

自己阻害型 p47^{phox} の活性化機構に関する分子シミュレーション

渡部 洋子^a, 坪井 秀行^a, 古山 通久^a, 久保 百司^{a,b}, Carlos A. Del Carpio^a,
一石 英一郎^c, 河野 雅弘^c, 宮本 明^{a,c*}

^a 東北大学大学院工学研究科 応用化学専攻, 〒 980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-11-1302

^b 科学技術振興機構さきがけ, 〒 332-0012 埼玉県川口市本町 4-1-8

^c 東北大学未来科学技術共同研究センター, 〒 980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-10

*e-mail: miyamoto@aki.che.tohoku.ac.jp

(Received: July 21, 2005; Accepted for publication: October 24, 2005; Published on Web: April 5, 2006)

食細胞 NADPH オキシダーゼ複合体が生成する活性酸素は強い殺菌作用・毒性があり、貪食作用と呼ばれる生体防御機構にとって非常に重要である。特に細胞質サブユニットの一つである p47^{phox} のリン酸化によるコンホメーション変化は、NADPH オキシダーゼ活性化すなわち活性酸素の生成力において大きな役割を果たしている。これまで不活性状態および活性状態という2つの p47^{phox} の立体構造が決定されたが、この2つの構造をつなぐコンホメーション変化は解明されていなかった。そこで本研究では分子動力学法を用い、活性化において重要な役割を果たす Ser 303、304、及び 328 のリン酸化が p47^{phox} の活性化に及ぼす影響について解析した。その結果、3つのリン酸化サイトにおける高次構造の変化が立体的に離れて位置する領域の構造変化に寄与していることが明らかとなった。更に p47^{phox} の活性化におけるリガンド交換は、リン酸化によって溶媒に露出した p47^{phox} の N 末端側 SH3 ドメインと別の細胞質サブユニットである p22^{phox} が相互作用することで誘起されるとの示唆が得られた。

キーワード：分子動力学法, NADPH オキシダーゼ, SH3 ドメイン, リン酸化

1 緒言

NADPH オキシダーゼは白血球細胞の顆粒球のうち特に好中球中に存在し、細菌やウイルスに対する生体防御において重要な役割を果たす酵素である。これは次式に示す溶存酸素と還元基質である NADPH から活性酸素を生成する反応の触媒として機能する [1, 2]。



細菌や異物が侵入すると好中球はそれらを食胞内に取り込み、NADPH オキシダーゼによって生成された活性酸素産生系によって殺菌を行う。しかし同時に過剰に生成した活性酸素は正常な細胞を破壊する可能性も有しており、慢性炎症など種々の病態に深く関与していることが報告されている [3]。従って NADPH オキシダーゼの活性/不活性状態を厳密に制御することは、

生体の恒常性維持にとって必須である。

休止状態の好中球において、NADPH オキシダーゼサブユニットは細胞膜と細胞質に分かれて存在している。NADPH オキシダーゼの触媒中心は膜内在性の鉄タンパク質であるシトクロム b₅₅₈ である。シトクロム b₅₅₈ は、細胞膜サブユニット gp91^{phox} 及び p22^{phox} から構成される [4]。このシトクロム b₅₅₈ は細胞質サブユニット p47^{phox}、p67^{phox}、及び低分子 GTPase Rac と複合体を形成しなければ活性化することができない。これらの細胞質サブユニットは好中球が貪食作用を惹起する過程で細胞膜へ移行する [5]。

膜移行において重要な役割を果たすのが p47^{phox} であり、このサブユニットは Figure 1 に示すように Phox homology (PX) ドメイン、N 末端側及び C 末端側の Src homology ドメイン (N-SH3 及び C-SH3)、polybasic 領域、及び proline-rich (P) 領域から構成されている。

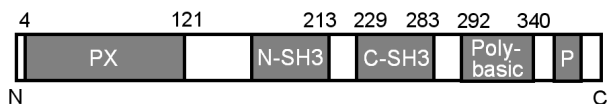


Figure 1. Domain organization of NADPH oxidase subunits p47^{phox}.

NADPH オキシダーゼ活性化のスイッチの役割を持つ p47^{phox} には、SH3 ドメインの結合表面を polybasic 領域との分子内相互作用によって覆うことで、細胞膜サブユニットとの結合を阻害するという負の制御が存在している [1, 6-8]。好中球が異物と認識している物質の体内進入、すなわち貪食シグナルを受けると、細胞認識に従い p47^{phox} はリン酸化され、この不活性な自己阻害型の構造が変化する。2 つの SH3 ドメインは polybasic 領域の代わりに p22^{phox} の細胞質領域と複合体を形成することで、細胞質サブユニットを細胞膜に会合させシトクロム b₅₅₈ を活性化させる [9]。

一方、これまでに polybasic 領域において 5 つのセリン残基 (Ser 303, Ser 304, Ser 315, Ser 320, Ser 328) が貪食シグナルによってリン酸化されることが解明されている [10, 11]。しかし、これらのリン酸化サイトの中でも Ser 315 及び Ser 320 はシトクロム b₅₅₈ に与える影響は少なく、Ser 303, Ser 304, 及び Ser 328 が特に重要であることが示された [1, 12, 13]。これらのセリン残基はいずれも 1 残基もしくは 2 残基のリン酸化ではシトクロム b₅₅₈ を活性化することはできず、3 つ全てがリン酸化して初めて活性酸素生成が可能になる。このような p47^{phox} のリン酸化メカニズムの解明は炎症性疾患の発症原因を特定するために重要である。しかし、p47^{phox} のセリン残基のリン酸化によってどのような構造変化が起こり、SH3 ドメインのリガンド交換が導かれるかは明らかになっていない。そこで本研究では分子動力学法を用いて、自己阻害型 p47^{phox} のリン酸化におけるダイナミクスを解析し、各リン酸化サイトの役割及びリン酸化プロセスのメカニズムを検討した。

2 方法

本研究では計算手法として生体分子用分子力学・分子動力学プログラム Impact 及び MacroModel (Schrodinger Inc., Portland, OR) [14] を用い、力場として OPLS-AA [15]、溶媒効果の考慮に Surface Generalized Born (SGB) モデル [16, 17] を適用した。

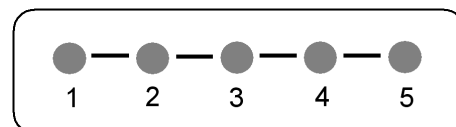


Figure 2. Definition of bond topology.

