

「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

((公)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。

1- I:藤田、若宮、黒木グループ

自然免疫の生体防御システムは、生命体に備わった基本的な特性であり、その生存の根幹をなしている。この生体防御システムは、感染症や悪性腫瘍などの種々の疾患の予防や治療においても重要な機構である。これまでの多くの研究によって、自然免疫における異物識別と排除の分子基盤は、特異的で高度に発達したものであることが明らかになってきている。本研究では、いくつかの生体防御システムに焦点を絞り、非自己認識の分子基盤、引き続き起こる異物排除に至る応答と制御の分子機序を明らかにすることを目指している。

藤田グループは、生体防御システムの一つである補体レクチン経路に焦点を当て、その分子構成、作用機序および生理的役割の全容解明を目指している。これまでの解析により、レクチン経路は、活性化と制御のシステムをもつ高度に進化した経路であること、レクチン経路の活性低下は細菌やウイルスに対する易感染性の原因であること等を明らかにした。本年度は、昨年度に引き続き、レクチン経路の各種欠損マウスの表現型解析と再構成実験を進め、MASP-1 を介する経路(MASP-1 経路)の反応機構とこの経路の補体第二経路との接点や、これまで機能不明であったMASP-3 の働きなどを明らかにした。また、共同研究により進めて来たレクチン経路の認識分子であるフィコリンの結晶解析が終了し、糖などの異物結合様式の興味ある全容を明らかにできた。今後は、各種欠損マウスの新たな表現型の発見やヒト疾患への応用などが課題である

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、膜型コレクチン CL-P1 において、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。本年度の研究では、血管内皮細胞における RNAi 法を用いた酵母の貪食実験では、主に貪食機能に CL-P1 が関与することが明らかになった。また、上記における CL-P1 におけ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。

黒木由夫グループは、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 A(SP-A)および D (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研究を遂行している。SP-A のコラーゲン様領域に存在する Gly-X-Y 繰り返しの中断(kink)を消失させた SP-A は花束様構造を呈さず、SP-A の機能低下を来すこと、SP-D も SP-A と同様に糖鎖認識領域を介して蛋白質間相互作用で TLR2 と TLR4 の細胞外ドメインに結合すること、MBL はクッパー細胞との相互作用を介して貪食受容体の細胞膜局在を増強させマクロファージの細菌貪食を促進することを明らかにした。TLR4 細胞外ドメインにおける MD-2 結合領域を同定し、リポ多糖との相互作用による TLR4 細胞外ドメイン蛋白質の構造変化の解析を計画している。

1- II :住本、神田、伊藤グループ

本グループでの研究は、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 18 年度は、ファゴゾーム膜における食細胞 NADPH オキシダーゼ活性化に関与すると考えられる $p40^{phox}$ の作用機構についてかなりの進展があった。即ち、 $p40^{phox}$ は N 末 PX ドメインによりファゴゾーム膜へ移行するが、この PX ドメインの働きは PX ドメインが分子内結合することによって負に調節されていることを明らかにした。更に、全長型 $p40^{phox}$ を結晶化し、その3次構造決定に成功した。これらの成果を踏まえて、 $p40^{phox}$ の作用機構について平成 19 年度も更なる研究を展開したいと考えている。

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 18 年度は、低分子量 G 蛋白質 Rac が Noxa1 と結合することにより Nox1 活性化に関与すること、またこの結合は Noxa1 の膜移行とコンフォメーション変化の両者を誘導することを明らかにした。Noxo1 自体が分子内結合により負に調節されていること、および Noxo1 の活性化に翻訳後修飾が関与することを示した。また Nox3 の活性化にも Rac が関与することを明らかにした。平成 19 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。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てきた。その結果、全 MASP 欠損によりレクチン経路活性はほぼ完全に消失し、このことが易感染性を引き起こすことがわかった。また、MASP-1 で惹起される独自のルート(MASP-1 経路)は、補体第二経路と深く関連しており、その活性化機構の詳細が明らかになりつつある。第二経路の活性化は、細菌などの異物表面で自然に起こるとされていたが、その概念が大きく修正される可能性がある。3種類のMASPの中でMASP-3の機能についてはこれまでほとんど知られていなかった。本研究により、レクチン経路の異物認識に伴って活性化され、実際にレクチン経路のエフェクターであることが明らかになった。

