

「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

本研究は、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と題して、藤田、若宮、黒木グループは、自然免疫における非自己を認識する機構と、引き続き起こる生体防御機構活性化の機序を解明し、各生体防御システムの役割を明らかにすることを目指している。一方、住本、神田、伊藤グループは、食細胞における殺菌作用に関与するたんぱく質相互作用を解析し、その機能発現、すなわち、殺菌能発現の機構の解明を目指している。

I. 藤田、若宮、黒木グループ

藤田グループは補体レクチン経路の分子基盤およびその生理的役割の究明を目ざして、とくにレクチン経路構成成分の欠損マウスの解析を中心に進めてきた。認識分子であるレクチンおよびレクチンと複合体を形成しているセリンプロテアーゼMASPの欠損マウスの作製と表現型解析を進め、レクチン経路が感染防御に働いていること、フィコリンがレクチン経路の認識分子として働くこと、複合体中のMASPとsMAP (MASP-2の短縮型タンパク) の競合的な関連性などを明らかにした。今後は、3種類のMASP分子の役割分担、フィコリンの構造と糖鎖認識の分子基盤、2つの異なるタイプのフィコリンの役割の相違、レクチン経路の非自己認識システムと腫瘍免疫やアポトーシスとの関連性の解明などが今後の課題である。

若宮グループは、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を明らかにする目的で、関連分子探索を行い、アダプチン μ 2分子を発見した。微生物の貪食過程では、CL-P1細胞内領域・アダプチン μ 2・クラスリンの3分子の結合と、アダプチン分子が貪食に有利に働くこと、さらにCL-P1のエンドサイトーシスモチーフ領域は貪食過程では関与しないことを明らかにした。貪食に関与する新たなCL-P1細胞内領域部分とそれと細胞内で関与する分子を探索することが次の課題である。

黒木グループは、生体防御に関わる蛋白質として、分泌型コレクチンの肺サーファクタント蛋白質 (SP-AとSP-D) 、および、Toll様受容体 (TLR) とその関連蛋白質に焦点を絞り、その構造と機能の関係を明らかにすることを目的として遂行し、臨床応用への分子基盤の

確立を目指している。肺コレクチンがマクロファージとの相互作用を介して貪食受容体の細胞膜局在を増加させることによって細菌貪食を促進することを示した。また、TLR4細胞外ドメインからなる可溶型TLR4 (sTLR4)とMD-2との直接結合を証明し、ロイシンリッチモチーフを含まないTLR4のN末端側がMD-2との相互作用に必須であることを示すとともに、sTLR4とMD-2の同時投与がエンドトキシン惹起炎症反応抑制へ臨床応用可能であることを示した。

II. 住本、神田、伊藤グループ

住本、神田、伊藤グループは、「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解明することと、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を進めている。

ここでの第1の課題である「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」については、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することが目的である。平成16年度は、食細胞NADPHオキシダーゼ活性化に必須のたんぱく質であるp47^{phox}とp67^{phox}の作用機構について、更に詳しい解析を行い、いくつかの興味深い知見を得ている。また、「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」に注目した研究を進めており、特に、平成15年度に同定・クローニングしていた新規なp40^{phox}結合蛋白質について、更なる解析を行っているところである。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している。

また、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。私達は平成14年に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 (p41^{nox}/Noxo1とp51^{nox}/Noxa1) を同定・クローニングし、両者がNox1の活性化に必須であることを明らかにしていた。平成16年度は、特にNox3の活性調節機構についての研究に進展があり、Noxo1とNoxa1によるNox3の活性調節につき興味深い知見を得た。17年度も、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。

3. 研究実施内容

藤田グループ

補体レクチン経路は、MBLやフィコリンなどの認識分子がMASPおよびsMAPと複合体を形成し、細菌などの表面糖鎖を認識することに伴い補体系が活性化される第三の補体活性化経路である (図1)。藤田グループはその分子基盤およびその生理的役割の究明を目的として、とくにレクチン経路構成成分の欠損マウスの表現型解析を中心に進め、以下の結果

