

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域
「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」
研究課題
「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」

研究終了報告書

研究期間 平成15年10月～平成21年3月

研究代表者：藤田 禎三
((公)福島県立医科大学医学部・教授)

§ 1 研究実施の概要

本研究の目的は、分子・原子レベルから細胞レベルまでを対象に蛋白質複合体の動的な構造変化に基づく生体防御の調節機構を解明するものである。そこで、(1) 生体が、コレクチンとフィコリン依存性に自己と非自己を規定する認識機構、引き続くセリンプロテアーゼ活性化による補体活性化メカニズムの解析、さらに(2) ファゴサイトーシスというダイナミックな細胞現象の場における NADPH オキシダーゼの活性化モデルなどから、機能発現のための複合体の構造変換の実態に迫り、その結果として感染症や自己免疫性疾患に対する生体の新しいバイオマーカーと自然免疫増強による感染防御システムの確立を目指した。

(1) 生体が、コレクチンとフィコリン依存性に自己と非自己を規定する認識機構、引き続くセリンプロテアーゼ活性化による補体活性化メカニズムの解析

生体防御反応は、自己と非自己の識別に基づく自己維持のための基本的な生命反応であり、一連の反応がタンパク質の相互作用に基づいて起こると考えられ、その機構の解明は多細胞生物の根幹をなす生体反応の一つを明らかにする点で大きな意義と価値がある。また、得られた成績はその破綻によって生じる種々の疾患の予防と治療に応用できる。生体防御反応は自然免疫と獲得免疫から成り立っており、なかでも自然免疫は獲得免疫をもたない無脊椎動物でも働いており、生物に共通する生体反応である。獲得免疫が抗体による抗原の認識とその記憶を特徴とするのに対し、自然免疫は感染微生物などの表面に保存された分子パターン (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) を認識タンパクが認識することに基づいている。近年、自然免疫のパターン認識に関わるとされる Toll 様受容体が発見され、その受容体が種々のサイトカインを誘導して T 細胞や B 細胞を活性化することが見いだされた。しかし、ショウジョウバエ Toll は自然免疫に関連した生体防御因子の発現誘導に関わってはいるが、PAMPs を直接認識しないことが判明し、哺乳類においても Toll 類似受容体が複数のコファクターと複合体を形成してパターン認識に関与する可能性があり、パターン認識の分子基盤の詳細は依然として不明である。一方、研究代表者らによって発見された補体レクチン経路は、レクチンであるマンノース結合レクチン(MBL)や Ficolin(フィコリン)が真のパターン認識分子として働くことによって惹起される。MBL は C 型レクチン(Ca イオン依存性レクチン)のなかのコレクチン (Collectin, Collagen-like lectin) ファミリーに属する。コレクチンは、共通して Ca イオン依存性に糖を認識するドメイン(糖認識ドメイン、CRD)とコラーゲン様ドメインをもち、MBL をはじめとして肺表面活性物質アポタンパク A (SP-A)、SP-D などの分泌型レクチンを含む。本研究におけるこれらレクチンの構造と認識機構の解明は、パターン認識という概念の本質を理解する上で極めて大きな意味を持つ。さらに、引き続き起こる非自己排

除までの応答反応は、タンパク質間の一連の相互作用によって進行すると考えられ、その機構と生理的意義の解明は本研究の中心課題である。レクチンと Toll 様受容体との関連性および膜型レクチンの作用機序の解明も本研究のテーマである。最終的には、その低下や破綻によって生じる疾患、たとえば感染症や悪性腫瘍などの予防と治療に役立てることが目標である。

藤田グループは、補体レクチン経路を研究対象として、その分子構成、作用機序および役割の解明を目指してきた。この経路は、認識分子である MBL と Ficolin、三種類のセリンプロテアーゼ MASP (MASP-1, MASP-2, MASP-3) および sMAP (MASP-2 短縮型タンパク) からなる複合体を中心とする経路である。認識分子による非自己の認識に伴って MASP が活性化され、活性型 MASP が補体 C4, C2, C3 を限定加水分解して補体系を活性化する。本研究ではレクチン経路のキー酵素である MASP を欠損させ、補体レクチン経路を遮断した時に生じる表現型を解析することによって、この経路の役割を明らかにしてきた。三種類の MASP 欠損マウス (MASP-1/3 欠損、MASP-2/sMAP 欠損および MASP-null マウス) を作成してその表現型を解析した結果、MASP-2/sMAP 欠損 < MASP-1/3 欠損 < MASP-null マウスの順で補体レクチン経路が低下しており、MASP-null では活性がほぼ消失していること、リコンビナント MASP の補充によって回復することが判明した。細菌やウイルス感染に対しては、MASP-null マウスで明らかな易感染性が認められ、補体レクチン経路が感染防御に深く関与することが明らかになった。また、MASP-1 は MASP-2 の活性化に関与するとともに、補体第二経路の活性化にも大きく関与していることが判明した。MASP-1/3 欠損マウスでは補体第二経路の因子である D 因子が未活性型であり、リコンビナント MASP-1 が D 因子を活性型に転換することが *in vitro* で明らかになった。これまで、補体第二経路は細菌などの異物表面上で自然に活性化され、古典的経路やレクチン経路の増幅経路と考えられてきたが、その概念を根本から見直す結果となった。さらに、sMAP は、MBL との結合において MASP と競合し、結果として補体レクチン経路を阻害することが判明し、この経路の制御因子である可能性が示された。

藤田らがレクチン経路の第二の認識分子として見いだした Ficolin については、血清型 Ficolin A と非血清型 Ficolin B の両者について欠損マウスを作製し、その生理的役割を追求した。血清型 Ficolin は、MBL 同様、補体レクチン経路を介して生体防御に働くことが示された。Ficolin の異物認識機構については、共同研究により、ヒト Ficolin のフィブリノーゲン様ドメインのリコンビナント蛋白と糖リガンドとの複合体を作製し X 線結晶回析を行ない、三種類のヒト Ficolin の立体構造とリガンド認識部位を明らかにした。

若宮グループは、膜型コレクチン CL-P1 の、エンドサイトーシス・ファゴサイトーシスに関与する分子とその役割を明らかにし、個体における本分子の生理的意義を解明す

ることで、以下の研究を行った。

① CL-P1 の異物認識とエンドサイトーシスに関わる分子の探索を酵母 two hybrid 法にて行い、CL-P1 の細胞内領域に結合する分子アダプチン μ 2 鎖を発見した。酵母の two hybrid 法と pull down assay により、in vitro での両者の結合を明らかにし、細胞での結合は細胞免疫染色法と免疫沈降法により、明らかにした。CL-P1 抗体や酸化 LDL をリガンドとしたエンドサイトーシスは、カリウムイオン欠乏条件下で阻害され、 μ 2 鎖依存性 tyrosine kinase の阻害剤添加でも阻害された。また、カベオリン依存性エンドサイトーシス阻害剤では、阻害が見られないことより、CL-P1 が関与するエンドサイトーシスは、 μ 2 鎖とクラスリン分子の関与が明らかになった。

② CL-P1 の結合ドメインの役割探索のために、CL-P1 完全長と7つの CL-P1 ドメイン欠損発現細胞を作成し、それらのリガンドに対する結合を解析した。その結果、糖鎖リガンドに関しては糖鎖結合領域が欠損した細胞群のみに、結合できなかった。微生物リガンドにおいて、大腸菌ではコラーゲン様構造領域と coiled-coil 領域が結合に重要な役割を持つことが認められた。酵母では、コラーゲン様構造領域は同様に結合に重要であったが、coiled-coil 領域は結合に抑制的に働くことが明らかになった。リガンドの生化学的特性や物理学的特性によって、CL-P1 は分子内の異なるドメインを利用して多様なリガンドと結合していることが推測できた。

③ 血管内皮細胞 HUVEC における役割探索として、本細胞での異物リガンド捕捉受容体としては、CL-P1, SR-B1, CD36, FcRn などが明らかになったが、遺伝子 knock down の結果、CL-P1 がもっとも酵母ファゴサイトーシスに関与することが明らかになった。マクロファージでは、Dectin-1 という膜型 C レクチンが酵母などの真菌ファゴサイトーシスに関与するとされているが、血管では主に CL-P1 によって酵母のファゴサイトーシスが担われていることを明らかにした。

④ 血管内皮細胞との低酸素・再酸素化刺激では、CL-P1 は 48 時間以降の遷延する発現増強が認められた。ラット総頸動脈における一過性虚血／再灌流モデルを作成すると、血管内皮部分に CL-P1 蛋白が3日後より発現増強し、7日後にピークに達し、14日で前状態に戻った。さらに、CL-P1 発現増強部位において酸化 LDL の取り込み促進が認められた。本結果により、ヒト血管内皮細胞とラット血管において、低酸素・再酸素化刺激により、レドックス系反応と考えられる、遅発性の CL-P1 過剰産生のメカニズムを明らかにした。本研究により、従来のマクロファージ脂肪蓄積からの「動脈障害モデル」と異なる、血管内皮主導型の血管損傷モデルの提示を行った。

⑤ ゼブラフィッシュ(z) CL-P1 遺伝子は、ヒト CL-P1 遺伝子と高いホモロジーと同じゲノム構成を持ち、卵では、受精後ごく初期から 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。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障害、心嚢浮腫、背部の湾曲などが認められた。硬骨魚類で初めてスカベンジャー受容体を明らかにし、胎生初期では、本分子が血管の初期形態形成に重要な役割をもつこ

とを提示し、生体防御因子である、コレクチンやスカベンジャー分子の新たな生物学的意義の可能性を提示した。

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 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ついて、その構造と機能発現の機構を明らかにすることを目的として研究を遂行した。

本研究で、肺コレクチンの SP-A と SP-D が、TLR4-MD-2 の受容体複合体に結合することを見いだした。SP-A は、非リガンドの smooth serotype LPS の TLR4/MD-2 発現細胞に対する結合を阻止することによって、smooth LPS 惹起 NF- κ B 活性化と TNF- α 分泌を抑制することを示した。SP-A のコラーゲン様ドメインを欠失してネック領域とレクチンドメイン(CRD)から成る CRF は、18量体の花束様構造を呈する SP-A と違って、溶液中では3量体を呈するが、TLR および MD-2 に対する結合親和性が、それぞれ、600倍と155倍減弱しており、smooth LPS 惹起 NF- κ B 活性化と TNF- α 分泌の抑制効果が著明に減弱していた。一方、SP-D は、SP-A と違って、非リガンドの smooth LPS ばかりでなく、rough LPS 惹起炎症反応も抑制した。SP-D 存在下では、両 serotype LPS に対する MD-2 の結合が有意に抑制され、TLR4/MD-2 発現細胞への蛍光標識 LPS の結合が阻止された。SP-D の多量体構造と機能発現の関係を明らかにするために、SP-A コラーゲン領域と SP-D CRD を持つキメラ蛋白質を作成した。野生型 SP-D は、十字架様12量体とその multimer から成り、キメラ体は、SP-A 類似の花束様多量体を呈していた。LPS 惹起 TNF- α 分泌と NF- κ B 活性化に対する抑制効果は、キメラ体で有意に減弱していた。キメラ体は、MD-2 の LPS 結合抑制効果も有意に低下し、SP-D の LPS 惹起炎症抑制機能には SP-D の十字架様12量体のその多量体構造が重要であることを示した。

肺コレクチンは、マクロファージとの直接の相互作用を介して、細胞膜の貪食受容体(スカベンジャー受容体 A およびマンノース受容体)の局在を増強させることによって細菌貪食を促進することを見いだした。貪食受容体局在増強は、新規蛋白合成によるものではなく、カゼインキナーゼ2活性化が関与していた。また、肺コレクチンは、レジオネラ菌に直接結合し、殺菌作用を示すとともに、IV 型分泌機構の Dot/Icm 分泌系によるマクロファージへの pore-forming を減少させた。さらに、肺コレクチン存在下でマクロファージに貪食されたレジオネラ菌の細胞内増殖はコレクチン非存在下に比べて有意に低下していた。酸性 pH で蛍光を発する pHrodo 標識レジオネラ菌の貪食実験から、肺コレクチン存在下での菌体貪食ではレジオネラ菌含有ファゴソームのリソソームとの融合が促進されたためと考えられた。

TLR4 の構造と機能発現の機構の解明を行った。Leucine-rich repeat 構造を有する TLR2、TLR4 および CD14のうち、TLR4 のみが MD-2 と結合し、TLR4 の N 端側 Glu²⁴-Lys⁴⁷ 領域が MD-2 との結合に必須であることを明らかにした。さらに、この領域内

の Cys²⁹と Cys⁴⁰の重要性を示した。また、組換え可溶性蛋白質の sTLR4 と sMD-2 を用いて、TLR4 は、単独では LPS に結合しないが、MD-2 と複合体を形成してはじめて LPS 結合性を獲得し、LPS 惹起シグナルを伝達できることを示した。sTLR4-sMD-2 複合体は、LPS 結合性に対して野生型 TLR4-MD-2 複合体と競合するので、in vitro および in vivo で、LPS 惹起炎症反応の抑制効果を有することが示され、臨床応用の可能性が示された。

(2) 食胞膜上で形成される活性型食細胞 NADPH オキシダーゼ複合体の形成機構

好中球などの食細胞 (phagocyte) は、病原性の微生物に対する防御において第 1 線で働く細胞であり、微生物を貪食 (食作用 ; ファゴサイトーシス) し、その時形成される食胞 (ファゴゾーム) 中で殺菌を行う。この過程で活性酸素が重要な役割を果たす。活性酸素生成は食細胞 NADPH オキシダーゼが担うが、この酵素は gp91^{phox} (別名 Nox2) と呼ばれている。本研究は、「食細胞 NADPH オキシダーゼの活性化機構」について、特に『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。また、本研究のもう 1 つの課題は、「食細胞以外の活性酸素生成型 NADPH オキシダーゼ (Nox1, Nox3, Nox4 等) の調節機構」を解明することである。

膜結合型の酵素である食細胞 NADPH オキシダーゼ (gp91^{phox}/Nox2: 膜タンパク質である p22^{phox} と膜上でヘテロ 2 量体を形成している) は、細胞休止時には不活性型であるが、微生物等の貪食時にファゴゾーム膜上で活性化されスーパーオキシド (O_2^-) を生成するようになる。

O_2^- それ自身の殺菌能は余り強くないが、 O_2^- が生成するとそれに由来する種々の活性酸素 (特にヒドロキシラジカル $OH\cdot$ や次亜塩素酸 $HOCl$ 等) が強力な殺菌剤として働くことになる (図 1)。

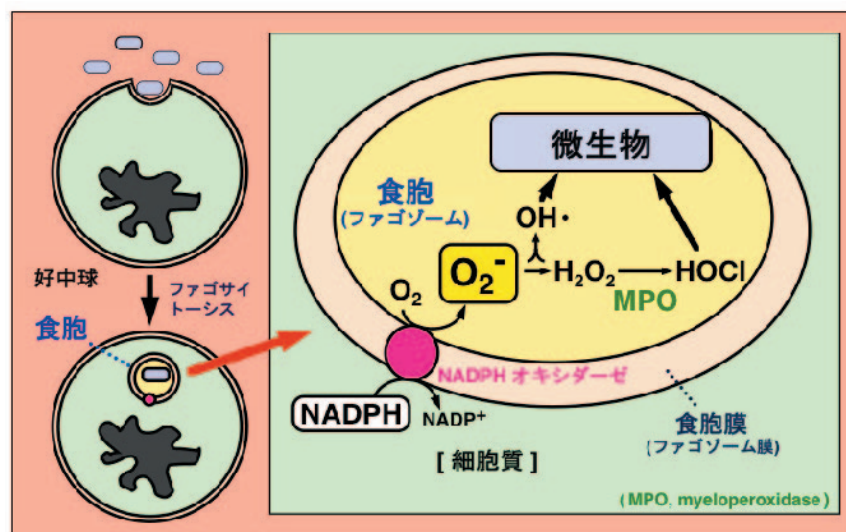


図 1 (概要)：活性酸素による殺菌

食細胞 NADPH オキシダーゼの遺伝的欠損症である慢性肉芽腫症 (chronic

granulomatous disease; CGD)の患者では、侵入微生物に対して活性酸素生成が全くできないために好中球の殺菌能が極めて弱く、重篤でしばしば死に至る感染症を幼少時より繰り返すことから、感染防御における食細胞 NADPH オキシダーゼ系の重要性は十分理解されよう。一方、不適切な活性酸素生成は組織傷害の原因となるので、オキシダーゼの活性化は厳密に制御されなければならない。実際にオキシダーゼは細胞休止時には不活性型で全くスーパーオキシドを生成しない。食細胞 NADPH オキシダーゼが活性化されるためには、細胞休止時には細胞質に存在する種々のオキシダーゼ活性化タンパク質 ($p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$, および低分子量タンパク質 Rac) が必要である(図2)。では、これらの活性化タンパク質はどのようにして膜に移行して膜結合型の酵素本体と相互作用するのであろうか。

