



p40^{phox} の結晶構造と活性酸素発生の制御機構

はじめに

好中球は感染が起こると速やかにその部位へ集まり、病原性微生物を貪食し、活性酸素を産生することで殺菌を行う。好中球 NADPH オキシダーゼは活性酸素の発生前に直接関わる酵素であり、細胞内の NADPH から電子を受け取り、微生物を取り込んだファゴソーム内の酸素分子へと、ファゴソーム膜を越えて電子を受け渡すことで活性酸素を発生する。NADPH オキシダーゼの遺伝的欠損症である慢性肉芽腫症の患者では、好中球が活性酸素を産生できないためにその殺菌能が極めて低くなり、重篤な感染症を繰り返すことから、その重要性は明らかである¹⁾。一方で、活性酸素は反応性が極めて高く、その過剰な産生は自身にも損傷を与える。このため、NADPH オキシダーゼの活性は厳密に制御されている。

1. NADPH オキシダーゼの制御機構

NADPH オキシダーゼの酵素本体は膜上に存在する p22^{phox}, gp91^{phox} のヘテロダイマーからなる、シトクロム b₅₅₈ である。シトクロム b₅₅₈ は電子伝達 (NADPH → FAD → ヘム → 酸素分子) に必要な NADPH, FAD, ヘム結合部位を全て有している。しかし、シトクロム b₅₅₈ のみでは電子伝達は行われず、活性酸素を発生することはできない。シトクロム b₅₅₈ の活性化には、細胞質中に存在する細胞質因子複合体 (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox})、および低分子量 G タンパク質 Rac との複合体形成が必要である²⁾ (図 1)。細胞質因子複合体は p47^{phox}-p67^{phox} 間相互作用と、p40^{phox}-p67^{phox} 間相互作用からなる 1:1:1 の三者複合体であり³⁾、p47^{phox} のタンデム SH3 ドメインが⁴⁾、シトクロム b₅₅₈ の構成成分である p22^{phox} と相互作用することで膜へと移行する^{4,5)}。Rac

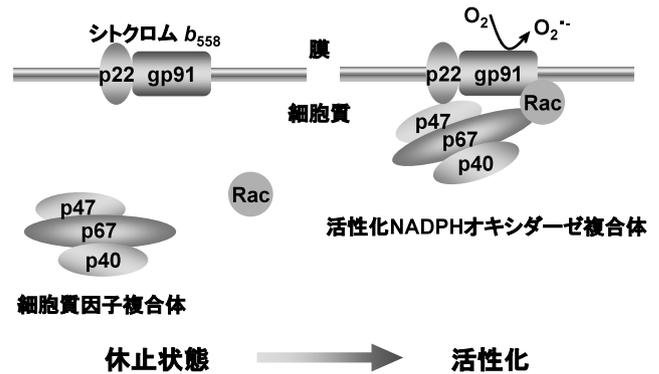


図 1 NADPH オキシダーゼの活性化機構

休止時にはシトクロム b₅₅₈, 細胞質因子複合体, 低分子量 G タンパク質 Rac はそれぞれ別々に存在している, 細胞質因子複合体, Rac が膜へと移行することで, シトクロム b₅₅₈ は活性酸素を産生できるようになる。

はこれとは独立に膜へと移行し、シトクロム b₅₅₈ との複合体を形成する⁶⁾。p47^{phox} と p22^{phox} との相互作用および Rac の膜への移行は厳密に制御されており、これは活性酸素を適切な場所、時間で発生させるための機構であるといえる。

2. 細胞質因子 p40^{phox}

p40^{phox} は、N 末端側から順に PX ドメイン, SH3 ドメインおよび PB1 ドメインを持つ。PX ドメインはホスファチジルイノシトール 3-リン酸 (PI(3)P) を結合し、また PB1 ドメインは p67^{phox} の PB1 ドメインとヘテロダイマーを形成することで p40^{phox}-p67^{phox} 間相互作用を形成する (図 2A)。p40^{phox} はシトクロム b₅₅₈ の活性化に必須な p47^{phox}, p67^{phox} と強固な三者複合体を形成するにもかかわらず、*in vitro* のアッセイにおいて、シトクロム b₅₅₈ の活性化に必須ではない。このため p40^{phox} の機能は長らく不明であったが、2002 年に *in vivo* において、p40^{phox} が細胞質因子 p47^{phox}, p67^{phox} の膜への移行を亢進することにより NADPH オキシダーゼの活性化を促進することが示された⁷⁾。さらに最近、p40^{phox} はファゴサイトーシスに伴う NADPH オキシダーゼの活性化に重要であり、この活性化に p40^{phox} の PX ドメインと PI(3)P との相互作用が必要であることが示された^{8,9)}。以上のことから、p40^{phox} は NADPH オキシダーゼの正の制御因子であると考えられる。

