

「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

平成15年度採択研究代表者

藤田 禎三

(福島県立医科大学 医学部 教授)

「生体防御におけるたんぱく質間相互作用と機能発現機構の解析」

1. 研究実施の概要

藤田禎三グループ

藤田グループの目的は、補体レクチン経路の活性化機構の意義とその分子基盤を明らかにすることである。レクチン経路を構成する各成分の欠損マウスを作成して表現型を解析することにより、それぞれの役割と全体としてのレクチン経路の果たす役割を明らかにできると考える。既に作成したMASP-1/3欠損マウスの解析の結果、レクチン経路の初動が遅延していること、インフルエンザウィルスに易感染性であることなど、レクチン経路の生体防御における重要性が明らかになった。同様の手法によりMASP-2/sMAP欠損マウスを作成し、現在その表現型を解析中である。とくに、プロテアーゼ部分を持たないsMAPの役割を明らかになると期待される。さらに、レクチン経路の認識分子の一つであるフィコリンの役割を明らかにするために、フィコリンA欠損マウスを作成した。マンノース結合レクチン (MBL) とは異なるフィコリンの新たな役割が明らかになると期待される。さらに、レクチン経路の認識分子の糖鎖認識機構を明らかにするために、ヒトフィコリン、マボヤMBL様タンパクなどの組換えタンパクの作製とその結晶解析を進めている。

若宮伸隆グループ

本研究の目的は、血管内皮細胞における膜型コレクチンCL-P1による、異物認識と引き続いておこるエンドサイトーシスや貪食に関わる分子とその動的变化を明らかにすることである。初年度の成果としては、two hybrid法にてCL-P1と結合するタンパクAdaptin μ 2chainを明らかにした。Adaptin μ 2chainは、CL-P1とclathrinを結びつける蛋白であることが予想された。そこで、pull downアッセイなどによりCL-P1とAdaptin μ 2chainの結合を、in vitroの系で明らかにした。次の実験課題としては、CL-P1遺伝子のエンドサイトーシスと貪食に関わる分子の相互作用 (結合) を、細胞レベルで明らかにすることを2年度の目的とする。

黒木由夫グループ

黒木グループは、分泌型コレクチンの糖鎖認識領域およびコラーゲン様領域と生体防御機能との関係を明らかにすることである。糖質結合特異性変換変異体、Toll様受容体細胞外ドメイン (sTLR)、MD-2の組換え蛋白を精製し、コレクチンとTLRとの結合、MD-2とTLRや

リポ多糖との直接結合を明らかにした。

住本、神田、伊藤グループ

本研究は、1つには「食細胞における活性酸素生成の調節機構、即ち活性酸素生成型NADPHオキシダーゼの活性化機構」について、特に「食細胞オキシダーゼの活性化とファゴサイトーシスをカップリングさせる機構、およびその調節機構」を細胞レベル・分子レベルで更には原子レベルで明らかにしようというものである。

平成15年度は、特に「活性化食細胞NADPHオキシダーゼのファゴゾームへのtargetingにおけるp40^{phox}の役割」に注目して研究を進め、新規なp40^{phox}結合蛋白質を同定・クローニングすることに成功した。この新規p40^{phox}結合蛋白質の発見が「食細胞オキシダーゼの活性化とファゴサイトーシスをカップリングさせる機構」についての研究を更に進展させると期待される。

また、本研究のもう1つの重要な課題は、食細胞以外に存在する活性酸素生成型NADPHオキシダーゼ(Nox1, Nox3, Nox4など)の機能と調節機構の解明である。私共は昨年食細胞オキシダーゼの活性化蛋白質であるp47^{phox}とp67^{phox}それぞれの新規ホモログ(それぞれp41^{nox}とp51^{nox}と命名)をクローニングしていたが、平成15年度は、p41^{nox}とp51^{nox}のNox1, Nox3, Nox4などの活性化における役割について検討を開始し既に幾つかの知見を得ている。16年度には、これらのオキシダーゼの活性化機構について更に解析を進める。