を得た。

① MASP-1/3欠損マウスの解析により、体重が低下していること、血清中でレクチン経路の初動が遅延していること、インフルエンザウイルスに易感染性であることなどを明らかになった。MASP-2遺伝子を改変することによりMASP-2/sMAP欠損マウスを作成し、その表現型を解析した。その結果、MASP-2/sMAP欠損マウスは体重や外観は正常であるが、レクチン経路の補体活性化能が著明に低下していること、リコンビナントMASP-2の添加により活性が回復すること、リコンビナントsMAPがMBLとの結合においてMASP-2と競合し、レクチン経路を調節している可能性があることなどが明らかになった。現在、細菌による感染実験を進めている。

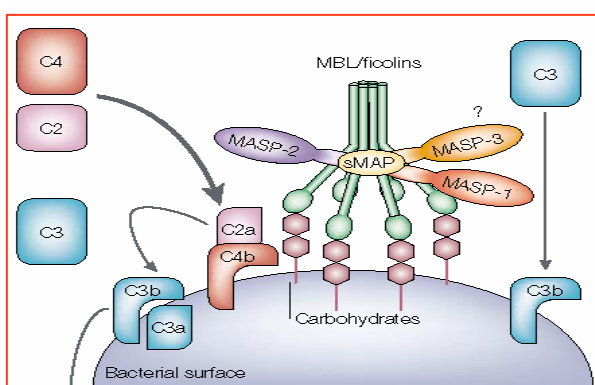


図1 補体レクチン経路の構成と活性化

MBL: mannose-binding lectin
MASP: MBL-associated serine protease
sMAP: small MBL-associated protein
(a truncated form of MASP-2)

② MASPの役割を一層明確なものとするため、二系統のMASP欠損マウスの交配によりMASP完全欠損マウスを作製した。現在、表現型の解析を進めている。

③ レクチン経路の認識分子の1つであるフィコリンの役割を解明するため、フィコリンA欠損マウスを作成しその表現型を解析した。フィコリン欠損マウスの外観は正常で、血清中のMBLを介するレクチン経路も正常であったが、フィコリンを介するレクチン経路が欠損しており、補体活性化能が有意に低下していた。組換え型フィコリンAの添加により活性が回復し、MBL複合体の場合と同様にsMAPが補体活性化に抑制的に働くことなどが明らかになった。

④ ヒトL-フィコリンの結晶X線回析により、その立体構造およびフィブリノーゲン様ドメインの中の糖鎖結合構造が明らかになった。

若宮グループ

研究の目的：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を明らかにする。

研究の方法：膜型コレクチンCL-P1の細胞内領域に結合する分子アダプチン μ 2を酵母two hybrid法にて同定し、樹立したCL-P1発現細胞株において酵母の貪食におけるアダプチン μ 2と関与する分子の相互作用を免疫蛍光染色、免疫沈降法、強制発現実験やdominant negative実験などを用いて解析を行った。

研究の結論：酵母two hybrid法にて発見された、CL-P1の細胞内領域に結合するアダプチン μ 2は、たんぱく質レベルでの結合を、酵母のtwo hybrid法と蛋白質におけるpull down assayで、細胞レベルでの結合を、細胞免疫染色法と免疫沈降法によって明らかにした。さらに、酵母貪食時には、CL-P1細胞内領域とアダプチン μ 2とクラスリンの3分子が複合体形成を行うことによって、酵母を細胞内部に取り込んでいることが明らかになった。また、貪食に関与する遺伝子の強制発現実験では、CL-P1発現細胞において、さらなるCL-P1の発現増加に伴って、結合と貪食される酵母数は、比例して増加した。しかしながらアダプチン μ 2は発現レベルが増加しても、結合する酵母数は増加しないが、貪食される酵母数には増加がみられた。この結果は、レセプター分子であるCL-P1は、酵母の結合と取り込みに直接有利に働くが、アダプチン μ 2は表面に発現させるCL-P1量を増加させないが、結合した酵母の内部への取り込みには有利に働くことが推測された。さらに従来報告されている、CL-P1で見出している“エンドサイトーシスモチーフ”は、酵母two hybrid法やpull down assayでは、CL-P1とアダプチン分子との結合に重要な役割をしているが、細胞レベルでの貪食には直接関与していないことが明らかになった。

