

ウイルス学部門 Department of Virology

好中球は微生物を貪食して初めて活性酸素を生成して殺菌に利用するが、この活性酸素を生成する酵素・食細胞 NADPH オキシダーゼは細胞休止時には不活性型であり、その活性は厳密に制御されている。ではこの活性化のスイッチは如何にコントロールされているのだろうか？ 広く細胞は様々な外的刺激に対して、多様な応答反応を起こす。情報の多様性に対し、伝達機構を構成する蛋白質は、分子構造から見ると基本的な幾つかのモジュール構造からなっていることが明らかになりつつある。この基本構造を介した分子間相互作用が、モジュラー蛋白質上で統合されることで情報伝達機構の複雑な制御を可能にしていると考えられる。

このような観点から、ウイルス学部門では、細胞内情報伝達機構解明の良いモデルとして、食細胞 NADPH オキシダーゼの活性化機構の研究を生化学的・分子生物学的手法及び構造生物学者とのコラボレーションによりすすめている。さらには、特に蛋白質のドメイン構造とその分子間相互作用の視点から、細胞の極性形成や細胞骨格の制御といった方面の細胞内情報伝達の研究にも取り組んでいる。

本年度の人事異動について、まず 2001 年 1 月よりウイルス学教授として住本英樹教授（併任・医学研究院分子病態学分野教授）を迎えた。さらに、2001 年 3 月 16 日付けで武谷 立（日本学術振興会特別研究員）を助手に採用した。

A. 食細胞 NADPH オキシダーゼ活性化の分子機構

食細胞 NADPH オキシダーゼは、病原性微生物の貪食時などにスーパーオキシド（高殺菌能をもつ種々の活性酸素の前駆物質）を生成する酵素系であり、その酵素本体は細胞膜に存在するシトクロム b_{558} (gp91^{phox} と p22^{phox} の 2 つのサブユニットから成る) である。オキシダーゼは細胞休止時には不活性型であり、その活性化には、特異的アダプター蛋白質 (p47^{phox}, p67^{phox} と p40^{phox} : それぞれ SH3 ドメインをもつ) と低分子量 G 蛋白質 Rac が刺激依存性に細胞質から細胞膜に移行してシトクロム b_{558} と相互作用する必要がある。私共はこの系に関してアダプター蛋白質の活性化機構を中心に研究を行ない、2000 年度は以下のような成果を得ている。

a. p47^{phox} の構造変化とそのメカニズム及び NADPH オキシダーゼ活性化との関連

シトクロム b_{558} と細胞質因子の相互作用は、p47^{phox} SH3 ドメインと p22^{phox} 細胞質領域 PRR との結合に依存し、この結合は NADPH オキシダーゼ活性化の ON/OFF を担う。p47^{phox} C 末端領域の S303, S304, S328 のリン酸化が、SH3 ドメインの unmasking、標的蛋白質である p22^{phox} との結合、更にはオキシダーゼ活性化に必要であることを明らかにするとともに、アラキドン酸がリン酸化と共同的に働いて上記の作用を増強することを明らかにした [Shiose & Sumimoto, 2000]。p47^{phox} SH3 ドメインと p22^{phox} の細胞質領域との複合体の 3 次構造決定も稲垣冬彦博士（北大薬）との共同研究により進行中である。

b. Rac と p67^{phox} の作用機構

私共は、Rac が p67^{phox} の N 末領域に存在する TPR ドメインに結合して作用することを明らかにしていた。今年度は、p67^{phox} の Rac 結合ドメイン (TPR ドメイン) 3 次構造決定を決定した [稲垣冬彦博士 (北大薬) との共同研究: 投稿準備中] .

c. p47^{phox} と p67^{phox} の結合

p67^{phox} C 末 SH3 ドメインは p47^{phox} の PRR に結合するが、この結合には PRR 以外にその更に C 末の領域が必要である [投稿準備中] . また、この複合体の構造を神田大輔博士 (BERI) との共同研究により明らかにした [投稿準備中] .

d. PB1 ドメイン

p40^{phox} は休止時細胞で p67^{phox} と会合しているが、この結合は、新規なドメイン間 (p40^{phox} の PC モチーフと p67^{phox} の PB1 ドメイン) の全く新しいタイプの蛋白質間相互作用によるものであることを示し、更に、これら新規なドメインが酵母のシグナル伝達蛋白質 (Cdc24p と Bem1p) にも存在し、酵母のシグナル伝達においても重要な役割を担うことも明らかにした [Ito et al., in press] . 同時に稲垣冬彦博士との共同研究より、Bem1p の PB1 ドメインの 3 次構造決定に成功した [Terasawa et al., in press] p40^{phox} の役割は今まで不明だったが、PB1 PC 相互作用による p67^{phox} との結合を介して、p67^{phox} と p47^{phox} の膜移行を促進させ、オキシダーゼ活性化を正に制御していることを明らかにした [投稿準備中] .