2. 研究実施内容

藤田、若宮、黒木グループ

補体レクチン経路の活性化機構の意義とその分子基盤を明らかにする研究に於いては、レクチン経路を構成する各成分の欠損マウスを作成して表現型を解析することにより、それぞれの役割と全体としてのレクチン経路の果たす役割を明らかにできると考える。既に作成したMASP-1/3欠損マウスの解析の結果、レクチン経路の初動が遅延していること、インフルエンザウィルスに易感染性であることなど、レクチン経路の生体防御における重要性が明らかになった。同様の手法によりMASP-2/sMAP欠損マウスを作成し、現在その表現型を解析中である。とくに、プロテアーゼ部分を持たないsMAPの役割を明らかになると期待される。さらに、レクチン経路の認識分子の一つであるフィコリンの役割を明らかにするために、フィコリンA欠損マウスを作成した。マンノース結合レクチン(MBL)とは異なるフィコリンの新たな役割が明らかになると期待される。さらに、レクチン経路の認識分子の糖鎖認識機構を明らかにするために、ヒトフィコリン、マボヤMBL様タンパクなどの組換えタンパクの作製とその結晶解析を進めている。

血管内皮細胞における膜型コレクチンCL-P1による、異物認識と引き続いておこるエンドサイトーシスや貪食に関わる分子とその動的変化については、初年度の成果として、two hybrid法にてCL-P1と結合するタンパクAdaptin μ 2chainを明らかにした。Adaptin μ 2chainは、CL-P1とclathrinを結びつける蛋白であることが予想された。そこで、pull downアッセイなどによりCL-P1とAdaptin μ 2chainの結合を、in vitroの系で明らかにした。

次の実験課題としては、CL-P1遺伝子のエンドサイトーシスと貪食に関わる分子の相互作用（結合）を、細胞レベルで明らかにすることを2年度の目的とする。

分泌型コレクチンの糖鎖認識領域およびコラーゲン様領域と生体防御機能との関係解明に関しては、糖質結合特異性変換変異体、Toll様受容体細胞外ドメイン(sTLR)、MD-2の組換え蛋白を精製し、コレクチンとTLRとの結合、MD-2とTLRやリポ多糖との直接結合を明らかにした。

住本、神田、伊藤グループ

(1) 食細胞NADPHオキシダーゼの活性化とファゴサイトーシスをカップリングさせる機構について、生化学・分子細胞生物学的手法に加えて、構造生物学的解析により3次構造情報を得ながら、オキシダーゼの活性化の時間的空間的な全体像を明らかにしたいと考えている。平成15年度は、特に、「活性化された食細胞NADPHオキシダーゼのファゴゾームへのtargetingにおけるp40^{phox}の役割」及び「Racの役割」に注目して研究を進めた。

(i) 活性化された食細胞NADPHオキシダーゼのファゴゾームへのtargetingにおけるp40^{phox}の役割について： p40^{phox}はN末から、「PXドメイン-SH3ドメイン-PB1ドメイン」という構造をしている。p40^{phox}のPXドメイン (p40^{phox}-PX) は (PI3P) に特異的に結合し、p40^{phox}-PXをGFP (green fluorescent protein) との融合蛋白質 (GFP-p40-PX) として発現させた種々の食細胞では、GFP-p40-PXがファゴゾーム膜に集まることを見出ししていた。平成15年度は、種々の変異型p40^{phox}を作成し、『このPXドメインのPI3Pとの分子内相互作用（及びファゴゾーム膜への集積）は、PXドメインの結合がPB1ドメインと分子内相互作用することにより調節されていること』を共焦点レーザー顕微鏡を用いて明らかにした。更に、p40^{phox}のPXドメインおよびSH3ドメインに結合する新規蛋白質をYeast two-hybrid法を用いて同定・クローニングした。これら新規蛋白質はp40^{phox}のファゴゾーム膜への集積を促進しているらしい、というpreliminaryな結果を既に得ており、その解析を現在進めている。また、p40^{phox}とその結合蛋白質の大量精製系を構築にも成功したので、これを用いた複合体の3次構造解析の準備を行なっているところである。

(ii) Racの役割について： ファゴサイトーシス時のRacの活性化をモニターするためには、平成15年度は、野生型および変異型RacをもつGFP-Rac融合蛋白質を作成した。現在、これらのファゴサイトーシスとオキシダーゼ活性化の連関に対する影響について、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析を進めている。

