病原体を種々の機構で殺菌するが、その中心的な役割を担うものが活性酸素であり、食細胞NADPHオキシダーゼの働きにより生成される。細胞休止時には不活性型であるNADPHオキシダーゼは、好中球が刺激を受けると活性化され、スーパーオキシド(O₂⁻)を生成する。このO₂⁻に由来する種々の活性酸素(H₂O₂、[•]OH、HOClなど)が強力な殺菌剤として働くことになる。一方で、活性酸素の高い反応性から、その過剰な生成が周囲の組織に及ぶと炎症の原因となる。そのため、NADPHオキシダーゼには活性酸素の生成を厳密に制御するための巧妙なシステムが備わっている。ここではオキシダーゼ活性化

において必須の働きをする細胞質因子の作用機構について概説したい。

NADPHオキシダーゼ

NADPHオキシダーゼの酵素本体は、細胞膜貫通型のタンパク質であるシトクロム b558 であり、p22^{phox} と gp91^{phox} (肩文字の phox は phagocyte oxidase の意) という2つのサブユニットからなる^{1,2)}。この2つのサブユニットのうち、酵素活性を担うのは gp91^{phox} であると考えられている。gp91^{phox} は一次構造上の分子中央部付近にフラビン(FAD)結合部位を、またC末端側にNADPH結合部位を持つ。さらに、gp91^{phox} のN末端側には6つの膜貫通セグメントがあり、ヘムの結合部位を含む。このように gp91^{phox} にはNADPHから酸素分子へ電子が渡され、O₂が生成するため

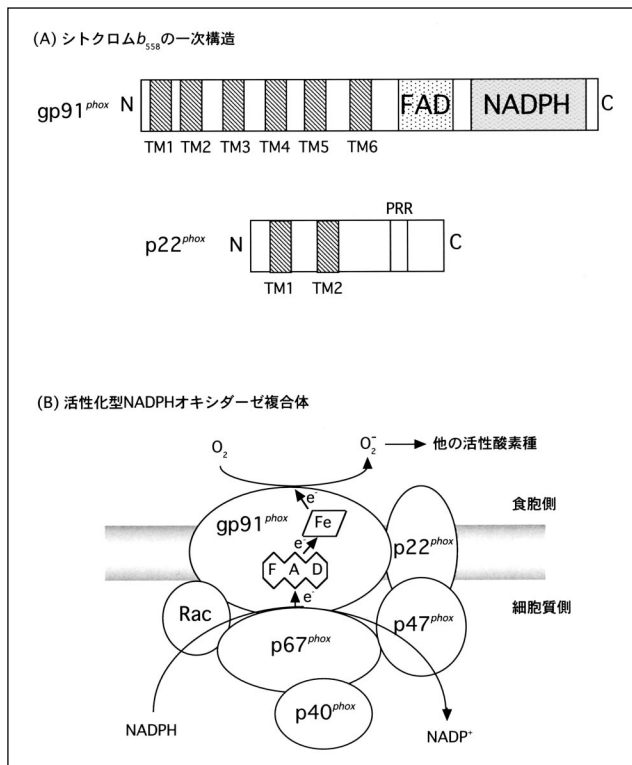


図1 食細胞NADPHオキシダーゼ

A: gp91^{phox} と p22^{phox} のドメイン構造. TM; transmembrane segment, FAD; FAD binding domain, NADPH; NADPH binding domain, PRR; proline-rich region

B: 食細胞NADPHオキシダーゼによる活性酸素の生成. 細胞質に存在する特異的タンパク質p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}と低分子量Gタンパク質Racが, 細胞膜に存在する酵素本体のシトクロムb₅₅₈と膜上で会合することにより活性化され, その結果活性酸素を生成する.

に必要な電子伝達系「NADPH → FAD → ヘム → O₂」の全てを潜在的に含んでいる(図1A). 一方, p22^{phox}はgp91^{phox}を安定化する役割に加えて, NADPHオキシダーゼの活性化を引き起こす細胞質因子の結合部位としての働きを持つ(後述).

上述のように活性酸素は反応性が高く宿主にとっても有害であることから, その生成は時間的にも空間的にも厳密に制御されなければならない. 実際, シトクロムb₅₅₈は, 細胞休止時には不活性でありO₂をまったく生成しない. 食作用時にオキシダーゼの活性化, すなわちgp91^{phox}による電子伝達を引き起こすためには, 細胞質に存在する特異的タンパク質(p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox})と低分子量Gタンパク質であるRacが, 細胞膜に移行してシトクロムb₅₅₈と会合することが必要である(図1B).