2.1 OPLS-AA 力場

OPLS-AA は溶液の分子シミュレーションに対して有効な力場として知られている。これは実験値及び量子力学計算の結果を用いて分子内の共有結合 (bond)、結合角 (angle)、及び二面角 (torsion) のパラメータを決定している。OPLS-AA において、これらの相互作用 (V_{intra}) はパラメータ r_{eq} 及び θ_{eq} を用いて次式で与えられる。

$$V_{\text{intra}} = \sum_{\text{bonds}} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{\text{angles}} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + V_{\text{torsion}} \quad (2)$$

ここで K_r 及び K_θ は定数、 r 及び θ は結合長及び結合角を示す。ここで V_{torsion} は次のようにフーリエ級数で展開して計算する。

$$V_{\text{torsion}} = \sum_i \frac{V_1^i}{2} [1 + \cos(\varphi)] + \sum_i \frac{V_2^i}{2} [1 - \cos(2\varphi)] + \sum_i \frac{V_3^i}{2} [1 + \cos(3\varphi)] \quad (3)$$

ここで φ は二面角、 V はフーリエ係数である。非共有結合力 (van der Waals 力及び静電相互作用) は次式で与えられる。

$$V_{\text{inter}} = \sum_{i>j} \left[4\varepsilon_{ij} \left(\frac{\sigma_{ij}^{12}}{R_{ij}^{12}} - \frac{\sigma_{ij}^6}{R_{ij}^6} \right) + \frac{q_i q_j}{R_{ij}} \right] \quad (4)$$

q_i 及び q_j は電荷、 R_{ij} は原子間距離を示す。結合トポロジー (Figure 2) での距離が 1-5 の位置以上に遠い場合は式 (4) を適用し、1-4 の場合はその 1/2 を適用する。ここで ε_{ij} 及び σ_{ij} は各原子の Lennard-Jones ポテンシャルパラメータ (σ 及び ε) の相乗平均を用いて計算する。

$$\varepsilon_{ij} = \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_j} \quad (5)$$

$$\sigma_{ij} = \sqrt{\sigma_i \sigma_j} \quad (6)$$

2.2 Surface Generalized Born モデル

生体内に近い環境でシミュレーションを行うためには、溶媒分子の考慮は不可欠である。溶媒を陰的に扱い平均的な寄与を計算する連続体近似の手法は、効率的な計算を可能とし生体分子系のシミュレーションに非常に有効である [18]。そのため近年 Poisson-Boltzmann 式の近似に基づいた Surface Generalized Born (SGB) モデルが開発された [16, 17]。

Born 式において、誘電率 ϵ_i の媒質から誘電率 ϵ_o の媒質へ球状の溶質を移すときに必要とされる静電エネルギーは、この 2 つの系のエネルギー差として求めることができる [19]。任意の形状を持った溶質分子に対しては、溶媒の静電エネルギーは以下の Generalized Born (GB) 式から求めることができる [20, 21]。

$$\begin{aligned}\Delta G_{\text{GB}} &= -\frac{1}{2} \left(\frac{1}{\epsilon_i} - \frac{1}{\epsilon_o} \right) \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \frac{q_i q_j}{\sqrt{r_{ij}^2 + \alpha_{ij}^2} e^{-D}} \\ &= -\frac{1}{2} \left(\frac{1}{\epsilon_i} - \frac{1}{\epsilon_o} \right) \sum_{i=1}^n \sum_{j=1, j \neq i}^n \frac{q_i q_j}{\sqrt{r_{ij}^2 + \alpha_{ij}^2} e^{-D}} \\ &= -\frac{1}{2} \left(\frac{1}{\epsilon_i} - \frac{1}{\epsilon_o} \right) \sum_{i=1}^n \frac{q_i^2}{\alpha_i} \\ &= \Delta G_{\text{pair}} + \Delta G_{\text{single}} \quad (7)\end{aligned}$$

ここで q 及び α は原子の電荷及び半径であり、 r_{ij} は原子 i 及び j 間の距離である。 ΔG_{pair} 、 ΔG_{single} 、 α_{ij} 及び D は式 (8)、(9)、(10)、(11) でそれぞれ示される。

$$\Delta G_{\text{pair}} = -\frac{1}{2} \left(\frac{1}{\epsilon_i} - \frac{1}{\epsilon_o} \right) \sum_{i=1}^n \sum_{j=1, j \neq i}^n \frac{q_i q_j}{\sqrt{r_{ij}^2 + \alpha_{ij}^2} e^{-D}} \quad (8)$$

$$\Delta G_{\text{single}} = -\frac{1}{2} \left(\frac{1}{\epsilon_i} - \frac{1}{\epsilon_o} \right) \sum_{i=1}^n \frac{q_i^2}{\alpha_i} \quad (9)$$

$$\alpha_{ij} = \sqrt{\alpha_i \alpha_j} \quad (10)$$

$$D = r_{ij}^2 / (2\alpha_{ij})^2 \quad (11)$$

ΔG_{single} は自己エネルギーであり、 ΔG_{pair} は溶質原子間の静電エネルギーを示す。

SGB モデルにおいて、 ΔG_{single} は次式で定義される。

$$\begin{aligned}\Delta G_{\text{single}} &= -\frac{1}{8\pi} \left(\frac{1}{\epsilon_i} - \frac{1}{\epsilon_o} \right) \int_S \frac{q_k^2}{|\mathbf{R} - \mathbf{r}_k|^4} \\ &\quad \times (\mathbf{R} - \mathbf{r}_k) \cdot \mathbf{n}(\mathbf{R}) d^2\mathbf{R} \quad (12)\end{aligned}$$

ここで、 \mathbf{r}_i は原子 i の座標であり、 $\mathbf{n}(\mathbf{R})$ は分子表面 (\mathbf{R}) に垂直なベクトルを示す。 ΔG_{single} が求められると、式 (9) から有効 Born 半径 α_i を計算することができる。このように全ての原子の有効 Born 半径が求められると、式 (7) で表される GB 式から溶媒の静電自

由エネルギーを計算することができる。

2.3 初期構造及び計算条件

自己阻害状態の p47^{phox} の X 線結晶構造は Protein Data Bank (PDB コード : 1NG2 [12]) から得た。この X 線結晶構造に、溶液中での触媒作用を想定するために SGB モデルを適用し、エネルギー最小化を行ったものを野生型の初期構造とした。これまで p47^{phox} を含む多くのタンパク質において、アミノ酸残基のリン酸化による効果はグルタミン酸置換によって検討されてきた [1, 11, 20]。そこで本研究においてもこの構造の polybasic 領域におけるセリン残基をグルタミン酸置換することで、リン酸化セリンを模倣した。リン酸化モデルは Ser 303 及び 304 を置換したものの (S303/304E)、Ser 303、304、及び 328 を全て置換したものの (S303/304/328E)、及び Ser 328 のみを置換したものの (S328E) の 3 種類とした。これらのモデルのうち S303/304/328E のみが NADPH オキシダーゼを活性化させることができ、野生型、S303/304E、及び S328E は酵素としては不活性型である。リン酸化モデルの作成には Swiss-PDB viewer [22] の回転異性体ライブラリを用い、グルタミン酸置換を行った残基の周囲のみ再度エネルギー最小化を行って初期構造とした。