(2) もう一つの重要な課題は、食細胞以外に存在する活性酸素生成型NADPHオキシダーゼ (Nox1, Nox3, Nox4など) の機能と調節機構の解明である。私共は昨年食細胞オキシダーゼの活性化蛋白質であるp47^{phox}とp67^{phox}それぞれの新規ホモログ (それぞれp41^{nox}とp51^{nox}と命名) をクローニングしていたが、平成15年度は、p41^{nox}とp51^{nox}のNox1, Nox3, Nox4などの活性化における役割について検討を開始した。まず、p41^{nox}とp51^{nox}の種々の変異体蛋白質を作成し、これらを培養細胞系 (COS-7細胞, HEK293細胞, CHO細胞, など) に発現させNox1, Nox3, Nox4などの活性化における役割を検討した。その結果、(i) Nox1の活性化にはp41^{nox}とp51^{nox}の両者が必須であること (しかもp41^{nox}とp51^{nox}の結合が必要であ

ること)、(ii) Nox1はconstitutiveに強い活性をもつがその活性はp41^{Nox}により増強されること、(iii) Nox4はconstitutiveに極めて弱い活性をもつがその活性はp41^{Nox}やp51^{Nox}によって影響を受けないこと、等の知見を得ている。16年度には、これらのオキシダーゼの活性化機構について更に解析を進める計画である。また、平成15年度には、p41^{Nox}、p51^{Nox}、およびNox3に対して特異的な抗体を作成することに成功した。今後の解析に極めて有用だと考えられる。

3. 研究実施体制

藤田禎三グループ

- ① 研究分担グループ長：藤田禎三（福島県立医科大学 医学部 教授）
- ② 研究項目：補体レクチン経路の分子機構の解析

若宮伸隆グループ

- ① 研究分担グループ長：若宮伸隆（旭川医科大学 医学部 教授）
- ② 研究項目：新規膜型コレクチンの機能解析

黒木由夫グループ

- ① 研究分担グループ長：黒木由夫（札幌医科大学 医学部、教授）
- ② 研究項目：
 - ・コレクチン糖鎖認識領域における糖質結合特異性変換変異体のcDNA作成と蛋白精製
 - ・TLR2とTLR4の可溶性細胞外ドメイン(sTLR2、sTLR4)のcDNA作成と蛋白精製
 - ・MD-2のcDNA作成と蛋白精製
 - ・コレクチン変異体とそのリガンド（リポ多糖、ペプチドグリカン等）との相互作用
 - ・sTLR2およびsTLR4とMD-2あるいはLPSとの結合とビアコア解析

住本英樹グループ

- ① 研究分担グループ長：住本 英樹（九州大学 生体防御医学研究所、教授）
- ② 研究項目：生化学・分子生物学・細胞生物学・発生工学的手法による分子認識機構解明

神田大輔グループ

- ① 研究分担グループ長：神田 大輔（九州大学 生体防御医学研究所、教授）
- ② 研究項目：構造生物学的手法による分子認識機構解明

伊藤隆司グループ

- ① 研究分担グループ長：伊藤 隆司（東京大学 大学院新領域創成科学研究科、教授）
- ② 研究項目：分子遺伝学的手法による分子認識機構解明

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Mizukami, Y., Sumimoto, H., and Takeshige, K.: Induction of cytochrome CYP4F3A in all-trans-retinoic acid-treated HL60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **314**, 104-109 (2004)
- Kawahara, T., Kuwano, Y., Teshima-Kondo, S., Takeya, R., Sumimoto, H., Kishi, K., Tsunawaki, S., Hirayama, T., and Rokutan, K.: Role of NADPH oxidase 1 in oxidative burst response to Toll-like receptor 5 signaling in large intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* **172**, 3051-3058 (2004)
- Yuzawa, S., Suzuki, N. N., Fujioka, Y., Ogura, K., Sumimoto, H., and Inagaki, F.: A molecular mechanism for autoinhibition of the tandem SH3 domains of p47^{phox}, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase. *Genes Cells* **9**, 443-456 (2004)
- Yuzawa, S., Yokochi, M., Fujioka, Y., Ogura, K., Kataoka, M., Sumimoto, H., and Inagaki, F.: Sequence-specific resonance assignments of the tandem SH3 domains in an autoinhibitory form of p47^{phox}. *J. Biomol. NMR* **29**, 451-452 (2004)
- Hashida, S., Yuzawa, S., Suzuki, N. N., Fujioka, Y., Takikawa, T., Sumimoto, H., Inagaki, F., and Fujii, H.: Binding of FAD to cytochrome *b*₅₅₈ is facilitated during activation of the phagocyte NADPH oxidase, leading to superoxide production. *J. Biol. Chem.* **279**, 26378-26386 (2004)

論文（総説）発表

- Takeya, R., and Sumimoto, H.: Molecular mechanism for activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *Mol. Cells* **16**, 271-277 (2003)

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：0件）