e. PX/PB2 ドメイン

私共は p47^{phox} と p40^{phox} (オキシダーゼの調節因子) の N 末領域に新規ドメイン を見い出していたが (PX/PB2 ドメイン) , 神田大輔博士 (BERI) との共同研究により、p47^{phox} PX ドメインの 3 次構造を決定するとともに、PX ドメインが phosphoinositides 結合能をもち p47^{phox} の膜移行およびオキシダーゼ活性化に必須であることを示した [Hiroaki et al., in press: 及び投稿中] . また p47^{phox} と p40^{phox} の PX ドメインが共に SH3 ドメインとの分子内結合により負に制御されていることを明らかにした [投稿中] .

B. 新規 NAD(P)H オキシダーゼの同定

gp91^{phox} は、N 末の 6 つの膜貫通領域 (ヘム結合部位を含む) と、C 末の FAD 結合ドメイン及び NADPH 結合ドメインからなる。この NADPH 結合ドメインのホモロジー検索から得た EST をもとにヒト腎 cDNA library を screening し、新規 gp91^{phox} ホモログ (NOX4 と命名) をクローニングした。NOX4 は腎臓尿管上皮細胞に高発現しており、NAD(P)H 依存性にスーパーオキシドを生成する活性をもつ [Shiose et al., 2001] . 更にマウスとラットの cDNA、及びヒトゲノム DNA のクローニングにも成功している [Shiose et al., 2001: 及び投稿準備中] .

C. 細胞極性決定の分子機構

線虫の極性決定に關与する蛋白質 PAR6 のヒトホモログ 3 種をクローニングし、ヒト PAR6 が、GTP 結合型の Rac/Cdc42 および atypical PKC (aPKC) と 3 者複合体を形成すること、この 3 者複合体が membrane ruffle に局在すること等を明らかにした [Noda et al., 2001] . 更に、PAR6 と aPKC の結合は、先の A . d . で述べた「PB1 PC 相互作用」によるものであることを見出している .

D. 新規ホスホリパーゼ A₂ の同定

カルシウム非依存性のアラキドン酸遊離に關与する、膜結合型の新規な細胞内ホスホリパーゼ A₂ (iPLA₂-2 と命名) を同定し、そのヒト cDNA をクローニングした [Tanaka et al., 2001] .

E. 新規 Formin 関連遺伝子の機能解析

formin 相同蛋白質ファミリーは、形態形成や極性形成、細胞質分裂に機能する蛋白質群であるが、profilin や Rho ファミリー-GTP 結合蛋白質といったアクチン細胞骨格の調節分子との結合蛋白質としても同定され、細胞内情報伝達系と細胞骨格系を結びつけアクチン線維形成を制御する分子として注目されている . 我々は、1164 個のアミノ酸からなる新規ヒト formin 相同蛋白質 p127 をクローニングした . p127 を COS-7 細胞に強制発現させると一部は細胞縁のラフリング膜に集積するのが観察された . HeLa 細胞を用いた強制発現系では、C 末端の欠失体 (アミノ酸 1-1053) が著明なアクチンストレスファイバー形成を誘導するとともに、ストレスファイバー上に沿って局在することを見出した . そこでアクチン線維との結合能を考え、p127 の大腸菌組み換え蛋白質を用いたアクチン線維との共沈実験により検討した結果、p127 は FH1 ドメインより N 末の領域 (アミノ酸 1-569) で *in vitro* で直接のアクチン線維結合能があることを明らかにした . formin ファミリーの蛋白質で、直接アクチン線維に作用するものはこれまで報告されておらず、アクチン線維との結合が、アクチン細胞骨格系の制御において同ファミリーの中でも p127 に特異的な機能の発現に関わっていると考えられる .

業績目録

原著論文

1. Shiose, A., Sumimoto, H. 2000.
Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47^{phox} to activate the phagocyte NADPH oxidase.
J. Biol. Chem. 275, 13793-138801.
Genes Cells. 6, 107-119.
2. Tanaka, H., Takeya, R., Sumimoto H. 2000.

