

「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

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いう課題の下で、二つのグループ(I:藤田、若宮、黒木グループ、II:住本、神田、伊藤グループ)がそれぞれ以下の通りの研究を行った。

I. 藤田、若宮、黒木グループ

外来異物や非自己成分を識別し排除するという生体防御システムは、生物に備わった基本的な特性である。なかでも自然免疫の生体防御機構は、獲得免疫をもたない生物でも働き、その根幹をなしている。自然免疫における生体防御システムは、感染症や悪性腫瘍などにおいて重要であり、特異的なその分子基盤が次第に明らかになってきた。本グループの研究では、生体防御システムにおける非自己認識の機構、引き続き起こる応答と制御の機序を解明し、その生理学的役割を明らかにすることを目ざしている。

藤田グループは、自然免疫の生体防御システムの一つである補体レクチン経路の分子基盤およびその生理的役割の解明を目的として、レクチン経路の認識分子やキーエンザイムであるMASPを欠損したマウスの作製し、その表現型解析を進めてきた。その結果、これまで考えられてきたMASP-2をエフェクターとする経路に加え、MASP-1が独自に働く新たなルート(MASP-1経路)があること、MASP-2の短縮型タンパクであるsMAPがレクチン経路の抑制に関与していること、MASP-1とMASP-2の両者の欠損はレクチン経路の遮断に伴い、初期感染に対する抵抗性が低下すること、認識分子の一つであるフィコリンがレクチン経路の認識分子として働き、細菌の増殖を抑制すること、等が明らかになった。このことは、レクチン経路が、自然免疫の生体防御において重要な役割を担うことを示唆している。今後は、レクチン経路の増幅と制御の機構、レクチン経路の腫瘍免疫、アポトーシスあるいは虚血再還流への関与などが課題である。

若宮グループの研究目標は、膜型コレクチンCL-P1の、エンドサイトーシスと貪食に関わ

る分子の相互作用を明らかにし、個体における本分子の生理的意義を探ることである。今年度までの研究により、食食に関してadaptin, clathrinの関与とゼブラフィッシュでのノックダウン実験による血管形成阻害の現象が得られている。さらに、ラットでは虚血・再灌流処置でCL-P1 の遷延性過剰亢進を認めている。これらの細胞レベルと個体レベルの研究成果は、CL-P1 分子が血管において多様な生物現象を担う可能性を示しており、今後CL-P1 が上記生物現象を引き起こす詳細なメカニズムの解析を計画している。

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)とマンノース結合レクチン(MBL)、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、臨床応用への基盤形成を目指している。SP-AとSP-Dが糖鎖認識領域(CRD)を介して蛋白間相互作用によってTLR4 細胞外ドメインに結合すること示した。MBLは肝クッパー細胞と相互作用を有し、細胞表面のスカベンジャー受容体発現を増強させることによってエンドトキシンや細菌の貪食を促進させることを示した。TLR4 のN末端側がMD-2 との結合に重要であり、TLR4 細胞外ドメインはそれ自身ではリポDに結合できないが、MD-2 によるリポD結合の親和性と結合量を増加させることを示した。細胞表面における貪食受容体局在増強の機序、および、TLR4 細胞外ドメインとMD-2 との結合による蛋白質の構造変化の解明が今後の課題である。

II. 住本、神田、伊藤グループ

本グループの研究は、1 つには「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明らかにしようというものである。平成 17 年度は、食細胞NADPHオキシダーゼ活性化に必須の蛋白質である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、特に「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」に注目した研究を行っているが、平成 17 年度は、p40^{phox}のファゴゾームへのtargetingを感度よく半定量的に測定する方法を開発した。これにより、例えば、p40^{phox}は脂質結合を介してファゴゾーム膜に集まることを示し、その調節機構に関する解析が進行中である。この方法を用いて、平成 18 年度の新たな展開が期待できる状況である。

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 (Noxo1 と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 17 年度は、Nox1 活性化におけるNoxo1 とNoxa1 の作用メカニズム、およびRacの役割につい