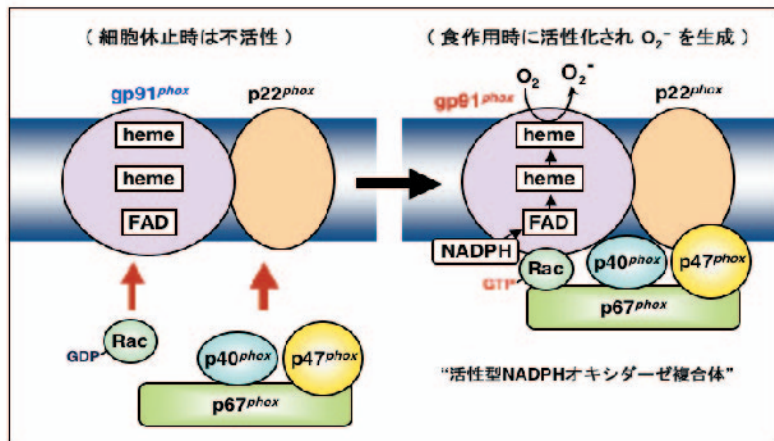


図2 (概要) . 食細胞 NADPH オキシダーゼ $gp91^{phox}$ (Nox2) の活性化

本研究では、特に、『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』に注目し、細胞質に存在するオキシダーゼ活性化タンパク質の食細胞膜への移行におけるメカニズムの解明を、細胞レベル・分子レベルで、更には原子レベルで目指した。

5年の期間に、 $p40^{phox}$ の全長型の結晶構造、 $p47^{phox}$ の2つの SH3 ドメインと $p22^{phox}$ ペプチドの複合体の NMR 構造、休止型 $p47^{phox}$ (分子内相互作用を含む) の結晶構造、などの3次構造の決定に成功するとともに、「細胞質オキシダーゼ活性化タンパク質のダイナミックな

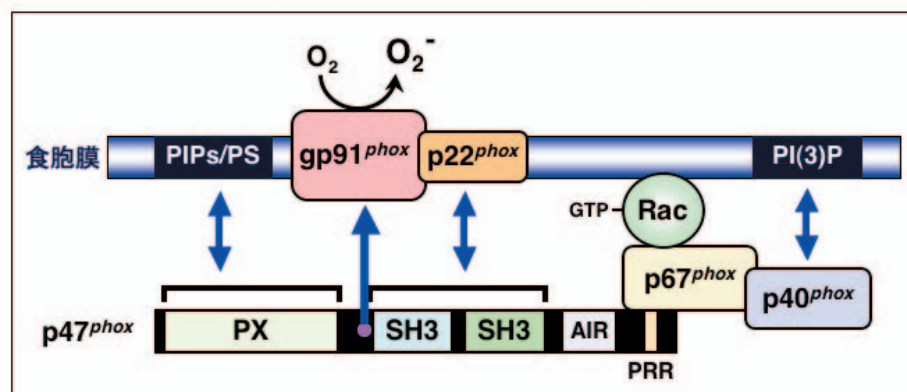


図3 (概要) . $gp91^{phox}$ の活性化に必要な $p47^{phox}$ の作用機構

コンフォメーション変化」および「膜リン脂質のダイナミックな組成変化」に伴い、種々のタンパク質-タンパク質相互作用およびタンパク質-脂質相互作用のスイッチが ON/OFF されるメカニズムについて、分子レベルおよび原子レベルでの理解を深めることができ

た。

詳細は「§3 研究実施内容及び成果」で述べるが、 $p47^{phox}$ に関して言えば、「プロリン・リッチ領域 (PRR) を介した $p67^{phox}$ との『恒常的な』相互作用」に加えて、「PX ドメインを介した膜リン脂質 (PIPs, ホスホイノシチド; PS, ホスファチジルセリン; など) との相互作用」と「2 つの SH3 ドメイン (bis-SH3 ドメイン) を介した $p22^{phox}$ との相互作用」がファゴサイトーシス時に誘導されるが、その詳細な調節機構を明らかにした。また、ファゴゾーム膜に移行した $p47^{phox}$ は、bis-SH3 より N 末の領域によって $gp91^{phox}$ を活性化することを示した。

また、 $p67^{phox}$ については、2 つの恒常的な相互作用、すなわち、「C 末 SH3 ドメインを介した $p47^{phox}$ との相互作用」

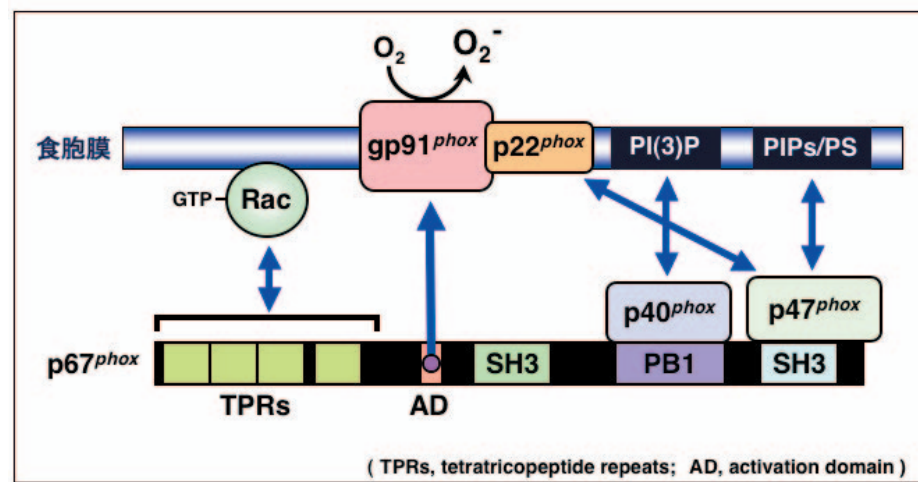


図4 (概要) . $gp91^{phox}$ の活性化に必要な $p67^{phox}$ の作用機構

と「PB1 ドメインを介した $p40^{phox}$ との相互作用」に加えて、ファゴサイトーシス時には「GTP 結合型の Rac との相互作用」が誘導される。そして最終的には activation domain (AD) が働いて $gp91^{phox}$ を活性化することを明らかにした。

一方、 $p40^{phox}$ は、PX ドメインを用いてホスファチジルイノシトール-3-リン酸 (PI(3)P: ファゴゾーム膜に豊富に存在) と相互作用し、それがファゴゾームへの移行に必須であることを示した。さらに、この PI(3)P との相互作用が、 $p40^{phox}$ の PB1 ドメインとの分子内結合により制御されていることを明らかにした。

本研究のもう1つの課題である「食細胞以外に存在する活性酸素生成型 NADPH オキシダーゼの調節機構の解明」については、まず、Nox1、Nox3、および Nox4 の細胞レベルでの再構成系を確立することに成功した。この再構成系を用いて、(1) Nox1 の活性化には、Noxo1 ($p47^{phox}$ のホモログ) や Noxa1 ($p67^{phox}$ のホモログ) に加えて、Rac が重要な役割を果たすこと、(2) Nox3 も $p22^{phox}$ と複合体を形成しており、その活性化には $p47^{phox}$ 、 $p67^{phox}$ 、Noxo1 や Rac などに関与しうること、一方、(3) Nox4 は細胞内にのみ存在し(細胞膜には target されない)、やはり $p22^{phox}$ と複合体を形成するが、Nox1~Nox3 の活性化に関与する細胞質タンパク質によっては調節されないこと、等々を明らかにした。

§ 2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

生体が、コレクチンとフィコリン依存性に自己と非自己を規定する認識機構、引き続くセリンプロテアーゼ活性化による補体活性化メカニズムの解析：

レクチンは多価の糖結合タンパクであり、生体防御レクチンは病原体などの異物表面の糖鎖を認識して凝集させ、貪食を誘導することによって自然免疫において働いていると考えられる。しかし、その認識から応答、異物排除にいたる機構の詳細は明らかではない。1992 年の研究代表者らによるセリンプロテアーゼ MASP の発見によって、新たな補体活性化経路であるレクチン経路の存在が明らかになった。このことは、古典的経路と第二経路に続く第三の補体活性化経路の存在を明らかにしたと同時に、レクチンの作用が特異的で高度な分子基盤の上に成り立っていることを示した。一方で Toll 様受容体の研究が進展し、この経路の認識やシグナル伝達経路と分泌型レクチンとの関連性、膜型レクチンの作用機序が改めて問題となった。本研究では、MBL と Ficolin (フィリコン) を認識分子とする補体レクチン経路の解析に加えて、分泌型肺コレクチンや膜型レクチンも研究対象として、自然免疫で働くレクチンに共通する、また一方では多様性をもつ、その分子基盤と役割を明らかにすることを目的とした。

藤田グループは、分泌型コレクチンである MBL とフィブリノーゲン様ドメインを機能ドメインとする Ficolin を認識分子として働く補体レクチン経路の分子基盤と役割の解明を担当した。MBL-MASP 複合体を介する補体レクチン経路の解析では、MASP 欠損マウスを作製して表現型を解析し、レコンビナント蛋白を補充して表現型を再構成することによって、構成分子の相互作用と役割を解析した。野生型マウスやヘテロ接合体マウスを対照に、ホモ接合体マウスの補体活性化能やレクチン経路の構成を生化学的・分子生物学的手法により解析した。各構成成分のリコンビナントタンパクおよびその変異体が昆虫細胞系で迅速に作製できるようになり、正確な再構成実験が可能になった。また、マウス個体を対象に細菌・ウイルスによる感染実験を施行した。当初予定した欠損マウスの作成は順調に進み、MASP 欠損という一種の疾患モデルマウスを作ることができた。解析には、C4 欠損マウスや MBL 欠損マウスなどの材料も加わり、より詳細で正確な解析が可能となった。これらの進展により、補体レクチン経路の各成分の機能と相互作用の解明が大きく前進した。なかでも、MASP による補体第二経路の活性化は予想外の大きな成果で、今後その詳細な機序と役割の解明に向けて大きな進展が期待される。一方、レクチン経路の分子構成は当初の予想を超えて多様で複雑であることも明らかになった。レクチン経路の個々の複合体の生理作用の解明は今後に残された課題である。

Ficolin は研究代表者らがヒト血清からレクチンとして発見して以来約 10 年と日が浅く、その作用機序や役割についてはまだ多くの不明な点を残している。本研究では、とくにその生理的役割を明らかにするために、欠損マウスを作成し表現型を解析してきた。マ

ウスには血清型 Ficolin A と非血清型 Ficolin B の2種類の Ficolin が知られており、本研究ではその両者について欠損マウスを作製した。本研究の期間内に Ficolin A 欠損マウスの表現型については一定の結果が得られ、MBL 同様、補体レクチン経路を介して生体防御に働くことが示された。Ficolin B 欠損マウスおよび交配から得られた Ficolin A/B ダブル欠損マウスは作製後の世代が浅く、解析は今後に残された。Ficolin は多機能性分子という見方があることから、今後、Ficolin-MASP 複合体の働きや Ficolin 欠損マウスの表現型については、生体防御の観点はもとより、アポトーシスや血液凝固などとの関連性など多方面から調べる必要がある。Ficolin の異物認識機構については、共同研究により、フィブリノーゲン様ドメインのリコンビナント蛋白と糖リガンドとの複合体を作製し X 線結晶回析を行なった。その結果、三種類のヒト Ficolin の立体構造とリガンド認識部位が明らかになった。その認識機構は MBL の CRD による糖認識機構とは異なるものの、以前報告された節足動物のカブトガニの生体防御レクチンである Tachylectin 5A の認識部位とよく似ていることも判明し、研究は脊椎動物・無脊椎動物の壁を越えて大きく広がった。現在、レクチンや補体が関与する生体防御機構の原型の解明に向けた新たな共同研究がスタートしている。

黒木グループは、分泌型肺コレクチンである SP-A と SP-D の分子基盤の解明と Toll 様受容体との相互作用の解析を担当した。SP-A と SP-D は MBL に類似した構造をもつが、MASP のようなプロテアーゼとの結合は知られていない。本研究では、肺コレクチンが Toll 類似受容体 TLR-4 と MD-2 との複合体に結合して、炎症反応抑制に関与することを初めて明らかにした。このことは、2つの異なる自然免疫系が相互に関連することを示すとともに、MBL と同じドメイン構造をもつコレクチンがまったく異なる分子基盤の上で働くことを明らかにした点で注目される。今後、可溶性リコンビナント TLR-4-MD-2 複合体を抗炎症剤に応用する新たな展開が期待される。

若宮グループは、細胞膜に局在する膜型レクチンの作用機序の解析を担当した。細胞内にもドメインをもつ新規膜型レクチンである CL-P1 の発現および機能を解析し、この分子が血管内皮細胞においてスカベンジャー受容体として働き、細胞内ドメインでエンドサイトーシス関連分子であるアダプチン μ 2 鎖と結合することによって異物取り込みの機能を担うことをはじめて明らかにした。また、ゼブラフィッシュの CL-P1 遺伝子ノックダウンでは、血管形成不全や形態形成の異常という表現型に大きな変化が観察された。現在、このメカニズムの解明とヒトに近いマウスでの解析を進めており、膜型レクチンの役割について新知見が得られるものと期待される。

このように、レクチンは異物表面の糖鎖を特異的な分子基盤に基づいて認識し、その後 MBL と Ficolin はプロテアーゼ MASP との複合体形成により、肺コレクチンは Toll 様受容体-MD-2 との結合により、また膜型レクチン CL-P1 はアダプチン分子との相互作用により、それぞれの機能を発揮することが判明した。本研究は、自然免疫においてレクチンが特異的で多様な分子基盤の上で働いていることを明らかにするとともに、生体防御をはじめとする生体反応に重要な役割を担っていることを示した。今後、疾患の治

療・予防への応用に向けた進展が期待される。

食胞膜上で形成される活性型食細胞 NADPH オキシダーゼ複合体の形成機構：

(A) 「ファゴサイトーシス時に食胞膜上で形成される活性型食細胞 NADPH オキシダーゼ複合体の形成機構」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する研究構想であった。その結果、次項「§3 研究実施内容及び成果」に述べるような成果をあげることができた。

(A-i) 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、分子細胞生物学的手法を駆使して解析する計画であった。本研究により、「食細胞に効率良く ectopic な遺伝子発現をできる実験系」を開発することに成功したので、この系によって詳細な解析が可能になった。その結果、 $p40^{phox}$ が NADPH オキシダーゼのファゴゾームへの targeting に必須の役割を果たしていることを示し、それに必要な相互作用を明らかにした。また、本研究により全長型 $p40^{phox}$ の結晶構造決定に成功したので、その情報をもとにした詳細な解析を研究構想に加え、研究を展開した。

(A-ii) 食細胞 NADPH オキシダーゼ活性化に必須のタンパク質 $p67^{phox}$ の役割についても、上記の私達が開発した「食細胞に効率良く ectopic な遺伝子発現をできる実験系」が詳細な解析を可能にした。そして、 $p67^{phox}$ のファゴゾームへの targeting に必要な相互作用を明らかにすることができた。この際、 $p67^{phox}$ と $p40^{phox}$ の相互作用が部分的あるいは完全に抑制された種々の変異体タンパク質の作製が決定的であったが、それには、伊藤グループによる分子遺伝学的手法がきわめて重要な役割を果たした。

(A-iii) 食細胞 NADPH オキシダーゼ活性化に必須なもう1つタンパク質 $p47^{phox}$ の役割についても、上記の私達が開発した「食細胞に効率良く ectopic な遺伝子発現をできる実験系」が詳細な解析を可能にした。そして、 $p47^{phox}$ のファゴゾームへの targeting に必要な相互作用を明らかにすることができた。この過程には、 $p47^{phox}$ のコンフォメーション変化が重要であるが、これを経時的に解析することが可能な FRET を用いた測定系を伊藤グループが開発している。これを用いた生細胞での解析はまだ現在進行中である。コンフォメーション変化を起こした後は、 $p47^{phox}$ は $p22^{phox}$ (膜タンパク質であり、食細胞 NADPH オキシダーゼの酵素本体 Nox2 と膜上でヘテロ2量体を形成している) と結合するが、その詳細な結合実験のデザインにおいては神田グループが重要な役割を果たした。