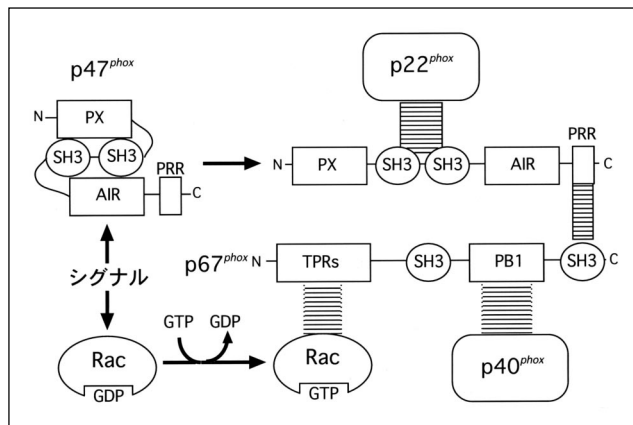


図2 NADPHオキシダーゼ活性化のための2つのスイッチ
1つ目のスイッチはp47で, シグナル伝達の結果, コンフォメーション変化が誘導されると, 分子内相互作用が切断され, SH3ドメインとPXドメインはそれぞれの標的分子と結合する. 2つ目のスイッチはRacで, シグナル伝達により活性化されると膜へ移行し, p67のTPRsドメインと結合する. この2つのスイッチが同時にONになることによりNADPHオキシダーゼは初めて活性化される. PX; phox homology domain, AIR; auto inhibitory region, TPRs; tetratricopeptide repeat, PB1; phox and Bem1

細胞質因子によるNADPHオキシダーゼの活性化

食作用時に好中球が刺激されると, そのシグナルは最終的には細胞質因子(p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}, Rac)に伝えられる. p47^{phox}は一次構造上, N末端からPXドメイン, 2つのSH3ドメイン, さらにC末端近くにプロリンリッチ領域(PRR, proline-rich region)を持つ. 細胞休止時には, p47^{phox}のSH3ドメインはp47^{phox}自身のAIR(auto inhibitory region)およびPXドメインと分子内相互作用しているため標的分子であるp22^{phox}と結合できない³⁾. 細胞内シグナル伝達の結果p47^{phox}のコンフォメーション変化が誘導されると, これらの分子内相互作用が切断され, SH3ドメインはp22^{phox}のPRRと⁴⁾, PXドメインは膜のホスホイノシチドと特異的に結合できるようになる⁵⁾(図2). これらの相互作用がp47^{phox}の膜移行とオキシダーゼの活性化に必須である. p47^{phox}とp67^{phox}は恒常的に複合体を形成しており, p47^{phox}の膜移行に伴い, p67^{phox}は膜移行することになる. このようにp47^{phox}のコンフォメーション変化がオキシダーゼ活性化のスイッチの一つとなっている.

一方, 細胞内シグナル伝達により活性化され膜移行したRacは, 膜上でp67^{phox}と結合することになる. p67^{phox}のN末端領域には4つのTPR(tetratricopeptide repeats)モチーフが存在し, これらで1つのドメインを形成している(図2).

GTP 結合型 Rac は、この TPR ドメインに結合し、この結合もオキシダーゼ活性化に必須である⁶⁾。このように、「p47^{phox} のコンフォメーション変化」と「Rac の GTP 結合型への変換」という、少なくとも2つのスイッチが同時に ON になって初めて NADPH オキシダーゼが活性化されることが、その活性制御をより厳密しているメカニズムの一つと思われる。

p67^{phox} は p47^{phox} と結合しているが、また p40^{phox} と同時に結合しており、恒常的に p47^{phox}-p67^{phox}-p40^{phox} 複合体(存在比は 1:1:1)を形成している(図2)。NADPH オキシダーゼ活性は、好中球膜画分と組換えタンパク質である p47^{phox}, p67^{phox}, Rac を組み合わせ、活性化剤としてアラキドン酸や SDS を加えることにより、cell-free 系で再構成することができる。この cell-free 系において、p40^{phox} を加えなくても O₂⁻ を生成することから、p40^{phox} は NADPH オキシダーゼの活性化に必須の因子でないことを示している^{7,8)}。一方、細胞レベルでは、p40^{phox} は p47^{phox} と p67^{phox} の膜移行を強力に促進する作用を持ち、オキシダーゼ活性を増強する働きを有する⁹⁾。このように p40^{phox} は、必須ではないがオキシダーゼの正の制御因子と考えられる。ちなみに、p67^{phox} と p40^{phox} の結合はそれぞれの PB1 ドメインを介するが、この PB1 ドメイン間の相互作用は、ドメイン内の「保存されたりジン残基」(p67^{phox} 側)が「PC モチーフ」(p40^{phox} 側)を直接認識することにより行われる^{10,11)}。