黒木由夫グループ

Mycobacterium avium (非定型抗酸菌) による呼吸器感染症は高齢者および免疫不全状態の患者で増加傾向にあり、社会的にも注目されている。SP-AとSP-Dがマクロファージによる*M. avium*の貪食を促進することを見いだした。SP-AとSP-Dの相同体のコレクチンであるマンノース結合レクチン(MBL)はマクロファージの*M. avium*貪食を促進しなかった。肺コレクチンはCa²⁺依存性に*M. avium*菌体に結合するが、EDTA存在下でも菌体貪食を促進したので、肺コレクチンはオプソニンとして働くのではないことが示された。*M. avium*貪食に関わる貪食受容体であるマンノース受容体のマクロファージ細胞表面の発現を調べた結果、肺コレクチンは、マクロファージ細胞膜上のマンノース受容体局在を増加させることが判明し、これが*M. avium*貪食促進の機序であることが示された。

一方、SP-Aが肺胞マクロファージによるグラム陽性菌の*Streptococcus pneumoniae*と*Staphylococcus aureus*の貪食を促進させることを見いだした。SP-Dはこれらの菌体の貪食促進作用は示さなかったため、SP-AのCRD領域を相同なSP-DのCRD領域に置換したキメラ体を作成し、肺胞マクロファージによる*S. pneumoniae*貪食を調べた結果、SP-A CRD内のC末端側Cys²⁰⁴-Cys²¹⁸がSP-Aの貪食促進に重要であることが判明した。SP-Aはオプソニンとして作用しているのではなく、SP-Aが菌体に結合しないEDTA存在下、および、SP-AとマクロファージとのpreincubationでもSP-Aは*S. pneumoniae*貪食を促進した。SP-Aによる貪食促進は、アセチル化LDL存在下で抑制され、スカベンジャー受容体A (SR-A) 欠損マウス由来肺胞マクロファージでは貪食促進は観察されなかったため、SP-AはSR-Aを介する菌体の貪食を促進することが示された。さらに、SP-Aが肺胞マクロファージ細胞膜上のSR-A局在を増加させることが貪食促進の機構として明らかにされ、さらに、SR-Aの局在変化は新規蛋白合成は関与せず、カゼインキナーゼ2の活性化に依存することが示された。

TLR4細胞外ドメイン(Glu²⁴-Leu⁶³¹)から成る可溶性組換え蛋白質(sTLR4)をバキュロウイルス-昆虫細胞系で発現させ、sTLR4を分離精製した。sTLR4とMD-2およびリポ多糖(LPS)との相互作用を解析し、MD-2がTLR4細胞外ドメインに直接結合し、TLR4とMD-2の複合体がLPSに結合しうることを証明した。sTLR4はMD-2との結合で、 6.29×10^{-8} MのK_dを示した。MD-2はTLR4にのみ結合し、TLR4と同様にロイシンリッチリピート構造を有するTLR2やCD14には結合しなかった。さらに、TLR4/TLR2キメラ体及びTLR4の欠損変異体を用いた解析から、TLR4 N末端側のロイシンリッチモチーフを含まないGlu²⁴-Pro³⁴領域がMD-2との相互作用に必須であることが明らかにされた。また、sTLR4とMD-2との複合体がマクロファージ系細胞株におけるLPS惹起IL-8分泌、および、TLR4トランスフェクト細胞におけるLPS惹起NF-κB活性化を抑制することが示され、エンドトキシン惹起炎症に対する新規治療法として応用できる可能性が示唆された。

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16年度は、特に、「活性化型食細胞NADPHオキシダーゼ複合体の形成機構」及び「活性化型食細胞NADPHオキシダーゼ複合体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た。