(B) 「食細胞以外の細胞に存在する NADPH オキシダーゼ (Nox) ファミリーのタンパク質の活性化機構」についても、生化学・分子細胞生物学的手法を駆使して、その全体

像を明らかにする研究構想であった。本研究により、Nox1、Nox3、および Nox4 の細胞レベルでの再構成系を構築できたので、それを用いた詳細な解析が可能となり、次項「§3 研究実施内容及び成果」に述べるような成果をあげることができた。

(2)実施体制

グループ名	研究代表者又は主たる共同研究者氏名	所属機関・部署・役職名	研究題目
藤田グループ	藤田 禎三	(公)福島県立医科大学・医学部 教授	補体レクチン経路の分子機構の解析
若宮グループ	若宮 伸隆	(国)旭川医科大学・医学部 教授	新規膜型コレクチンの機能解析
黒木グループ	黒木 由夫	(公)札幌医科大学・医学部 教授	分泌型コレクチンと Toll 様受容体による炎症制御とマクロファージ機能活性化機構
住本グループ	住本 英樹	九州大学大学院医学研究院・生化学分野 教授	生化学・分子生物学・細胞生物学・発生工学的手法による分子認識機構解明
神田グループ	神田 大輔	九州大学生体防御医学研究所・ワクチン開発構造生物学分野 教授	構造生物学的手法による分子認識機構解明
伊藤グループ	伊藤 隆司	東京大学大学院新領域創成科学研究科 教授	分子遺伝学的手法による分子認識機構解明

§ 3 研究実施内容及び成果

3.1 補体レクチン経路の分子機構の解析 ((公)福島県立医科大学 藤田グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

本研究は、これまでの補体レクチン経路の基礎研究を踏まえて、補体レクチン経路の分子構成、非自己認識機構、タンパク質間の相互作用に基づく応答機序および生体防御における役割を解明することを目的とした。得られた一連の成果は、レクチン経路が標的に特化した活性化機構と制御のシステムをもつ高度に発達した経路であることを示し、その分子基盤の解明に大きな前進をもたらした。同時に、レクチン経路の活性低下は細菌やウィルスに対する易感染性の原因になることなどレクチン経路の役割を *in vivo* で明らかにした。

補体レクチン経路の構成分子

MBL は、血中では 32 kDa の単量体が重合したホモポリマーとして存在する。単量体分子は、N 末端より、システインリッチ領域、コラーゲン様ドメイン、ネックドメインおよびコレクチンに共通の CRD より構成されている(図 3.1.1(A))。MBL は C 型レクチンのコレクチンファミリーに属する。コレクチンは、共通して 3 分子のサブユニット分子がコラーゲン様ドメインによって重合し、この 3 量体が N 末端のシステインリッチ領域間のジスルヒド結合によりさらに重合する。この重合体構造によって、糖リガンドに対し多価で親和性の高い結合性をもつとともに、非自己に特徴的な分子パターン PAMPs を認識していると考えられる。1992 年、研究代表者らは、ヒト MBL には新規セリンプロテアーゼ MASP が結合していること、この MBL-MASP 複合体が補体系を活性化することが明らかにした。すなわち、MBL の PAMPs への結合に伴って、未活性型 MASP が活性型に転換し、引き続き、活性型 MASP が補体 C2, C4, C3 を限定加水分解して活性化することが判明した。この経路は、「補体レクチン経路」と命名され、自然免疫の生体防御系として大きな役割を担っていることが示されてきた (Fujita et al, *Immunol Rev* 198:185-202, 2004; Fujita et al, *Mol Immunol.* 41:103-111, 2004; Matsushita et al, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:10127-10131, 2004 など)。現在では、第三の補体活性化経路として多くの教科書に記載されている。しかし、その機構の詳細やその役割、さらに他の生体反応系との関連性など多くの未解決な問題を残している。

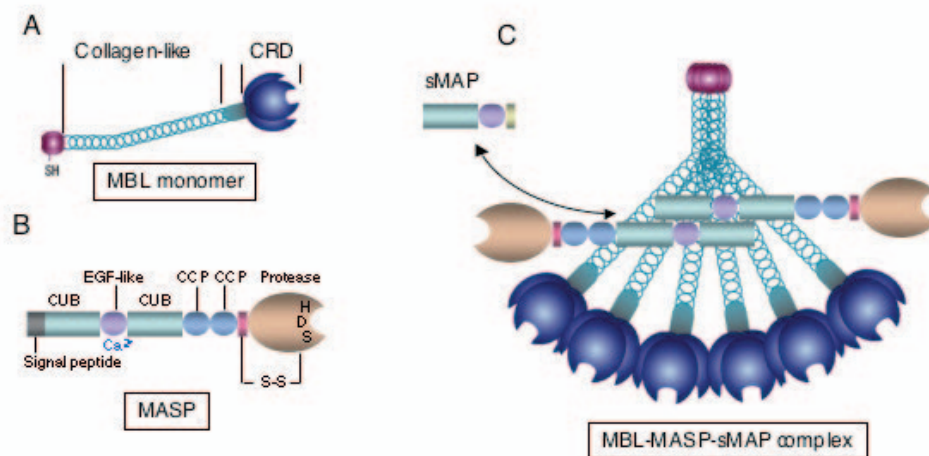


図3. 1. 1 (A):補体レクチン経路で働くレクチン MBL のドメイン構造 (B):セリンプロテアーゼ MASP のドメイン構造 (C): MBL-MASP 複合体の概略

レクチン経路のキー酵素 MASP の構造と作用機序

MASP-1(研究代表者らによって発見された MASP は現在 MASP-1 と呼ばれる)は、分子量 93 kDa で Arg448-Ile449 の間の限定加水分解によって N 末端側の H 鎖(66 kDa)と C 末端側の L 鎖(31 kDa)に分かれ、活性型 MASP になる。H 鎖と L 鎖はジスルヒド結合によって結合しており、このうち L 鎖はプロテアーゼドメインからなる。H 鎖は N 末端側から、C1r/C1s/Uegf/bone morphogenetic protein 1 (CUB)ドメイン、EGF 様ドメイン、2つ目の CUBドメインおよび2つの complement control protein (CCP)ドメインからできている(図 3.1.1(B))。現在、MASP はヒトやマウスでは三種類(MASP-1, MASP-2, MASP-3)が知られている。MASP-1 と MASP-3 は共通の *MASP1/3* 遺伝子から、また MASP-2 とその短縮型タンパクである sMAP は *MASP2* 遺伝子から、それぞれスプライシングの違いにより産生される。sMAP は、N 末端の CUB および EGF 様ドメインのみからなりプロテアーゼドメインをもたない。レクチン経路は、認識分子である MBL と Ficolin、三種類の MASP および sMAP からなる複合体を中心とする経路である。本研究では、血清試料の生化学的解析やリコンビナントタンパクを用いた再構成実験などにより、MBL-MASP-sMAP 複合体あるいは Ficolin-MASP-sMAP 複合体がどのような化学量論的構造をとるのか、解析してきた。その結果、個々の複合体は、大まかには獲得免疫で働く古典的経路の補体第一成分 C1 と類似していると推定された(Fujita et al, Immunol Rev 198:185-202, 2004)。C1複合体は、構造・機能両面で MBL-MASP 複合体あるいは Ficolin-MASP 複合体に類似しており、免疫複合体を認識する C1q にセリンプロテアーゼ C1r の2量体およびセリンプロテアーゼ C1s の2量体がそれぞれ1単位ずつ結合してできている。C1q は N 末端側にコラーゲン構造を持つという点で MBL や Ficolin に類似し、C1r と C1s は MASP/C1r/C1s ファミリーに属し MASP と構造的・機能的に類

似している。MASP, C1r および C1s それぞれの2量体の形成は、2分子の単量体間の N 末端側の2つのドメイン (CUB および EGF 様ドメイン) の相互作用による (図 3.1.1(C))。また、MASP と MBL の結合は、MASP の CUB ドメイン/EGF 様ドメインと MBL のコラーゲン様ドメインとの相互作用による。MASP の CCP ドメインは、補体系のタンパクにみられる構造で、補体 C3 や C4 との相互作用に機能すると推定される。三種類の MASP のうち、MASP-2 は C1s と同様に補体 C2 および C4 を活性化し、C3 転換酵素である C4b2a の形成に働くと考えられる。

MBL-MASP 複合体は in vivo で生体防御に働く

MASP-2 が古典的経路の C1s に似て C4 を活性化することは明らかになっていたが、MASP-1 と MASP-3 がどのような分子に作用するかについては不明であった。MASP-1 は C3 を直接活性化できるという報告もあるが、その活性は低く生理的意味を持つかどうかについては議論がある。本研究では、各 MASP の役割を明らかにするために、三種類の MASP 欠損マウスを作製した。一つ目は MASP-1 と MASP-3 の両者が欠損した MASP-1/3 欠損マウスで、MASP-1/3 遺伝子上流エクソンを NeoR カセットで置換することにより作製した (Takahashi et al, *Adv. Exp. Med. Biol.* 598:93-104, 2007)。二つ目は、MASP-2 遺伝子の第5エクソンを NeoR カセットで置換することにより、MASP-2 と sMAP が欠損した MASP-2/sMAP 欠損マウスを作製した (Iwaki et al, *J. Immunol.* 177:8626-8632, 2006)。さらに、MASP-1/3 欠損マウスと MASP-2/sMAP 欠損マウスの交配によって MASP-null マウスを作製した。MASP-1/3 欠損マウスは外見上やや小さく、生殖能力もやや劣ることが観察されたが、MASP-2/sMAP 欠損マウスおよび MASP-null マウスの表現型には明らかな異常はみられなかった。マウス血清中の MBL-MASP 複合体による補体活性化能を、マンナン結合プレート上での C4 または C3 の沈着を指標に、*Staphylococcus aureus* やザイモザンに対するオプソニン活性を C3 沈着活性により測定した。その結果、MASP-2/sMAP 欠損 > MASP-1/3 欠損 > MASP-null マウスの順で低下しており、MASP-null マウスでは、MASP の完全欠損に伴いレクチン経路はほぼ完全に消失していることが判明した (Takahashi et al, *J. Immunol.* 180:6132-8, 2008)。この活性低下は、昆虫細胞系で作製したリコンビナント MASP-1 または MASP-2 をノックアウトマウス血清に補充することによって部分的に回復した。また、MASP-1 は MASP-2 を活性化することが判明し、レクチン経路における MASP-1 の中心的な役割が示唆された。インフルエンザウィルスの鼻粘膜への投与や *Staphylococcus aureus* の腹腔内投与による感染実験では、MASP-null マウスの生存率が有意に低下していた (Takahashi et al, *Adv. Exp. Med. Biol.* 598:93-104, 2007; Iwaki et al, 論文準備中)。また、FITC 標識 *S. aureus* を腹腔に投与し、腹腔内マクロファージによる貪食を調べたところ、その貪食能が MASP-1/3 欠損マウスと MASP-null マウスで有意に低下していることが明らかになった。このように、MBL-MASP 複合体が実際に感染防御に働いていることが初めて in vivo で確認された。

MASP-1 は第二経路の D 因子を活性化する

MASP-1/3 欠損マウスとリコンビナント MASP-1 を用いた解析から、レクチン経路には MASP-2 をエフェクターとする経路 (この経路は古典経路において C1 が C4 の活性化・C3 転換酵素 (C4b2a) の形成に働く経路に似ている) の他に、MASP-1 が独自に働く新たなルートがあり、この経路が補体第二経路の活性化に密接に関連していることが判明した (Takahashi et al, 論文準備中)。はじめに、MASP1/3 欠損マウスから得られた血清では、Mg-EGTA 存在下でウサギ赤血球の溶血が起こらず、補体第二経路に異常があることが明らかになった。この異常は、第二経路で働くことが知られている D 因子を添加することによって相補されることがわかった。一方、MASP-1/3 欠損マウス血清に存在する D 因子は正常マウス由来 D 因子よりも分子量が大きく、質量分析による解析の結果、N 末端に QPRGR の5つのアミノ酸が付加されたものであることが明らかになった。すなわち、野生型マウス血清の D 因子は活性型で存在するのに対し、MASP1/3 欠損マウスの D 因子は未活性型であることがわかった。MASP1/3 欠損マウスの D 因子と同様に、昆虫細胞 (Sf21 細胞) で発現させたリコンビナント D 因子も未活性型であった。さらに、リコンビナント MASP-1 が D 因子の N 末端の5アミノ酸を切断し、活性型 D 因子に転換することが試験管内で確認された。第二経路の構成成分である B 因子は D 因子によって活性化されることが知られているが、MASP-1/3 欠損マウスでは B 因子も MASP-1 の補充によってはじめて活性化されることが分かった。これらの結果は、MASP-1 が D 因子を活性化することによって補体第二経路の活性化に働いていることを示しており、これまで考えられてきた第二経路の概念を変える発見となった。一方、研究代表者らの系統発生学的解析から、B 因子や MBL、MASP の進化的起源は古く、古典的経路が現れる以前に存在していたと推定された (Fujita et al, *Mol Immunol.* 41:103-111, 2004; Endo et al, *Immunobiology.* 211:283-293, 2006)。すなわち、MASP-1 を介するレクチン経路と第二経路との密接な関連性を示す今回の結果は、補体系の進化からも支持される。

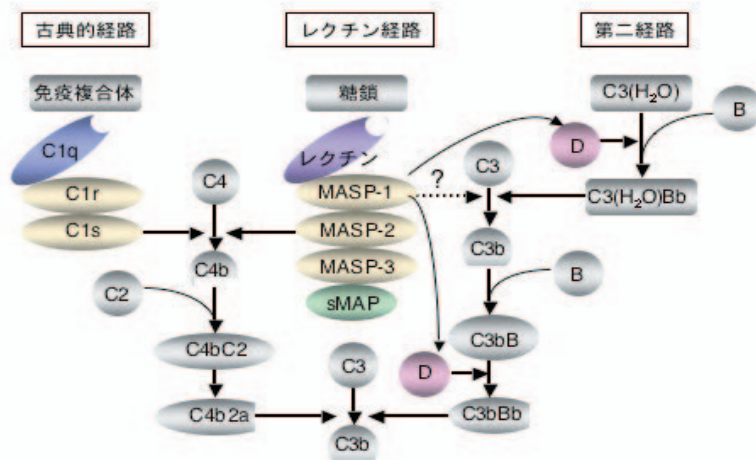


図3. 1. 2 補体活性化経路における C3 活性化までの概略

三種類の補体活性化経路は、その異物認識の方法は異なるが相互に関連して存在し、その活性化は補体系の中心成分である C3 の活性化に収束している。

sMAP はレクチン経路の制御因子である

MBL-MASP 複合体や Ficolin-MASP 複合体には、量的に MASP-2 よりも多くの sMAP が結合している。しかし、これまでその働きは不明であった。本研究では、リコンビナント sMAP と MASP-2/sMAP 欠損マウスを用いた検討から、sMAP は MBL との結合に関して MASP-2 と用量依存的に競合し、結果的にレクチン経路の活性を阻害するということを明らかにした(Iwaki et al, *J. Immunol.* 177:8626-8632, 2006)。この結果は、sMAP がレクチン経路の制御・調節に働く可能性を示唆している。古典的経路には sMAP に相当する分子がみられないことから、レクチン経路は制御系を備えた高度に組織化された経路であると考えることができる。一方、MASP-3 の作用については、MASP-2 の活性を阻害するという報告があるが、その真偽は明らかではない。本研究では、リコンビナント MASP-3 を用いた検討から、MASP-3 の活性化には *S. aureus* の菌体と MBL-A が必要であることを明らかにした (Iwaki et al, 論文準備中)。この結果は、MBL-A-MASP-3 複合体が *S. aureus* を認識することにより、MASP-3 が活性型に転換することを示している。また、MASP-null マウスへの MASP-3 の添加によって *S. aureus* への C3 のオプソニン化が起こることから、MASP-3 がレクチン経路を介して補体活性化のエフェクターとして働くことが明らかになった。しかし、MASP-3 と MASP-1 あるいは MASP-2 との相互作用については、今後の課題として残された。