続いてこれら 4 つのモデル (野生型, S303/304E, S303/304/328E, S328E) に関して分子動力学計算を行った。この際、生体内に近い条件にするため polybasic 領域を除く N 末端と C 末端の 1 残基を、また C-SH3 と polybasic 領域をつなぐ linker をリン酸化による構造変化に大きな影響を与えないと考え初期位置に拘束した。拘束した原子は、シミュレーション中一定のバネ定数で初期位置からの動きを制限される。計算条件は原子数、体積、温度一定の NVT アンサンブルとし、310 K において 2 fs の積分時間で 500000 step、トータルで 1 ns のダイナミクス計算を行い、4 ps ごとにトラジェクトリを出力した。また力場は OPLS-AA とし、溶媒効果として SGB モデルを適用した。

2.4 トラジェクトリの評価

本研究において、分子の立体構造の可視化には UCSF Chimera [23] を用いた。またモデルの水素結合及び疎水性相互作用は LIGPLOT [24] を用いて解析し、溶媒露出面積 (ASA) は Lee 及び Richards が提案したアルゴリズム [25] に基づいて算出した。

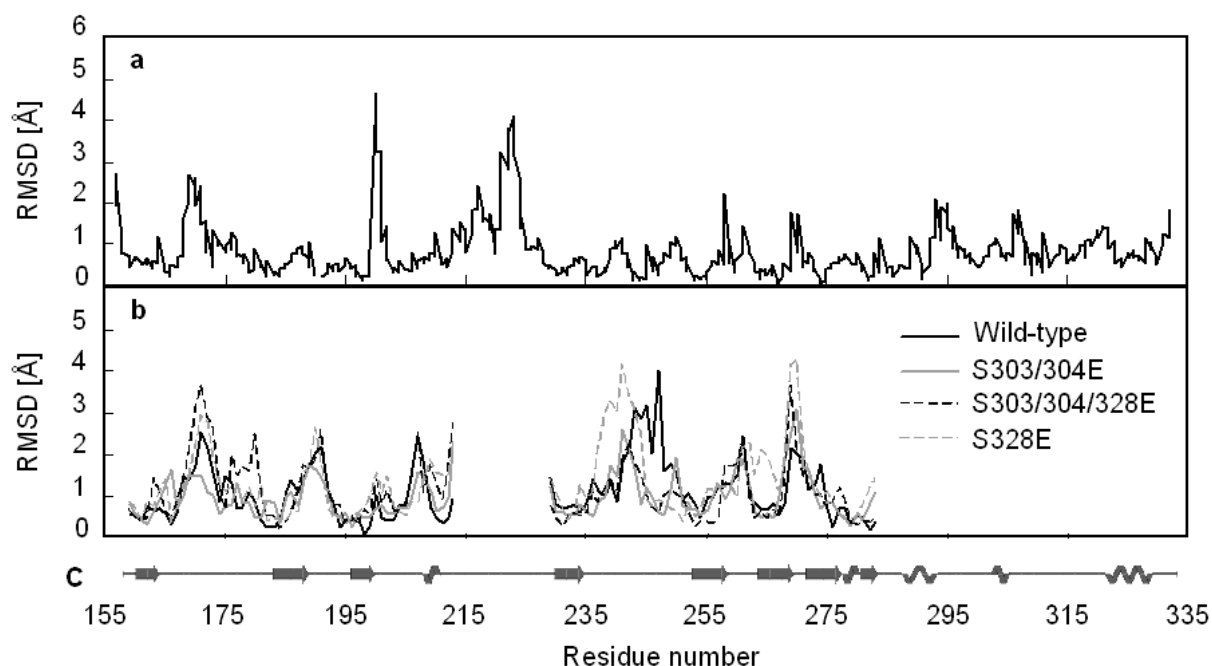


Figure 3. Root mean square deviation (RMSD) of the initial and final structures of auto-inhibited p47^{phox} for the molecular dynamics simulations against residue number. a, RMSD between the energy-minimized initial structure and the X-ray structure; b, RMSD between structures of Wild-type, S303/304E, S303/304/328E, and S328E and the X-ray structure. RMSD of only N- and C-SH3 domains is shown; c, Secondary structure of p47^{phox}.

3 結果と考察

3.1 初期構造及び分子動力学計算の妥当性

Figure 3(a) にエネルギー最小化後の p47^{phox} と X 線結晶構造の座標の根平均二乗変位 (RMSD)、Figure 3(c) にその残基が形成する二次構造を示す。ループ領域において RMSD は大きく変化しているが、波型で示される α ヘリックス及び矢印で示される β ストランド領域においてはエネルギー最小化の過程において X 線結晶構造を良く保っていることが分かる。

またそれに続く分子動力学計算も同様に、溶媒モデルに SGB モデルを用いた。この分子動力学計算の妥当性を確認するため、計算の初期構造と 1 ns 後の最終構造における SH3 ドメインの座標の比較を行った。ここで N-SH3 及び C-SH3 それぞれに関して初期構造と最終構造の重ね合わせを行った後、RMSD を算出した。Figure 3(b) に N-SH3 及び C-SH3 における RMSD を示す。Figure 3(a) と同様、SH3 ドメインにおいて α ヘリックス及び β ストランド領域は初期構造を保っていることが分かる。以上より、SGB モデルを適用した 2.3 のエネルギー最小化の手順、及びそれに続く分

子動力学計算によって得られた構造が妥当であると言える。

3.2 SH3ドメイン-PPIIヘリックス領域間の相互作用

p47^{phox} が形成する自己阻害型構造において、polybasic 領域は 2 つの SH3 ドメインの両方と相互作用を形成している。Yuzawa らは X 線結晶構造に基づいてこの相互作用を解析し、特に polyproline type-II (PPII) ヘリックス構造をとっている ²⁹⁷GAPPR₃₀₁ 配列が中心的役割を担っていることを明らかにした [26]。PPII ヘリックスの主鎖は三角柱に似た立体構造としており、頂点に位置する Pro 299 を中心に三角柱の 2 つの面がそれぞれ N-SH3 及び C-SH3 と相互作用している。まず自己阻害型 p47^{phox} におけるこのような相互作用が、グルタミン酸置換によりどのように変化していくかを解析した。Figure 4 に 1 ns の分子動力学計算における系のトータルエネルギー変化を示す。野生型は 130、320、420、及び 930 ps、S303/304E は 100、810、及び 970 ps、S303/304/328E は 490、610、及び 710 ps、

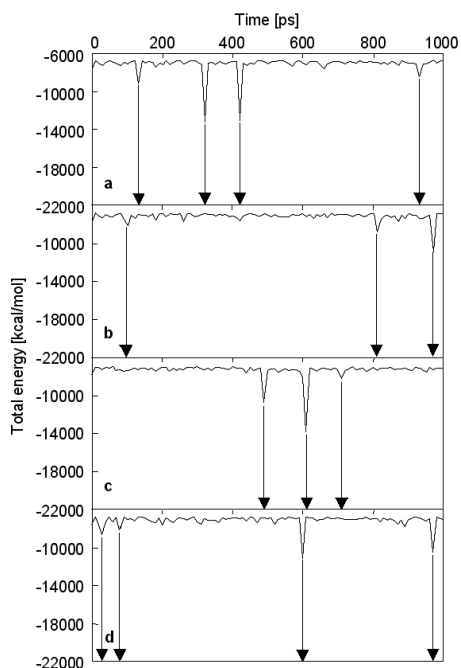


Figure 4. Total energy changes during the molecular dynamics simulations of four investigated models. a, Wild-type; b, S303/304E; c, S303/304/328E; d, S328E .