- A novel intracellular membrane-bound calcium-independent phospholipase A₂.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 272, 320-326.
3. Takeya, R., Takeshige, K., and Sumimoto, H. 2000.
Interaction of the PDZ Domain of Human PICK1 with Class I ADP-Ribosylation Factors.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 267, 149- 155.
 4. Kimura, G., Takimoto, H., Yoshida, H., Ninomiya, T., Nukina, H., Ohtsu., M., and Nomoto K. 2000.
Organ dependent T-cell subset requirement in defense against virus in mice acutely and systemically infected with murine cytomegalovirus.
Biomed. Res. 21, 111-115.
 5. Kimura, G., Takimoto, H., Yoshida, H., Hamano, S., Li, W., Watanabe, Y., Ohtsu., M., and Nomoto K. 2000.
Roles of alveolar macrophages in defense against experimental pulmonary infection of mice with murine cytomegalovirus.
Biomed. Res. 21, 145-163.
 6. Kimura, G., Takimoto, H., Yoshida, H., Ninomiya, T., Chen, Q., Ohtsu., M., and Nomoto K. 2000.
Roles of T lymphocytes in defense against experimental acute pulmonary infection of mice with murine cytomegalovirus.
Biomed. Res. 21, 225-246.
 7. Yamasaki, M., Mansho, K., Mishima, H., Kimura, G., Sasaki, M., Kasai, M., Tachibana, H., and Yamada, K. 2000.
Effect of dietary conjugated linoleic acid on lipid peroxidation and histological change in rat liver tissues.
J. Agr. Food Chem. 48, 6367-6371.
 8. Noda, Y., Takeya, R., Ohno, S., Naito, S., Ito T., Sumimoto H. 2001.
Human homologues of the *Caenorhabditis elegans* cell polarity protein PAR6 as an adaptor that links the small GTPases Rac and Cdc42 to atypical protein kinase C.
Genes Cells. 6, 107-119.
 9. Shiose, A., Kuroda, J., Tsuruya, K., Hirai, M., Hirakata, H., Naito, S., Hattori, M., Sakaki, Y., Sumimoto, H. 2001.
A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney.
J. Biol. Chem. 276, 1417-1423.
 10. Okuda, A., Ohtsu, M., and Kimura, G. 2001.
Reversion of temperature-sensitive mutation by inhibition of proteasome-mediated degradation of mutated D123 protein.
Cell Struct. Funct. 26, 204-213.
 11. Hiroaki, H., Ago, T., Ito, T., Sumimoto, H., and Kohda, D. 2001.

Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain.

Nature Struct. Biol. (in press).

12. Nosaka, Y., Arai, A., Kanda, E., Akasaki, T., Sumimoto, H., Miyasaka, N., and Miura, O. 2001.
Rac is activated by tumor necrosis factor and is involved in activation of Erk.
Biochem, Biophys. Res. Commun. (in press)
13. Ito, T., Matui, Y., Ago, T., Ohta, K., and Sumimoto, H. 2001.
Novel modular domain PB1 recognizes PC motif to mediate functional protein-protein interactions.
EMBO J. (in press)
14. Terasawa, H., Noda, Y., Ito, T., Hatanaka, H., Ogura, K., Sumimoto, H., and Inagaki, F. 2001.
Structure and ligand recognition of the PB1 domain: a novel protein module capable of binding PC motif-containing protein.
EMBO, J. (in press)

総説

1. 住本 英樹, 伊藤 隆司. 2000
ドメイン構造からみた活性酸素生成のシグナリング.
実験医学 (増刊) 18, 101-107.
2. 塩瀬 明, 住本 英樹. 2001.
好中球における活性酸素産生機構とそのシグナル伝達
血液フロンティア 11,印刷中.
3. 神田 大輔, 住本 英樹, 稲垣 冬彦. 2001
複数の蛋白質ドメインの協調に基づく機能調節 活性酸素生成を例として.
蛋白質 核酸 酵素 46,印刷中.

著書

1. 栗林 太, 住本 英樹. 2000
基礎生化学実験法 第2巻 生体試料 (日本生化学会編, 東京化学同人, 東京) 142-147.

学会発表

1. Hideki Sumimoto, Akira Shiose, Junya Kuroda. (2000, 6/24-6/25).
NADPH oxidases in phagocytic and non-phagocytic cells.
第6回MPO研究会 (シンポジウム), 熱海.
2. 住本 英樹, 栗林 太. (2000, 9/1-9/2)
殺菌において重要な食細胞NADPH オキシダーゼ活性化の分子機構.