共同研究により進めてきたフィコリンのX線結晶解析が終了し、ヒトフィコリンの立体構造とリガンド結合の分子機序が明らかになった(図1)。フィコリンの分子構造は、カプトガニの生体防御レクチンであるカキレクチン 5A と類似しており、その糖結合部位も類似していた。

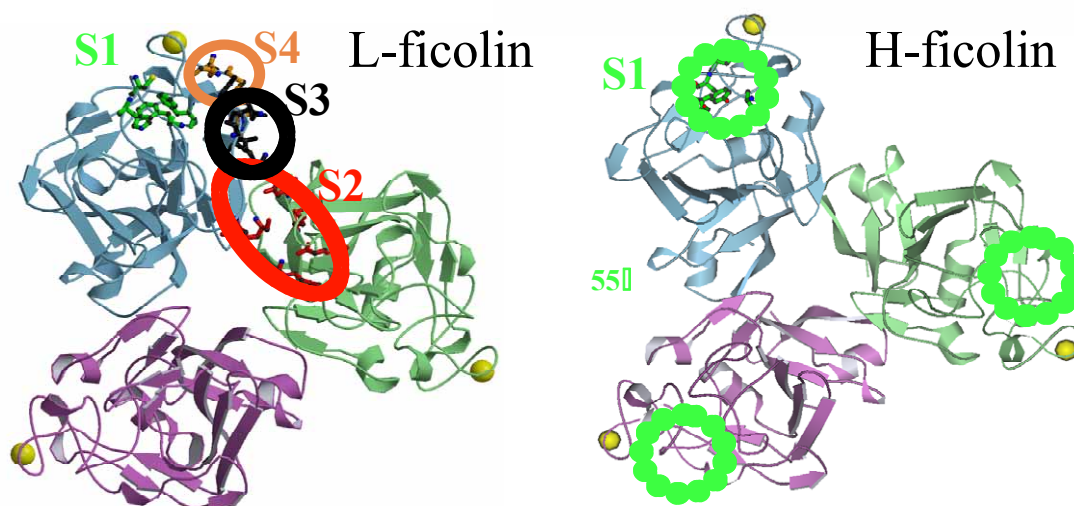


図1 認識分子ヒトL-フィコリン(L-Ficolin)およびH-フィコリン(H-ficolin)の構造と4ヶ所のリガンド結合部位(円)、およびカルシウム結合部位(黄色の球形)

しかし、L-フィコリンは、例外的に4個のリガンド結合部位をもち、その高度な認識機構と多様性が示された。フィコリン欠損マウスの解析からも、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。レクチン経路は、MBL とフィコリンを認識分子とし、3つの

MASPをエフェクター、sMAPを調節因子とするシステムであり、自然免疫における生体防御に働い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。本年度は血管内皮細胞における RNAi 実験とゼブラフィッシュでのさらなる CL-P1 の機能解析を試み、個体レベルで新たな役割をもつ可能性を見いだした。

1. 血管内皮細胞におけるCL-P1遺伝子ノックダウンによる解析

血管内皮細胞（ヒト臍帯静脈血管内皮細胞株HUVEC）における、微生物や異物に対する結合は主に、静止電荷に依存することが認められた。さらに、血管内皮細胞では、CL-P1とSR-B1の発現が多く、LOX-1、SR-A、MARCO、CR1は real time PCR の検出感度以下でほとんど発現していないことが明らかになった。さらにSiRNA実験により、ヒト血管内皮細胞において、酵母貪食の検討で、CL-P1が主に貪食機能に関与することが明らかになった。また、ヒト臍帯動脈細胞株（HUAEC）やヒト大動脈血管内皮細胞株（HAEC）においても同様に、CL-P1が主に酵母貪食機能に関与することが明らかになり、上記現象がほとんどのヒト血管において、重要な働きをしていることが推測された。