て興味深い知見を得た。またNox3 の活性調節機構についての研究に進展があった。平成 18 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。

2. 研究実施内容

2-1. 藤田、若宮、黒木グループ

藤田グループ

補体レクチン経路においては、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（図 1）。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解明を目的として、3 種類の MASP 欠損マウス（MASP-1/3 欠損マウス、MASP-2/sMAP 欠損マウスおよび MASP 完全欠損マウス）を作成し、その表現型を解析した。その結果、MASP の欠損に伴いレクチン経路の活性は低下し、MASP の完全欠損によりほぼ完全に欠失すること、またレクチン経路の活性化の時間経過の比較から、この経路は数分内のごく初期に作動することがわかった。さらに、MASP-1 で惹起される独自のルート（MASP-1 経路）が存在し、この経路は補体第二経路によって増幅されると考えられた（図 1）。sMAP は、MBL およびフィコリンとの結合において MASP と競合し、レクチン経路の活性を抑制することが明らかになった（図 1）。この機構は、レクチン経路の制御系の一つと考えられる。細菌による感染実験の結果、MASP 完全欠損マウスは著しく易感染性であることが明らかになった。

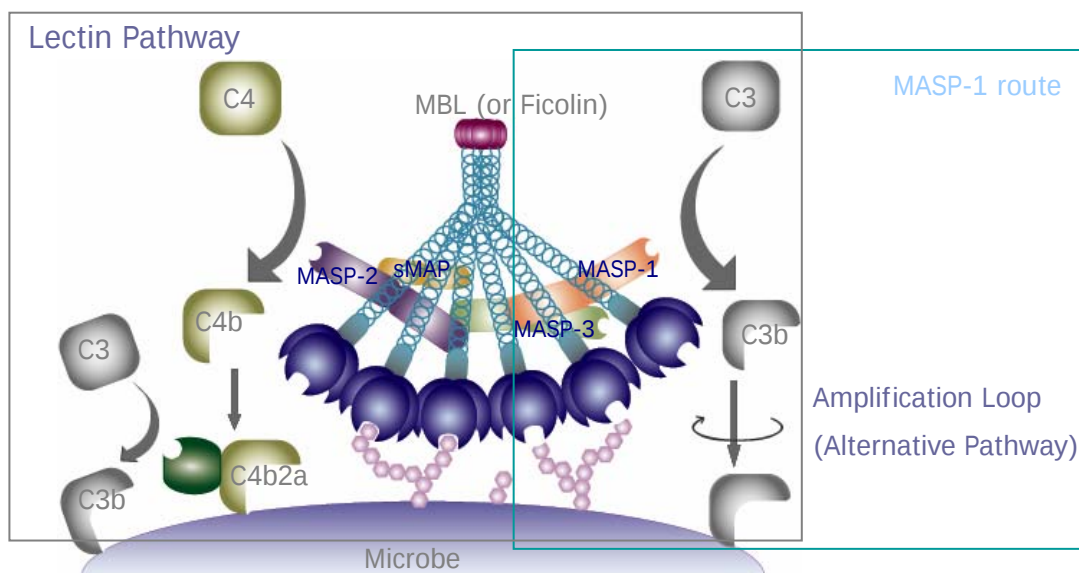


図1 レクチン経路の構成と反応経路

一方、MBL とともにレクチン経路の認識分子として働くと考えられるフィコリン A の欠損マウスを作成しその表現型を解析した。その結果、このマウスは MBL を介するレクチン経路は正常であるが、フィコリンを介するレクチン経路が欠損していることが明らかになった。すなわち、2つのレクチン経路は独立して存在することが示唆された。フィコリン A 欠

損マウスでは、血液中での細菌の増殖抑制能力が低下していることが明らかになり、フィコリンを認識分子とするレクチン経路が実際に生体防御に機能していることが示された。これらの結果から、レクチン経路は MBL とフィコリンを認識分子とし、少なくとも二つの MASP (MASP-1 と MASP-2) をキーエンザイム、sMAP を調節因子とするシステムとして存在し、これらの構成分子は異なる組成で複数の複合体を形成し、自然免疫における生体防御機能を分担していることが明らかになった。

