

# 両親媒性アニオンによる 低分子量G蛋白質Racの活性化と活性酸素生成<sup>1)</sup>

技術センター 医学部等部門  
総合薬学科技術班 濁川 清美

NIGORIKAWA Kiyomi : Division of Molecular Medical Science,  
Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University

## 1. 序文

好中球、マクロファージなどの食細胞の細胞膜上には活性酸素生成を触媒する酵素:NADPHオキシダーゼが存在する。この酵素により生成された活性酸素は、細菌を攻撃するために使われる一方で生体組織を損傷し炎症を悪化させることもある。このような、活性酸素による負の影響を抑える治療薬を開発するため、NADPHオキシダーゼ制御機構の解明が急務となっている。

NADPHオキシダーゼは、活性本体のチトクロームb<sub>558</sub> (gp91phoxとp22phoxの二量体) と3つの制御因子 (p47phox, p67phox, 低分子量G蛋白質Rac) より構成される (Fig. 1)。休止状態の細胞では、各制御因子は細胞質に局在するが、受容体刺激を受けると、細胞膜上のチトクロームb<sub>558</sub>と会合し、活性複合体が形成される。

制御因子のうちp67phoxは、gp91phoxに直接作用して酵素活性を制御する重要な因子であるが、単独ではgp91phoxとの親和性は弱い。p67phoxがgp91phoxと安定に相互作用するためには、p47phoxとRacが共にアダプター分子として働く必要があると考えられている。p47phoxとRac

は共に、p67phox及びチトクロームb<sub>558</sub>との結合部位を有する。この結合部位は、細胞が活性化された時のみ、分子構造が変化した結果、機能すると考えられている。

p47phoxとRacの分子構造変化を起こすシグナル分子として、アラキドン酸 (AA) などのアニオン性脂質が考えられている。これは、アニオン性脂質や、これと似た性質をもつ (両親媒性アニオンである) SDSが、無細胞系でNADPHオキシダーゼの活性複合体形成を促進するためである。しかしながら、この無細胞系での作用は、生理的には考えにくい高濃度を必要とする。このため、アニオン性脂質が細胞レベルで機能することは疑問視されていた。しかし、最近の研究により、p47phoxに関しては、低濃度のアニ

