

77. 好中球による殺菌機構の研究

住本 英樹

Key words : NADPH オキシダーゼ, 活性酸素,
ケモタキシス

九州大学 大学院医学研究院
生化学分野

緒 言

白血球の一種である好中球は、病原性微生物（細菌・真菌）の殺菌において重要な役割を果たしている。一度微生物が体内に侵入すると、循環している好中球は血管から出て組織内を遊走して微生物侵入部位に至り（この過程はケモタキシスと呼ばれる）、微生物を食べて（貪食：ファゴサイトーシス）、それを殺菌する。この過程でスーパーオキシド (O_2^-) 生成酵素である食細胞 NADPH オキシダーゼ (Nox2: NADPH oxidase 2) が2度活性化される。1度目はケモタキシス中であり、この時に生成される O_2^- の役割はよく分かっていないが、遊走自体を亢進する可能性が指摘されている。Nox2 の2度目の活性化はファゴサイトーシス時に起こる。この時はケモタキシス中よりも遥かに多い O_2^- が生成される。Nox2 は、強力な殺菌剤である過酸化水素 (H_2O_2) や次亜塩素酸 (HOCl) の前駆体である O_2^- の供給源として機能している。Nox2 の重要性は、その遺伝的欠損が幼少期より重篤な感染症を繰り返す慢性肉芽腫症 (CGD: chronic granulomatous disease) を引き起こすことから示される。本研究では、「Nox2 と活性化タンパク質の直接の相互作用による Nox2 の活性化の分子メカニズム」及び「Nox2 由来の O_2^- が好中球の遊走過程で果たす役割」の解明、さらに「食胞での過酸化水素検出用蛍光プローブによる活性酸素の検出方法の確立」を目的とし研究を行った。

方法、結果および考察

1. Nox2 と活性化タンパク質の直接の相互作用による Nox2 の活性化の分子メカニズム

Nox2 は、同じく膜タンパク質である p22^{phox} と安定な 2 量体を形成している（この 2 量体はシトクロム *b*₅₅₈ とも呼ばれる）。Nox2 は、それだけでは酵素活性を示さない。その活性化には、細胞質に存在する特異的な活性化タンパク質 p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} および低分子量 G タンパク質が必要である。細胞刺激に応じて、これらのタンパク質は膜移行し複合体を形成する。この複合体の形成は、2つのスイッチが同時にオンになること、すなわち「p47^{phox} の構造変化」と「Rac の GDP/GTP 交換」が必要である（図 1A）¹⁾。活性化型となった p47^{phox} および Rac はそれぞれのターゲットである p22^{phox} および p67^{phox} と結合し、膜上での Nox2 活性化型複合体を形成する。

アラキドン酸は、*in vivo* と *in vitro* の両方で Nox2 を効果的に活性化するが、そのメカニズムについては p47^{phox} の構造変化を誘導すること以外には十分には分かっていなかった。我々は、GST-Pak-PBD (GTP 結合 Rac が特異的に結合する) pull-down アッセイ法によりアラキドン酸で処理した好中球において、もうひとつのスイッチである Rac が活性化されていることを見出した（図 1B）²⁾。次に我々は、分子内自己制御領域を欠く p47^{phox}-ΔAIR 変異体（構造変化が誘導されたフォーム）と恒常的活性化型として知られる Rac1 (Q61L) 変異体の両者を組み合わせて、培養細胞で Nox2 活性の再構成を試みた。驚いたことに、両スイッチがオンになっているにもかかわらず、Nox2 による O_2^- 生成は依然としてアラキドン酸を必要とした（図 1C）。この結果は、Nox2 活性化型複合体の形成後のステップに第3のスイッチが存在することを推測させた。実際に *in vitro* の結合実験において、アラキドン酸は GTP 結合型 Rac と p67^{phox} の結合に影響を与えずに、p67^{phox}-Rac 複合体と Nox2 の C 末側細胞質領域との直接相互作用を誘導することを見出した（図 1D）¹⁾。p67^{phox} の Rac 結合ドメインである TPR ドメインのすぐ C 末端側には「活性化ドメイン」が存在する。p67^{phox}-Rac-Nox2 複合体形成と O_2^- 生成は、活性化ドメイン内の進化的によく保存されたアミノ酸残基の置換により失われた（図 1D）¹⁾。これまで、活性化タンパク質と Nox2 の直接の相互作用が重要であると考えられるが、その実体は長らく