若宮グループ

新規膜型コレクチン CL-P1 は、血管内皮に存在し、細胞レベルの実験から自然免疫やスカベンジャー受容体機能を有することが推測されている。本年度はラットとゼブラフィッシュでの CL-P1 の機能解析を試み、個体レベルで新たな役割をもつことを見いだした。

1. ラットにおける虚血・再灌流後の CL-P1 発現誘導についての解析

ラットでは、総頸動脈のクリッピングにより、一過性虚血／再灌流モデルを構築しその生理的役割の検討を行った。ラット総頸動脈血管において、CL-P1 は再灌流48時間後から mRNA の上昇が見られ、免疫組織染色では血管内皮相当部分に CL-P1 蛋白が3日後から増加し、7日後にピークに達し、14日で前状態に戻った。本結果は、細胞における低酸素・再酸素化刺激後の CL-P1 の動態と類似し、ラット血管における遅発性の CL-P1 蛋白過剰産生の惹起を示している。さらに、常在型蛋白と考えられるコレクチン分子の新しい発現誘導メカニズムを提示したばかりか、臨床病態でのその意義は興味深く、つぎの検討課題と考えている。

2. ゼブラフィッシュ CL-P1 遺伝子ノックダウンによる血管・形態形成についての解析

ゼブラフィッシュ CL-P1 (zCL-P1) 遺伝子のクローニングを行った後、細胞での遺伝子発現実験を行い、微生物や酸化 LDL に対してヒト CL-P1 と同等の機能を有することを明らかにした。ゼブラフィッシュ卵では、受精後早期から zCL-P1 mRNA の発現が認められ、稚魚の in situ hybridization や免疫組織染色では zCL-P1 は血管部分に発現を認めた。Morpholino oligonucleotide を用いた、遺伝子ノックダウンでは、血管形成不全に依存すると考えられる体幹形成の著しい阻害が認められ、その表現型は zCL-P1 mRNA の同時注入によって抑制された。これらの実験結果から、硬骨魚類で初めてスカベンジャー受容体の存在が確認されたばかりか、さらに発生初期においては、zCL-P1 が血管形成や形態形成に重要な役割を担う可能性のあることが明らかになった。

黒木グループ

TLR4 は、グラム陰性菌およびエンドトキシンを受容体として機能し、MD-2 と複合体を形成することによって、エンドトキシンによるシグナルを伝達し、炎症性サイトカイン分泌を惹起する。SP-A と SP-D が可溶型組換え TLR4 細胞外ドメイン (sTLR4) に結合することを明らかにした。肺コレクチンは、Glycosidase F 処理後の糖鎖除去 sTLR4 にも結合したので、TLR4 細胞外ドメインと蛋白質間相互作用により結合すると考えられた。また、抗 SP-D 単ク

ローン抗体による阻止作用、および、抗体のエピトープマッピングにより、SP-D は糖鎖認識領域(CRD)を介して sTLR 蛋白に結合することが示された (投稿中)。SP-A をコラゲナーゼ処理して得られたコラゲナーゼ抵抗性フラグメント(CRF)は、ネックと CRD から成る三量体を呈するが、CRF は sTLR4 に結合するものの、その親和性は著明に減弱し、TLR4/MD-2 発現細胞において smooth LPS 惹起 NF- κ B 活性化の抑制効果は、18 量体を呈する SP-A に比べて著しく減弱し、SP-A の N 末端側とコラーゲン様領域による多量体構造の形成が TLR4 を介する炎症反応の制御に重要であることを示した (投稿中)。

スカベンジャー受容体 A(SR-A)は、肝臓におけるエンドトキシン除去に重要な役割を果たしているが、肝で産生される MBL と肝組織マクロファージであるクッパー細胞のエンドトキシンクリアランスにおける役割について検討した。MBL は、クッパー細胞に直接作用し、細胞膜 SR-A の局在を増加させることによって、リピド A、ブドウ球菌と大腸菌の貪食を促進させることを明らかにした (投稿中)。さらに、MBL は、滲出性中耳炎の起炎菌として注目されている *Alloiococcus otitidis* に直接結合するとともに、中耳滲出液中に存在し、マクロファージによる SR-A を介する *A. otitidis* 貪食を促進することを示した (Eur J Immunol, in press)。

