

審査結果の要旨

氏名 Stampoulis Pavlos

食細胞NADPHオキシダーゼの活性制御におけるp47^{phox} PXドメインの機能に関するNMR解析と題する本論文は、新規NMR測定法である転移交差飽和法ならびに常磁性緩和増大効果を利用して、p47^{phox} PXドメインのリガンド認識メカニズムを明らかにした研究成果について記したものである。全体は主に3つの内容から成っており、第1は、転移交差飽和法を用いたp47^{phox} PXドメインにおける、ホスファチジルイノシトール3、4リン酸(PI (3,4) P₂)を含むリポソームとの結合面の同定、第2は、マンガンイオンによる常磁性緩和増大効果を利用したPI (3,4) P₂極性頭部認識部位の決定、第3は、NADPHオキシダーゼのリガンドであるNADPHが、p47^{phox} PXドメインに結合することをNMRに基づいて明らかにした、以上から構成されている。

第1章のイントロダクション、第2章の実験項につづき、第3章では、p47^{phox} PXドメインの発現・精製とNMRシグナルの帰属について述べ、主鎖アミドシグナルを三重共鳴法とアミノ酸選択的ラベル法により完全に帰属している。第4章では、p47^{phox} PXドメインが可溶性PI (3,4) P₂と特異的に結合することを示し、解離定数を求めている。

第5章前半では、p47^{phox} PXドメインのリガンド含有リポソーム結合部位を決定するために転移交差飽和法を適用している。転移交差飽和法は、複合体形成時に受けた飽和を遊離状態にて観測するため、原理的には複合体の分子量に制限を受けることなく結合界面を決定できる。本研究で行われたp47^{phox} PXドメインとPI (3,4) P₂含有リポソーム複合体に対する転移交差飽和実験の結果は、この手法がリポソームのような巨大かつ大きさの不均一な生体物質に対して適用可能であることを実証するものである。

第5章後半においては、マンガンイオンによる常磁性緩和増大効果を利用して、p47^{phox} PXドメインのPI (3,4) P₂極性頭部認識部位を決定している。イノシトール環の隣接する水酸基がリン酸化されると2価金属を配位することに着目し、PI (3,4) P₂がマンガンイオンと結合することをNMRに基づいて明らかにした。次に、p47^{phox} PXドメインがPI (3,4) P₂ マンガンイオン複合体に結合することを示し、マンガンイオンの常磁性緩和増大効果により、近傍のNMRシグナルが広幅化することを利用して、47^{phox} PXドメイン上のPI (3,4) P₂結合部位を同定した。

2つの異なる NMR 手法によって示された結合部位は良く重なっており、結果が妥当であることを裏付けている。また、リガンド含有リポソーム結合面とリガンド極性頭部認識部位を比較することにより、脂質二重膜認識残基を示している。このような手法の組み合わせは、脂質認識タンパク質の構造生物学的研究に広く適用可能と考えられる。また、従来用いられているミセル滴定実験による脂質二重膜同定法と比較し、後者がミセル濃度によって結果が大きく変化し、本論文で提示した結果と一致しないことを示している。

p47^{phox} PXドメインについて、点変異法と表面プラズモン共鳴法により、PI (3,4) P₂結合部位が以前の報告にて提案されており、他のPXドメインのリガンド認識部位と同一と考えられていたが、本研究で示された結合部位は全く異なる部位であった。PXドメインは、共通したフォールドを持ち、共通の骨格をもつ

リガンドを認識するにもかかわらず、リガンド認識部位は全く異なる場合があることを本研究は明らかにしている。

第6章においては、活性酸素の発生装置であるNADPHオキシダーゼのリガンドであるNADPHが、p47^{phox} PXドメインに結合することをNMRに基づいて示している。まず、NADPHが、本論文で明らかにしたPI (3,4) P₂結合部位に結合することを示し、次に認識部位がアデノシン部位であることを示した。また、PI (3,4) P₂とNADPHの結合が競合的であり、生体内のNADPH濃度において、p47^{phox} PXドメインの結合がPI (3,4) P₂からNADPHへと十分に置換されうることを示している。従来、NADPHオキシダーゼのリガンド結合部位は、膜結合サブユニットであるgp91^{phox}と考えられていたが、その結合は弱く、本研究の成果は、従来の説に新たな展開を開く可能性がある。

食細胞NADPHオキシダーゼは、生体防御において重要な役割を果たす一方で、自己免疫疾患など様々な炎症増悪に関与すると考えられており、その制御が可能になれば、抗炎症薬の開発につながる事が期待される。p47^{phox} PXドメインのリガンド認識機構を解明し、さらにNADPH結合についても明らかにした成果は、このような創薬への足がかりとしても重要である。また、本研究で示された構造生物学的手法は、様々な膜結合タンパク質に適用可能である。

以上、本研究の成果は、p47^{phox} PXドメインのリガンド認識機構の解明とその制御ならびに、膜近傍における分子間相互作用の解析に大きく貢献するものであり、これを行った学位申請者は博士(薬学)の学位を得るにふさわしいと判断した。