S328E は 30、80、600、及び 970 ps においてエネルギーが低い値をとっていた。そこでこれらの構造が安定なコンホメーションを形成していると考え、更に詳しく構造を解析した。ここで、シミュレーション中に現れた全ての構造が互いにどのような関係にあるかを確認するため、XCluster [27] によるクラスタ解析を行い各構造の座標に基づいて類似度を求めた。Table 1 に S303/304E 及び S328E に対する分子動力学計算において、互いに類似度が高い構造が現れた時間を示す。S303/304E において低いエネルギー値を示したうちの 1 つである 100 ps、及び S328E において低いエネルギー値を示したうちの 1 つである 30 ps における構造と類似度の高い構造は、シミュレーション中にほとんど現れていなかった。一方野生型の 130、320、420、930 ps、における構造及び S303/304/328E の 490、610、710 ps における構造にはこのような現象は見られなかったため、クラスタ解析の結果は省略する。以上よりこれら 2 つの構造の重要性は低いと考え、この先の考察から除外した。

Table 1. Classification for S303/304E and S328E by Cluster analysis. Structures derived by molecular dynamics simulations are classified according to their degree of similarity. Low energy structures are presented in bold type.

S303/304E		S328E	
Group	Structures that have similarity to each other [ps]	Group	Structures that have similarity to each other [ps]
Group 1	10	Group 1	10
Group 2	20	Group 2	20
Group 3	30	Group 3	30 , 40
Group 4	40	Group 4	60
Group 5	50	Group 5	70, 80 , 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 180, 16, 170, 190, 200, 210
Group 6	60	Group 6	220
Group 7	70	Group 7	230
Group 8	80	Group 8	240
Group 9	90	Group 9	50
Group 10	110, 120	Group 10	250
Group 11	170	Group 11	260
Group 12	130, 140, 150, 160, 180, 190, 200, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690	Group 12	270, 280, 290, 300, 380, 390, 400, 340, 350, 360, 370, 410, 420, 310, 320, 330
Group 13	700	Group 13	430
Group 14	710	Group 14	440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600 , 610, 620, 630, 640, 670, 680, 650, 660, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970 , 980, 990, 1000
Group 15	210	Group 14	840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970 , 980, 990, 1000
Group 16	720, 730, 760, 770, 780, 790, 800, 810 , 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920		
Group 17	930, 940, 950, 960, 970 , 980, 990, 1000		
Group 18	740, 750		
Group 19	100		
Group 20	460		

Figure 5は各モデルにおけるSH3ドメイン-polybasic領域間の相互作用を示す。ここでは、各々のモデルにおいて低いエネルギー値を与えたもののうち、最終の構造についての結果を示す。具体的には野生型は930 ps、S303/304Eは970 ps、S303/304/328Eは710 ps、S328Eは970 psとし、polybasic領域の残基296-304の周囲のみ更にエネルギー最小化を行った後解析した。この図から野生型、S303/304E、及びS303/304/328Eにおいて、polybasic領域はN-SH3及びC-SH3と同様に相互作用を形成しているが、S303/304/328Eにおいては

主にC-SH3と相互作用していることが分かる。またPPIIヘリックス領域であるGAPPR配列に注目すると、野生型においてはGly 297、Pro 299、及びPro 300がN-SH3と、Ala 298、Pro 299、及びArg 301がC-SH3と相互作用しており、Pro 299は2つのSH3ドメイン両方と相互作用していた。これはYuzawaらによって示されたX線結晶構造におけるSH3ドメインのターゲット認識[26]と全く同じであり、野生型においてはこのSH3ドメイン-PPIIヘリックス間相互作用が保たれていることを示す。それに対しシクロロム b₅₅₈を活