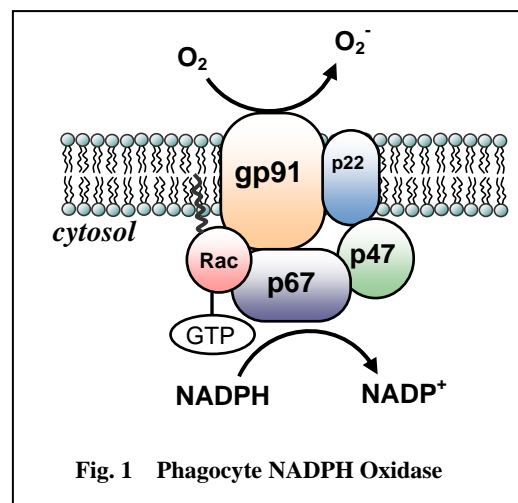


Fig. 1 Phagocyte NADPH Oxidase

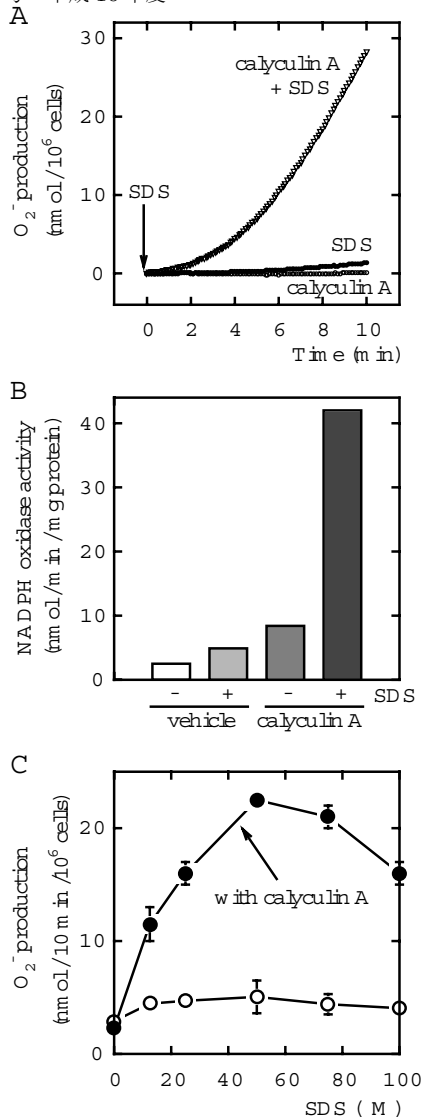
オン性脂質とPKCによるリン酸化が相乗的に作用し、分子構造変化を引き起こすことが提案されている<sup>2)</sup>。一方、Racの分子構造変化、すなわちGDP結合型（不活性型）からGTP結合型（活性型）への変換に、アニオン性脂質が関与しているのかについて、細胞レベルでの検討はされていない。両親媒性アニオンが、Racの細胞質での会合分子、Rho-GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor)からの解離を促進することが、無細胞系で確認されているが、やはり高濃度を要求する<sup>3)</sup>。

本研究では、アニオン性脂質が「細胞レベルのNADPHオキシダーゼ活性化」に関与するのかわかりやすくするため、無細胞系では効果のない低濃度両親媒性アニオンの、細胞での効果を検討した。

## 2. 結果・考察

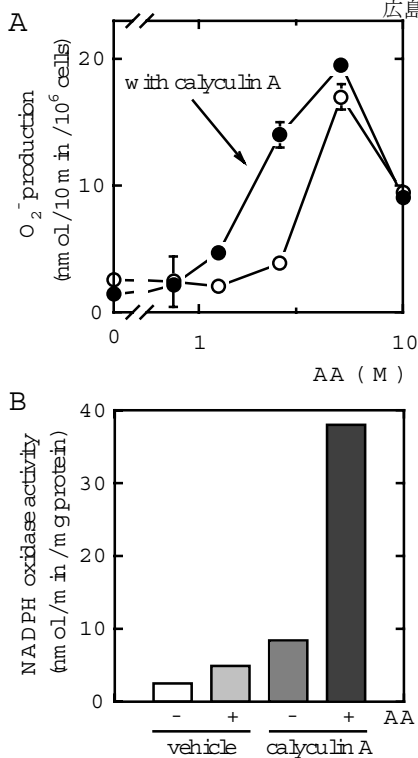
モルモット好中球に、低濃度のAA又はSDSを作用させても、殆ど応答は観察されなかった (Fig. 2, 3)。しかし、細胞を予め、Ser/Thrプロテインホスファターゼ阻害薬のカリクリンAで処理することによって、p47phoxをリン酸化しておくこと、両親媒性アニオンは強力に活性酸素生成を増大させた (Fig. 2, 3)。これより、低濃度両親媒性アニオンが、p47phoxとRacの活性化(分子構造変化)に関与していると推測した。

そこでまず、p47phoxのリン酸化レベルと膜への移行量を調べた。その結果、カリクリンA処理によってp47phoxは強力にリン酸化され、膜面へ移行したが、SDSはこれに余り影響し



**Fig. 2 Effect of SDS on the NADPH oxidase activity of calyculin A-treated neutrophils.** Neutrophils were incubated with 0.1  $\mu$ M calyculin A or DMSO at 37°C for 5 min. A, Production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> was monitored with or without the addition of 50  $\mu$ M SDS. B, The cells were further incubated with or without 50  $\mu$ M SDS for 10 min. The cells were then disrupted and the membrane preparations therefrom were analyzed for NADPH oxidase activity. C, The cells were further incubated for 10 min with or without the addition of various concentrations of SDS. Production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> during the incubation was measured.