(1-1) 活性化型食細胞NADPHオキシダーゼ複合体の形成機構：食細胞NADPHオキシダーゼ活性化に必須のたんぱく質であるp47^{phox}とp67^{phox}の作用機構について、更に詳しい解析を行い、平成16年度は以下のような知見を得た：(i) p47^{phox}は2つのSH3ドメインで挟むようにp22^{phox}を認識し結合しているが、その3次構造をNMRにより決定し(論文投稿中)、更に、p47^{phox}とp22^{phox}との様式がオキシダーゼ活性化に必須であることを示した(論文投稿中)。(ii) p67^{phox}はそのC端のSH3ドメインを介してp47^{phox}のC末に結合するが、この結合がオキシダーゼ活性化に必要であること、またp47^{phox}のC末のSer-479のリン酸化によりp67^{phox}との結合が阻害され、その結果オキシダーゼ活性が負に調節されること、等を明らかにした(論文投稿中)。

(1-2) 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。私達は、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・クローニングしていたが、これら新規蛋白質がp40^{phox}のファゴゾーム膜への集積を促進していると考えられ、その解析を現在進めている。

(2) 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。私達は食細胞オキシダーゼの活性化蛋白質であるp47^{phox}とp67^{phox}のそれぞれの新規ホモログ (p41^{nox}/Noxo1とp51^{nox}/Noxa1) をクローニングしていた。Noxo1及びNoxa1が、Nox1, Nox3, Nox4などの活性化において果す役割を明らかにする為に、Noxo1とNoxa1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, HeLa細胞, など) に発現させ、種々の解析を行っている。既に私達は、Nox1の活性化にはNoxo1とNoxa1の両者が必須であることを示していたが、平成16年度は、特にNox3の解析が進み以下のことを明らかにすることができた (Ueno et al., JBC280, in press) : (i) Noxo1はp22^{phox}と複合体を形成しその上でconstitutiveに強いスーパーオキシド生成活性をもつこと、(ii) Nox3の活性はNoxo1により増大すること、(iii) Noxo1はp22^{phox}と結合して作用すること、(iv) Noxo1によるNox3活性の増大はNoxa1により抑制されること、(v) 一方、Nox3活性には低分子量Gたんぱく質Racは関与しないこと。また、未だpreliminaryではあるが、Nox1の活性化はRacによって正に制御されていること、一方Nox4活性にはNoxo1とNoxa1あるいはRacは関与しないと考えられること、等々を明らかにしつつある。平成17年度は、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。

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：生体防御に関わる蛋白質 (コレクチンとTo11様受容体) の構造と機能の解析

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（原著論文）発表

藤田禎三グループ

- Fujita T, Matsushita M, Endo Y. : The lectin-complement pathway--its role in innate immunity and evolution. Immunol Rev. 198:185-202. (2004)
- Zundel S, Cseh S, Lacroix M, Dahl MR, Matsushita M, Andrieu JP, Schwaeble WJ, Jensenius JC, Fujita T, Arlaud GJ, Thielens NM. : Characterization of recombinant mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-3 suggests an activation mechanism different from that of MASP-1 and MASP-2. J Immunol. 172(7):4342-50. (2004)
- Fujita T, Endo Y, Nonaka M. : Primitive complement system-recognition and activation. Molecular Immunology, 41:103-111 (2004)
- Ma YG, Cho MY, Zhao M, Park JW, Matsushita M, Fujita T, Lee BL. : Human mannose-binding lectin and L-ficolin function as specific pattern recognition proteins in the lectin activation pathway of complement. The Journal of Biological Chemistry, 279:25307-25312 (2004)
- Matsushita M, Matsushita A, Endo Y, Nakata M, Kojima N, Mizuochi T, Fujita T. : Origin of the classical complement pathway : Lamprey orthologue of mammalian C1q acts as a lectin. Pro. Nat. Acad. Sci. USA, 101:10127-10131 (2004)
- Gomi K, Tokue Y, Kobayashi T, Takahashi H, Watanabe A, Fujita T, Nukiwa T. (Department of Respiratory Oncology and Molecular Medicine, Institute of Development, Aging, and Cancer, Tohoku University, : Mannose-binding lectin gene polymorphism is a modulating factor in repeated respiratory infections. Chest, 126(1):95-9. (2004)
- Kimura Y, Inoue N, Fukui A, Oshiumi H, Matsumoto M, Nonaka M, Kuratani S, Fujita T, Nonaka M, Seya T. : A short consensus repeat-containing complement regulatory protein of lamprey that participates in cleavage of lamprey complement 3. J Immunol., 15:173(2):1118-28.
- Roos A, Garred P, Wildenberg ME, Lynch NJ, Munoz JR, Zuiverloon TC,