TLR4 細胞外ドメイン(Glu²⁴-Leu⁶³¹)から成る可溶性組換え蛋白質(sTLR4)はそのN末端側を介してMD-2 に結合すること、また、sTLR4 単独では³H標識リピドAには結合できないことを示した。さらに、MD-2 は濃度依存性に³H標識リピドAに結合するがsTLR4 の存在下でリピドA結合量、親和性ともに増加し、sTLR4-MD-2 複合体はTLR4/MD-2 発現細胞へのLPS結合性およびLPS惹起細胞応答を減弱させることが示された。エンドトキシン惹起肺炎マウスモデルにおいてsTLR4/MD-2 の気管内投与は肺炎を緩和させることも示され、エンドキシン惹起炎症に対する新規治療法に応用できる可能性が示された (投稿中)。

2-2. 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17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蛋白質である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17年度は以下のような知見を得た。(i) 食細胞NADPHオキシダーゼ (酵素の本体はgp91^{phox}：膜蛋白質であり、やはり膜蛋白質であるp22^{phox}とヘテロダイマーを形成している) の活性化に必要なp47^{phox} (細胞非刺激時には細胞質に存在) とp22^{phox}の結合が、p47^{phox}のSH3 ドメインによる新規な認識様式によるものであること (p47^{phox}の2つのSH3 ドメインで挟むように

p22^{phox}のポリプロリンIIヘリックス領域を認識し、p22^{phox}の更にC末の α ヘリックスをN末側SH3が認識する)、この認識様式が食細胞NADPHオキシダーゼ活性化に必須であることを明らかにした (Nobuhisa et al., Biochem. J., 2006)。更に、NMR法によりp47^{phox}の2つのSH3とp22^{phox}のプロリン・リッチ領域の複合体の立体構造を決定した (Ogura et al., JBC, 2006)。

(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。(iii) p47^{phox}のSH3ドメインよりも更にN末に存在する3つのアミノ酸残基が、p47^{phox}のp22^{phox}との結合や膜移行には必要ではないが、gp91^{phox}の活性化に必須であることを示した (論文準備中)。

(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-SH3-PB1」というドメイン構造をしている。p40^{phox}のPXドメイン (p40^{phox}-PX) はホスファチジルイノシトール-3-リン酸 (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い出していた。平成17年度は、全長型のp40^{phox}がPI3P結合を介してファゴゾーム膜に集まることを示し (驚いたことに、これは今まで示されていなかった。実験条件の改良が決定的であった!)、更に、この時のSH3ドメインやPB1ドメインの役割を明らかにした。また、私達が同定・クローニングしていた新規なp40^{phox}結合蛋白質が、p40^{phox}のファゴゾーム膜への集積において担う役割について、現在解析を進めている。

(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 (Noxo1 と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17年度は、以下のことを明らかにすることができた。(i) Nox1 について: Noxo1 の2つのSH3ドメインを介したNoxo1-p22^{phox}相互作用がNox1 活性化に必要であること、Noxa1 のSH3ドメインを介したNoxo1-Noxa1 相互作用がNoxa1 の膜への局在とNox1 活性化に必要であること、RacはNoxa1 に結合することでスーパーオキシド生成活性を促進すること、等を明らかにした (Miyano et al., 論文投稿中)。(ii) Nox3 について: Noxo3 はp22^{phox}とヘテロダイマーを形成して恒常的にスーパーオキシドを生成する活性をもつこと、この活性はp47^{phox}, Noxo1 やp67^{phox}により更に促進されること、この際p47^{phox}およびNoxo1 はp22^{phox}に結合して作用すること、Noxo1 によるNox3 活性の増大はp67^{phox}やNoxa1 により抑制されること、等を示した (Ueno et al., JBC, 2005)。(iii) Nox4 について: 私達が同定クローニングし