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

ゼブラフィッシュにおける CL-P1 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発達阻害、心嚢浮腫、背部の湾曲などが認められた。さらに、その表現型の回復実験では、MO と zCL-P1mRNA の同時注入によって、zCL-P1mRNA の投与量依存性に回復することが明確になり、zCL-P1 がその直接原因であることが確認された。さらにその表現型出現稚魚では、real time PCR 解析で、zVEGF mRNA の低下が認められ、MO 投与と血管増殖関連因子 mRNA の同時投与により、一部分出現型の回復を認めた。ゼブラフィッシュの初期発生における血管形成における CL-P1 の関与とそのシグナル伝達の一部に VEGF/VEGFR の経路が関与することが推測された。

黒木グループ

分泌型コレクチンの SP-A と SP-D は肺特異的コレクチンで肺胞マクロファージとの相互作用を介して、また、MBL は肝においてクッパー細胞との相互作用を介して、自然免疫機能を発揮する。まず、SP-A の構造とコラーゲン様領域に着目して Gly-X-Y の繰り返しの途中に存在する中断(kink)のないコラーゲン様領域を作成して、組換え蛋白質を発現させて、ロータリーシャドウ法による電子顕微鏡で観察したところ、この SP-A 変異体は花束様構造(Y 構造)ではなくて、bendをもたない18量体(V 構造)を呈していた。V 構造の SP-A は、リン脂質を含むリポソームの凝集能が野生型に比較して低下していた。SP-A と SP-D はともに TLR2 と TLR4 の細胞外ドメインに蛋白質間相互作用を介して結合し、特に、SP-A は TLR4/MD-2 発現細胞に対する smooth LPS の結合を抑制し、LPS

惹起細胞応答を抑制した。また、コラーゲン様領域を除去した SP-A (CRF: collagenase-resistant fragment) は、TLR4 に対する結合親和性が600倍低下しており、十分なLPS惹起炎症抑制効果が得られなかった。以上の結果は、SP-A の機能発現におけるコラーゲン様領域の重要性を証明している。MBL は、肝細胞で正合成され、血中に出現するが、肝組織の免疫染色ではクッパー細胞とも相互作用を有することが示された。そこで、クッパー細胞を分離して、MBL 存在下で *Staphylococcus aureus*、*Escherichia coli* と lipidA の取り込みをみたところ、非存在下に比べて有意に取り込みが亢進していた。これは MBL がクッパー細胞との相互作用を介してスカベンジャー受容体 A (SR-A) の細胞膜局在を増加させることによると考えられた。さらに、SR-A の局在変化の分子機構解明のために、yeast two-hybrid 法と mass spectrometry を用いて SR-A 結合蛋白質として、微小管結合蛋白質の Hook3 を同定した。Hook3 は、SR-A の degradation process に関与していることが示唆された。

TLR4 細胞外ドメインの N 末端側に着目し、TLR4 Glu²⁴-Lys⁴⁷ 領域に相当する合成ペプチド (TLR4 ペプチド) を作成し、組換え可溶性 MD-2 (sMD-2) に対する結合性を調べたところ、TLR4 ペプチドは MD-2 に濃度依存性に結合し、組換え可溶性 TLR4 細胞外ドメイン (sTLR4) と sMD-2 との結合を阻害した。さらに、TLR4 ペプチドは TLR4 発現細胞での LPS 惹起細胞応答を有意に抑制した。以上の結果は、TLR4 Glu²⁴-Lys⁴⁷ 領域が MD-2 結合領域であることを示している。また、sTLR4 の還元、S-カルボキシメチル化によって sMD-2 結合性が失われること、および、Glu²⁴-Lys⁴⁷ 領域内の Cys²⁹ と Cys⁴⁰ の Cys→Ala 変異体は、免疫沈降 TLR4 と共沈せず、LPS シグナルを伝達できないことから、Cys²⁹ と Cys⁴⁰ の MD-2 結合性における重要性が示された。sTLR4 は lipid A は結合しないが、sTLR4 は sMD-2 への lipid A 結合親和性と結合量を有意に増加させ、sTLR4-sMD-2 複合体は、TLR4/MD-2 発現細胞への LPS 結合性を阻止することによって、LPS 惹起炎症反応を抑制することが細胞レベル、および、LPS 惹起肺炎マウスモデルで示された。