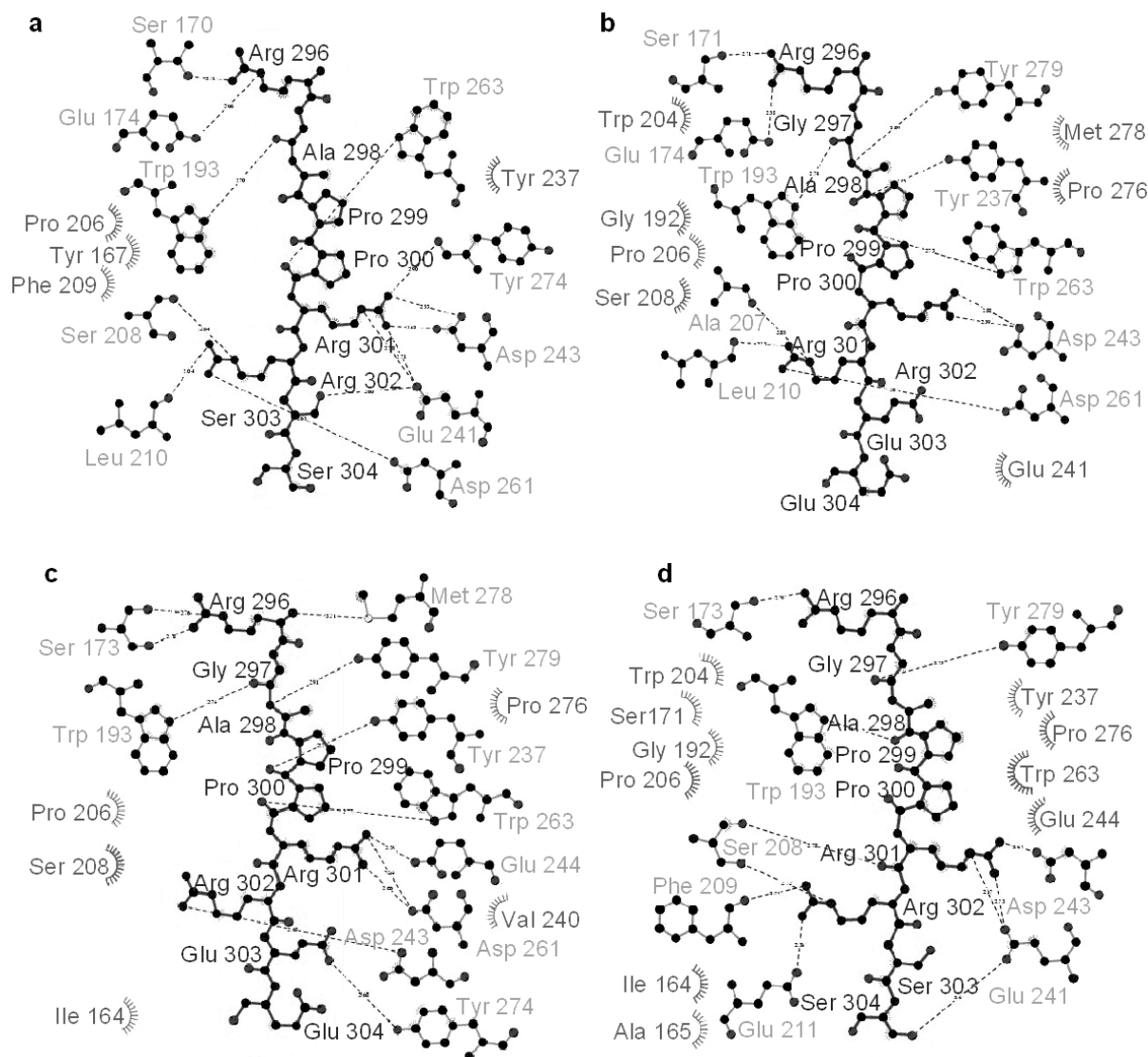


Figure 5. Intra-molecular interaction between the tandem SH3 domains and the polybasic region. a, Wild-type at 930ps; b, S303/304E at 970ps; c, S303/304/328E at 710ps; d, S328E at 970ps. The residues of the polybasic region are shown in the middle of the figures. The residues of N-SH3 and C-SH3 are drawn on the left side and right side of the polybasic region, respectively. Hydrogen bonds and hydrophobic interactions are indicated by black dashed lines and gray semi-circles, respectively.

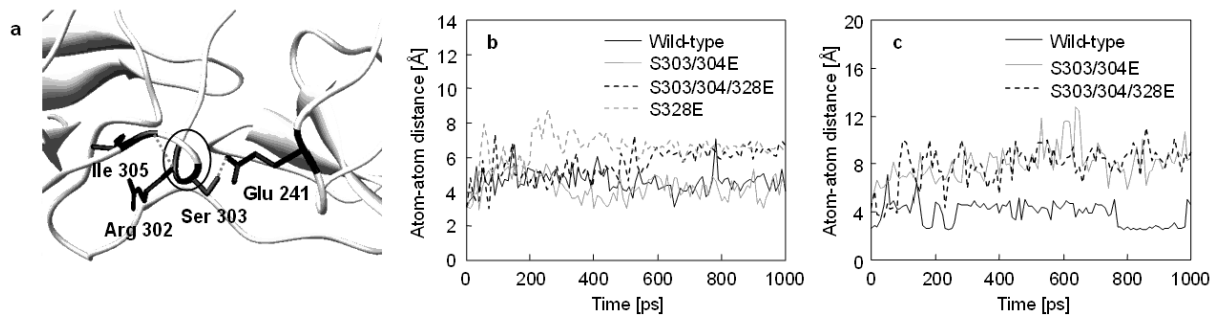


Figure 6. Hydrogen bonds formed by the mutation site, Ser 303 and 304, and the residues around it. a, Hydrogen bonds formed in the initial structure of wild-type. Hydrogen bonds are indicated with gray dashed lines. The residues located in C-SH3 and the polybasic region are shown in black. 3_{10} Helix region is shown in black circle; b, The changes in atom-atom distance between the backbone carbonyl oxygen atom of Arg 302 and the amide nitrogen atom of Ile 305 in four investigated models; c, The changes in atom-atom distance between the sidechain of Ser (Glu in S303/304E and S303/304/328E) 303 and Glu 241.

性化することのできる S303/304/328E は GAPPR 配列の全ての残基が C-SH3 と相互作用しており、Gly 297 及び Pro 300 のみ N-SH3 とも相互作用を形成していた。またグルタミン酸置換はされているもののシクロム b_{558} を活性化することのできない S303/304E 及び S328E は、GAPPR 配列のほぼ全ての残基が 2 つの SH3 ドメイン両方と相互作用を形成していた。以上より、polybasic 領域はリン酸化の度合いに従って次第に C-SH3 との相互作用を形成し、活性酸素を生成可能なモデルにおいては PII ヘリックスを形成する全ての残基が C-SH3 と相互作用していることが明らかになった。

3.3 p47^{phox} の活性化プロセスにおける各リン酸化サイトの寄与

Figure 6(a) は野生型の初期構造において Ser 303、304 及び隣接した残基が形成する水素結合を示す。PII ヘリックス構造と隣接した残基 302-305 は、Arg 302 のカルボニル酸素と Ile 305 のアミド窒素間の水素結合で安定化した 3_{10} ヘリックス構造を形成している。Figure 6(b) にこの水素結合を形成する原子間の距離の経時変化を示す。S303/304/328E においてこの原子間距離が増加していることから、 3_{10} ヘリックスが p47^{phox} の自己阻害型構造の形成に重要であることが示唆される。しかし Ser 303 及び 304 はこの 3_{10} ヘリックスに含まれているにもかかわらず、この 2 つをグルタミン酸置換しただけではヘリックスを形成する水素結合に影響はない。一方 S328E においては、S303/304/328E と同

様に Arg 302 のカルボニル酸素-Ile 305 のアミド窒素の原子間距離が増加している。このことから Ser 328 は立体的に離れて位置しているにもかかわらず、残基 302-305 から成る 3_{10} ヘリックスの安定化に大きく影響することが示された。また Figure 6(a) に示すように、この 3_{10} ヘリックスに含まれる Ser 303 の側鎖は Glu 241 の側鎖と水素結合することで C-SH3 との相互作用を形成している。Figure 6(c) にこの水素結合を形成する原子間の距離の経時変化を示す。Ser 303 をグルタミン酸置換したモデル (S303/304E, S303/304/328E) においてはこの水素結合を形成する原子が存在せず、2 つの残基の側鎖間の距離も増加する。一方 3.2 で述べたように、p47^{phox} はリン酸化に伴って次第に C-SH3 との相互作用を形成していく。従ってリン酸化の過程における p47^{phox} の polybasic 領域は、自己阻害型構造とは異なるサイトで C-SH3 との結合を形成している可能性が示された。

PII ヘリックスに隣接している Ser 303 及び 304 と比較して、Ser 328 は p47^{phox} の SH3 ドメインから形成される結合サイトと直接相互作用することはない。Figure 7(a) は野生型の初期構造において Ser 328 及び隣接した残基が形成する水素結合を示す。Ser 328 は残基 321-328 から形成される α ヘリックスに含まれており、C-SH3 の残基 Arg 267 と水素結合を形成している。Figure 7(b) にこの水素結合を形成する原子間の距離の経時変化を示す。Ser 328 をグルタミン酸置換したモデル (S303/304/328E, S328E) においてはこの水素結合を形成する原子が存在せず、2 つの残基の側鎖間距離も増加する。また Figure 8 に α ヘリックス領域