Ficolin はレクチン経路の第二の認識分子である

Ficolin(フィコリン)は、1993年にブタ子宮細胞膜に存在する TGF- β 1 結合タンパクとして、単離された。しかし、実際に Ficolin と TGF- β 1 との間に相互作用があるか否かについては、その後解析がない。研究代表者らは、1996年にヒト血漿から 35kDa の分子量を持つ Ficolin のヒト相同分子 P35 を単離した。その後、P35 は L-Ficolin(遺伝子名 FCN-2)と命名された。また、類似の構造をもつ P35 関連タンパク(のちに M-Ficolin と命名された、遺伝子名は FCN-1)を単離した。第3のヒト Ficolin である H-Ficolin (Hakata 抗原、遺伝子名 FCN-3)は、別の研究グループによって単離された。Ficolin に共通する構造は、N 末端側のコラーゲン様ドメインと C 末端側のフィブリノーゲン様ドメインであり、両方で構造のほとんどを占める(図 3.1.3(A))。Ficolin は、コレクチンファミリーには属さないが、コラーゲン様ドメインをもつ点で構造上 MBL に似ている。L-Ficolin は、MBL 同様、コラーゲン様構造によって3量体を形成し、その4単位が N 末端の分子間ジスルヒド結合によって重合すると考えられる。フィブリノーゲン様ドメインは、MBL の CRD と同じように球状構造をしており、L-Ficolin の全体像は MBL に似たブーケ状である。

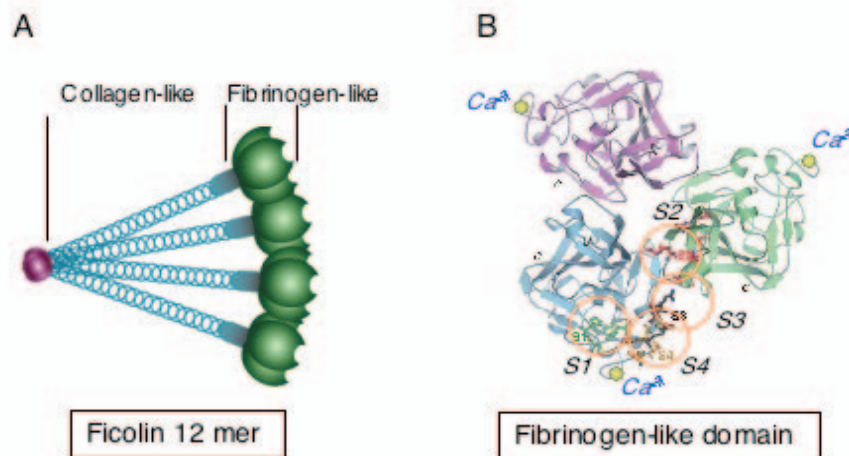


図 3. 1. 3 (A):補体レクチン経路の第二の認識分子である Ficolin の構造
(B):L-Ficolin のフィブリノーゲン様ドメインの3量体構造とリガンド結合部位(円内)

る。

Ficolin に共通する機能の一つは、N-アセチル-D-グルコサミン(GlcNAc)を認識するレクチン活性である。この活性は、フィブリノーゲン様ドメインによって発揮される。L-Ficolin は主に肝臓で産生され、血清レクチンとして血中に存在する。種々の培養細胞を用いた結果では、L-Ficolin はリンパ球系、骨髄球系および非骨髄球系の細胞で産生される。M-Ficolin は、主に末梢白血球や肺で産生されるが、血中では検出されない (Liu et al, *J. Immunol.* 175: 3150-3156, 2005)。H-Ficolin は、主に肝臓と肺で産生される。肝臓では、胆管上皮細胞と肝細胞で産生され、胆管や血中に分泌される。

肺においては、気管支上皮細胞とタイプ II 肺胞上皮細胞で合成され、気管支や肺胞に分泌される。このように、Ficolin には血清型と非血清型がある。研究代表者らは、Ficolin が MBL と同様に MASP と複合体を形成し、補体系の活性化に働くことを明らかにしてきた。本研究では、これまで明らかにしてきた血清型の L-Ficolin と H-Ficolin に加え、非血清型の M-Ficolin も MASP と複合体を形成し、レクチン経路の活性化に働くことを明らかにした (Liu et al, *J. Immunol.* 175: 3150-3156, 2005)。三種類すべてのヒト Ficolin がレクチン経路の認識分子であることが明らかになり、Ficolin は MBL と同様に、セリンプロテアーゼとの結合というユニークな特性を獲得することによって、より強力な生体防御因子へと進化したと考えられた。しかし、それぞれの Ficolin がどのような働きを担い役割を分担しているのか、依然明らかになっていない。それぞれの Ficolin の糖結合特異性を調べてみると、GlcNAc を共通して認識するものの、その結合の強さやその他の糖、たとえば GalNAc, フコース、などの認識に関してはやや異なるように見える。また、非血清型 Ficolin である M-Ficolin およびマウス Ficolin B は、GlcNAc, GalNAc に加え、シアリル N-アセチルラクトサミンに結合することをわかった (Endo et al, *Immunogenet.* 57:837-844, 2005; Liu et al, *J. Immunol.* 175: 3150-3156, 2005)。この非血清型 Ficolin のシアリ酸に対する結合活性は、糖タンパクの1つであるフィツイン (fetuin) に結合し、そのアシアロ体には結合しないことによっても示された。この結果は、非血清型 Ficolin が組織内においてシアリ化糖鎖を多量に含む分子や細胞の認識に関与する可能性を示唆しているが、その生理的意味は現在のところ不明である。さらに、マウス個体発生に伴う血清型と非血清型 Ficolin の発現場所と時期を調べた結果、その発現パターンが両方で異なることを明らかになった (Liu et al, *Mol. Immunol.* 42:1265-1273, 2005)。このことは、血清型と非血清型 ficolin の役割が異なることを示唆している。Ficolin A は10日目胎児から発現を認め、肝臓や脾臓での発現は出生時にピークに達し、その後はやや低下する。一方、Ficolin B の発現は、出生後肝臓や脾臓での発現は急速に低下し、骨髄での発現に推移する。成体マウスでの産生細胞を調べた結果、Ficolin A は肝臓の組織マクロファージである Kupffer 細胞で、Ficolin B は骨髄のミエロイド系細胞で発現していることが明らかになった。

Ficolin を認識分子とするレクチン経路の役割

Ficolin の in vivo での役割を明らかにするために、MASP の場合と同様に欠損マウスを作製して表現型を解析した。マウス Ficolin A はヒト L-Ficolin に、マウス Ficolin B はヒト M-Ficolin に相同であることが、研究代表者らの系統発生的解析から明らかになっている。本研究では、Ficolin A 欠損マウスと Ficolin B 欠損マウスの両者を作製した。また、両者の交配による Ficolin A/Ficolin B ダブル欠損マウスの作製は、Ficolin A 遺伝子と Ficolin B 遺伝子が同一染色体上にあって距離的に近いため当初困難と思われたが、繰り返しの試みによってその作製に成功した。本研究の期間内に Ficolin A 欠損マウスの解析は進めることができたが、Ficolin B 欠損マウスと Ficolin A/B ダブル欠損マウ

スの解析は、作製に時間を要し解析は今後に残された。Ficolin A 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、Ficolin A を介するレクチン経路が欠損しており、C4 活性化で測定した補体活性化能が有意に低下していた。リコンビナント Ficolin A の添加により活性は回復し、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も明らかになった(Endo et al, *Immunobiology*, 212:371-379, 2007; Endo et al, 論文準備中)。このことは、Ficolin A-MASP 複合体は MBL-MASP 複合体とは独立して存在するが、よく似た機構で働くことを示している。さらに、Ficolin A-MASP 複合体は *S. aureus* の認識と C3 オプソニン化に働いていること、ficolin A の欠損は血液による *S. aureus* の増殖阻止を減弱することが明らかになった。しかし、Ficolin の解析には1つ技術的問題点があり、マウスにおいて Ficolin A を介するレクチン経路の活性は MBL を介する経路の活性よりも極端に弱く、Ficolin A と MBL の糖認識特異性も似ていることから、Ficolin A に固有の活性あるいは機能を調べるのが困難であった。最近になって Ficolin A が認識し MBL が認識しない細菌がみつき、これを感染実験等を用いることよって Ficolin A の働きがさらに明らかになるものと期待される。Ficolin B 欠損マウスについては、発現場所である骨髄をはじめとする各種の組織や末梢血の血球数・血液像を調べたが、現時点で表現型の明らかな異常は検出されていない。

本研究では、Ficolin が生体防御に関与するというデータに加えて、Ficolin がアポトーシスを起こした細胞のクリアランスにも関与するというデータを得ている (Kuraya et al, *Immunobiology* 209:689-697, 2005)。現時点で Ficolin 欠損マウスに明確なアポトーシス異常は観察されていないが、今後、詳しい測定と個体発生や組織形成における異常について調べる必要がある。

Ficolin の結晶解析とリガンド結合部位の同定

ヒト Ficolin の立体構造とリガンド結合部位については、共同研究によりリコンビナント Ficolin と糖リガンドの結晶を作製し、X 線結晶回析を行なった。その結果、M-Ficolin の場合、Phe274, His284, Tyr300, Ala301, Tyr312 が作る疎水性のポケットと Cys270 と His284 のペプチド結合の NH 鎖との水素結合が GlcNAc 結合に働いていることが判明した (Garlatti et al, *J. Biol. Chem.* 282:35814-35820, 2007)。この GlcNAc 結合部位の近傍には Ca イオン結合部位があり、Ca イオンは Asp262, Asp264, Ser266, Ser268 の側鎖の酸素と配位結合している。GlcNAc 結合部位と Ca イオン結合部の間には1個のジスルヒド結合があり、両者の構造の安定化に寄与している。このように、Ficolin の GlcNAc 結合部位の構造は、Ca イオン結合部位の構造に大きく依存しており、Ficolin の GlcNAc 結合の Ca イオン依存性をよく説明している。

一方、L-Ficolin には4カ所の異なるリガンド結合部位が同定された (Garlatti et al, *EMBO J.* 26:623-633, 2007; 図 3. 1. 3(B))。その1カ所 (S1) は、M-Ficolin や H-Ficolin と共通の部位である。L-Ficolin の4カ所の結合部位は隣接して分子表面に

広がり、微生物やアポトーシス細胞にみられる 1,3- β -D-グルカンのような広がりを持つ構造体の中の種々のアセチル化糖や中性糖を認識できるように工夫されている。このように、L-Ficolin は多種類のリガンドを認識することができ、その働きはこれまでのレクチンにはみられなかった高度の対応性と柔軟性をもっていることが判明した。一方、Ficolin のフィブリノーゲン様ドメインの三次元構造は、カプトガニの生体防御レクチンである Tachylectin 5A やフィブリノーゲン γ 鎖の構造によく似ていることも判明した。さらに、Ficolin に共通する GlcNAc 結合部位は、Tachylectin 5A の GlcNAc 結合部位に相同であることも明らかになり、脊椎動物と無脊椎動物に共通する生体防御レクチンの認識機構が分子レベルで明らかになった。

Ficolin の細菌認識能力

以前、研究代表者らは L-Ficolin が GlcNAc 結合 BSA(ウシ血清アルブミン)の GlcNAc や複合型糖鎖中の3本鎖マンノシルコアに結合した GlcNAc に結合するが、マンノース結合 BSA や高マンノース型糖鎖あるいは混成型糖鎖には結合しないことを示した。MBL とは異なり、フィコリンは糖鎖のなかでガラクトースに隣接する GlcNAc に結合できる。H-Ficolin は、GlcNAc や N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)に結合する。また、H-Ficolin は *Salmonella typhimurium*, *Salmonella minnesota* and *Escherichia coli* (O111)などの細菌から得られたリポ多糖(LPS)をコートしたヒト赤血球を凝集させ、この凝集は GlcNAc、GalNAc およびフコースで阻害される。これまで、Ficolin は細菌や真菌の細胞壁成分に結合することを報告してきた。L-フィコリンは、グラム陽性細菌の細胞壁成分であるリポテイコ酸に特異的に結合する。また、細菌細胞壁の重要な成分であるペプチドグリカンや酵母やカビ類の主要な成分であってグルコースの β -1,3 あるいは β -1,6 結合重合体である 1,3- β -D-グルカンに結合する。実際に、L-フィコリンは serotype III group B *streptococci*, *Streptococcus pneumoniae* 11F、*Staphylococcus aureus* などのグラム陽性細菌に結合し、*Escherichia coli*、ラフ型 *Salmonella typhimurium* TV119 などのグラム陰性細菌にも結合する (Aoyagi et al, *J. Immunol.* 174:418-425, 2005)。対照的に、H-Ficolin は *Staphylococcus aureus* にも *Streptococcus pneumoniae* にも結合できないが、*Aerococcus viridans* に結合し、その増殖を阻害する。さらに、M-Ficolin が *Staphylococcus aureus* や *Salmonella typhimurium* LT2 に結合できることを明らかにした (Liu et al, *J. Immunol.* 175: 3150-3156, 2005)。このように、ヒト Ficolin 間の細菌認識特異性は異なり、このことは侵入する外来微生物や自己の異常細胞がもつ多種類の分子パターンに対応するために、個々の Ficolin が特化して役割分担したことを示唆していると考えられる。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究によりレクチン経路の分子基盤の解析が大きく前進し、補体レクチン経路の役割が生体防御に重要であることを示すとともに、他の反応系とも接点をもつ可能性が示さ

れた。MASP-1 は D 因子を活性化するが、この D 因子は脂肪細胞から分泌されることが知られている。一方で、MASP-1/3 欠損マウスは外見上少し小さく、生殖能力もやや劣る成績を得ている。これらの結果は、MASP-1/3 を介するレクチン経路が代謝などこれまで予想されてこなかったと生体反応に関わっている可能性を示唆している。今後、これまでとは異なる観点からの新たな展開が予想される。確実なことは、本研究によるレクチン経路と第二経路の密接な関連性の発見によって、補体系の概念が根本から見直される可能性が高いことである。今後、補体活性化機構に関して、再度教科書の記載が修正されることになると考えられる。

Ficolin の研究については、アポトーシス反応との関連性が指摘されており、個体発生や組織形成への関与が想定される。今後、このような観点から、Ficolin 欠損マウスの遺伝子や組織の解析が必要と考えられる。レクチン経路は血液凝固系と関連することを示唆する基礎データがあり、もう一つの生体防御系である血液凝固系との協調関係という観点からの新たな展開も可能である。また、非血清型 Ficolin によるシアル酸の認識については、現時点で生理的意味が不明であるが、腫瘍細胞など自己の異常細胞を認識する可能性があり、今後新たなアプローチが可能である。

本研究の成果は、直接に臨床応用に向けて展開できる。MBL の投与は、現在既に感染症などの治療に向けて試行されている段階にあるが、本研究の成果は、その展開に拍車をかけるものと考えられる。MBL に加え、認識分子である Ficolin、キー酵素である MASP、制御因子である sMAP が治療や予防に応用可能かどうか、リコンビナントタンパクを欠損マウスに投与してデータを集め、その可能性を探ることが今後の方向である。

一方、研究代表者らは、系統発生学的解析からレクチン経路は進化上起源が古く無脊椎動物まで遡ることを明らかにしてきた。その役割は、とくに獲得免疫をもたない、あるいは未発達の動物において大きいと考えられる。近年、レクチンやレクチン経路の関する論文の投稿が水産学のような分野から増えており、水産資源の確保と利用を目的とした解析が今後大きく展開されるものと考えられる。

3.2 新規膜型コレクチンの機能解析 ((国)旭川医科大学 若宮グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

本研究の目的は、膜型コレクチン CL-P1 の、異物認識とエンドサイトーシスや食食に関わる分子とその動的变化を明らかにし、個体における本分子の生理的意義を解明することである。はじめに CL-P1 の異物認識とエンドサイトーシスに関わる分子の探索を行い、それら関連分子に対して dominant negative 法や RNAi 法を用いて発現抑制や阻害実験を行い、細胞レベルで CL-P1 が dominant に関わる機能についての解明を行った。次に、CL-P1 のドメイン欠損タンパク発現細胞を作成し、異物認識に関わるドメイン解析を行った。一方、ヒト血管内皮細胞で低酸素・再酸素化実験を行い、細胞レベルでの CL-P1 の動態を検討し、さらにラット総頸動脈の結紮による虚血・再灌流モデルを作成し、個体レベルでの CL-P1 の機能解析を行った。また、硬骨魚類ゼブラフィッシュ

において、胎生初期胚からの CL-P1 mRNA 発現動態を検討し、その結果から CL-P1 の遺伝子 knock down を行い、発生初期の形態形成における CL-P1 の役割解明を試みた。