2-II: 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 18 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 18 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) の活性化に必要なアダプター蛋白質である p47^{phox} と p67^{phox} は、p67^{phox} の C 末 SH3 ドメインが p47^{phox} の C 末に結合により相互作用しているが、この相互作用が両者のファゴゾームへの targeting に必要であること、また

p67^{phox}と Rac の相互作用も p67^{phox} のファゴゾームへの targeting に必須であることを明らかにした (論文準備中)。(ii) 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} による gp91^{phox} の活性化に必要であるばかりでなく p47^{phox} のファゴゾームへの targeting に重要であることを示した (論文準備中)。(iii) 食細胞 NADPH オキシダーゼの活性化には低分子量 G 蛋白質 Rac の insert region が必要であると言われていたが、実際は全く必要でないことを明らかにした (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。私達は、本 CREST により、2種の異なる蛋白質-脂質結合の測定系の改良を行い、p40^{phox} の PX ドメイン (p40^{phox}-PX) によるホスファチジルイノシトール-3-リン酸 (PI3P) との特異的な結合を、定量的に測定系の開発に成功していた。一方、細胞レベルでの p40^{phox} の測定系の改良も平行して行い、p40^{phox}-PX を GFP (green fluorescent protein) との融合蛋白質 (GFP-p40-PX) のファゴゾーム膜への移行を感度よく検出する方法を見いだしていた。これらの実験系を用いることにより、平成 18 年度は、「p40^{phox}-PX による PI3P 結合」が、PB1 ドメインが PX ドメインと分子内結合することによって負に調節されていること、その結果、「p40^{phox} のファゴゾーム膜への移行」も抑制されることを明らかにした (Honbou et al. EMBO J., 2007)。更に、全長型の p40^{phox} を結晶化し、その3次構造決定に成功した。この構造情報をもとにアミノ酸置換を導入して「PB1 ドメインと PX ドメインとの分子内結合を遮断した p40^{phox} 変異体」を作製し、PB1 ドメインが PX ドメインと分子内結合することが「全長型 p40^{phox} の PI3P 結合能」を制御しているという上記仮説を証明した (Honbou et al. EMBO J., 2007)。

(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が、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 18 年度は、以下のことを明らかにした。

(2-1) Nox1 について: 低分子量 G 蛋白質 Rac が Noxa1 と結合することにより Nox1 活性化に関与すること、またこの結合により Noxa1 の膜移行とコンフォメーション変化の両者を誘導されることが重要であること、などを明らかにした (Miyano et al., JBC, 2006)。更に、Noxo1 自体が分子内結合により負に調節されていること (Yamamoto et al. BBRC, 2007)、および Noxo1 の活性化に翻訳後修飾が関与することを示した (論文準備中)。

(2-2) 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等を平成 17 年度に示していた。平成 18 年度は、Rac が Nox3 の活性化にも関与することを明らかにし、特に、

p67^{phox} 存在下での Nox3 活性化に重要な役割を果たすことを示した (Miyano et al., 投稿中)。

3. 研究実施体制

3- I : 藤田、若宮、黒木グループ

(1) 「藤田禎三」グループ

① 研究者名

藤田 禎三 ((公) 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

(2) 「若宮伸隆」グループ

① 研究者名

若宮 伸隆 ((国) 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

(3) 「黒木由夫」グループ

① 研究者名

黒木 由夫 (札幌医科大学 教授)

② 研究項目

- ・ 分泌型コレクチンと Toll 様受容体のリガンド認識と機能発現の分子機構の解析

3- II : 住本、神田、伊藤グループ

(1) 「生化学・分子生物学」グループ

① 研究者名

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

(2) 「構造生物学」グループ

① 研究者名

神田 大輔 (九州大学 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

(1)「分子遺伝学」グループ

①研究者名

伊藤 隆司(東京大学 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. 研究成果の発表等

4- I :藤田、若宮、黒木グループ

(1) 論文発表(原著論文)