の間不明なままであった。今回我々は第3のスイッチ、すなわち「アラキドン酸により誘導される p67^{phox}-Rac 複合体と Nox2 との相互作用」の存在を明らかにすることができた。

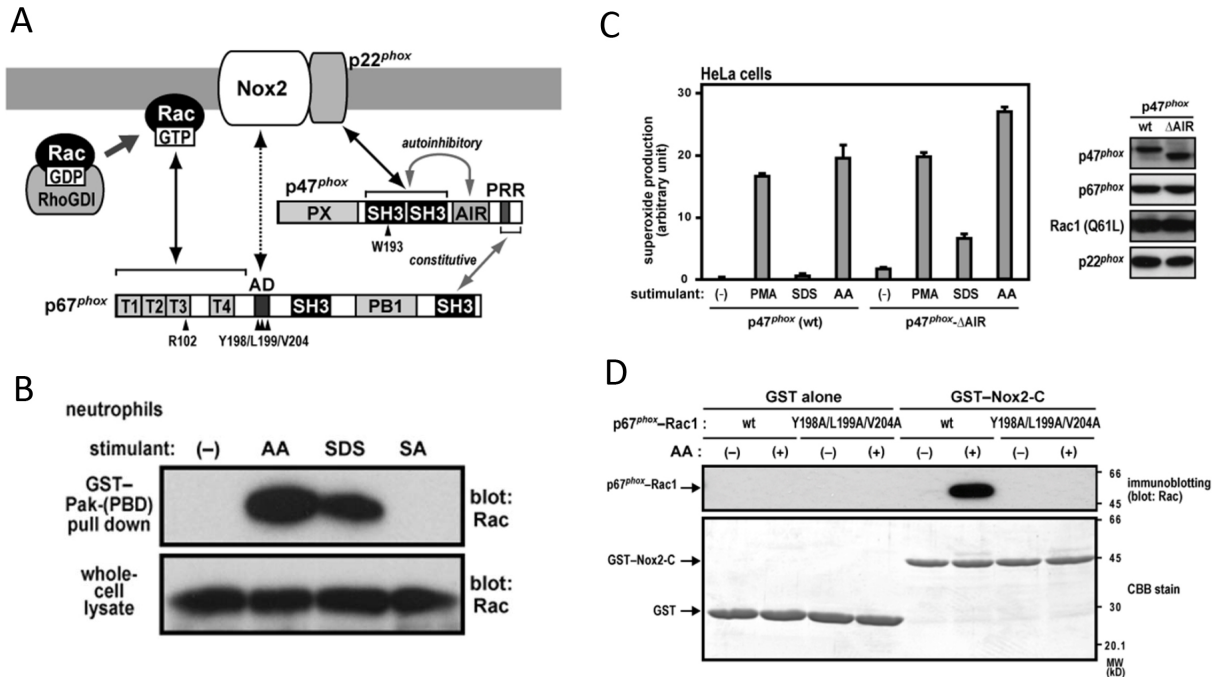


図1. Nox2 と活性化タンパク質の直接の相互作用による Nox2 の活性化の分子メカニズム。

A) Nox2 の活性化に必要なタンパク質間相互作用. PRR: プロリンリッチ領域, PX: PX ドメイン, SH3: SH3 ドメイン, AIR: auto-inhibitory region, TPR: tetratricopeptide repeat モチーフ, AD: activation domain (活性化ドメイン), PB1: PB1 ドメイン. B) アラキドン酸刺激に応答した Rac の活性化. 好中球を 50 μ M アラキドン酸 (AA), 100 μ M SDS (sodium dodecyl sulfate), 50 μ M stearic acid (SA) で 2 分間インキュベートし, その後細胞を溶解した. ライゼートに, GST-Pak-PBD を加えて glutathione-Sepharose-4B ビーズにより pull-down した. 沈降した Rac と whole-cell ライゼート中の Rac は, 抗 Rac 抗体を用いて免疫プロット解析により見積もった. C) 培養細胞を用いた Nox2 活性の再構成. HeLa 細胞に, pcDNA3-Nox2, pEF-BOS-p22^{phox}, pEF-BOS-Myc-p67^{phox}, pEF-BOS-Myc-Rac1 (Q61L), そして pEF-BOS-FLAG-p47^{phox} (wt) または pEF-BOS-FLAG-p47^{phox} Δ AIR をトランスフェクションした. 生成される O₂⁻ は, DIOGENES を用いて化学発光法により測定した. D) p67^{phox}-Rac 複合体と Nox2 との相互作用におけるアラキドン酸の役割.