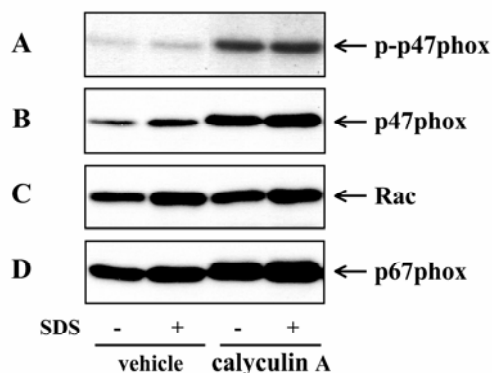
なかった (Fig. 4)。この結果から、p47phoxの分子構造変化は、リン酸化によって十分に達成されると考えられた。



**Fig. 3 Effect of AA on the NADPH oxidase activity of calyculin A-treated neutrophils.**

Neutrophils were incubated with 0.1  $\mu$ M calyculin A or DMSO at 37°C for 5 min. A, The cells were further incubated for 10 min with or without the addition of various concentrations of AA. Production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> during the incubation was measured. B, The cells were further incubated with or without 2.5  $\mu$ M AA for 10 min. The cells were then disrupted and the membrane preparations therefrom were analyzed for NADPH oxidase activity.

次に Rac の膜への移行量と活性化を検討した。その結果、カリクリン A 処理の有無に関わらず、SDS は膜への移行と活性化を促進していた (Fig. 4, 5)。このことから、両親媒性アニオンは細胞レベルで、Rac の制御を介して NADPH オキシダーゼの活性化に関わっていると考えられた。さらに以上の結果は、p47phox と Rac の活性化

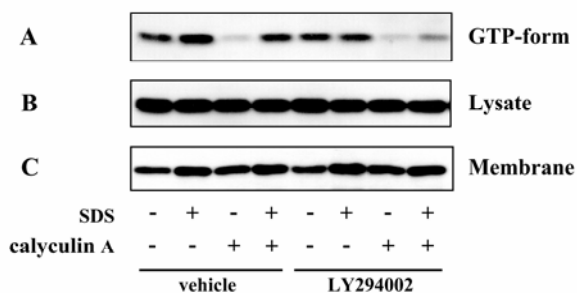


**Fig. 4 Effects of SDS and calyculin A on the translocation of each component of NADPH oxidase.**

A, <sup>32</sup>P-labeled neutrophils were treated with 0.1  $\mu$ M calyculin A or DMSO at 37°C for 5 min, and then for 10 min with or without the addition of 50  $\mu$ M SDS. The lysate of the cells was mixed with the anti-mouse p47<sup>phox</sup> antibody. The proteins in the immune complex were separated by SDS-PAGE and analyzed for the radioactivity. B, C, D, Neutrophils were incubated with 0.1  $\mu$ M calyculin A or DMSO at 37°C for 5 min, and then for 10 min with or without the addition of 50  $\mu$ M SDS. The cells were disrupted to prepare the membrane fraction. The peptides in the fraction were subjected to SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and analyzed with antibodies against p47<sup>phox</sup> (B), Rac (C), or p67<sup>phox</sup> (D).

が別々に制御されることを示唆している。

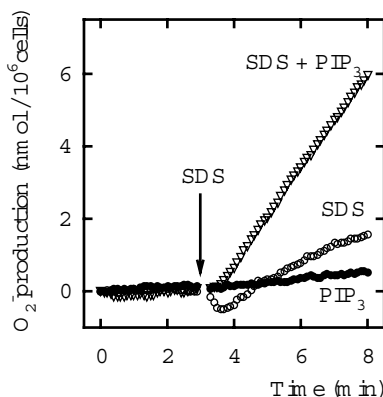
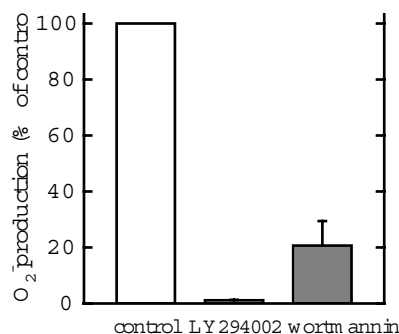
ヒト好中球の Rac 活性化に、PI-3 キナーゼが関与すると報告されている。そこで、SDS による Rac の膜移行と活性化に、PI-3 キナーゼ阻害薬 (LY294002 及びワートマニン) が影響するか検討した。結果、PI-3 キナーゼ阻害薬は、SDS による Rac の膜移行には何ら影響しなかったが、活性化を阻害した (Fig. 5)。この結果は、細胞レベルでの Rac の活性化が (1) PI-3 キナーゼ非依存的な膜移行と (2) PI-3 キナーゼ依存的な活性化の 2 段階で制御されていることを示している。