(Res 321-328)におけるRamachandran Plotを示す。ここでPhi及びPsiはそれぞれポリペプチド鎖におけるN-C α 結合及びC α -C結合の回転角を表している。野生型はシミュレーションを通して α ヘリックス構造を保っているが、他の3つのモデルはいずれも α ヘリックスに対するプロットから外れておりヘリックス構造が壊れていることが読み取れる。よってこの α ヘリックス構造が壊れC-SH3と相互作用できなくなることが、p47^{phox}の自己阻害型構造の変化に影響を与える可能性が考えられる。またS303/304Eにおいてもこの α ヘリックス構造が壊れていたことから、ヘリックスを形成するSer 328だけでなくSer 303及び304もヘリックスの安定化に大きな役割を持っていることが示

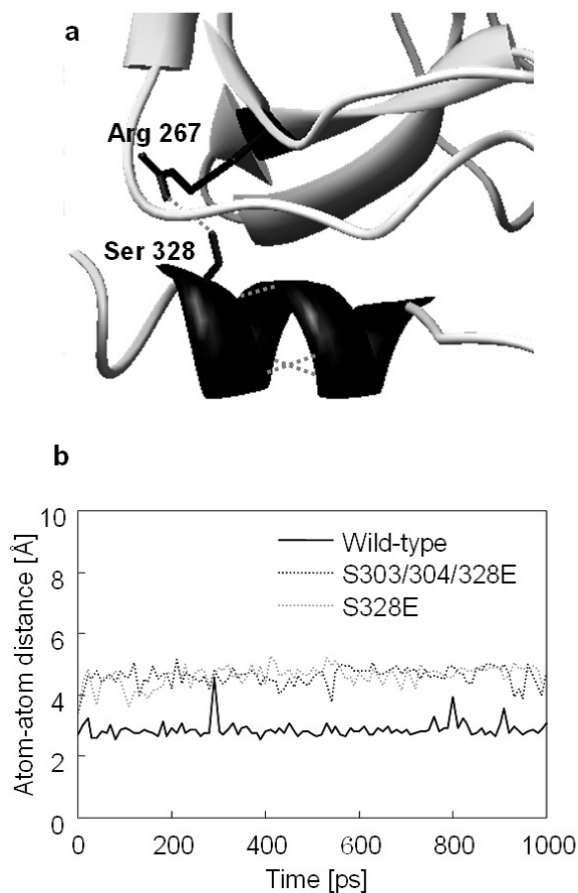


Figure 7. Hydrogen bonds formed by the mutation site, Ser 328, and the residues around it. a, Hydrogen bonds formed in the initial structure of wild-type. Hydrogen bonds are indicated with gray dashed lines. The residues located in C-SH3 and the polybasic region are shown in black; b, The changes in atom-atom distance between the sidechain of Ser (Glu in S303/304E and S303/304/328E) 303 and Glu 241.

された。

以上より、SH3ドメインのターゲットであるPPIIヘリックス領域(Res 297-301)に隣接している 3_{10} ヘリックス(Res 302-305)だけではなく、PPIIヘリックス領域から離れて位置する α ヘリックスもp47^{phox}の自己阻害型構造の安定化に寄与していると考えられる。またSer 303及び304とSer 328は立体的に離れているが、そのリン酸化は互いに他方が形成する二次構造も変化させている。一方S303/304/328Eにおいては 3_{10} ヘリックス構造が変化し、更に自己阻害型構造におけるC-SH3との相互作用が壊れているが、これらの変化は3つの残基を全てリン酸化しなければ同時には起こらないことが示された。

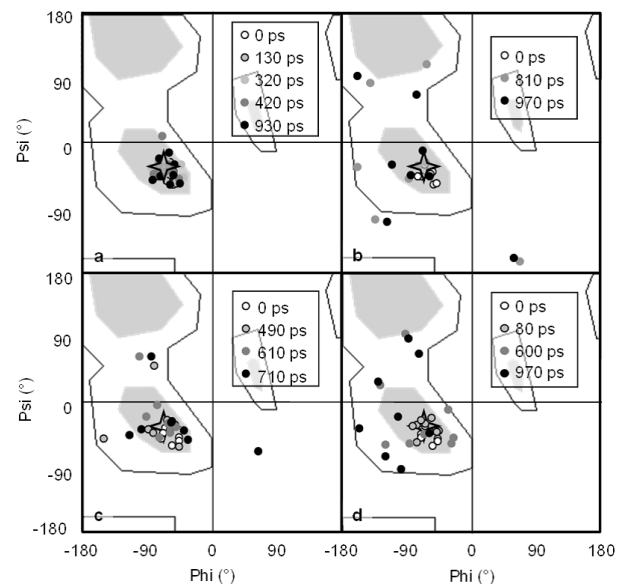


Figure 8. Ramachandran plots for the PPII helix region of the polybasic region (residues 297-301) during the molecular dynamics simulations. a, Wild-type; b, S303/304E; c, S303/304/328E; d, S328E. The dark gray solid lines and light gray regions indicate the range of allowed and core regions [28], respectively. The star region indicates the plot of typical α helix.

3.4 SH3ドメインのリガンド交換メカニズム

Figure 9は各モデルにおいて、N-SH3 (Res 159-213) 及び C-SH3 (Res 229-283) の原子それぞれについて算出したASAの経時変化を示す。野生型、S303/304E、及びS328EにおいてはN-SH3、C-SH3共にASAはほぼ一定に保たれていた。それに対しS303/304/328EはN-SH3のASAが増加傾向にあり、逆にC-SH3のASAは減少していた。これは3つのセリン残基のリン酸化により、N-SH3が溶媒に露出することを示している。また3.2で述べたようにS303/304/328EはC-SH3と新たに相互作用を形成しているため、C-SH3のASAが減少していると考えられる。

以上の結果よりp47^{phox}のリン酸化によるSH3ドメインのリガンド交換について、Figure 10に示すメカニ

ズムを提案する。まずNADPHオキシダーゼが不活性な状態では、p47^{phox}はSH3ドメインとpolybasic領域が結合した自己阻害型構造を形成している。飢食シグナルを受けてp47^{phox}のセリン残基がリン酸化すると、polybasic領域はC-SH3ドメインと新たな相互作用を形成し、N-SH3の結合表面は溶媒に露出する。続いて露出したN-SH3にp22^{phox}の細胞質領域が結合してリガンド交換が起こり、最終的にp47^{phox}とp22^{phox}が安定な複合体を形成しシトクロムb₅₅₈のgp91^{phox}のヘム部位において活性酸素を生成することが可能になる。Groempingらは等温滴定型熱量測定により、C-SH3のみではp22^{phox}細胞質領域間との間に相互作用は存在しないが、N-SH3は単独でもp22^{phox}細胞質領域と弱い相互作用を形成することを報告している[12]。よってFigure 10に提案したリガンド交換メカニズムは、この報告によっても妥当性が支持される。