2. Nox2 由来の O₂⁻ が好中球の遊走過程で果たす役割

CGD 好中球では, 従来, ケモタキシスとファゴサイトーシスは正常におこるが, 活性酸素の生成ができないために殺菌能のみが著しく低下していると考えられていた. 近年, 遊走能測定法の進歩に基づいて再検討がなされ, CGD 好中球は, 遊走能が低下していることが報告された. これまでに我々は, 好中球遊走時の方向性維持に必須のシグナル伝達系を明らかにしている³⁾. 即ち, 走化性因子受容体とカップルしている 3 量体 G タンパク質の G α i サブユニットは, アダプタータンパク質 mInsc (mammalian homolog of Inscuteable) を介して aPKC (atypical protein kinase C) を活性化し, その結果 遊走時の細胞極性が維持されその方向性が維持される, というものである³⁾. 今回我々は, 遊走時に産生される O₂⁻ の役割を検討するために, PLB-985 細胞 (好中球様に分化する前骨髄性白血病由来細胞株) を用いて, C5a の濃度勾配に依存したケモタキシス (3D transwell chemotaxis assay) の解析を行った. PLB-985 細胞のケモタキシスは, Nox の阻害剤である DPI (diphenylene iodonium) の濃度依存的に抑制された. 遊走軌跡の詳細な解析から, DPI を処理した細胞では, 遊走の方向性に異常があることが分かった. さらに, 細胞染色などによる観察から, Nox2 の活性化因子である p67^{phox} 及び p47^{phox} は, 遊走時に細胞の前方に局在することを見出した. これらの因子は, aPKC 活性を阻害した好中球においても前方に集積していた. このように, Nox2 の活性化因子が細胞極性制御因子とは独立

の機構で好中球の前方にリクルートされること、前方で活性化された Nox2 が産生する O_2^- が 遊走方向の制御に重要であることが示唆された。

3. 食胞での H_2O_2 検出用蛍光プローブによる H_2O_2 の検出方法の確立

Nox2 から生成された O_2^- は速やかに H_2O_2 に変換され、ファゴサイトーシス時の食胞内においては殺菌に使用され、またケモタキシス時の leading edge においてはシグナル伝達に関わっている可能性がある。好中球は、Nox2 を活性化する空間や時間を制御することにより、使用目的に応じて H_2O_2 を生成するようであるが、その生成の経時的な観察はなされていない。SNAP-tag タンパク質は、PDGF (platelet-derived growth factor) レセプターの膜貫通ドメインに融合させることにより、食胞膜に局在することができる。我々は、この SNAP-tag タンパク質に高感度な過酸化水素検出用蛍光プローブ NBzF-BG (O-6-benzylguanine derivative of 5-(4-nitrobenzoyl)carbonylfluorescein) を結合させることにより、食胞内に生じる H_2O_2 の観察を行うための検出方法の確立に成功した (図3) ⁴⁾。