p47^{phox} の PX ドメインは分子内の SH3 ドメインにより、その機能が制御されていることがこれまでに示されている^{10,11)}。その一方で、p40^{phox} の PX ドメインの制御機構についてはこれまで明らかとされていなかった。本稿では我々が最近明らかとした、PB1 ドメインによる PX ドメインの

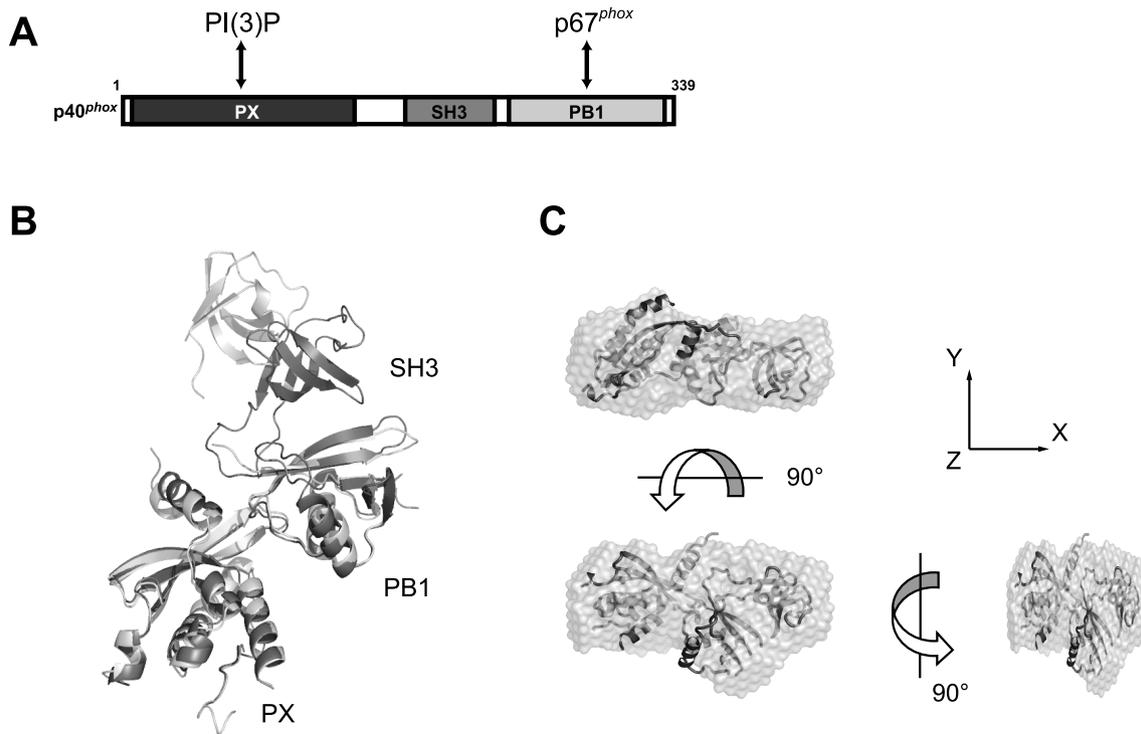


図2 p40^{phox}の結晶構造

A, p40^{phox}のドメイン構成. PXドメインはPI(3)Pと、PB1ドメインはp67^{phox}との相互作用に関与する. B, 分子Aと分子Bとの重ね合わせ. 電子密度の明瞭な分子Aを黒で、不明瞭な分子Bを灰色で示す. C, 結晶構造の分子Aと、X線小角散乱データから構築した低分解能モデルとの重ね合わせ. 結晶構造をリボン図、低分解能モデルを表面モデルで示す.