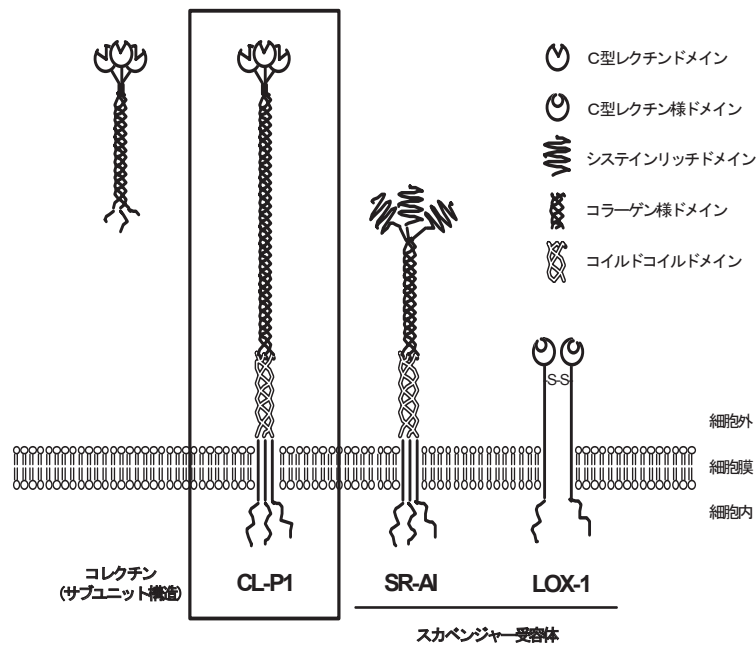


図 3. 1. 4 CL-P1 の構造

CL-P1 はN末端側から、細胞内、膜貫通、コイルドコイル、コラーゲン様、ネック、C型レクチンドメインからなるⅡ型膜蛋白質である。スカベンジャー受容体 SR-AI のシステインリッチドメインがC型レクチンドメインに置き換わった以外、類似のドメイン構造をもつ

CL-P1 結合タンパクの探索とエンドサイトーシスやファゴサイトーシスにおける役割

CL-P1 の細胞内領域に結合する分子を酵母の two hybrid 法にて探索を行った。そこで得られた候補因子において、酵母 two hybrid 法での結合実験とそれぞれのリコンビナント蛋白質を作成して、それらの蛋白質の結合実験を pull down アッセイにより行った。また、それぞれの蛋白質の局在を、CL-P1 発現細胞株 (CL-P1/CHO) において免疫蛍光染色法にて、検討した。さらに、CL-P1/CHO において CL-P1 とその結合関連分子との相互作用が、エンドサイトーシスとファゴサイトーシスにどのように関与するかを、解析した。結果として、CL-P1 の細胞内部分と結合する候補分子として、アダプチン μ 2 鎖が発見された。アダプチン μ 2 鎖と CL-P1 との結合は、酵母の two hybrid 法と蛋白質における pull down assay により、in vitro での結合を明らかにし、細胞レベルでの結合は細胞免疫染色法と免疫沈降法により、明らかにした。CL-P1 抗体や酸化 LDL をリガンドとしたエンドサイトーシスは、カリウムイオン欠乏条件下で阻害され、クラスリン依存性エンドサイトーシスの関与が考えられた。次に阻害剤添加実験では、アダプチン μ 2 鎖依存性 tyrosine kinase の阻害剤である TyrophostinA23 の添加により、エンドサイトーシスの阻害が認められた。また、カベオリン依存性エンドサイトーシス阻害剤では、エンドサイトー

シスの阻害が見られないことより、CL-P1 が関与する上記分子のエンドサイトーシスでは、アダプチン μ 2鎖とクラスリン分子の関与が明らかになった。一方、アダプチン μ 2鎖に結合する CL-P1 側の解析としては、CL-P1 細胞内ドメインに存在するエンドサイトーシスモチーフと思われる 16 番目のアミノ酸である tyrosine を置換した変異 CL-P1 では、リガンド分子の結合は認められるが、エンドサイトーシスが認められないことから、本モチーフとチロシンリン酸化がエンドサイトーシスに重要であることが明らかになった。成果としては、スカベンジャー受容体で初めてエンドサイトーシスに関与する分子アダプチン μ 2鎖を見出し、CL-P1 依存性のエンドサイトーシスでは CL-P1 の細胞内領域エンドサイトーシスモチーフにあるチロシンのリン酸化に依存することを明らかにした。

一方、ファゴサイトーシスでは、蛍光標識酵母を用いて、CL-P1 とアダプチン μ 2鎖の結合を細胞レベルで明らかにした。CL-P1 の発現増加に伴って、結合とファゴサイトーシスされる酵母数は、比例して増加した。しかしながらアダプチン μ 2鎖はその発現レベルが増加しても、結合する酵母数に変化が無く、ファゴサイトーシスされる酵母数のみに増加が認められた。また、siRNA をもちいた、関連候補分子の遺伝子 knock down により、アダプチン μ 2鎖やクラスリン H 鎖の発現抑制を行うと、酵母の結合は阻害されないが、ファゴサイトーシスのみ阻害される知見を得ている。ファゴサイトーシスにおいて、クラスリン分子やアダプチン μ 2鎖が関与するかどうかについては、現時点ではコンセンサスを得られた知見はないので、さらに他のアダプチン分子の遺伝子抑制実験やエンドサイトーシスにおける上記分子の遺伝子抑制実験を行い、それらの関与を明らかにする必要があると考えている。

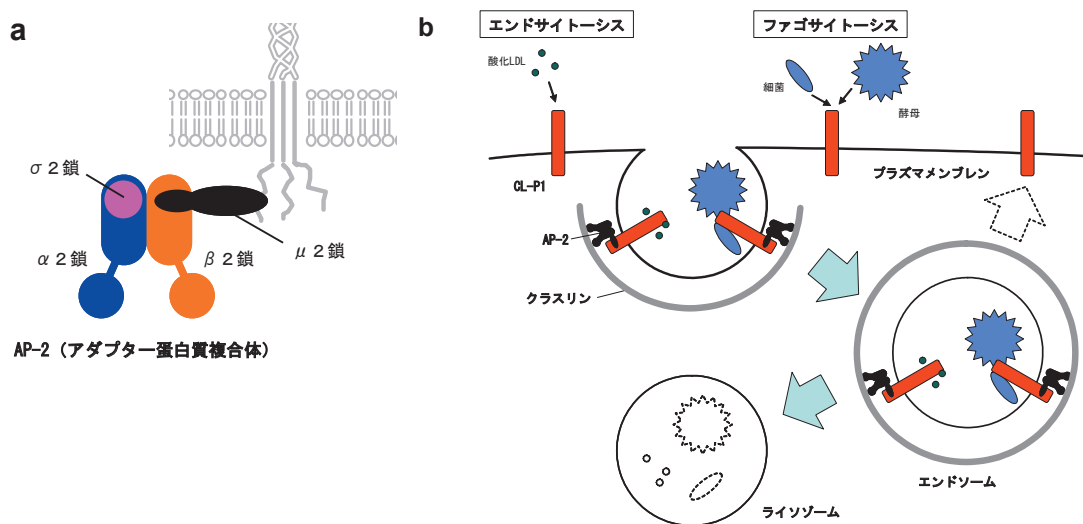


図 3. 1. 5 CL-P1 によるエンドサイトーシス、ファゴサイトーシスのモデル

a : CL-P1 結合蛋白質として見出されたアダプチン2の構造

b : CL-P1 によるエンドサイトーシスはアダプチン2、クラスリン依存性であるが、ファゴサイトーシスに関してはさらなる検証が必要

異物認識に関わる CL-P1 のドメイン解析

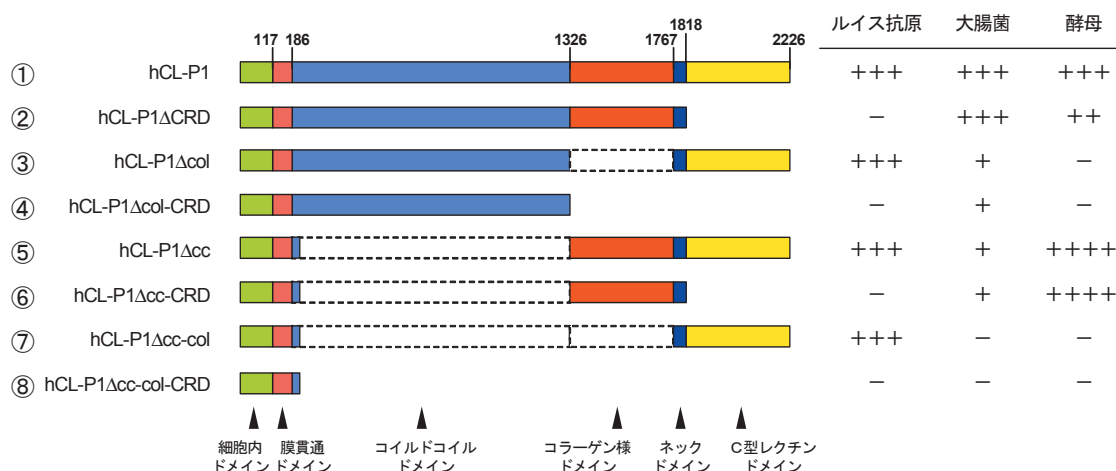


図 3. 1. 6 CL-P1 ドメイン欠損発現細胞の構造と抗原に対する結合性

①～⑧の8種類のドメイン欠損発現細胞 (CHO 細胞) の CL-P1 コンストラクトと、ルイス抗原、大腸菌および酵母に対する結合性

完全長と7つの CL-P1 ドメイン欠損発現細胞を作成し、それらのリガンドに対する結合を解析した。その結果、糖鎖リガンド (ルイス抗原) に関しては糖鎖結合領域が欠損して細胞群のみに、ルイス抗原は結合できなかった。また、微生物リガンドにおいては、大腸菌ではコラーゲン様構造領域と coiled-coil 領域が欠損すると、おもに結合の減少が認められた。一方、酵母では、同様に、コラーゲン様構造領域が結合に重要であることが認められたが、coiled-coil 領域は結合に抑制的に働くことが明らかになった。CL-P1 はリガンドの物理学的特性や生化学的特性によって、分子内の異なるドメインを利用し、多様なリガンドと結合していることが明らかになった。スカベンジャー受容体としての結合については、結晶解析による構造学的研究からは、糖鎖結合領域の関与が示唆されているが、現時点では酸化 LDL に対する結合や取り込みについて、CL-P1 のどのドメインが決定的に関与するか、はっきりした結果を得られておらず、詳細な検討が待たれる。

血管内皮細胞における、CL-P1 の微生物認識とファゴサイトーシスにおける役割

ヒト正常組織の生理的細胞である血管内皮細胞株を用いて、酸化 LDL や微生物に対する異物に対する結合・ファゴサイトーシス実験を行い、CL-P1 が生理的条件下でどのように関与するかを検討した。酵母を用いた、微生物に対する結合阻害実験では、それらの結合に関わる候補因子である、スカベンジャー受容体や補体受容体の mRNA 発現を、real time PCR による定量解析を行った。つぎに細胞レベルでこれらの遺伝子 knock down を行い、どの因子がもっとも、認識やファゴサイトーシスに関与するのかを検討した。さらに、CL-P1 においては異なる個体から得られた複数の血管内皮細胞を用い

て、遺伝子 knock down を行い、機能阻害の程度を比較した。また、血清非存在下と血清存在下での、酵母ファゴサイトーシス実験を行い、血清因子の関与についての検討を行った。血管内皮細胞では、HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) を主に用いて、認識やファゴサイトーシスに関する検討を行った。HUVEC では、リガンド阻害実験により酵母が電荷依存的に結合することが、明らかになった。また、ファゴサイトーシスについては、cytochalasin D や Wortmannin により阻害がかかり、マクロファージで見られるファゴサイトーシス同様、アクチンの重合が関与する細胞骨格の変化が必要であると考えられた。つぎに、HUVEC に発現するリガンド捕捉受容体としては、real time PCR 法による mRNA 発現量では、CL-P1, SR-B1, CD36, FcRn などが比較的多く発現していることが明らかになった。これらの遺伝子 knock down の結果、酵母ファゴサイトーシスに CL-P1 がもっとも関与することが明らかになった。さらに、異なる個体から得られた複数の HUVEC 細胞においても同様の関与が認められた。また、その他の血管内皮細胞株である、HUAEC (human umbilical artery endothelial cells) や HAEC (human aortic endothelial cells) においても、同様に CL-P1 の関与が認められた。一方、血清添加実験では、血清中に存在する補体因子が、血管内皮細胞の酵母ファゴサイトーシスを亢進させることが明らかになった。上記の結果から、ヒトにおいては、血管内皮細胞では、おもに CL-P1 が関与して酵母ファゴサイトーシスが行われることが明らかになった。マクロファージでは、Dectin-1 という膜型 C レクチンが酵母などの真菌ファゴサイトーシスに関与する報告があるが、血管において酵母ファゴサイトーシスに第一義的に関与する分子の最初の報告である。個体レベルでの CL-P1 の関与を調べる実験が待たれる。

血管内皮細胞や血管に存在する CL-P1 分子の動態や機能についての役割

血管内皮細胞において、低酸素・再酸素化刺激における、CL-P1 と他のスカベンジャー受容体との、動態解析を行った。それらの因子は、mRNA と蛋白質を、定量 PCR とウエスタンブロット法により、経時的変動を解析した。また、ラットでは、総頸動脈の一定時間クリッピングとその後開放処置を行い、一過性虚血／再灌流モデルを構築した。処置後切除された、ラット総頸動脈血管において、CL-P1 と他のスカベンジャー受容体 mRNA の定量解析を行った。また、切除血管において、免疫組織染色にて、CL-P1 蛋白質の比較検討を行った。さらに、処置血管と非処置血管において、総頸動脈部分にクリッピングを行い、内部に蛍光標識された酸化 LDL を注入し、血管部位での酸化 LDL 取り込みを比較検討した。結果として、血管内皮細胞では、低酸素・再酸素化刺激によって、LOX-1 は 24 時間を小さなピークとする一過性の発現増強と消退が認められ、CL-P1 では、48 時間以降の遷延する発現増強が認められた。ラット個体モデル実験では、総頸動脈血管において、CL-P1 では再灌流 48 時間後から mRNA の上昇がみられ、さらに免疫組織染色では血管内皮相当部分に CL-P1 が 3 日後から発現が亢進し、7 日後にピークに達し、14 日で前状態に戻った。さらに、本 CL-P1 発現増強部位において酸化 LDL の取り込み促進のおこることが明らかになった。一方、LOX-1 は、

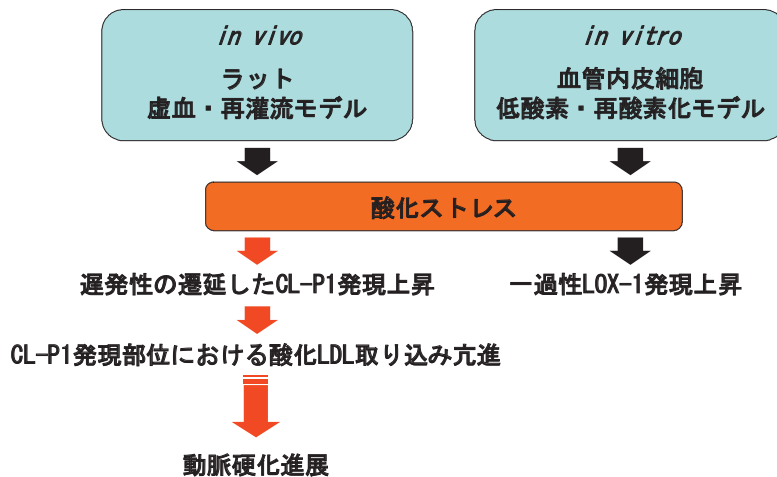


図3. 1. 7 血管内皮主導型の新しい血管損傷モデル

マクロファージの脂肪蓄積に始まる動脈傷害モデルとは異なる、レドックス系反応を介した CL-P1 による血管損傷モデル

mRNA レベルでの一過性の弱い発現が見られたが、その後発現は完全に消退した。これらの結果により、ヒト血管内皮細胞とラット血管において、低酸素・再酸素化刺激により、レドックス系反応と考えられる、遅発性の CL-P1 過剰産生のメカニズムを明らかにした。さらに、CL-P1 発現部位に一致して、酸化 LDL の取り込み亢進がおこることを提示し、生体での虚血・再灌流刺激から動脈硬化進展に関与すると、新たな臨床病態進展カスケードを提示した。このことは、現時点では、スカベンジャー受容体の機能が生体防御におもに関与するとされているが、本研究により、CL-P1 という分子が、従来のマクロファージの脂肪蓄積に始まる、動脈障害モデルとは異なる、血管内皮主導型の新しい血管損傷モデルの提示を行った。