【国際】

- 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*, 176:4861-4868(2006)
- Endo Y, Takahashi M, Fujita T. Lectin complement system and pattern recognition. *Immunobiology*, 211:283-293(2006)
- Koide T, Nishikawa T, Asada S, Yamazaki C, Takahara Y, Homma D, 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*, 281(6) :11177-11185(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*, 36 : 1527-1536(2006)
- Chen X, Katoh Y, Nakamura K, Oyama N, Kaneko F, Endo Y, Fujita T, Nishida T, Mizuki N. Single nucleotide polymorphisms of Ficolin 2 gene in Behcet's disease. *J Dermatol Sci*, 43:201-205(2006)
- Ohya M, Nishitani C, Sano H, Yamada C, Mitsuzawa H, Shimizu T, Saito T, Smith K, Crouch E, Kuroki Y. Human surfactant protein D binds the extracellular domains of Toll-like receptors 2 and 4 through the carbohydrate recognition domain by a mechanism different from its binding to phosphatidylinositol and lipopolysaccharide. *Biochemistry*, 45: 8657-8664(2006)
- Endo Y, Liu Y, Fujita T. Structure and function of ficolins. *Adv Exp Med Biol*, 586: 265-279(2006)
- Yamada C, Sano H, Shimizu T, Mitsuzawa H, Nishitani C, Himi T, Kuroki Y. Surfactant protein A directly interacts with TLR4 and MD-2, and regulates inflammatory cellular responses : importance of supratrimeric oligomerization.

J Biol Chem, 281:21771-21780 (2006)

- Nakao M, Kajiya T, Sato Y, Somamoto T, Kato-Unoki Y, Matsushita M, Nakata M, Fujita T, Yano T. Lectin pathway of bony fish complement: identification of two homologs of the mannose-binding lectin associated with MASP2 in the common carp (*Cyprinus carpio*). *J Immunol*, 177(8): 5471-5479 (2006)
- Ono K, Nishitani C, Mitsuzawa H, Shimizu T, sano H, Suzuki H, Kodama T, Fujii N, Fukase K, Hirata K, Kuroki Y. Mannose-binding lectin augments the uptake of lipid A, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by Kupffer cells through increased cell surface expression of scavenger receptor A. *J Immunol*, 177:5517-5523 (2006)
- Keshi H, Sakamoto T, Kawai T, Ohtani K, Katoh T, Jang S-J, Motomura W, Yoshizaki T, Fukuda M, Koyama S, Fukuzawa J, Fukuoh A, Yoshida I, Suzuki Y, Wakamiya N. Identification and characterization of a novel human collectin CL-K1. *Microbiol. Immunol.* 50(12):1001-1013(2006)
- Mitsuzawa H, Nishitani C, Hyakushima N, Shimizu T, Sano H, Matsushima N, Fukase K, Kuroki Y. Recombinant soluble forms of extracellular Toll-like receptor 4 domain and MD-2 inhibit LPS binding on cell surface and dampen LPS-induced pulmonary inflammation in mice. *J Immunol*, 177:8133-8139 (2006)
- Uemura T, Sano H, Katoh T, Nishitani, C, Mitsuzawa H, Shimizu T, Kuroki Y. Surfactant protein A without the interruption of Gly-X-Y repeats loses a kink of oligomeric structure and exhibits impaired of phospholipid liposome aggregation ability. *Biochemistry*, 45:14543-14551 (2006)
- Iwaki D, Kanno K, Takahashi M, Endo Y, Lynch NJ, Schwaeble WJ, Matsushita M, Okabe M, Fujita T. Small mannose-binding lectin-associated protein plays a regulatory role in the lectin complement pathway. *J Immunol*, 177(12):8626-8632 (2006)
- Nishitani C, Mitsuzawa H, Sano H, Shimizu T, Matsushima N, Kuroki Y. Toll-like receptor 4 region Glu²⁴-Lys⁴⁷ is a site for MD-2 binding; importance of CYS²⁹ and CYS⁴⁰. *J Biol Chem*, 281:38322-38329 (2006)
- Takeyama K, Mitsuzawa H, Nishitani C, Shmizu T, Sano H, Kunishima Y, Takahashi S, Hotta H, Matsukawa M, Shibata K, Tsukamoto T, Kuroki Y. The 6-Fluoro-8-methoxy-quinolone, gatifloxacin, down-regulates IL-8 production in prostate cell line PC-3. *Anti-microbial Agents and Chemotherapy*, 51:162-168 (2007)
- Garlatti V, Belloy N, Martin L, Lacroix M, Matsushita M, Endo Y, Fujita T, Fontecilla-Camps JC, Arlaud GJ, Thielens NM, Gaboriaud C. Structural insights

into the innate immune recognition specificities of L- and H-ficolins. *EMBO J*, **26**(2):623-633 (2007)