細胞質因子の分子内相互作用の切断や活性化因子間のドメイン結合が、NADPH オキシダーゼを活性化するスイッチになることは分かったが、それでは実際に gp91^{phox} 内の電子伝達を引き起こすには、どのドメインが必須なのであろうか。そこで、活性化因子 p47^{phox} と p67^{phox} の短縮型の変異体を用いて cell-free 系でオキシダーゼを再構成した実験から、p47^{phox} は PX ドメインと2つの SH3 ドメインが⁸⁾、p67^{phox} は TPR ドメインとその後続く activation ドメインが必須であることが分っている¹²⁾。このように、p47^{phox} と p67^{phox} は、一次構造上分子の前半部分にオキシダーゼの活性化領域、そして後半部分に制御領域を持っていると考えられる(図3A)。

細胞質因子の融合タンパク質による活性型 NADPH オキシダーゼの安定化

NADPH オキシダーゼの活性化状態は、短時間しか維持されないことが知られている。例えば、cell-free 系で活性化した場合、酵素活性の半減期は 10 分以下である¹³⁾。上記のように NADPH オキシダーゼは細胞質因子の会合により活性化されるが、活性化状態の維持には、因子間の継続的な会合が必要なのであろうか。この疑問に答えるには、

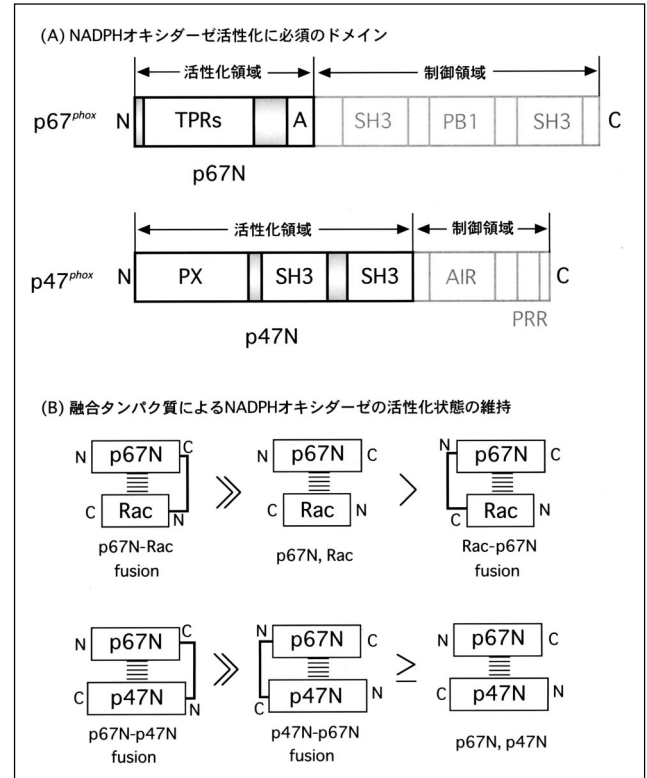


図3 NADPH オキシダーゼの活性化に必須なドメインと融合タンパク質の構成

A: 一次構造上分子の前半部分にオキシダーゼの活性化領域、そして後半部分に制御領域を持っていると考えられる。オキシダーゼの活性化に必要な最小限のドメインを含んでいる短縮型 p67^{phox}(p67N)と p47^{phox}(p47N)は実線で示した。A; activation domain

B: 融合タンパク質は、短縮型 p67N と p47N あるいは Rac を組み合わせてデザインされる。図中の不等号は融合タンパク質のオキシダーゼ活性の維持に対する効果を示す。また、破線は細胞質因子間の相互作用を、実線は融合タンパク質の連結部分 (Ser-Glu-Phe の3残基) を示す。

細胞質因子間を共有結合で繋げた融合タンパク質を作成し、オキシダーゼの活性化状態の維持にどのような影響を与えるか検討するのが一つの方法であろう。その際、融合タンパク質は、オキシダーゼの活性化に必要な最小限のドメインを含んでいる短縮型 p67^{phox}(p67N)と p47^{phox}(p47N)、あるいは Rac を組み合わせてデザインするのが適切と思われる。