制御機構について、p40^{phox}の結晶構造を中心として述べる¹²⁾.

3. p40^{phox}の分子内制御

p40^{phox}のPXドメインとPI(3)Pとの相互作用が分子内で制御されているかどうかを調べるため、筆者らはまずHeLa細胞に各ドメインを欠失したp40^{phox}をGFP融合タンパク質として発現させ、初期エンドソーム(EE)への局在を見る実験を行った. EEにはPI(3)Pが集積しているため、PXドメインとPI(3)Pとの相互作用をp40^{phox}のEEへの局在として確認できる. 全長(p40^{phox}-F)に加えて、PXドメインのみ(p40^{phox}-PX)、SH3ドメインを除いたもの(p40^{phox}-ΔSH3)、PB1ドメインを除いたもの(p40^{phox}-ΔPB1)を作製し実験を行った. その結果、PB1ドメインを含まないp40^{phox}-PXやp40^{phox}-ΔPB1はEEへの局在が見られたのに対し、PB1ドメインを含むp40^{phox}-Fやp40^{phox}-ΔSH3は細胞質へ均一に分布し、EEへの局在は見られなかった. この結果から、PXドメインとPI(3)Pとの相互作用がPB1ド

メインにより制御されていることが示唆された.

4. p40^{phox}の全長構造

PB1ドメインによるPXドメインの制御機構をより詳細に解明することを目的として、p40^{phox}全長のX線結晶構造解析を行った. 解析の結果、p40^{phox}は結晶非対称単位中に二分子存在していた. この二分子のうち、一分子は電子密度が比較的明瞭であるのに対し、もう一分子は電子密度の不明瞭な部分が多い. 以降、電子密度が明瞭な方を分子A、不明瞭な方を分子Bと呼ぶ. 分子Bの電子密度が不明瞭である理由として、マルチドメインタンパク質であることによる運動性の高さが考えられる. 実際本構造は全体として原子の熱振動の大きさを表す指標である温度因子の値が高い. 図2Bに分子Aと分子Bの構造の重ね合わせを示す. SH3ドメインが異なる相対位置にあるのは、SH3ドメインの自由度が高いという性質に由来すると考えることができる. 一方、PXドメインとPB1ドメインは分子A、B間で同じ相対配置で存在しており、PX-PB1ドメイ

ン間の相互作用の存在が示唆された。

PX-PB1 ドメイン間の相互作用が結晶化のアーティファクトではないことを確認するために、X線小角散乱の実験を行った。*ab initio* 解析による $p40^{phox}$ の低分解能モデルの構築をプログラム DAMMIN¹³⁾ により行い、分子 A と重ね合わせたものを図 2C に示す。この図から、結晶構造と低分解能モデルとが、大きさ、形状共におよそ一致していることがわかる。このことから溶液中においても、結晶構造で見られた PX-PB1 ドメイン間の相互作用が存在し、ドメインの配置を規定していることが強く示唆される。一方で、結晶構造と低分解能モデルとの重ね合わせには一部ずれが見られるが、これは SH3 ドメインが溶液中で自由な配向を取っていることに由来すると考えることができる。

5. PX-PB1 ドメイン間相互作用

図 3A に PX-PB1 ドメイン間相互作用を形成する主な残基を示した。PX-PB1 ドメイン間相互作用は主に、PX ドメインの $\beta 1$ と $\beta 2$ との間のループ部分に存在する F35 が、PB1 ドメインの V257, P265, L273, F320, W322 からなる疎水性ポケットに突き刺さることにより形成されている。また、この疎水性相互作用を取り囲むように PX ドメインの塩基性残基 H38, R58, R60 と PB1 ドメインの酸性残基 E259, D269 とが相互作用している。PX ドメインと PB1 ドメインとの接触面積は合計で $1,300 \text{ \AA}^2$ であった。この値は決して大きいものではないが¹⁴⁾、PX-PB1 ドメイン間相互作用は同一分子内に存在し、ドメイン同士の局所