たNox4 は、p22^{phox}と複合体を形成することでスーパーオキシド生成活性をもつようになること、内皮細胞では核に存在し転写制御に関与するらしいこと等を明らかにした (Kuroda et al., Genes to Cells, 2005)。Nox4 の活性は、Nox1-3 と異なり、p47^{phox}、Noxol、p67^{phox}およびNoxa1 等により調節されないことも見い出している。

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、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、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、教授）

②研究項目：生体防御に関わる蛋白質（コレクチンと Toll 様受容体）の構造と機能の解析

「住本英樹（生化学・分子生物学）」グループ

①研究分担グループ長：住本 英樹（九州大学、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（構造生物学）」グループ

①研究分担グループ長：神田 大輔（九州大学、教授）

②研究項目：構造生物学的的手法による分子認識機構解明

「伊藤隆司（分子遺伝学）」グループ

①研究分担グループ長：伊藤 隆司（東京大学、教授）

②研究項目：分子遺伝学的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）

藤田グループ

- Hisano S, Matsushita M, Fujita T, Iwasaki H. Activation of the lectin complement pathway in Henoch-Schonlein purpura nephritis. Am J Kidney Dis. 45(2): 295-302. (2005)

- Iwaki D, Fujita T. Production and purification of recombinants of mouse MASP-2 and sMAP. J Endotoxin Res. 11(1):47-50. (2005)
- Kuraya M, Ming Z, Liu X, Matsushita M, Fujita T. Specific binding of L-ficolin and H-ficolin to apoptotic cells leads to complement activation. Immunobiology. 209(9): 689-97. (2005)
- Berger SP, Roos A, Mallat MJ, Fujita T., de Fijter JW, Daha MR. Association between mannose-binding lectin levels and graft survival in kidney transplantation. Am J Transplant. 5(6): 1361-6. (2005)
- Hummelshoj T, Munthe-Fog L, Madsen HO, Fujita T., Matsushita M, Garred P. Polymorphisms in the FCN2 gene determine serum variation and function of Ficolin-2. Hum Mol Genet. 14(12): 1651-8. (2005)
- Liu Y, Endo Y, Homma S, Kanno K, Yaginuma H, Fujita T. Ficolin A and ficolin B are expressed in distinct ontogenic patterns and cell types in the mouse. Mol Immunol. 42(11): 1265-73. (2005)
- Liu Y, Endo Y, Iwaki D, Nakata M, Matsushita M, Wada I, Inoue K, Munakata M, Fujita T. Human M-ficolin is a secretory protein that activates the lectin complement pathway. J Immunol. 175(5): 3150-6. (2005)
- Satomura A, Endo M, Fujita T., Ohi H, Ohsawa I, Fuke Y, Matsumoto K, Sudo S, Matsushita M, Fujita T. Serum mannose-binding lectin levels in maintenance hemodialysis patients: impact on all-cause mortality. Nephron Clin Pract. 102(3-4):c93-9 (2005)
- Endo Y, Nakazawa N, Liu Y, Iwaki D, Takahashi M, Fujita T., Nakata M, Matsushita M. Carbohydrate-binding specificities of mouse ficolin A, a splicing variant of ficolin A and ficolin B and their complex formation with MASP-2 and sMAP. Immunogenetics. 57(11): 837-44. (2005)
- Hashimoto S, Nakamura K, Oyama N, Kaneko F, Fujita T., Tsunemi Y, Saeki H, Tamaki K. Mannose-binding lectin (MBL) single nucleotide polymorphism is not associated with atopic dermatitis in Japanese patients. J Dermatol. 32(12):1038-40. (2005)
- Takahashi M, Iwaki D, Matsushita A, Nakata M, Matsushita M, Endo Y, Fujita T. Cloning and Characterization of Mannose-Binding Lectin from Lamprey (Agnathans) J Immunol. in press (2006)
- 藤田禎三 補体レクチン経路の重要性 日本臨床. 63(4):93-6. (2005)
- 藤田禎三 補体活性化経路 (古典, 第二, レクチン) 日本臨床. 63(4):269-73. (2005)
- 若宮グループ
- Takahashi R, Tsutsumi A, Ohtani K, Wakamiya N., Sumida T.:Lack of relationship between mannose-binding lectin variant alleles and risk of arterial thrombosis in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. Mod. Rheumatol. 15: 459-460. (2005)