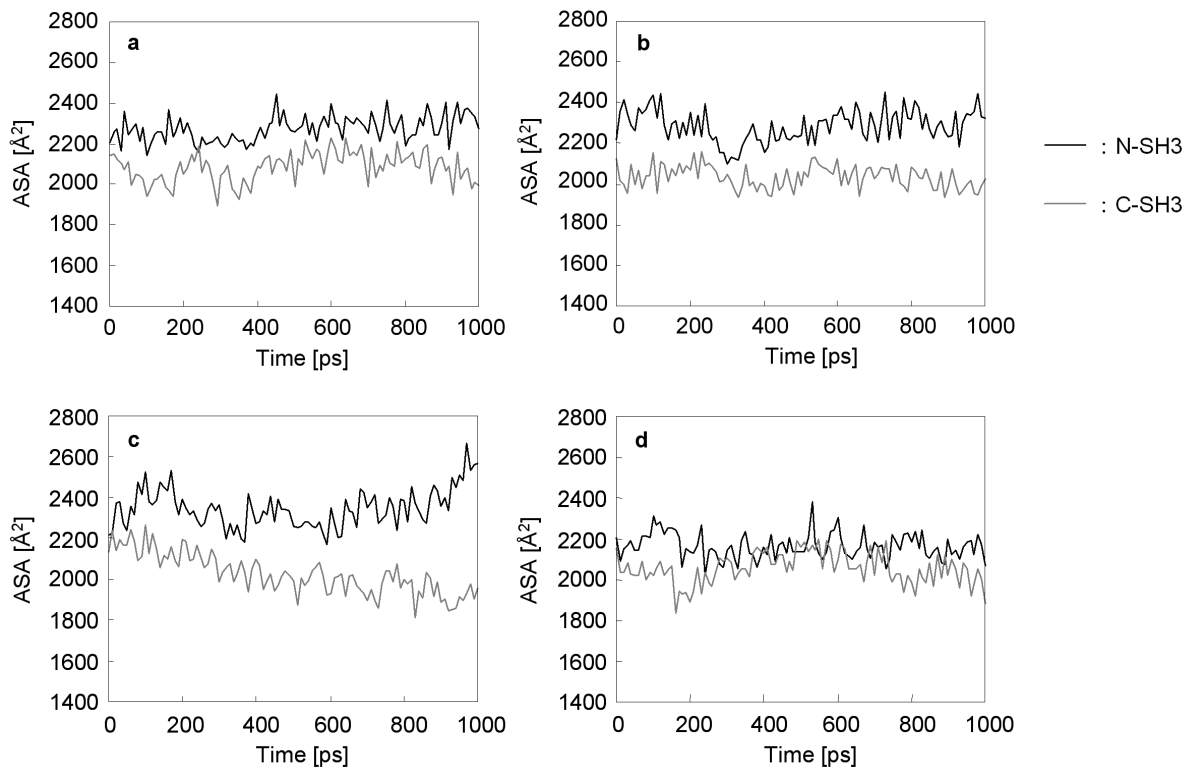


Figure 9. The changes in solvent accessible surface area (ASA) for the SH3 domains. a, Wild-type; b, S303/304E; c, S303/304/328E; d, S328E.

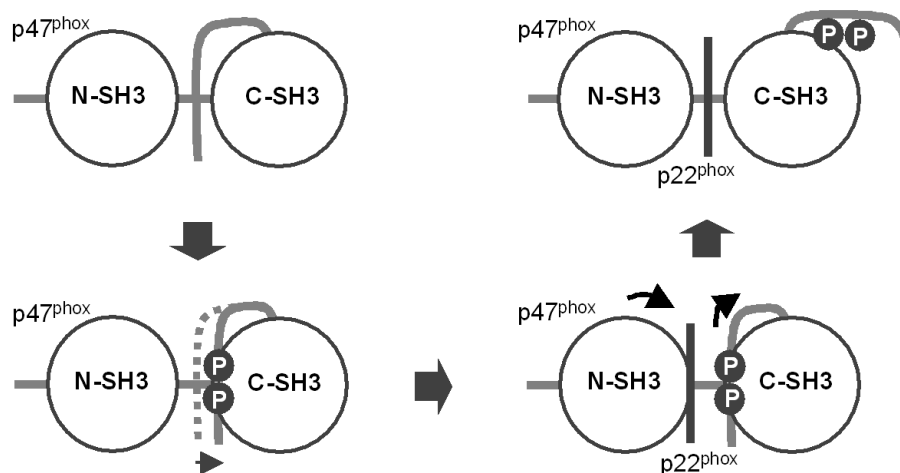


Figure 10. A proposed mechanism for the ligand exchange of SH3 domain.

Table 2. Intra-molecular interaction energy of the initial structure of the wild-type at the beginning of the molecular dynamics simulations.

Ligand	Receptor	Interaction energy [kcal/mol]
SH3 domain-binding region	Tandem SH3	-117.139
	N-SH3	-52.344
	C-SH3	-53.763
PPII helix region	Tandem SH3	-66.831
	N-SH3	-21.153
	C-SH3	-47.317

Table 2 は野生型の初期構造における SH3 ドメイン-polybasic 領域間の相互作用エネルギーを示している。相互作用エネルギーは、リガンドを polybasic 領域の SH3 ドメイン結合領域全体 (Res 296-304) 及び PPII ヘリックス領域のみ (Res 297-301) の 2 種類、レセプタを 2 つの SH3 ドメイン両方 (Tandem SH3, Res 159-283)、N-SH3 のみ (Res 159-213)、及び C-SH3 (Res 229-283) のみの 3 種類として次式から求めた。

$$\Delta E = E_{\text{complex}} - (E_{\text{receptor}} + E_{\text{ligand}}) \quad (13)$$

ここで E_{receptor} 及び E_{ligand} は上述のレセプタとリガンドのトータルエネルギーであり、 E_{complex} はレセプタとリガンドから形成される複合体のトータルエネルギーを示す。Table 2 から、SH3 ドメイン結合領域 - N-SH3 間と SH3 ドメイン結合領域 - C-SH3 間の相互作用エネルギーはほぼ等しいことが分かる。しかし PPII ヘリックス領域のみに注目すると、この領域は主

に C-SH3 と強く相互作用している。従って p47^{phox} の polybasic 領域は 2 つの SH3 ドメインと同様に相互作用しつつも、PPII ヘリックス領域 - N-SH3 間の相互作用は比較的弱いと言える。またこのようにして自己阻害型構造を形成していることは、Figure 10 に示すようなリガンド交換を起しやすくなるのではないかと考えられる。