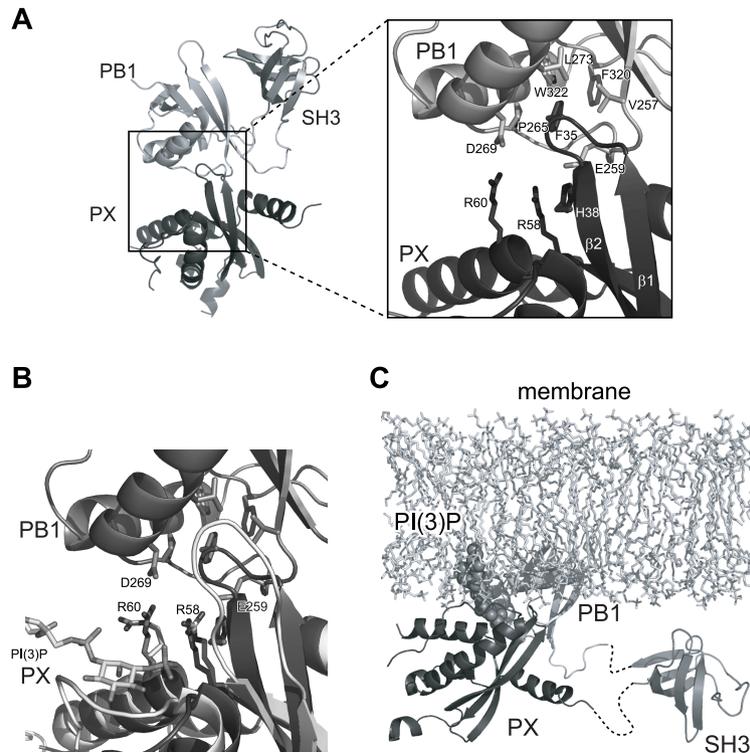


図 3 PX-PB1 ドメイン間相互作用

A, 左に分子 A の全体図, 右に四角で囲った領域を拡大したものを示す。PX ドメインを黒, PB1 ドメインを灰色のリボン図で, また PX-PB1 相互作用に関与する側鎖をスティックモデルで示した。B, PX ドメインと PI(3)P との複合体結晶構造 (pdb: 1H6H) と分子 A との重ね合わせ。分子 A の PX ドメインを黒, PB1 ドメインを灰色, 複合体構造を白, また PI(3)P をスティックモデルで示す。A の拡大図と同じ領域について示す。C, 脂質二重膜上の PI(3)P と $p40^{phox}$ (分子 A) との相互作用モデル。脂質二重膜をスティックモデル, また PI(3)P を球面モデルで示す。SH3 ドメインは自由な配向を取っていると予想されるため, リンカー部分を点線で示した。

濃度が高いことから、溶液中で両者が解離せずに存在する上で十分であると考えられる。

結晶構造中で見られた相互作用が実際にPXドメインの制御に関与しているかどうかを確認するため、PX-PB1ドメイン間相互作用を形成するPB1ドメイン上の残基、E259, D269, F320をそれぞれアラニンに変異させたp40^{phox}-E259A, p40^{phox}-D269A, p40^{phox}-F320A変異体を作製し、再度HeLa細胞におけるEEへの局在を見る実験を行った。その結果、PB1ドメインが存在するにもかかわらず、いずれの変異体においてもp40^{phox}-PXやp40^{phox}-ΔPB1と同様にEEへの局在が見られた。以上の結果から、結晶中で見られたPX-PB1ドメイン間相互作用により、PXドメインのEEへの移行が阻害されていることが示された。

6. PB1ドメインによるPXドメインの制御モデル

結晶構造中で観察されたPX-PB1ドメイン間相互作用により、PXドメインとPI(3)Pとの相互作用はどのように制御されているのだろうか。このことを確認するため、p40^{phox}のPXドメインとPI(3)Pとの複合体構造¹⁵⁾と分子Aとの重ね合わせを行った(図3B)。この図から、PB1ドメインはPXドメインのPI(3)P結合部位付近で結合しているが、結合部位をふさいではないことがわかる。PI(3)Pの認識に関わる残基のうち、PB1ドメインとの相互作用にも用いられているものはR58, R60である。R58はPI(3)Pの認識にきわめて重要な残基であるが、PB1ドメインと相互作用してもR58の側鎖には大きな変化は起こっていない。したがって、PB1ドメインとR58との相互作用によって、PXドメインとPI(3)Pとの結合が阻害されることはないと考えられる。一方、R60はPB1ドメインと相互作用する結果、側鎖の方向が変化している。しかし、この側鎖の変化もPI(3)Pとの結合を妨げるようなものではなく、またR60はPI(3)Pの結合にはそれほど重要な残基ではないことから、PI(3)Pの結合に影響するとは考えにくい。したがって、p40^{phox}のPXドメインはPB1ドメインと相互作用しつつPI(3)Pを結合できると考えられる。