- Koide T, Nishikawa Y, Asada S, Yamazaki CM, Takahara Y, Homma DL, Otaka A, Ohtani K, Wakamiya N, Nagata K, Kitagawa K. : Specific recognition of the collagen triple helix by chaperone HSP47. II. The HSP47-binding structural motif in collagens and related proteins. *J Biol Chem.* in press. (2006)

黒木グループ

- Yamamoto O, Takahashi H, Hirasawa M, Chiba H, Shiratori M, Kuroki Y, Abe S. Surfactant protein gene expressions for detection of lung carcinoma cells in peripheral blood. *Respir Med.* 99(9):1164-74 (2005)
- Matsushima N, Tachi N, Kuroki Y, Enkhbayar P, Osaki M, Kamiya M, Kretsinger RH. Structural analysis of leucine-rich-repeat variants in proteins associated with human diseases. *Cell Mol Life Sci.* 62(23):2771-91 (2005)
- Takahashi H, Shiratori M, Kanai A, Chiba H, Kuroki Y, Abe S. Monitoring markers of disease activity for interstitial lung diseases with serum surfactant proteins A and D. *Respirology.* 11:S51-4 (2006)
- Sano H, Kuronuma K, Kudo K, Mitsuzawa H, Sato M, Murakami S, Kuroki Y. Regulation of inflammation and bacterial clearance by lung collectins. *Respirology.* 11:S46-50 (2006)
- Takeyama K, Mitsuzawa H, Shimizu T, Konishi M, Nishitani C, Sano H, Kunishima Y, Matsukawa M, Takahashi S, Shibata K, Tsukamoto T, Kuroki Y. Prostate cell lines secrete IL-8 in response to mycoplasma hominis through Toll-like receptor 2-mediated mechanism. *Prostate.* 66(4):386-91 (2006).
- Konishi M, Nishitani C, Mitsuzawa H, Shimizu T, Sano H, Harimaya A, Fujii N, Himi T, Kuroki Y. *Alloiococcus otitidis* is a ligand for collectins and Toll-like receptor 2, and its phagocytosis is enhanced by collectins. *Eur J Immunol.* in press. (2006).