実際に N 末端側に p67N を配した p67N-Rac 融合タンパク質を用いて cell-free 系で NADPH オキシダーゼを再構成すると、細胞質因子を別々に用いた場合に比べて、活性化されたオキシダーゼの寿命を約 10 倍に延長する(図3B)。一方、逆の順序で融合させた Rac-p67N はオキシダーゼ活

性の維持にほとんど効果を持たないばかりか、融合しなかった場合に比べて O_2^- の生成量は 1/8 に低下する¹⁴⁾。このように、適切な順序で p67N と Rac を共有結合させることが、活性型オキシダーゼの維持に効果的であると考えられる。それでは、p67N と p47N を融合させた場合にも同様の効果が得られるのであろうか。N 末端側に p67N を配置した p67N-p47N 融合タンパク質は細胞質因子を別々に用いた場合に比べて、再構成したオキシダーゼの寿命を約 15 倍に延長する¹⁵⁾ (図 3B)。以上の融合タンパク質を用いた実験は、Rac と p47^{phox} が p67^{phox} に会合し続けることが NADPH オキシダーゼの活性化状態の維持に必要なことを示している。

NADPH オキシダーゼの活性化に必須な細胞質因子のドメインは明らかにされたが、実際に酵素本体であるシトクロム *b558* にそれらのドメインはどのように相互作用するのだろうか。先に述べたように p47^{phox} は 2 つの SH3 ドメインを用いてシトクロム *b558* のサブユニットである p22^{phox} の PRR と相互作用する。この相互作用により p47^{phox} と恒常的に結合している p67^{phox} は膜移行し、これと独立に膜移行した Rac と直接結合する。では、この p67^{phox}-Rac 複合体はシトクロム *b558* の活性化に対して、どのような役割を持つのであろうか。NADPH 結合ドメインと FAD 結合ドメインのみで構成される短縮型 gp91^{phox} を用いた実験では、p67^{phox} と Rac の存在により NADPH から FAD への電子伝達が引き起こされ、さらに p67N-Rac 融合タンパク質を用いた場合、電子伝達は約 3 倍に加速される¹⁶⁾。p67^{phox} と Rac の複合体は gp91^{phox} の細胞質領域に直接的に相互作用し、NADPH から FAD、さらにヘムへの電子伝達を引き起こす重要な因子になり得ると推測される。

おわりに

食細胞 NADPH オキシダーゼの活性化には、p47^{phox}、p67^{phox} および Rac の 3 つの活性化タンパク質間で新たな相互作用が起こることが必要である。さらに、これらの融合タンパク質を用いた実験は、細胞質因子間の継続的な会合が酵素活性の維持に重要であることを明らかにするとともに、それらが gp91^{phox} 内の電子伝達を加速させることを示している。電子伝達の調節ポイントは NADPH の結合、NADPH から FAD への電子移動、さらに FAD からヘムへの電子移動などが挙げられる (図 1B)。また、FAD は gp91^{phox} に共有結合しているわけではないので、その会合/解離も調節ポイントの一つになるかもしれない^{17,18)}。しかしながら、複合体を形成した細胞質因子がシトクロム *b558* と相互作用することによって、どの調節ポイントに作用するのかは不明である。その理由の一つは、細胞質因子

に自己制御があるため酵素の活性化状態を得にくく、またオキシダーゼ複合体の形成が一過性であるため本酵素の寿命が極めて短いので、活性化酵素の性質の検討が困難なためである。オキシダーゼの活性化に必須のドメインで構成された上述の融合タンパク質は、再構成した酵素の安定性も格段に上昇させることから上記の問題をクリアできそうである^{18,19)}。また、cell-free 系でオキシダーゼを再構成するときに必要な SDS は活性化剤として働く反面、細胞質因子を非特異的に凝集させる傾向があるため不都合だが、幸いなことに p67N-p47N 融合タンパク質を用いた場合、オキシダーゼは活性化剤なしで再構成することができる¹⁵⁾。また、これとは別に Pick らによれば、p67N-Rac 融合タンパク質の Rac をプレニル化することにより活性化剤なしにオキシダーゼを活性化できるとのことである¹⁹⁾。これらの modify されたシステムは、SDS を含まない活性化システムとして、利用価値がある。

このように、細胞質因子を改変した融合タンパク質が NADPH オキシダーゼの cell-free 再構成を安定化させる性質は、今後のオキシダーゼ研究において有効なツールになり得ると期待される。一方、酵素本体であるシトクロム *b558* の調製は、依然として多量の好中球を集め、そこから精製する以外に方法がない。NADPH オキシダーゼのさらなる生化学的解析のためには、シトクロム *b558* の大量発現系の開発が不可欠であり、今後の重要な課題の一つである。