しかしながら、実際にp40^{phox}が生体内で機能する際、PXドメインは遊離したPI(3)Pではなく、脂質二重膜からなるファゴソーム上に集積しているPI(3)Pを認識していると考えられる。そこで、PI(3)Pが脂質二重膜上に存在すると仮定し、複合体構造をもとに分子Aと膜上のPI(3)Pとの相互作用モデルを構築した(図3C)。この図から、ちょうど脂質二重膜とPB1ドメインが重なることがわかる。このことから、PB1ドメインはPXドメイン上の

PI(3)P結合部位を直接ふさぐことによってではなく、膜との立体障害によりPXドメインと膜上のPI(3)Pとの結合を間接的に阻害している可能性が示唆される。

おわりに

本研究により、p40^{phox}のPXドメインと「膜上の」PI(3)Pとの相互作用がPB1ドメインにより制御されていることが明らかとなった。これは休止時にp40^{phox}のPXドメインがファゴソーム上のPI(3)Pと相互作用しないための機構であると考えられる。これまでにPXドメインがPB1ドメインにより阻害を受けているとの報告はなく、今回の例が初めてである。一方でこの制御が活性化の際、どのようにして解除されるのか、その機構はいまだ不明である。今後はこの点を含め、NADPHオキシダーゼの制御機構の全貌を明らかにしていきたいと考えている。

最後に、HeLa細胞におけるp40^{phox}変異体のEEへの局在の解析は、九州大学医学研究院 住本英樹先生との共同研究である。この場を借りて厚くお礼申し上げます。

- 1) Heyworth, P.G., Cross, A.R., & Curnutte, J.T. (2003) *Curr. Opin. Immunol.*, 15, 578-584.
- 2) Sumimoto, H., Miyano, K., & Takeya, R. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338, 677-686.
- 3) Lapouge, K., Smith, S.J., Groemping, Y., & Rittinger, K. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 10121-10128.
- 4) Leto, T.L., Adams, A.G., & de Mendez, I. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91, 10650-10654.
- 5) Sumimoto, H., Kage, Y., Nunoi, H., Sasaki, H., Nose, T., Fukumaki, Y., Ohno, M., Minakami, S., & Takeshige, K. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91, 5345-5349.
- 6) Heyworth, P.G., Bohl, B.P., Bokoch, G.M., & Curnutte, J.T. (1994) *J. Biol. Chem.*, 269, 30749-30752.
- 7) Kuribayashi, F., Nunoi, H., Wakamatsu, K., Tsunawaki, S., Sato, K., Ito, T., & Sumimoto, H. (2002) *EMBO J.*, 21, 6312-6320.
- 8) Suh, C.I., Stull, N.D., Li, X.J., Tian, W., & Price, M.O., Grinstein, S., Yaffe, M.B., Atkinson, S., & Dinauer, M.C. (2006) *J. Exp. Med.*, 203, 1915-1925.
- 9) Ellson, C.D., Davidson, K., Ferguson, G.J., O'Connor, R., Stephens, L.R., & Hawkins, P.T. (2006) *J. Exp. Med.*, 203, 1927-1937.
- 10) Karathanassis, D., Stahelin, R.V., Bravo, J., Perisic, O., Pacold, C.M., Cho, W., & Williams, R.L. (2002) *EMBO J.*, 21, 5057-5068.
- 11) Ago, T., Kuribayashi, F., Hiroaki, H., Takeya, R., Ito, T., Kohda, D., & Sumimoto, H. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100, 4474-4479.
- 12) Honbou, K., Minakami, R., Yuzawa, S., Takeya, R., Suzuki, N., Kamakura, S., Sumimoto, H., & Inagaki, F. (2007) *EMBO*

- J.*, 21, 1176–1186.
- 13) Svergun, D.I. (1999) *Biophys. J.*, 76, 2879–2886.
- 14) Lo Conte, L., Chothia, C., & Janin, J. (1999) *J. Mol. Biol.*, 285, 2177–2198.
- 15) Bravo, J., Karathanassis, D., Pacold, C.M., Pacold, M.E., Ellison, C.D., Anderson, K.E., Butler, P.J., Lavenir, I., Perisic, O., Hawkins, P.T., Stephens, L., & Williams, R.L. (2001) *Mol. Cell*, 8, 829–839.