- 第 37 回日本ウイルス学会九州支部総会, 第 53 回日本細菌学会九州支部総会 (シンポジウム), 長崎.
3. 住本 英樹, 赤崎 卓, 古賀 博文, 吾郷 哲朗, 武谷 立, 塩瀬 明, 信久 幾夫, 栗林 太. (2000, 9/28- 30).
食細胞 NADPH オキシダーゼ活性化の分子機構.
第 28 回日本臨床免疫学会総会 (ワークショップ), 東京.
 4. 田中 玄紀, 武谷 立, 住本 英樹. (2000, 10/11- 14).
ヒトの新規膜結合型カルシウム非依存性ホスホリパーゼ A₂ の cDNA クローニングと発現
第 73 回日本生化学会大会, 横浜.
 5. 栗林 太, 吾郷 哲朗, 住本 英樹. (2000, 10/11- 14).
p40^{phox} の SH3 ドメインと結合する新規蛋白質の cDNA クローニング.
第 73 回日本生化学会大会, 横浜.
 6. 塩瀬 明, 黒田 淳哉, 平井 百樹, 服部 正平, 住本 英樹. (2000, 10/11- 14).
ヒト新規 NADPH オキシダーゼ相同蛋白質 Kox のクローニングと機能解析.
第 73 回日本生化学会大会, 横浜.
 7. 黒田 淳哉, 塩瀬 明, 平井 百樹. (2000, 10/11- 14).
マウスおよびラットの新規 NADPH オキシダーゼ相同蛋白質 Kox のクローニングと発現.
第 73 回日本生化学会大会, 横浜.
 8. 佐々木正文, 吉田裕樹, 古賀泰裕, 木村元喜, 野本亀久雄. (2000, 10/12-14).
HIV-envgp160 発現 CD4 陽性細胞におけるカルシウム依存性アポトーシスの解析.
第 48 回日本ウイルス学会, 津.
 9. 奥田篤行. (2000 10/31-11/2).
温度感受性 G1 期変異株 3Y1tsd123 の変異 D123 蛋白の修飾とプロテアソームでの分解.
第 53 回日本細胞生物学会, 福岡.
 10. Hideki Sumimoto. (200011/6).
Role for a novel phosphoinositide-binding domain in activation of the superoxide-producing phagocyte NADPH oxidase.
Kyushu University Station for Collaborative Research (KUSCR) International Conference, Fukuoka.
 11. Akira, Shiose., Hideki, Sumimoto. (2000, 11/26-29).
A novel superoxide-producing nad(p)h oxidase in kidney.
The Third International Conference on Oxygenases.
 12. 住本 英樹. (2000, 12/13- 16).
活性酸素生成型 NADPH オキシダーゼ活性化と細胞極性決定のシグナル伝達と分子認識
第 23 回日本分子生物学会年会 (ワークショップ), 神戸.
 13. 信久 幾夫, 神田 大輔, 住本 英樹. (2000, 12/13- 16).

食細胞NADPHオキシダーゼ蛋白質p47^{phox}の2つのSH3ドメインによるプロリンリッチ領域の新しい認識機構.

第23回日本分子生物学会年会, 神戸.

14. 西岡 朋尚, 竹添 裕高, 房岡 恵理, 中村 岳史, 住本 英樹, 森 望, 高橋 直樹, 竹内 恒成. (2000, 12/13-16).

神経特異的アクチン結合タンパク質 Clipin Cの発現と機能.

第23回日本分子生物学会年会, 神戸.

15. 塩瀬 明, 黒田 淳哉, 鶴屋 和彦, 平井 百樹, 平方 秀樹, 服部 正平, 榊 佳之, 住本 英樹. (2000, 12/13-16).

ヒト新規スーパーオキシド生成型オキシダーゼ NOX4.

第23回日本分子生物学会年会, 神戸.

16. 黒田 淳哉, 塩瀬 明, 脇坂 政則, 遠城寺 宗近, 中牟田 誠, 鶴屋 和彦, 平方 秀樹, 平井 百樹, 住本 英樹. (2000, 12/13-16).

マウスおよびラットの新規NAD(P)Hオキシダーゼ NOX4.

第23回日本分子生物学会年会, 神戸.

17. 野田 祐紀子, 武谷 立, 大野 茂男, 内藤 誠二, 伊藤 隆司, 住本 英樹.
(2000, 12/13-16).

ヒトPAR6ホモログは活性化型 Rac 及び aPKC / と共に membrane ruffle に局在する.

第23回日本分子生物学会年会, 神戸.

18. 武谷 立, 栗林 太, 住本 英樹. (2000, 12/13-16).

Formin 相同蛋白質 p127 はストレスファイバーへ局在する F-アクチン結合蛋白質である.

第23回日本分子生物学会年会, 神戸.