文 献

- 1) Vignais PV: The superoxide-generating NADPH oxidase. CMLS, 59: 1428-1459, 2002.
- 2) 住本英樹: 活性酸素による自然免疫病原体排除機構。細胞工学, 21: 1312-1317, 2002.
- 3) Shiose A, Sumimoto H: Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47phox to activate the phagocyte NADPH oxidase. J Biol Chem, 275: 13793-13801.
- 4) Ago T, Nunoi H, Ito T, Sumimoto H: Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47^{phox}. J Biol Chem, 274: 33644-33653, 1999.
- 5) Ago T, Kuribayashi F, Hiroaki H, Takeya R, Ito T, Kohda D, Sumimoto H: Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. Proc Natl Acad Sci USA, 100: 4474-4479, 2003.
- 6) Koga H, Terasawa H, Nunoi H, Takeshige K, Inagaki F,

- Sumimoto H: Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67^{phox} participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem*, 274: 25051-25060, 1999.
- 7) Bromberg Y, Pick E: Activation of NADPH-dependent superoxide production in a cell-free system by sodium dodecyl sulfate. *J Biol Chem*, 260: 13539-13545, 1985.
 - 8) Hata K, Ito T, Takeshige K, Sumimoto H: Anionic amphiphile-independent activation of the phagocyte NADPH oxidase in a cell-free system by p47^{phox} and p67^{phox}, both in C terminally truncated forms. *J Biol Chem*, 273: 4232-4236, 1998.
 - 9) Kuribayashi F, Nunoi H, Wakamatsu K, Tsunawaki S, Sato K, Ito T, Sumimoto H: The adaptor protein p40^{phox} as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. *EMBO*, 21: 6312-6320, 2002.
 - 10) 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.
 - 11) Noda Y, Kohjima M, Izaki T, Ota K, Yoshinaga S, Inagaki F, Ito T, Sumimoto H: Molecular recognition in dimerization between PB1 domains. *J Biol Chem*, 278: 43516-43524, 2003.
 - 12) Hata K, Takeshige K, Sumimoto H: Roles for proline-rich regions of p47^{phox} and p67^{phox} in the phagocyte NADPH oxidase activation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 241: 226-231, 1997.
 - 13) Tamura M, Takeshita M, Curnutte JT, Uhlinger DJ, Lambeth JD: Stabilization of human neutrophil NADPH oxidase activated in a cell-free system by cytosolic proteins and by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide. *J Biol Chem*, 267: 7529-7538, 1992.
 - 14) Miyano K, Ogasawara S, Han C-H, Fukuda H, Tamura M: A fusion protein between rac and p67^{phox} (1-210) reconstitutes NADPH oxidase with higher activity and stability than the individual components. *Biochemistry*, 40: 14089-14097, 2001.
 - 15) Ebisu K, Nagasawa T, Watanabe K, Kakinuma K, Miyano K, Tamura M: Fused p47^{phox} and p67^{phox} truncations efficiently reconstitute NADPH oxidase with higher activity and stability than the individual components. *J Biol Chem*, 276: 24498-24505, 2001.
 - 16) Nisimoto Y, Ogawa H, Miyano K, Tamura M: Activation of the flavoprotein domain of gp91^{phox} upon interaction with N-terminal p67^{phox} (1-210) and the Rac complex. *Biochemistry*, 43: 9567-9575, 2004.
 - 17) Hashida S, Yuzawa S, Suzuki NN, Fujioka Y, Takikawa T, Sumimoto H, Inagaki F, Fujii H: Binding of FAD to cytochrome b₅₅₈ is facilitated during activation of the phagocyte NADPH oxidase, leading to superoxide production. *J Biol Chem*, 279: 26378-26386, 2004.
 - 18) Miyano K, Kitahara H, Ohmi S, Kakinuma K, Tamura M: Inactivation of neutrophil NADPH oxidase upon dilution and its prevention by cross-link and fusion of phox proteins. *Arch Biochem Biophys*, 431: 129-137, 2004.
 - 19) Miyano K, Fukuda H, Ebisu K, Tamura M: Remarkable stabilization of neutrophil NADPH oxidase using RacQ61L and a p67^{phox}-p47^{phox} fusion protein. *Biochemistry*, 42: 184-190, 2003.
 - 20) Gorzalczany Y, Alloul N, Sigal N, Weinbaum C, Pick E: A prenylated p67^{phox}-Rac1 chimera elicits NADPH-dependent superoxide production by phagocyte membranes in the absence of an activator and of p47^{phox}. *J Biol Chem*, 277: 18605-18610, 2002.