ゼブラフィッシュにおける CL-P1 分子の役割

ゼブラフィッシュから、mRNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作成し、データベースで得られた情報を元に、ゼブラフィッシュ CL-P1 遺伝子(zCL-P1)のクローニングを行った。つぎに、zCL-P1 遺伝子を CHO 細胞に導入して、遺伝子発現実験を行い、微生物や酸化 LDL に対しての、結合実験を行った。ゼブラフィッシュ卵では、受精直後から時間をおいて mRNA を採取し、zCL-P1 やその他関連因子の real time PCR を行い、遺伝子発現動態を検討した。つぎに、初期稚魚において、zCL-P1 mRNA や蛋白質レベルでの局在を、in situ hybridization や免疫組織染色にて、解析した。さらに、zCL-P1 遺伝子に対する Morpholino oligonucleotide(MO)を作成し、遺伝子 knock downを行った。MO によっておこる形態形成の変化を観察し、さらに血管染色と血管造影によって、血管形成不全の検討を行った。さらに、MO と zCL-P1 mRNA の同時注入によって、表現型の回復実験を行った。その際に、抑制された zCL-P1 の蛋白質の回復をウエスタンブ

ロットにより解析した。つぎに、MO 投与されたゼブラフィッシュにおいて、他の血管増殖に関わる因子の動態を、real time PCR を用いて比較検討した。さらに、関与すると推測される因子に mRNA を作成し、再び MO と同時にマイクロインジェクションし、表現型の回復を観察した。

zCL-P1 遺伝子は、ヒト CL-P1 遺伝子とアミノ酸レベルで約 51% の高いホモロジーと同じゲノム構成を持つことが明らかになった。また、zCL-P1 強制発現細胞では、微生物や酸化 LDL に対してヒト CL-P1 と同等の結合機能を有することを認めた。ゼブラフィッシュ卵では、受精後ごく初期から 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。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、表現型は、MO と zCL-P1 mRNA の同時注入によって、表現型が回復されることが認められ、zCL-P1 がその直接原因であることが確認された。本研究によって、硬骨魚類で初めてスカベンジャー受容体の存在を明らかにし、発生初期において、CL-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を示した。ゼブラフィッシュを用いた CL-P1 遺伝子 knock down 実験から、胎生初期では、本分子が血管の初期形態形成に重要な役割をもつことを提示し、生体防御因子である、コレクチン・スカベンジャー分子の新たな生物学的意義の可能性を明らかにした。

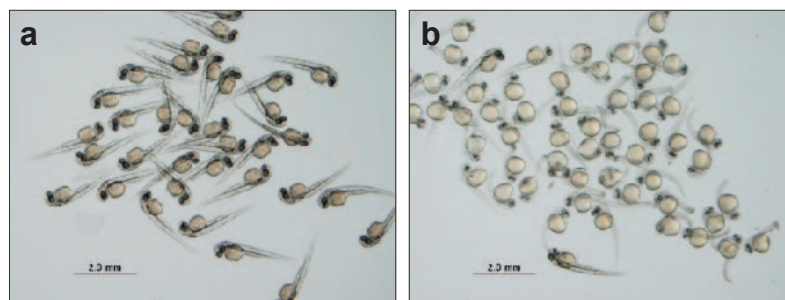


図 3. 1. 8 ゼブラフィッシュの発生における CL-P1 遺伝子発現抑制による形態変化

a: コントロール群の正常な形態

b: アンチセンスオリゴヌクレオチドインジェクション群の異常な形態

(2) 研究成果の今後期待される効果

膜型コレクチン・スカベンジャー受容体としての機能をもつ分子 CL-P1 において、CL-P1 細胞内領域結合タンパク質の検索から、アダプチン μ 2 鎖を発見した。本分子を利用して、CL-P1 はクラスリン依存性に、エンドサイトーシスを行うことが明らかになった。現在、生理的な CL-P1 発現細胞である血管内皮細胞において、アダプチン μ 2 鎖やクラスリン H 鎖遺伝子 knock down 実験により、エンドサイトーシスばかりでなく、ファゴサイトーシスにも CL-P1/アダプチン μ 2 鎖/クラスリン H 鎖系が関与する知見を得ている。ス

カベンジャー受容体や膜型 C 型レクチンにおける異分子取り込みのメカニズムの解明を、CL-P1 分子を基本として、詳細に解明することを考えている。

個体レベルでの研究では、ゼブラフィッシュの系で、大展開があったために、新たな実験系を組んでいる。予備実験では CL-P1 knock down した稚魚に関する、血管増殖関連因子の real time PCR 解析で、zVEGF mRNA の低下を発見している。現在、稚魚に MO 投与と、種々の血管増殖関連因子 mRNA の同時投与を行い、どの分子がその回復に関与するのか、それとも、CL-P1 自体に直接作用があるのかを、検討している。さらに、ゼブラフィッシュの発生段階で、CL-P1 分子の何処に結合して、内部にシグナル伝達されるのか、細胞外部分の一部欠損 CL-P1 mRNA を回復実験に用い、どのドメインが表現型正常化に重要であるかの検討を行っている。また、同様に、全 zCL-P1 の可溶性部分の抗原カラムを作成し、結合する分子を探索し、血管形成に関わる宿主因子の同定を大きな目標としている。一方、遺伝子ノックマウスが、ヘテロマウスまで作成できているので、よりヒトに近い個体レベルでの、生理的な意義解明のための、詳細な検討を今後予定している。

3.3 分泌型コレクチンと Toll 様受容体による炎症制御とマクロファージ機能活性化機構 ((公)札幌医科大学 黒木グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

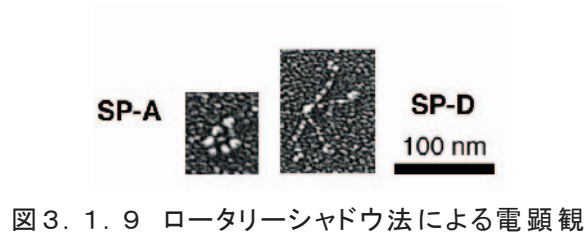
黒木グループの研究は、分泌型コレクチンの肺サーファクタント蛋白質(SP-A と SP-D)とマンノース結合レクチン(MBL)、および、Toll 様受容体(TLR)の構造と機能発現の機構を解明することを目的として、遂行された。SP-A と SP-D のノックアウトマウスは、野生型マウスに比較して、リポ多糖(LPS)惹起肺炎症が有意に強く、肺泡マクロファージによる細菌クリアランスも有意に低下していることが示されて、肺コレクチンの炎症と細菌クリアランスにおける役割が注目されているが、その分子機構は不明であった。一方、LPS 受容体として働く TLR4 は、その機能発現に MD-2 との相互作用が必須であるが、TLR4 の MD-2 結合領域は不明であった。

本研究では、【I】コレクチンの構造と TLR との相互作用による炎症制御 【II】コレクチンによる細菌貪食促進と感染防御 【III】TLR4 の構造と機能発現 という3テーマについて研究を遂行し、以下の成果を得た。

【I】コレクチンの構造と TLR との相互作用による炎症制御

肺コレクチンの SP-A と SP-D は、コラーゲン様ドメインと C 型レクチンドメイン(carbohydrate recognition domain, CRD)を有するのが構造上の大きな特徴である。SP-A は、23 回の Gly-X-Y 繰り返しを持ち、その中間付近に Gly-X-Y の中断(kink)がある。一方、SP-D は 53 回の Gly-X-Y 繰り返しと長いコラーゲン様構造を有し、Gly-X-Y の中断がない。その結果、SP-A がコラーゲン様ドメインの曲がり(bend)を持つ花束様の18量体を形成し、SP-D は bend のない長いコラーゲン様ドメインを持つ十字架様の12量体を形成している(図 3.1.9)。

SP-A コラーゲン様ドメインの G⁴⁴EMP⁴⁷CPPG⁵¹ND を GEMGND とした SP-A^{DEL}と GEMGPCGPPGND とした SP-A^{INS} の Gly-X-Y 中断を持たない2種類の SP-A 変異体 cDNA を



作成して、バキュロウィルスー昆虫細胞系で蛋白質を発現し、マンノースアフィニティ精製蛋白質のロータリーシャドウ法による電顕観察を行ったところ、野生型 SP-A で見られるような花束様構造(Y 構造)は観察されず、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、リン脂質結合能は野生型 SP-A と同程度有していたが、リン脂質を含むリポソームの凝集能は野生型に比較して低下していた。このことは、SP-A の Gly-X-Y 繰り返し中断が SP-A 花束様構造の形成に重要で、その機能に影響を与えることを示している。

SP-A と TLR4 および MD-2 との相互作用の有無を検討するために、組換え可溶性 TLR4 細胞外ドメイン (Glu²⁴-Lys⁶³¹, sTLR4) (His tag 付加)と組換え可溶性 MD-2 (sMD-2) (Histag 及び V5tag 付加)をバキュロウィルスー昆虫細胞系で発現させ、ニッケルカラムにより蛋白質を精製した。精製 sTLR4 および sMD-2 をマイクロタイターウェルに固相化し、種々の濃度の SP-A と反応させると、SP-A は濃度依存性に、また、Ca²⁺依存性に固相 sTLR4 および sMD-2 に結合した。SP-A CRD の Thr¹⁸⁴-Gly¹⁹⁴を認識する単クローン抗体は SP-A と sTLR4 および sMD-2 との結合を阻止したので、SP-A の CRD が結合ドメインと考えられた。また、ビアコアにより SP-A と sTLR4 および sMD-2 の結合性を確認し、固相化 SP-A に対してする sTLR4 および sMD-2 の解離定数は、それぞれ、 1.96×10^{-8} M 及び 3.28×10^{-8} M であった。また、ログアンドプロットによる解析から、SP-A は N-glycosidase F 処理 sTLR4 と sMD-2 に結合したので、SP-A と sTLR4 および sMD-2 との結合は蛋白間相互作用による結合であることが示唆された。さらに、LPS 惹起炎症反応に対する SP-A の影響を調べた。SP-A は、肺泡マクロファージからの O26:B6 LPS (smooth serotype)惹起 TNF- α 分泌と TLR4/MD-2 トランスフェクト細胞での O26:B6 LPS 惹起 NF- κ B 活性化を抑制したが、Re595 LPS (rough LPS)惹起細胞応答は抑制しなかった。TLR4/MD-2 発現細胞に対する Alexa 標識 LPS の結合を調べたところ、SP-A は smooth LPS の結合のみを抑制し、細胞応答に対する抑制と一致していた。以上の結果は、SP-A が TLR4/MD-2 と結合し、SP-A のリガンドではない smoothLPS と TLR4/MD-2 受容体複合体との相互作用を変化させることによって、LPS 惹起炎症反応を抑制することを示唆している。また、コラゲナーゼ処理によって得られたコラーゲン様ドメイン欠失 SP-A(collagenase-resistant fragment, CRF)を分離し、その抗炎症機能を調べた。CRF は、sTLR4 と sMD-2 に対する解離定数(Kd)が、それぞれ、SP-A の 600 倍と 155 倍高くなっており、smooth LPS 惹起 TNF- α 分泌抑制効果と NF- κ B 活性化阻止効果が SP-A に比べて著明に現弱していることが判明した。ゲル濾過による解析で、CRF は多量体構造を呈していないので、以上の結果は、CRD が SP-A

の機能ドメインであるにも関わらず、その高次多量体構造が機能発現に必須であることを示している。

SP-D も sTLR4 と sMD-2 に CRD を介して結合することを見いだした。sTLR4 と sMD-2 を昆虫細胞で共発現し、ゲル濾過により、分子量 110 kDa の sTLR4-sMD-2 複合体を分離し、SP-D との結合性を調べた。ビオチン化 SP-D の avidin-agarose による pull-down assay、および、抗 V5 抗体による免疫沈降により、SP-D は、sTLR4-sMD-2 複合体に結合することが判明した。次に、LPS 惹起 TLR4 シグナル伝達と TNF- α 分泌に対する SP-D の影響を調べた。SP-D は、SP-A とは違って、そのリガンドである rough serotype LPS (Re595 および Rc) と非リガンドの smooth serotype LPS (O26:B6, O111:B4) の異なる serotype の LPS の惹起する TNF- α 分泌促進と NF- κ B 活性化を有意に抑制した。また、sMD-2 の smooth LPS 及び rough LPS に対する結合を SP-D が有意に抑制し、TLR4/MD-2 発現細胞への Alexa 標識 LPS (両 serotype) の結合は SP-D 存在下で阻止された。以上の結果は、SP-D が TLR4/MD-2 複合体に結合し、LPS-受容体相互作用を変化させることにより、LPS 惹起炎症反応を抑制することを示している。

SP-D の多量体構造と機能発現の関係を明らかにするために、SP-A コラーゲン様領域と SP-D CRD を持つキメラ蛋白質 (図 3.1.10(A)) を CHO-K1 細胞を用いて発現させ、精製した。また、SP-D をコラゲナーゼ処理して Neck 領域と CRD から成る CRF を得た。電顕観察 (図 3.1.10(B)) で、SP-D が十字架様 12 量体とその multimer から成り、キメラ体は SP-A 類似の花束様多量体を含んでおり、CRF は多量体を呈していなかった。

O26:B6 LPS、Rc LPS 及び Re595LPS 惹起 TNF- α 分泌と NF- κ B 活性化に対する SP-D、キメラ体と CRF の影響を調べたところ、CRF の抑制効果はほとんど認められない

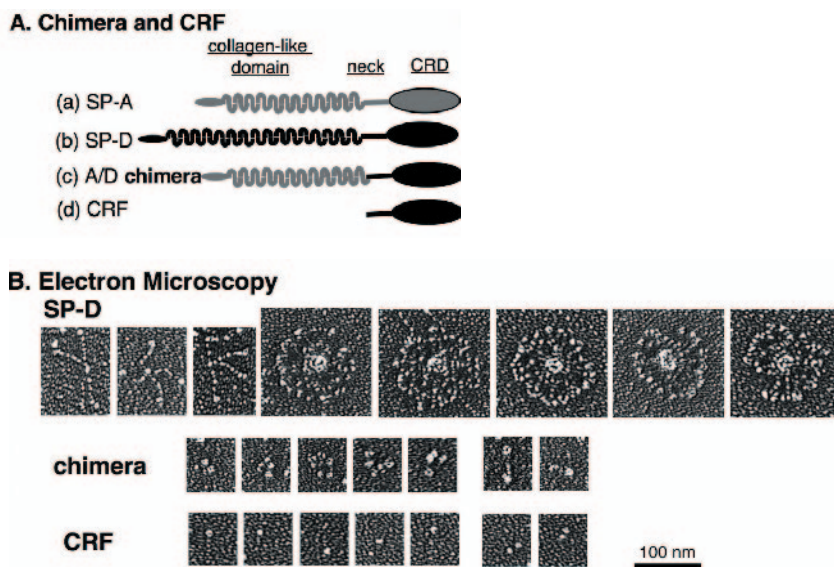


図 3. 1. 10 SP-A/SP-D キメラ体と CRF

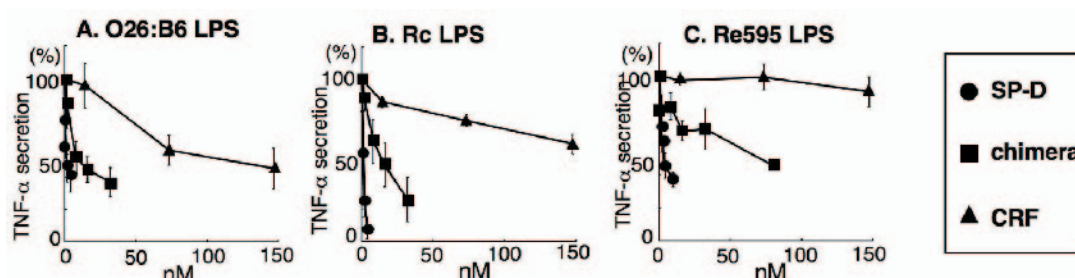


図 3. 1. 11 SP-A/SP-D キメラ体と CRF による抗炎症効果

か、著しく減弱していた(図 3.1.11)。キメラ体は LPS 惹起炎症反応を抑制はしたが、SP-D に比較して明らかにその効果は減弱していた。キメラ体は SP-D に比較して MD-2 の LPS 結合抑制能も劣っていた。以上の結果は、SP-D の LPS 惹起炎症抑制機能には SP-D の十字架様 12 量体とその多量体構造が重要であることを示している。