- Kawai T, Kase T, Suzuki Y, Eda S, Sakamoto T, Ohtani K, Wakamiya N. Anti-influenza A virus activities of mannan-binding lectins and bovine conglutinin. *J Vet Med Sci*, **69**(2):221-224 (2007)
- Sano H, Ishino M, Krämer H, Shimizu T, Mitsuzawa H, Nishitani C, Kuroki Y. The microtubule binding protein HooK3 interacts with a cytoplasmic domain of scavenger receptor A. *J Biol Chem*, **282**:7973-7981 (2007)

(2) 特許出願

平成 18 年度特許出願:1 件 (CREST 研究期間累積件数:4 件)

4-Ⅱ:住本、神田、伊藤グループ

(1) 論文発表(原著論文)

- Miyano, K., Ueno, N., Takeya, R., and Sumimoto, H. (2006) Direct involvement of the small GTPase Rac in activation of the superoxide-producing NADPH oxidase Nox1. *J. Biol. Chem.* **281**, 21857–21868.
- 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.
- 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.
- Takeya, R., and Sumimoto, H. (2006) Regulation of novel superoxide-producing NAD(P)H oxidases. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1523–1532.
- Takeya, R., Taura, M., Yamasaki, T., Naito, S., and Sumimoto, H. (2006) Expression and function of Nox1 γ , an alternative splicing form of the NADPH oxidase organizer 1. *FEBS J.* **273**, 3663–3677.
- Minakami, R., and Sumimoto, H. (2006) Phagocytosis-coupled activation of the superoxide-producing phagocyte oxidase, a member of the NADPH oxidase (Nox) family. *Int.*

J. Hematol. **84**, 193–198.

- Uchizono, U., Takeya, R., Iwase, M., Sasaki, N., Oku, M., Imoto, H., Iida, M., and Sumimoto, H. (2006) Expression of isoforms of NADPH oxidase components in rat pancreatic islets. *Life Sci.* **80**, 133–139.
- Honbou, K., Yuzawa, S., Suzuki, N. N., Fujioka, Y., Sumimoto, H., and Inagaki, F. (2006) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of p40^{phox}, a regulatory subunit of NADPH oxidase. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **62**, 1018–1020.
- Onohara, N., Nishida, M., Inoue, R., Kobayashi, H., Sumimoto, H., Sato, Y., Mori, Y., Nagao, T., and Kurose, H. (2006) TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *EMBO J.* **25**, 5305–5316.
- Akasaki, T., Ohya, Y., Kuroda, J., Eto, K., Abe, I., Sumimoto, H., and Iida, M. (2006) Increased expression of gp91phox homologues of NAD(P)H oxidase in the aortic media during chronic hypertension: involvement of renin-angiotensin system. *Hypertens. Res.* **29**, 813–820.
- Satoh, S., Tanaka, H., Ueda, Y., Oyama, J. I., Sugano, M., Sumimoto, H., Mori, Y., Makino, N. (2007) Transient receptor potential (TRP) protein 7 acts as a G protein-activated Ca²⁺ channel mediating angiotensin II-induced myocardial apoptosis. *Mol. Cell. Biochem.* **294**, 205–215.
- Yamamoto, A., Kami, K., Takeya, R., and Sumimoto, H. (2007) Interaction between the SH3 domains and C-terminal proline-rich region in NADPH oxidase organizer 1 (Noxo1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **352**, 560–565.
- Ueyama, T., Tatsuno, T., Kawasaki, T., Tsujibe, S., Shirai, Y., Sumimoto, H., Leto, T. L., and Saito, N. (2007) A regulated adaptor function of p40^{phox}: distinct p67^{phox} membrane targeting by p40^{phox} and by p47^{phox}. *Mol. Biol. Cell* **18**, 441–454.
- Honbou, K., Minakami, R., Yuzawa, S., Takeya, R., Suzuki, N. N., Kamakura, S., Sumimoto, H. (co-corresponding author), and Inagaki, F. (co-corresponding author) (2007) Full-length p40^{phox} structure suggests a basis for regulation mechanism of its membrane binding. *EMBO J.* **26**, 1176–1186.