- Bouwman LH, Schlagwein N, Fallaux van den Houten FC, Faber-Krol MC, Madsen HO, Schwaeble WJ, Matsushita M, Fujita T, Daha MR. : Antibody-mediated activation of the classical pathway of complement may compensate for mannose-binding lectin deficiency. Eur. J. Immunology 34(9):2589-98 (2004)
- Endo Y, Liu Y, Kanno K, Takahashi M, Matsushita M, Fujita T. : Identification of the mouse H-ficolin gene as a pseudogene and orthology between mouse ficolins A/B and human L-/M-ficolins. Genomics 84(4): 737-44(2004)
- Krarup A, Thiel S, Hansen A, Fujita T, Jensenius JC. : L-ficolin is a pattern recognition molecule specific for acetyl groups. J Biol Chem. 12;279(46):47513-9. (2004)
- Aoyagi Y, Adderson EE, Min JG, Matsushita M, Fujita T, Takahashi S, Okuwaki Y, Bohnsack JF. : Role of L-ficolin/mannose-binding lectin-associated serine protease complexes in the opsonophagocytosis of type III group B streptococci. J Immunol. 174(1):418-25. (2005)

若宮伸隆グループ

- Takahashi R, Tsutsumi A, Ohtani K, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Wakamiya N, Sumida T.: Anti-mannose binding lectin antibodies in sera of Japanese patients with systemic lupus erythematosus. Clin Exp Immunol. 136(3): 585-90. 2004.
- Takahashi, R. Tsutsumi, A. Ohtani, K. Mukai, Y. Goto, D. Matsumoto, I. Wakamiya, N Sumida, T.: Association of mannose-binding lectin (MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus. Ann. Rheum. Dis. 64:311-314, 2005.
- Kitamoto, N., Kobayashi, T., Kato, Y., Wakamiya, N., Ikuta, K., Tanaka, T., Miyamoto, H., Kato, S.: Possibility of rapid detection for Variola virus using monoclonal antibody cross-reacted with Orthopoxviruses. Microbiol. Immunol. 49(3) : 219-225. 2005.

黒木由夫グループ

- Kuronuma K, Sano H, Kato K, Kudo K, Hyakushima N, Yokota S, Takahashi H, Fujii N, Suzuki H, Kodama T, Abe S, Kuroki Y. : Pulmonary surfactant protein A augments the phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* by alveolar macrophages through a casein kinase 2-dependent increase of

- cell surface localization of scavenger receptor A. *J Biol Chem* 279:21421-21430 (2004)
- Kudo K, sano H, Takahashi H, Kuronuma K, Yokota S, Fujii N, Shimada K, Yano I, Kumazawa Y, Voelker DR, Abe S, Kuroki Y. : Pulmonary collectins enhance phagocytosis of *Mycobacterium avium* through increased activity of mannose receptor. *J Immunol* 172:7592-7602 (2004)
 - Hyakushima N, Mitsuzawa H, Nishitani C, Sano H, Kuronuma K, Konishi M, Himi T, Miyake K, Kuroki Y. : Interaction of soluble form of recombinant extracellular TLR4 domain with MD-2 enables lipopolysaccharide binding and attenuates TLR4-mediated signaling. *J Immunol* 173:6949-6954 (2004)
 - Nishitani C, Mitsuzawa H, Hyakushima N, Sano H, Matsushima N, Kuroki Y. : The Toll-like receptor 4 region Glu²⁴-Pro³⁴ is critical for interaction with MD-2. *Biochem Biophys Res Commun* 328:586-590 (2005)
 - Iwaki D, Nishitani C, Mitsuzawa H, Hyakushima N, Sano H, Kuroki Y. The CD14 region spanning amino acids 57-64 is critical for interaction with the extracellular Toll-like receptor 2 domain. *Biochem Biophys Res Commun* 328:173-176 (2005)