【II】コレクチンによる細菌貪食促進と感染防御

肺コレクチンは、肺泡マクロファージによる細菌貪食を促進する。これまでは、オプソニン効果としての取り込み促進が報告されてきたが、本研究により新たな貪食促進の機序が明らかになった。

Mycobacterium avium (非定型抗酸菌) による呼吸器感染症は高齢者や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 はマクロファージによる FITC 標識 *M. avium* 貪食を促進した。肺コレクチンは、 Ca^{2+} 依存性に *M. avium* に結合し、細菌の凝集を惹起することも明らかにしたが、結合性を失う EDTA 存在下でも、また、結合性を失っている SP-A 変異体も菌体貪食を促進したので、肺コレクチンによる *M. avium* 貪食促進はオプソニン効果によるものではないことが明らかとなった。*M. avium* 貪食促進は、ザイモサンやリポアラビノマンナンによって阻止されるので、その受容体であるマンノース受容体(MR)のマクロファージ細胞表面の発現を調べたところ、肺コレクチンとマクロファージとの共培養により、マクロファージ細胞膜上の MR 局在が増加していることが判明した。

さらに、SP-A が肺泡マクロファージによる *Streptococcus pneumoniae* (肺炎球菌) の貪食を促進することを示した。SP-A が *S. pneumoniae* に結合できない条件下、および、SP-A とマクロファージとの preincubation/washing でも、細菌貪食促進が観察されたこと、また、スカベンジャー受容体 A (SR-A) ノックアウトマウス由来肺泡マクロファージを用いると *S. pneumoniae* 貪食促進は観察されないので、SP-A は、非オプソニン効果で SR-A を介する *S. pneumoniae* 貪食を促進することが判明した。さらに、SP-A と肺泡マクロファージによるインキュベーションにより、マクロファージ表面上の SR-A 局在が増加することがわかった。

MBL もクッパー細胞との相互作用を介して SR-A の細胞膜局在を増加させることによ

り、Staphylococcus aureus や E. coli の貪食を促進することを示した。SP-A の SR-A 細胞表面局在増強にはカゼインキナーゼ2(CK2)の活性化が関与していた。

以上の結果は、コレクチンは、オプソニン効果の他に、マクロファージとの直接の相互作用を介して細胞表面の貪食受容体の局在増強によって、細菌の貪食を促進することを示している（図

3.1.12）。SR-A 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。

Pulmonary collectins augment phagocytosis through increased cell surface expression of phagocytic receptor

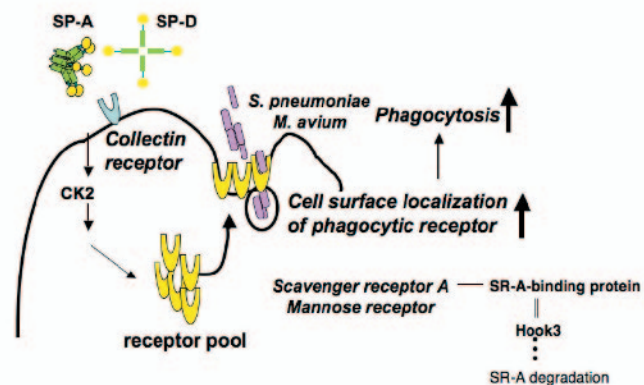


図3. 1. 12 肺コレクチンによる細菌貪食機構

レジオネラ菌は、細胞内に寄生するグラム陰性桿菌で、その感染症はレジオネラ病として重篤な肺炎を来すことが知られている。肺コレクチンは、レジオネラ菌体に CRD を介して結合するが、菌体の凝集は惹起しなかった。しかし、AYE 培地中での菌増殖による濁度変化、および、BCYE agar でのコロニー形成を調べたところ、肺コレクチンは有意にレジオネラ菌の増殖を抑制した。さらに、HBSS 中では、コレクチンはレジオネラ菌に対して有意な殺菌作用を示した。細胞内寄生菌であるレジオネラ菌は、IV 型分泌機構の Dot/Icm 分泌系を介してマクロファージを損傷し(pore-forming activity)、侵入したレジオネラ菌を含むファゴソームは、リソソームとの融合、ファゴソーム内 pH の酸性化など、通常ファゴソーム成熟経路から逸脱し、細胞内で増殖する。

レジオネラ菌をマクロファージと20分間インキュベートして、ethidium bromide 染色による pore-forming activity を調べたところ、肺コレクチン存在下では有意にレジオネラ菌による pore-forming activity が低下していた。さらに、レジオネラ菌を30分間感染させたマクロファージを0～4日間培養し、菌の細胞内増殖を調べたところ、肺コレクチン存在下で感染させた場合はレジオネラ菌の細胞内増殖が有意に抑制されていた。また、酸性 pH で蛍光を発する pHrodo 標識レジオネラ菌を MOI1 で10～60分間細胞に感染させたところ、肺コレクチン存在下での感染群で蛍光陽性細胞が有意に増加しており（図 3.1.13）、肺コレクチン存在下ではレジオネラ菌含有ファゴソームがリソソームと融合し、pH 酸性化が促進されたことを示唆している。肺コレクチンはレジオネラ菌に対する直接の増殖抑制効果を示すとともに、レジオネラ菌による pore-forming activity からマクロ

ファージを防御し、細胞に取り込まれたレジオネラ菌含有ファゴソームのリソソームとの融合を促進することによって菌の細胞内増殖を阻止していると考えられる。

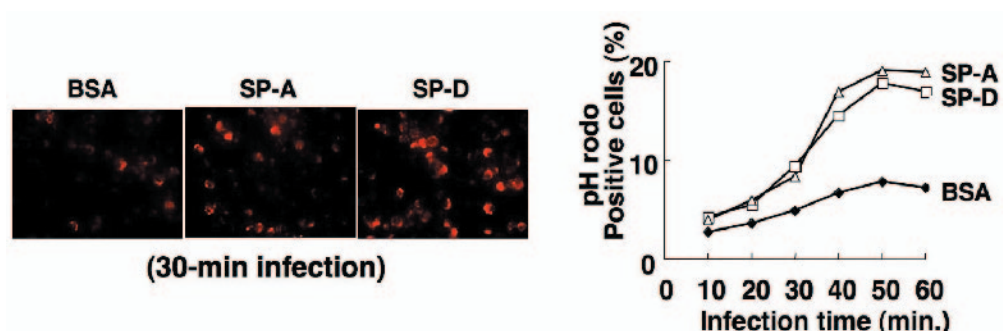


図 3. 1. 13

【III】TLR4 の構造と機能発現

TLR4 と TLR2 の細胞外ドメインからなる組換え可溶性蛋白質の sTLR4 (Glu²⁴–Lys⁶³¹) および sTLR2 (Glu²¹–Arg⁵⁸⁷)、組換え可溶性 CD14 (sCD14)、および、組換え可溶性 MD-2 (sMD-2) をバキュロウィルス–昆虫細胞系で発現し、ニッケルカラムで精製した。TLR2、TLR4 および CD14 は、いずれも、leucine-rich motif の繰り返し構造 (leucine-rich repeat) を有しているので、これらの可溶性蛋白質と sMD-2 の結合性を調べたところ、sMD-2 は、sTLR4 にのみ結合し、sTLR2 と sCD14 には結合しなかった。ビアコアによる解析で、sTLR4 は sMD-2 に対して $6.29 \times 10^{-8} \text{M}$ の解離定数を示した。LPS-conjugated bead による pull-down assay で、sTLR4 単独は共沈されず、sTLR4 と sMD-2 両者の複合体になってはじめて共沈を認めた。さらに、野生型 TLR4 トランスフェクト細胞は LPS に応答できず、sMD-2 添加によって LPS シグナルを伝達できた。さらに、sTLR4 と sMD-2 の複合体の添加により、野生型 TLR4 発現細胞による TLR4 介在 LPS シグナル伝達は抑制された。以上の結果は、TLR4 の機能発現には MD-2 との複合体形成が必須であることを示している。

sTLR4 と [³H] 標識 lipid A の結合を sTLR4 と共沈する lipid A を測定することにより調べた。sTLR4 は、[³H] 標識 lipid A には全く結合しなかったが、sMD-2 存在下では lipid A 結合性を獲得した。sMD-2 単独でも lipid A に結合するが、sTLR4 存在下では、その結合量は約 2 倍に増加し、lipid A との結合親和性も 2 倍高くなった。このことは、TLR4 は単独では LPS と結合できなくなるが、MD-2 と複合体を形成してはじめて、TLR4-MD-2 複合体が LPS を結合し、TLR4 を介する LPS シグナルが伝達されることを示している。さらに、sTLR4-sMD-2 複合体は、TLR4/MD-2 発現細胞に対する Alexa 標識 LPS の結合を阻止し、LPS 惹起炎症反応を抑制した。また、マウスへの LPS の気管内投与によるエンドトキシン惹起肺炎モデルで、sTLR4-sMD-2 の同時投与がエンドトキシン惹起肺炎を抑制することが示された (図 3.1.14)。

上記にあるように、sMD-2 は、sTLR4 のみに結合して、同様に leucine-rich motif 構造を有する sTLR2 と sCD14 には結合しない。そこで、leucine-rich repeat(LRR)領域ではない TLR4 の N 末端側に着目した。TLR4/TLR2 キメラ体を作成し、MD-2 との共沈実験を行ったところ、TLR4 の N 末端側 Glu²⁴-Lys⁴⁷ を含む領域を有するキメラ体は MD-2 との結合性を認め、TLR4 の Glu²⁴-Pro³⁴ 領域を欠失した TLR4 変異体は MD-2

に結合しなかった。次に、TLR4 の Glu²⁴-Lys⁴⁷ 領域に相当する合成ペプチド(TLR4 ペプチド)を作成し、固相化して sMD-2 との結合性を調べたところ、sMD-2 は TLR4 ペプチドに濃度依存性に結合したが、TLR2N 末端側 Glu²¹-Ser⁴⁵ 領域に相当する合成ペプチドには結合しなかった。さらに、TLR4 ペプチドは、sTLR4 と sMD-2 の共沈を濃度依存性に阻止した。また、TLR4 ペプチドは、sMD-2 添加の TLR4 発現細胞における LPS 惹起細胞応答を有意に抑制した。以上の結果は、TLR4 の Glu²⁴-Lys⁴⁷ 領域が MD-2 との結合に必須であることを示している。また、sTLR4 の還元と 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 変異が sMD-2 との結合性を失わせることから、TLR4N 末端側の Cys²⁹と Cys⁴⁰の MD-2 結合における重要性が示唆された。

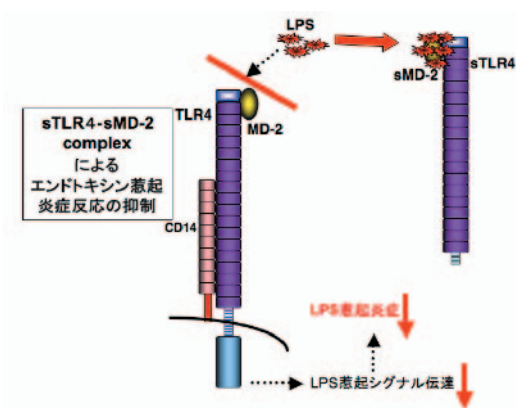


図 3. 1. 14

(2)研究成果の今後期待される効果

本研究は、生体防御に関わる蛋白質(コレクチン及び Toll 様受容体)の構造と機能発現の機構を解明することを目的として遂行された。肺コレクチン欠損マウスを用いた in vivo 研究で、コレクチンの抗炎症作用が明らかにされたが、その分子機序は不明であった。本研究により、肺コレクチンが TLR4-MD-2 受容体複合体との相互作用を介してエンドトキシン惹起炎症反応を抑制することが示された。肺胞上皮はガス交換を行うきわめて重要な上皮であるが、一旦傷害を受けるとその再生が困難でエンドトキシン惹起炎症の抑制は臨床的にも重要な課題である。本研究において、組換えヒト肺コレクチンの大量発現系を確立できたので、エンドトキシン惹起肺炎の抑制に応用可能であると考えられた。コレクチンの機能部位から成るペプチドあるいはドメインによる炎症制御への応用の可能性については今後も検討したい。レジオネラ菌や非定型抗酸菌、結核菌は、細胞内寄生菌で、マクロファージに取り込まれても独自のファゴゾームを形成し、増殖する。本研究によって、肺コレクチンが貪食されたレジオネラ菌のリソソームとの融合を促し、菌の細胞内増殖を抑制することが示された。レジオネラ菌、結核菌や非定型抗酸菌による感染症はコレクチンを含む肺サーファクタントの産生減少の考えられる高齢者および

免疫不全状態の患者では致死的になりうるので、肺コレクチンの投与による感染防御への応用が期待される。また、本研究で発現させ、研究に用いた TLR4 の細胞外ドメインかなら成る組換え可溶性蛋白質(sTLR4)は、TLR4-MD-2の構造解析、および、LPS との相互作用の更なる解明にきわめて有用であると考えられる。また、sTLR4-sMD-2 複合体を用いた in vivo でのエンドトキシン惹起肺炎の抑制は、臨床的応用の可能性を示すことができたが、sTLR4-sMD-2 複合体の LPS に対する結合親和性の増強が必要で今後の検討課題としている。

3. 4 「生化学・分子生物学」グループ(九州大学 住本グループ)

(1)研究実施内容及び成果

本研究は「活性酸素生成型 NADPH オキシダーゼの制御機構」を、多角的に、即ち、生化学、分子生物学、構造生物学、分子遺伝学などの手法を駆使して行うものである。研究の中心は住本グループ(九州大)であるが、種々の局面で、神田グループ(九州大)、伊藤グループ(東京大)と密な協力を行いながら研究を展開した。

(A)『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』

(1-1) p47^{phox} の活性化機構

細胞休止時には、gp91^{phox} は不活性型でありスーパーオキシドを生成しない。gp91^{phox} が活性化されてスーパーオキシドが生成されるためには、SH3ドメインをもつオキシダーゼ特異的シグナル伝達タンパク質

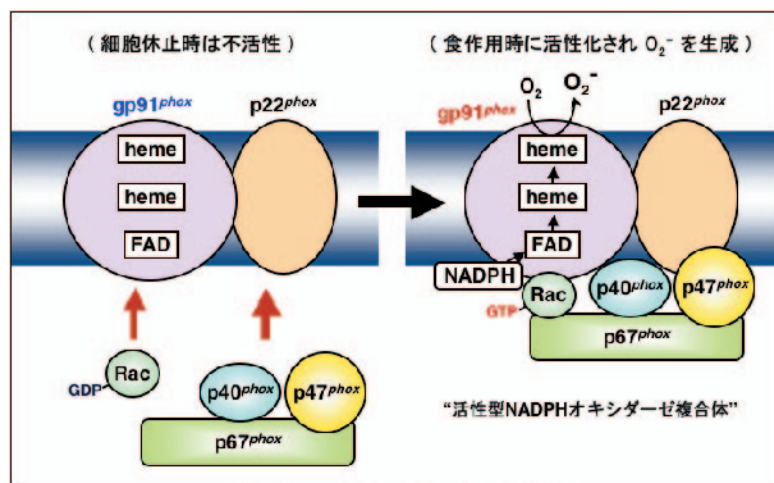


図3.2.1. gp91^{phox} (Nox2) の活性化

(p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}) および低分子量 G タンパク質 Rac がともに活性型となり、細胞質から細胞膜へ移行して、gp91^{phox}-p22^{phox} ヘテロ2量体と複合体を形成することが必要である(図 3.2.1)。私達は、本研究により、「食細胞に効率良く ectopic な遺伝子発現をできる実験系」を開発することに成功した。この系を用いて、細胞質に存在するオキシダーゼ活性化タンパク質のファゴゾームへの移行と解析した。