4 結言

p47^{phox} のリン酸化による自己阻害型構造の変化と各リン酸化サイトの役割、及びリガンド交換のメカニズムに関して分子動力学計算により解析を行った。p47^{phox} の活性化に重要なリン酸化サイトは Ser 303、304、及び 328 であり、PPII ヘリックス領域に隣接する Ser 303 及び 304 は 3_{10} ヘリックスに、Ser 328 は α ヘリックスに含まれている。これらはリン酸化により

ヘリックス構造を保てなくなることから、p47^{phox} の自己阻害型構造の安定化に寄与していることが示された。また自己阻害型 p47^{phox} は polybasic 領域が PPII ヘリックス構造をとっており、2つの SH3ドメイン両方と相乗的に相互作用している。しかし PPII ヘリックス領域は主に C-SH3 と相互作用しており、N-SH3 との相互作用は比較的弱いということが確認された。polybasic 領域におけるセリン残基がリン酸化すると更に C-SH3 との相互作用は強くなり、N-SH3 は溶媒に露出していく。このことから p47^{phox} の SH3ドメインにおけるリガンド交換は、まずリン酸化によって溶媒に露出した N-SH3 と p22^{phox} の細胞質領域が結合することによって起こると予測される。

参考文献

- [1] T. Ago, H. Nunoi, T. Ito, H. Sumimoto, *J. Biol. Chem.*, **274**, 33644 (1999).
- [2] A. J. Thrasher, N. H. Keep, F. Wientjes, A. W. Segal, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1227**, 1 (1994).
- [3] V. Benard, G. M. Bokoch, B. A. Diebold, *Trends Pharmacol. Sci.*, **20**, 365 (1999).
- [4] J. Huang, N. Hitt, M. E. Kleinberg, *Biochemistry*, **34**, 16753 (1995).
- [5] F. R. DeLeo, M. T. Quinn, *J. Leukocyte Biol.*, **60**, 677 (1996).
- [6] J. Huang, M. E. Kleinberg, *J. Biol. Chem.*, **274**, 19731 (1999).
- [7] H. Sumimoto, Y. Kage, H. Nunoi, H. Sasaki, T. Nose, Y. Fukumaki, M. Ohno, S. Minakami, K. Takeshige, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5345 (1994).
- [8] T. L. Leto, A. G. Adams, I. de Mendez, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10650 (1994).
- [9] H. Sumimoto, K. Hata, K. Mizuki, T. Ito, Y. Kage, Y. Sakaki, Y. Fukumaki, M. Nakamura, K. Takeshige, *J. Biol. Chem.*, **271**, 22152 (1996).
- [10] A. Fontayne, P. M. Dang, M. A. Gougerot-Pocidallo, J. El Benna, *Biochemistry*, **41**, 7743 (2002).
- [11] J. El Benna, R. P. Faust, J. L. Johnson, B. M. Babior, *J. Biol. Chem.*, **271**, 6374 (1996).
- [12] Y. Groemping, K. Lapouge, S. J. Smerdon, K. Ritter, *Cell*, **113**, 343 (2003).
- [13] O. Inanami, J. L. Johnson, J. K. McAdara, J. E. Benna, L. R. Faust, P. E. Newburger, B. M. Babior, *J. Biol. Chem.*, **273**, 9539 (1998).
- [14] F. Mohamadi, N. G. J. Richards, W. C. Guida, R. Liskamp, M. Lipton, C. Caufield, G. Chang, T. Hendrickson, W. C. Still, *J. Comput. Chem.*, **11**, 440 (1990).
- [15] W. L. Jorgensen, D. S. Maxwell, J. Tirado-Rives, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 11225 (1996).
- [16] L. Zhang, E. Gallicchio, R. Friesner, R. M. Levy, *J. Comput. Chem.*, **22**, 591 (2001).
- [17] A. Ghosh, C. S. Rapp, R. A. Friesner, *J. Phys. Chem. B*, **102**, 10983 (1998).
- [18] J. Tomasi, M. Persico, *Chem. Rev.*, **94**, 2027 (1994).
- [19] M. Born, *Z. Phys.*, **1**, 45 (1920).
- [20] L. Huang, T. Y. W. Wong, R. C. C. Lin, H. Furthmayr, *J. Biol. Chem.*, **274**, 12803 (1999).
- [21] W. C. Still, A. Tempczyk, R. C. Hawley, T. Hendrickson, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 6127 (1990).
- [22] N. Guex, M. C. Peitsch, *Electrophoresis*, **18**, 2714 (1997).
- [23] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin, *J. Comput. Chem.*, **25**, 1605 (2004).
- [24] A. C. Wallace, R. A. Laskowski, J. M. Thornton, *Protein Eng.*, **8**, 127 (1995).
- [25] B. K. Lee, F. M. Richards, *J. Mol. Biol.*, **55**, 379 (1971).
- [26] S. Yuzawa, N. N. Suzuki, Y. Fujioka, K. Ogura, H. Sumimoto, F. Inagaki, *Genes Cells*, **9**, 443 (2004).
- [27] P. S. Shenkin, D. Q. McDonald, *J. Comput. Chem.*, **15**, 899 (1994).
- [28] A. L. Morris, M. W. MacArthur, E. G. Hutchinson, J. M. Thornton, *Proteins*, **12**, 345 (1992).

Molecular Dynamics Study on the Activation Mechanism of p47^{phox} in the Auto-Inhibited Form

Yoko WATANABE^a, Hideyuki TSUBOI^a, Michihisa KOYAMA^a, Momoji KUBO^{a,b},
Carlos A. DEL CARPIO^a, Eiichiro ICHIISHI^c, Masahiro KOHNO^c
and Akira MIYAMOTO^{a,c*}

^aDepartment of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Tohoku University
6-6-11-1302 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8579, Japan

^bPRESTO, Japan Science and Technology Agency

4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan

^cNew Industry Creation Hatchery Center, Tohoku University

6-6-10 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8579, Japan

*e-mail: miyamoto@aki.che.tohoku.ac.jp

The phagocyte NADPH oxidase complex plays a crucial role in host defense against microbial infection through the production of reactive oxygen species. Key to the activation of NADPH oxidase is cytoplasmic subunit p47^{phox}, which includes tandem SH3 domains and the polybasic region (Figure 1). Recently, the crystal structures of the active and inactive states of p47^{phox} were determined, conformational change that mediates these two structures remains to be elucidated. Our simulations revealed that phosphorylations of Ser303, 304, and 328, which are important for activation of p47^{phox}, contribute to structural changes in the region that is isolated from these serine residues. Additionally, it is concluded that the ligand exchange of p47^{phox} in activation of NADPH oxidase is induced by interaction between the membrane subunit p22^{phox} and N-terminal SH3 domain of p47^{phox} that was exposed to solvent by phosphorylations.

Keywords: Molecular dynamics simulation, NADPH oxidase, SH3 domain, Phosphorylation