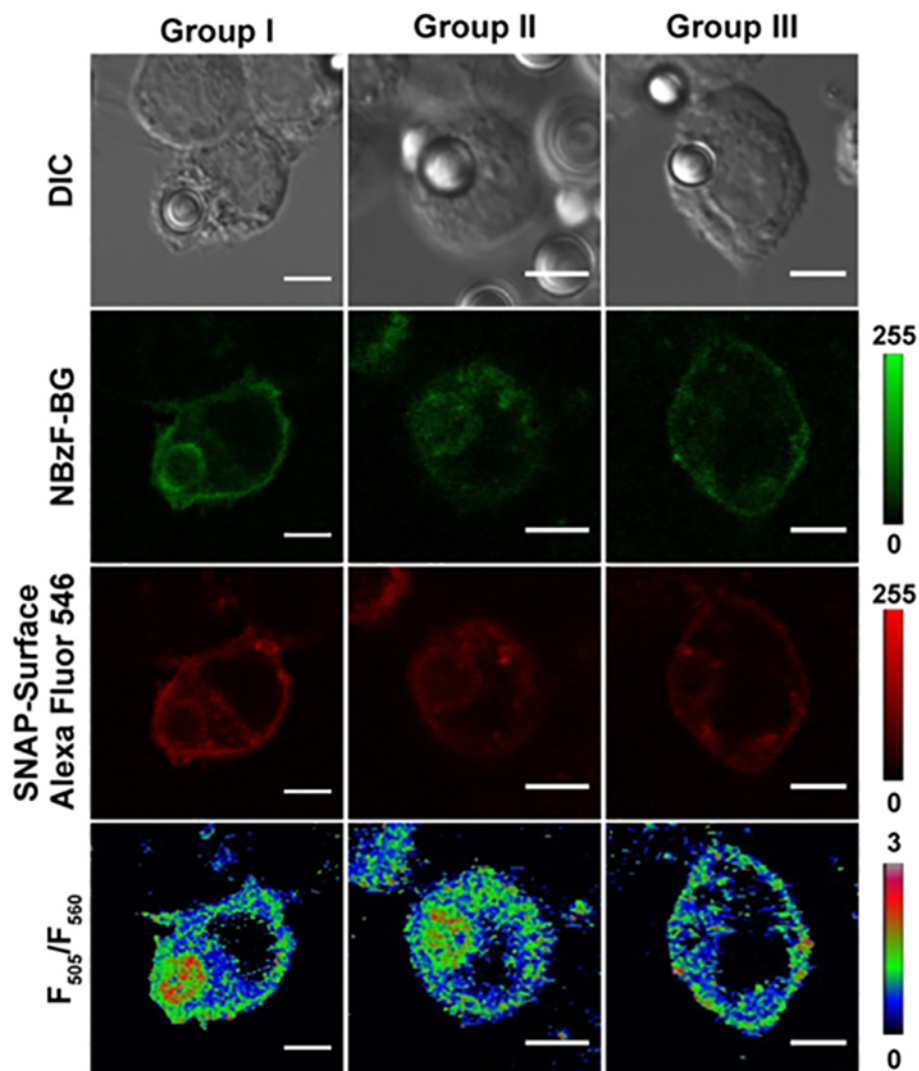


図2. 食胞での H_2O_2 検出用蛍光プローブによる H_2O_2 の検出方法の確立。

SNAP-tag をマクロファージ様細胞の RAW246.7 細胞に発現させ、 $5\mu M$ NBzF-BG と $0.5\mu M$ SNAP-Surface Alexa Fluor 546 でラベルし、IgG コートビーズとインキュベートした。食胞膜での F_{505}/F_{560} の比率を基に、3つのグループに分けた。グループ I は、食胞内で高い H_2O_2 生成が観察される ($R_{phagosome/PM} \geq 1.3$)。グループ II は、食胞内で中程度の H_2O_2 生成が観察される ($1.3 > R_{phagosome/PM} \geq 1$)。グループ III は、食胞内で低い H_2O_2 生成が観察される ($1 > R_{phagosome/PM}$)。スケールバー: $5\mu m$ 。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京大学大学院薬学系研究科の浦野泰照教授である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Watanabe, M., Terasawa, M., Miyano, K., Yanagihara, T., Uruno, T., Sanematsu, F., Nishikimi, A., Côté, J. F., Sumimoto, H. & Fukui, Y. : DOCK2 and DOCK5 act additively in neutrophils to regulate chemotaxis, superoxide production, and extracellular trap formation. *J. Immunol.*, **193** : 5660-5667, 2014.
- 2) Matono, R., Miyano, K., Kiyohara, T. & Sumimoto, H. : Arachidonic acid induces direct interaction of the p67^{phox}-Rac complex with the phagocyte oxidase Nox2, leading to superoxide production. *J. Biol. Chem.*, **289** : 24874-24884, 2014.
- 3) Kamakura, S., Nomura, M., Hayase, J., Iwakiri, Y., Nishikimi, A., Takayanagi, R., Fukui, Y. & Sumimoto, H. : The cell polarity protein mInsc regulates neutrophil chemotaxis via a noncanonical G protein signaling pathway. *Dev. Cell.*, **26** : 292-302, 2013.
- 4) Abo, M., Minakami, R., Miyano, K., Kamiya, M., Nagano, T., Urano, Y. & Sumimoto, H. : Visualization of phagosomal hydrogen peroxide production by a novel fluorescent probe that is localized via SNAP-tag labeling. *Anal. Chem.*, **86** : 5983-5990, 2014.