**Fig. 5 Inhibitory effect of LY294002 on the SDS-induced activation of Rac.**

Neutrophils were treated in the presence or absence of 0.1  $\mu\text{M}$  calyculin A with or without 100  $\mu\text{M}$  LY294002 at 37°C for 5 min. The cells were further incubated for 10 min with or without the addition of 50  $\mu\text{M}$  SDS. A, The cell lysate was incubated with PAK2-RBD-bound beads for 10 min. Proteins bound to the beads were solubilized, subjected to SDS-PAGE, transferred to PVDF membrane, and analyzed with the antibody against Rac. B, The cell lysate of was subjected to Western blotting analysis with anti-Rac. C, The membrane fraction from the cells was subjected to the Western blotting analysis with anti-Rac.

さらに、PI-3 キナーゼ阻害薬は、カリクリン A と SDS を処理した細胞での活性酸素生成を抑制した。この結果より、PI-3 キナーゼ依存的な Rac の活性化は、活性酸素生成に必須であると考えられた。さらに、PI-3 キナーゼの関与を証明するため、PI(3,4,5)P<sub>3</sub> を細胞に導入し、活性酸素生成に与える影響を観察することにした。PI(3,4,5)P<sub>3</sub> を導入する前に、細胞はカリクリン A 処理して p47phox のみを活性化し、同時に PI-3 キナーゼ阻害薬により内在の PI(3,4,5)P<sub>3</sub> レベルを低下させた。この細胞に、SDS または、PI(3,4,5)P<sub>3</sub> のみを処理しても、活性酸素生成は弱かったが、両方を処理すると相乗的に活性酸素生成が増大した (Fig. 6-B)。この結果より、細胞レベルで活性酸素生成を導く Rac の活性化は、

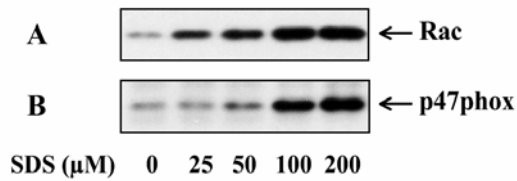


**Fig. 6 Effect of PtdIns 3,4,5-P<sub>3</sub> on the superoxide production of wortmannin-treated neutrophils.**

A, Neutrophils were incubated with 0.1  $\mu\text{M}$  calyculin A in the presence of 100  $\mu\text{M}$  LY294002, 1  $\mu\text{M}$  wortmannin or DMSO (control) at 37°C for 5 min. After the addition of 50  $\mu\text{M}$  SDS, production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> during a 10-min incubation was measured. B, Neutrophils were incubated with 0.1  $\mu\text{M}$  calyculin A and 0.5  $\mu\text{M}$  wortmannin at 37°C for 7 min. At time 0 in the figure, 5  $\mu\text{M}$  PtdIns (3,4,5) P<sub>3</sub> or empty carrier (10  $\mu\text{M}$  histone) was added. The cells were then incubated for 3 min before the addition of 50  $\mu\text{M}$  SDS or H<sub>2</sub>O (control).

両親媒性アニオンと PI(3,4,5)P<sub>3</sub> の二つのシグナル分子の制御を受けると推測された (Fig. 8)。

最後に、細胞レベルで観察された Rac の膜移行が、両親媒性アニオンの直接的な作用の結果であるのか、無細胞系で確認した。その結果、無細胞系でも SDS は Rac を膜面分へと移行させた (Fig. 7-A)。SDS は p47phox も移行させたが、



**Fig. 7 Effect of SDS on the in vitro translocation of Rac and p47<sup>phox</sup> to the plasma membrane.**

A, B, The membrane and the cytosol fractions from neutrophils were mixed and incubated at 25°C for 3 min with various concentrations of SDS. The membrane fraction was collected and analyzed by anti-Rac (A) or anti-p47<sup>phox</sup> (B).