住本、神田、伊藤グループ

- Ueno, N., Takeya, R., Miyano, K., Kikuchi, H., and Sumimoto, H. (2005) The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22^{phox}-dependent manner: its regulation by oxidase organizers and activators. *J. Biol. Chem.* **280**, 23328-23339.
- 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.
- 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 PB1 domains. **J. Biol. Chem.** **280**, 9653–9661.
- Kanaya, H., Takeya, R., Takeuchi, K., Watanabe, N., Jing, N., and Sumimoto, H. (2005) Fhos2, a novel formin-related actin-organizing protein, probably associates with the nestin intermediate filament. **Genes Cells** **10**, 665–678.
- Tsubouchi, H., Inoguchi, T., Sonta, T., Sato, N., Sekiguchi, N., Kobayashi, K., Sumimoto, H., Utsumi, H., and Nawata, H. (2005) Statin attenuates high glucose-induced and diabetes-induced oxidative stress *in vivo* and *in vitro* evaluated by electron spin resonance measurement. **Free Radic. Biol. Med.** **39**, 444–452.
- Fujii, T., Onohara, N., Maruyama, Y., Tanabe, S., Kobayashi, H., Fukutomi, M., Nagamatsu, Y., Nishihara, N., Inoue, R., Sumimoto, H., Shibasaki, F., Nagao, T., Nishida, M., and Kurose, H. (2005) $G_{\alpha 12/13}$ -mediated production of reactive oxygen species is critical for angiotensin receptor-induced NFAT activation in cardiac fibroblasts. **J. Biol. Chem.** **280**, 23041–23047.
- 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., and Kudo, I. (2005) Group VIB Ca^{2+} -independent phospholipase $A_2\gamma$ promotes cellular membrane hydrolysis and prostaglandin production in a manner distinct from other intracellular phospholipases A_2 . **J. Biol. Chem.** **280**, 14028–14041.
- Nakayama, M., Inoguchi, T., Sonta, T., Maeda, Y., Sasaki, S., Sawada, F., Tsubouchi, H., Sonoda, N., Kobayashi, K., Sumimoto, H., and Nawata, H. (2005) Increased expression of NAD(P)H oxidase in islets of animal models of type II diabetes and its improvement by an AT1 receptor antagonist. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **332**, 1153–1159.
- Ueyama, T., Eto, M., Kami, K., Tatsuno, T., Kobayashi, T., Shirai, Y., Lennartz, M. R., Takeya, R., Sumimoto, H., and Saito, N. (2005) Isoform-specific membrane targeting mechanism of Rac during Fc γ R-mediated phagocytosis: positive charge-dependent and independent targeting mechanism of Rac to the phagosome. **J. Immunol.** **175**, 2381–2390.
- Yoshida, S., Ogura, K., Yokochi, M., Yuzawa, S., Horiuchi, M., Morioka, H., Sumimoto, H., and Inagaki, F. (2005) 1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignments of the backbone and methyl

groups of the 24 kDa tetratricopeptide repeat domain in p67^{phox}. *J. Biomol. NMR* **32**, 176.

- Tanabe, M., Rådmark, O., Watanabe, T., Shiose, A., and Sumimoto, H. (2005) Cloning of rat p47^{phox} and comparison with human p47^{phox}. *DNA Seq.* **16**, 65–68.
- Kuroda, J., Nakagawa, K., Yamasaki, T., Nakamura, K., Takeya, R., Kuribayashi, F., Imajoh-Ohmi, S., Igarashi, K., Shibata, Y., Sueishi, K., and Sumimoto, H. (2005) The superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells. *Genes Cells* **10**, 1139–1151.
- Sumimoto, H., Miyano, K., and Takeya, R. (2005) Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 677–686.
- Mizuki, K., Takeya, R., Kuribayashi, F., Nobuhisa, I., Kohda, D., Nunoi, H., Takeshige, K., and Sumimoto, H. (2005) A region C-terminal to the proline-rich core of p47^{phox} regulates activation of the phagocyte NADPH oxidase by interacting with the C-terminal SH3 domain of p67^{phox}. *Arch. Biochem. Biophys.* **444**, 185–194.
- Takeya, R., Ueno, N., and Sumimoto, H. (2006) Regulation of superoxide-producing NADPH oxidases in nonphagocytic cells. *Methods Enzymol.* **406**, 456–468.
- Ogura, K., Nobuhisa, I., Yuzawa, S., Takeya, R., Torikai, S., Saikawa, K., Sumimoto, H., and Inagaki, F. (2006) NMR solution structure of the tandem SH3 domains of p47^{phox} complexed with a p22^{phox}-derived proline-rich peptide. *J. Biol. Chem.* **281**, 3660–3668.
- Izaki, T., Kamakura, S., Kohjima, M., and Sumimoto, H. (2006) Two forms of human Inscuteable-related protein that links Par3 to the Pins homologues LGN and AGS3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 1001–1006.
- Nobuhisa, I., Takeya, R., Ogura, K., Ueno, N., Kohda, D., Inagaki, F., and Sumimoto, H. (2006) Activation of the superoxide-producing phagocyte NADPH oxidase requires co-operation between the tandem SH3 domains of p47^{phox} in recognition of a polyproline type II helix and an adjacent α -helix of p22^{phox}. *Biochem. J.* **396**, 183–192.

(2) 特許出願

H17 年度出願件数： 0 件 (CREST 研究期間累積件数： 2 件)