本坊 和也

(北海道大学大学院薬学研究院構造生物学研究室)

Crystal structure of p40^{phox} and regulation mechanism of superoxide generation

Kazuya Honbou (Laboratory of Structural Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Frontier Research Center for Post-genome Science and Technology, Kita-21 Nishi11 Kita-ku, Sapporo 001-0021, Japan)

アンチセンス RNA ふたたび！

1. はじめに

哺乳類のゲノムにおけるタンパク質をコードする領域はほんのわずかであり、コードしない領域は98~99% (ヒト) にのぼる¹⁾。ところが転写産物について見てみると、タンパク質をコードするメッセンジャー RNA (mRNA) 以外に、タンパク質をコードしない転写産物がたくさん存在する。この non-coding RNA (ノンコーディング RNA, 非コード RNA; 以後 ncRNA と略す) はタンパク質をコード

しない、あるいはコードしたとしても短いタンパク質しかコードできない、多種多様な RNA 転写物の総称である。広義ではリボソーム RNA (rRNA) と転移 RNA (tRNA) を含むが、狭義では rRNA と tRNA を除く RNA 種を指すことが多い (表 1)。最近の網羅的な cDNA 解析により、予想外に多くの ncRNA がヒトにもマウスにも存在していることが見いだされた^{1~3)}。しかし機能が同定されているものはわずかであり、残りは transcript of unknown function (TUF)^{1,4)} とよばれるものである。このうちアンチセンス転写物は、タンパク質をコードするセンス鎖 (mRNA 側) の相補鎖、すなわちアンチセンス鎖と同じ配列を持っている。転写因子 HIF-1 α のアンチセンス転写物のように、今までにも偶然に見つかってはいたが、さほど注目されなかった。ところが網羅的な cDNA 解析により、かなり多くのアンチセンス転写物が転写されていることがわかってきた^{1,5)}。アンチセンス転写物を含めた ncRNA はガラクタ (junk) ではなく、生理的意義を持った「機能性 RNA」ではないかと予想されている。本稿ではアンチセンス転写物の機能に焦点を当て、最新の知見について紹介する。

2. アンチセンス転写物はどうのようにしてできるか？

アンチセンス転写物の合成のされ方には、いくつかのタイプがあることがわかった^{1,6)}。翻訳領域を含む mRNA 側の転写領域 (エクソン) と重なるかどうかという観点から転写領域は、1) mRNA の相補鎖側 (overlapping), 2) イントロン内 (intronic), 3) 遺伝子間 (intergenic) の場合に分けられる (図 1)。1) の場合には mRNA とアンチセンス転写物が重なり合う部分があるので、直接 RNA どうしが相互作用しうる (後述の iNOS)。また転写後のスプライシングを受けるか、受けないかによって 2 種類あるの

表 1 哺乳類の ncRNA の分類

RNA 種 (略号)	長さ (nt)*	機能
ribosomal RNA (rRNA)	120~4,700	翻訳
transfer RNA (tRNA)	70~90	翻訳
狭義の ncRNA :		
アンチセンス転写物 antisense transcript (AS transcript)	不定	mRNA の安定化, クロマチン制御など
small nuclear RNA (snRNA)	100~500	mRNA 前駆体のスプライシング
small nucleolar RNA (snoRNA)	60~330	RNA の修飾など
microRNA (miRNA)	20~23	翻訳効率, クロマチン制御など
Piwi-interacting RNA (piRNA)	25~31	Piwi タンパク質と相互作用
その他の機能がわかっている RNA (テロメラーゼ RNA, SRA など)	不定	テロメア合成 (テロメラーゼ RNA), 転写活性化 (SRA) など
機能不明の ncRNA = transcript of unknown function (TUF)	不定	不明

*nt = nucleotides.