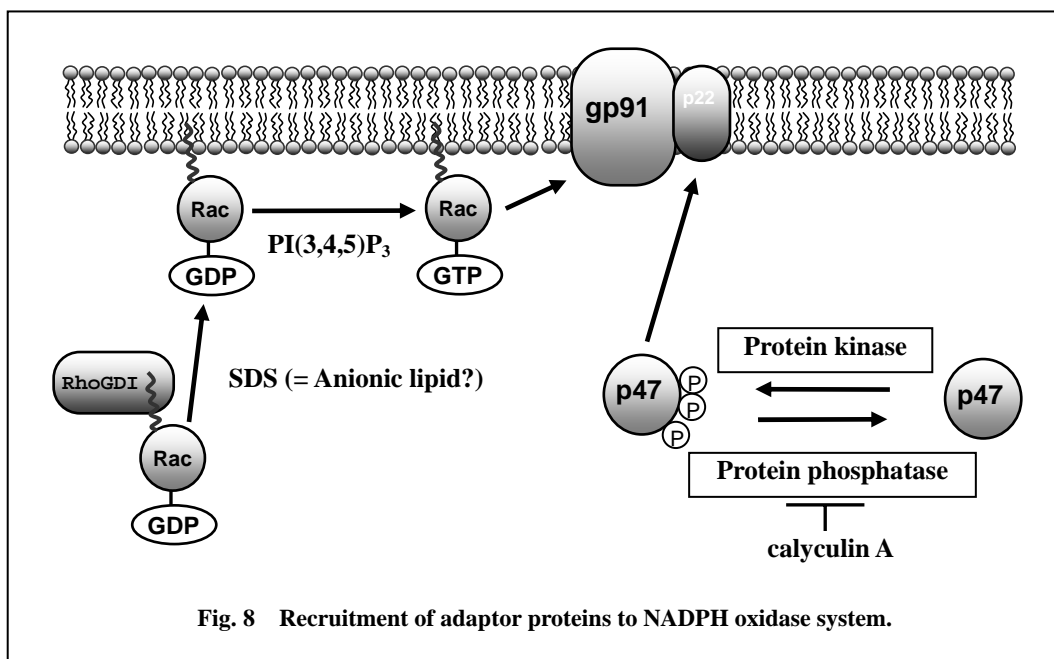
これは Rac の移行と比較すると、高濃度を要求した (Fig. 7). 従って、細胞レベルでも、無細胞系でも、両親媒性アニオンは直接作用により、Rac をより選択的に膜移行させることが明らかとなった。

以上の検討により、両親媒性アニオンである SDS は、Rac の膜移行を促進することにより、細胞レベルの NADPH オキシダーゼ活性化に関

与することが示された (Fig. 8). この知見は、生理的な両親媒性アニオンであるアラキドン酸やホスファチジン酸などが同様の作用を持つ可能性を示唆している。Rac は NADPH オキシダーゼの制御以外にも、細胞の運動や接着などの制御に関与している。これらの制御においても両親媒性アニオンの関与が推測される。

**参考文献**

- 1) Nigorikawa, N., Okamura, N., and Hazeki, O. (2004) The Effect of Anionic Amphiphiles on the Recruitment of Rac in Neutrophils. *J. Biochem.* **136**, 463-470
- 2) Shiose, A., and Sumimoto, H. (2000) Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47phox to activate the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem.* **275**, 13793-13801
- 3) Chuang, T.H., Bohl, B.P., and Bokoch, G.M. (1993) Biologically active lipids are regulators of Rac.GDI complexation. *J Biol Chem*, **268**, 26206-26211



**Fig. 8 Recruitment of adaptor proteins to NADPH oxidase system.**