住本、神田、伊藤グループ

- Yuzawa, S., Ogura, K., Horiuchi, M., Suzuki, N. N., Fujioka, Y., Kataoka, M., Sumimoto, H., and Inagaki, F. (2004) Solution structure of the tandem SH3 domains of p47^{phox} in an autoinhibited form. *J. Biol. Chem.* **279**, 29752-29760.
- Tanaka, H., Minakami, R., Kanaya, H., and Sumimoto, H. (2004) Catalytic residues of group VIB calcium-independent phospholipase A₂ (iPLA₂γ). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 1284-1290.
- Hirano, Y., Yoshinaga, S., Ogura, K., Yokochi, M., Noda, Y., Sumimoto, H., and Inagaki, F. (2004) Solution structure of atypical PKC PB1 domain and its mode of interaction with ZIP/p62 and MEK5. *J. Biol. Chem.* **279**, 31883-31890.
- Sasaki, Y., Ihara, K., Matsuura, N., Kohno, H., Nagafuchi, S., Kuromaru, R., Kusuhara, K., Takeya, R., Hoey, T, Sumimoto, H., Hara T. (2004) Identification of a novel type 1 diabetes susceptibility gene, T-bet. *Hum. Genet.* **115**, 177-184.
- Hanano, T., Hara, Y., Shi, J., Morita, H., Umebayashi, C., Mori, E., Sumimoto, H., Ito, Y., Mori, Y., Inoue, R. (2004) Involvement of TRPM7

in cell growth as a spontaneously activated Ca^{2+} entry pathway in human retinoblastoma cells. *J. Pharmacol. Sci.* **95**, 403–419.

- Ueyama, T., Lennartz, M. R., Noda, Y., Kobayashi, T., Shirai, Y., Rikitake, K., Yamasaki, T., Hayashi, S., Sakai, N., Seguchi, H., Sawada, M., Sumimoto, H., and Saito, N. (2004) Superoxide (O_2^-) production at phagosomal cup/phagosome through βI PKC during $\text{Fc}\gamma\text{R}$ -mediated phagocytosis in microglia. *J. Immunol.* **173**, 4582–4589.
- Kojima, C., Hashimoto, A., Yabuta, I., Hirose, M., Hashimoto, S., Kanaho, Y., Sumimoto, H., Ikegami, T., and Sabe, H. (2004) Regulation of Bin1 SH3 domain binding by phosphoinositides. *EMBO J.* **23**, 4413–4422.
- Kawahara, T., Kohjima, M., Kuwano, Y., Mino, H., Teshima-Kondo, S., Takeya, R., Tsunawaki, S., Wada, A., Sumimoto, H., and Rokutan, K. (2005) *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide activates Rac1 and transcription of NADPH oxidase Nox1 and its organizer Nox1 in guinea pig gastric mucosal cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **288**, C450–C457.
- Tsubouchi, H., Inoguchi, T., Inuo, M., Kakimoto, M., Sonta, T., Sonoda, N., Sasaki, S., Kobayashi, K., Sumimoto, H., and Nawata, H. (2005) Sulfonylurea as well as elevated glucose levels stimulate reactive oxygen species production in the pancreatic β -cell line, MIN6: a role of NAD(P)H oxidase in β -cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **326**, 60–65.
- Takamatsu, H., Takeya, R., Naito, S., and Sumimoto, H. (2005) On the mechanism of cell lysis by deformation. *J. Biomech.* **38**, 117–124.
- Hirano, Y., Yoshinaga, S., Takeya, R., Suzuki, N. N., Horiuchi, M., Kohjima, M., Sumimoto, H., and Inagaki, F. (2005) Structure of a cell polarity regulator, a complex between aPKC and Par6 PBI domains. *J. Biol. Chem.* **280**, 9653–9661.
- Izaki, T., Kamakura, S., Kohjima, M., and Sumimoto, H. (2005) Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 to Par3 β , a human Par3-related cell polarity protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**, 212–219.
- Murakami, M., Masuda, S., Ueda-Semmyo, K., Yoda, E., Kuwata, H., Takanezawa, Y., Aoki, J., Arai, H., Sumimoto, H., Ishikawa, Y., Ishii, T., Nakatani, Y., Kudo, I. (2005) Group VIB Ca^{2+} -independent phospholipase $\text{A}_2\gamma$ promotes cellular membrane hydrolysis and prostaglandin production in a manner distinct from other intracellular phospholipases A_2 . *J. Biol. Chem.* **280**, 14028–14041.

- Kamura, T., Maenaka, K., Kotoshiba, S., Matsumoto, M., Kohda, D., Conaway, R. C., Conaway, J. W., and Nakayama, K. I. (2004). VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. *Genes Dev.* **18**, 3055-3065.
- Shioi, S., Ose, T., Maenaka, K., Shiroishi, M., Abe, Y., Kohda, D., Katayama, T., and Ueda, T. (2005). Crystal structure of a biologically functional form of PriB from Escherichia coli reveals a potential single-stranded DNA-binding site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **326**, 766-776.
- Yoshizawa, S., Rasubala, L., Ose, T., Kohda, D., Fourmy, D., and Maenaka, K. (2005). Structural basis for mRNA recognition by elongation factor SelB. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 198-203.
- Rasubala, L., Fourmy, D., Ose, T., Kohda, D., Maenaka, K., and Yoshizawa, S. (2005) Crystallization and preliminary C-ray analysis of the mRNA-binding domain of elongation factor SelB in complex with RNA. *Acta Cryst.* **F61**, 296-298.
- Feng, S.-Y., Ota, K., Yamada, Y., Sawabu, N., and Ito, T. (2004) A yeast one-hybrid system to detect methylation-dependent DNA-protein interactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**, 922-925.
- Yamada, Y., Watanabe, H., Miura, F., Soejima, H., Uchiyama, M., Iwasaka, T., Mukai, T., Sakaki, Y., and Ito, T. A comprehensive analysis of allelic methylation status of CpG islands on human chromosome 21q. *Genome Res.* **14**, 247-266.
- Oki, M., Valenzuela, L., Chiba, T., Ito, T., and Kamakaka, R. (2004) Barrier proteins remodel and modify chromatin to restrict silenced domains. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 1956-1967.
- Sato, S., Ito, M., Ito, T., and Yoshioka, K. (2004) Scaffold protein JSAP1 is transported to growth cones of neurites independent of JNK signaling pathways in PC12h cells. *Gene* **329**, 51-60.
- Onda, M., Ota, K., Chiba, T., Sakaki, Y., and Ito, T. (2004) Analysis of gene network regulating yeast multidrug resistance by artificial activation of transcription factors: involvement of Pdr3 in salt resistance. *Gene* **332**, 51-59.
- Ichimura, T., Kubota, H., Goma, T., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Iwago, M., Kakiuchi, K., Shekhar, H. U., Shinkawa, T., Taoka, M., Ito, T., and Isobe, T. (2004) Transcriptomic and proteomic analysis of a 14-3-3 gene-deficient yeast. *Biochemistry* **43**, 6149-6158.

- Okamura, K., Yamada, Y., Sakaki, Y., and Ito, T. (2004) An evolutionary scenario for genomic imprinting of *Impact* lying between nonimprinted neighbors. *DNA Res.* **11**, 381-390.
- Okamura, K., Sakaki, Y., and Ito, T. (2005) Comparative genomics approach toward critical determinants for the imprinting of an evolutionarily conserved gene *Impact*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**, 824-830.
- Matsuo, R., Kubota, H., Obata, T., Kito, K., Ota, K., Kitazono, T., Ibayashi, S., Sasaki, T., Iida, M., and Ito, T. (2005) The yeast eIF4E-associated protein Eap1p attenuates *GCN4* translation upon TOR inactivation. *FEBS Lett.* **579**, 2433-2438.

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：2件（CREST研究期間累積件数：2件）