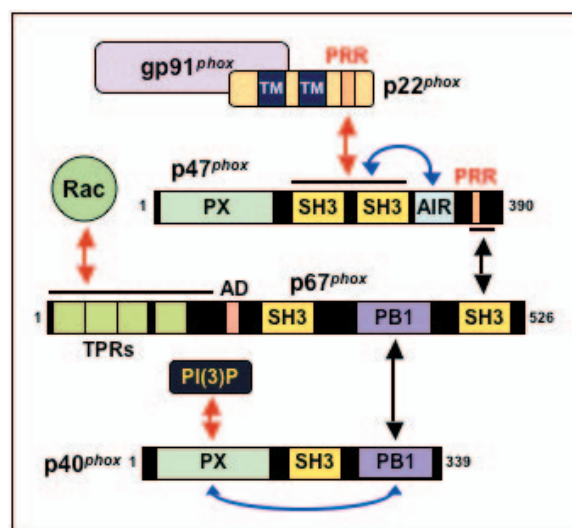


図3.2.2. オキシダーゼ因子と相互作用

細胞休止時の細胞質において、p67^{phox} は p47^{phox} 及び p40^{phox} と 1:1:1 の3者複合体を形成している(図 3.2.2)。この3者複合体形成には、p67^{phox} の C 末 SH3ドメインとp47^{phox} の C 末プロリン・リッチ領域 (PRR:proline-rich region) との結合 (Mizuki et al., 2006)、および p67^{phox}

の PB1 ドメインと p40^{phox} の PB1 ドメインとの結合 (Noda et al., 2003; Sumimoto et al., 2007) がそれぞれ必要であることを示すとともに、その結合様式の詳細を私達は明らかにした。

p47^{phox} は、1次構造上 N 末から、PX ドメイン、2つの SH3 ドメイン (bis-SH3 ドメイン)、更に C 末近くにプロリン・リッチ領域 (PRR: proline-rich region) をもつ (図 3.2.2)。p47^{phox} の PX ドメインは、以前私達が示したように、食細胞オキシダーゼの活性化に必須の領域であり、ホスファチジルイノシトール-3,4-ビスリン酸 (PI(3,4)P₂) 等のホスホイノシチド (PIPs) やホスファチジルセリン (PS) と結合する能力をもつ。一方、bis-SH3 ドメインは p22^{phox} の PRR と特異的に結合し、この結合はオキシダーゼ活性化に必須である (図 3.2.3;

Nobuhisa et al., 2006)。実際に、「食細胞に効率良く ectopic な遺伝子発現をできる実験系」を用いて、食細胞に「p22^{phox} と結合できない変異型 p47^{phox}」を発現させたところ、この変異型 p47^{phox} はファゴゾームに移行できな

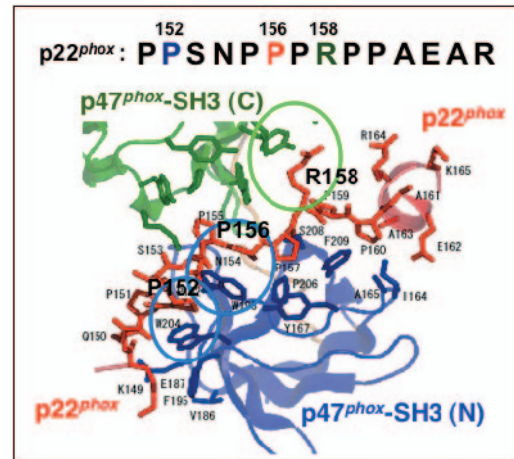


図3.2.3. p47^{phox} の bis-SH3ドメインと p22^{phox} の PRR との複合体の NMR 構造

図 3.2.3; Nobuhisa et al., 2006)。実際に、「食細胞に効率良く ectopic な遺伝子発現をできる実験系」を用いて、食細胞に「p22^{phox} と結合できない変異型 p47^{phox}」を発現させたところ、この変異型 p47^{phox} はファゴゾームに移行できな

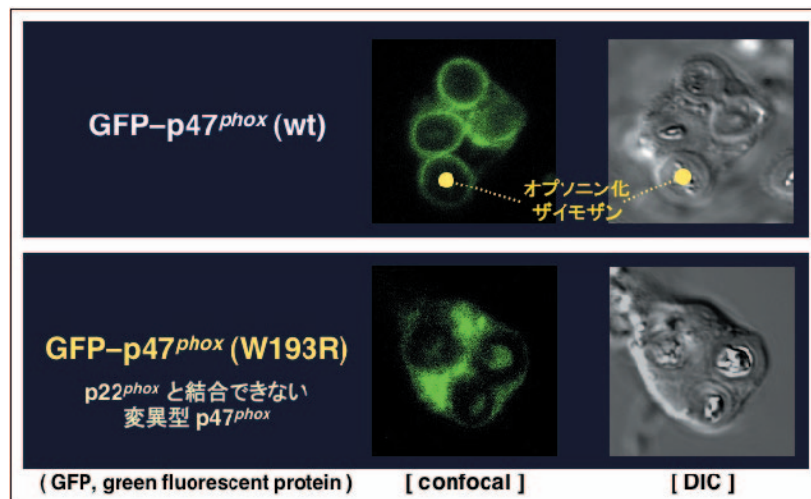


図3.2.4. p47^{phox} (W193R) はファゴゾーム膜に移行できない

かった (図 3.2.4; Minakami et al., 論文投稿中)。一方、休止状態の p47^{phox} において bis-SH3 ドメインは、その標的である p22^{phox} にアクセスできない。それは、図 3.2.5 (Yuzawa et al., 2004) に示すように、SH3 ドメインは、そのすぐ C 末側の領域 (AIR; autoinhibitory region) との間に分子内結合を形成しているからである。

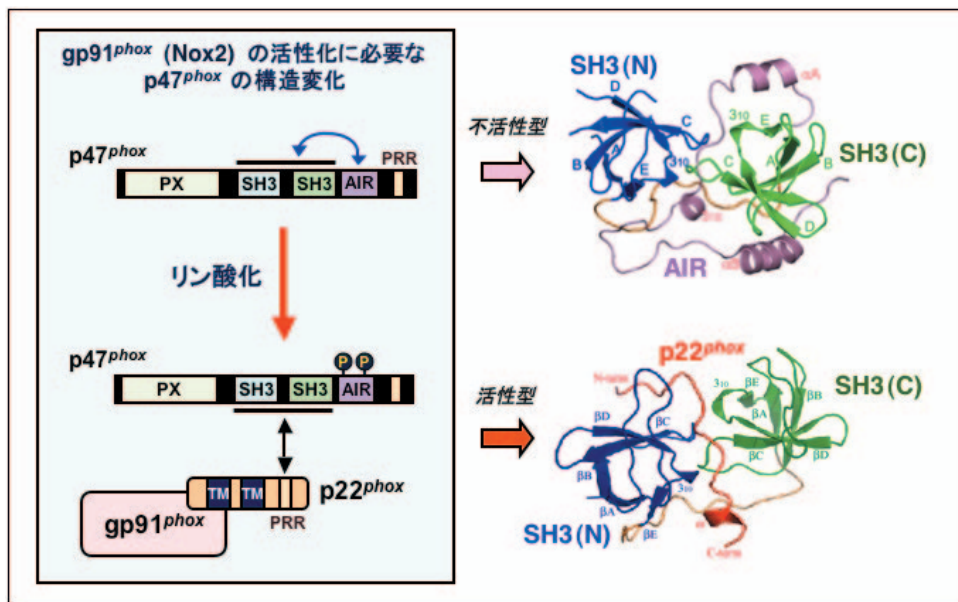


図3. 2. 5. 不活性型と活性型（リン酸化型）の $p47^{phox}$ の構造

細胞刺激により活性化されたタンパク質キナーゼによって $p47^{phox}$ の AIR にある Ser-303 や Ser-328 がリン酸化されると、高次構造変化（コンホメーション変化）が誘導され、bis-SH3 ドメインとの分子内相互作用が切断され、bis-SH3 ドメインは膜タンパク質

である $p22^{phox}$ と結合できるようになる。この不活性型の結晶構造を決定したところ、Ser-303 や Ser-328 が分子内結合に直接関与していることが明らかとなった（図 3.2.5; Yuzawa et al., 2004）。また、NMR によって「bis-SH3 ドメインと $p22^{phox}$ 由来ペプチドの複合体」の構造も決定し（図 3.2.5; Ogura et al., 2006）、 $p47^{phox}$ の2つの SH3 ドメインは協同的に標的である $p22^{phox}$ を認識していることを示した（図 3.2.3）。ここでの詳細な結合実験のデザイン

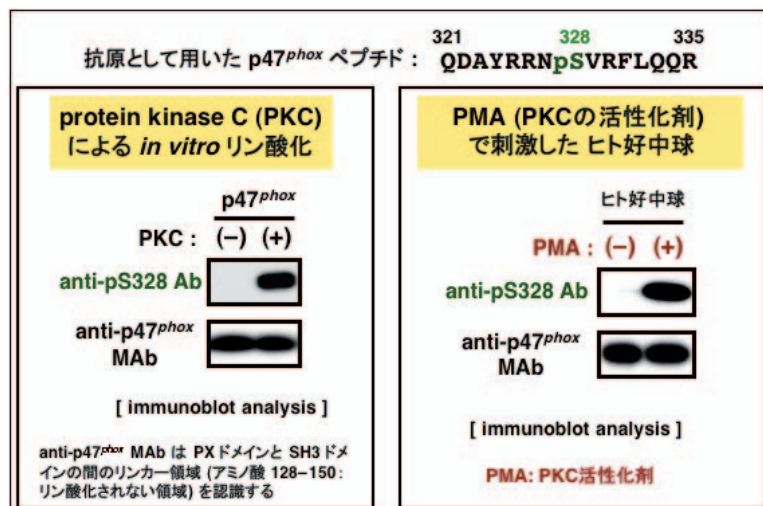


図3. 2. 6. 抗リン酸化 $p47^{phox}$ 抗体（anti-pS328 Ab）の作製

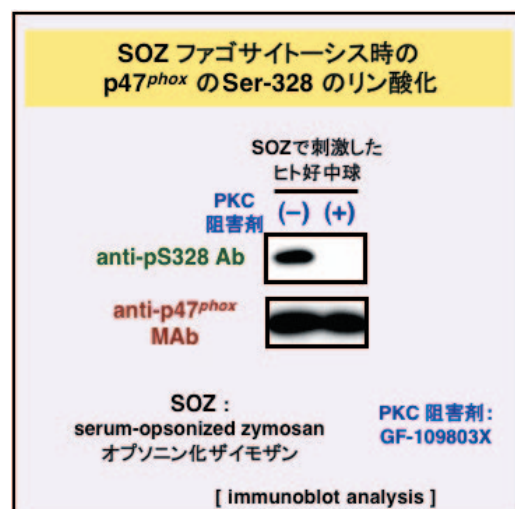


図3. 2. 7. $p47^{phox}$ の Ser-328 はヒト好中球のファゴサイトーシス時に PKC によってリン酸化される

ンおよび実験の実施においては神田グループが重要な役割を果たした。前述のように、この $p22^{phox}$ との協同的な結合は $p47^{phox}$ のファゴゾーム膜への移行に必須である(図 3.2.4)。

私達は、endogenous の $p47^{phox}$ のコンホメーション変化をモニターするために、『リン酸化された Ser-328 のみを認識する抗体』を作製することに成功した(図 3.2.6)。この抗体を用いて私達は、まず、ファゴサイトーシス時に $p47^{phox}$ の Ser-328 が実際にリン酸化されることを明らかにした(図 3.2.7)。さらに、Ser-328 がリン酸化された $p47^{phox}$ はファゴゾームに局在すること(図 3.2.8)、この Ser-328 のリン酸化には protein kinase C (PKC) を関与するらしいこと(図 3.2.6 および図 3.2.8)などを明らかにした(Minakami et al., 論文投稿中)。このように、ファゴサイトーシス時には、刺激に伴って $p47^{phox}$ の AIR がリン酸化された結果コンホメーション変化がおこり、これが $p47^{phox}$ のファゴゾームへの移行とオキシダーゼ活性化のスイッチの1つとなっていると考えられる。また、私達は、 $p47^{phox}$ のコンホメーション変化を直接経時的にモニターする方法として、FRET 法を用いた解析を進めている(詳細は、「伊藤グループ」の項参照)。

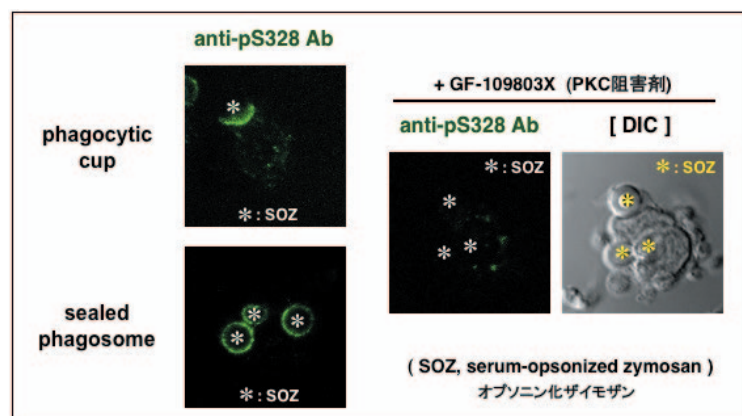


図3.2.8. $p47^{phox}$ の Ser-328 のリン酸化はファゴゾーム上でおこる

(1-2) $p40^{phox}$ の活性化機構

$p40^{phox}$ は、食細胞 NADPH オキシダーゼの活性化に必ずしも必要ではなく、その役割については長らく不明な点が多かった。私達は、 $p40^{phox}$ は細胞刺激時の $p67^{phox}$ と $p47^{phox}$ の膜移行を促進すること、それを通して食細胞オキシダーゼ活性化を正に制御すること、この効果は PB1 ドメイン間の相互作用による $p67^{phox}$ と $p40^{phox}$ の結合(図 3.2.2)に依存していること等を明らかにしていた。 $p40^{phox}$ の N 末には PX ドメインがあり、この PX ドメインは、($p47^{phox}$ の PX ドメインとは異なり)ホスファチジルイノシトール-3-リン酸 (PI(3)P) に特異的に強く結合できる。PI(3)P は、ファゴゾーム膜(および早期エンドゾーム膜)に特異的に集積することが知られているが、実際に、 $p40^{phox}$ (および $p67^{phox}$ - $p47^{phox}$ - $p40^{phox}$ 複合体)のファゴゾーム膜への移行には、PX ドメインによる PI(3)P との結合が必須の役割を果たしていた(Minakami et al., 論文投稿中)。また、私達は、この PX ドメインによる PI(3)P との結合は PB1 ドメインによって負に制御されてい

ることを示し、さらに、全長型 $p40^{phox}$ の結晶構造を決定して実際に PB1ドメインが直接 PXドメインと分子内相互作用をしていることを明らかにした(図 3.2.9; Honbou et al., 2007)。この分子内結合は、PB1ドメインによる $p67^{phox}$ との結合には影響を与えないが、PXドメインによる PI(3)P との結合には抑制的に働く。そして、この負の調節機構が巧妙に働くため、 $p40^{phox}$ は決して早期エンドゾーム膜には局在しないことを示した(Minakami et al., 論文投稿中)。

一方、 $p40^{phox}$ のファゴゾーム膜への局在には、PXドメインを介した PI(3)P との結合ばかり

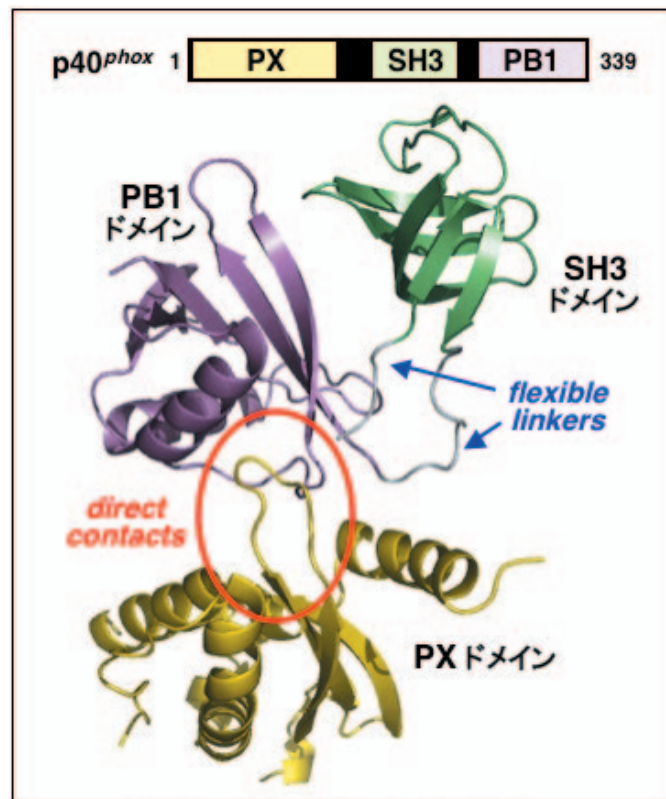


図3.2.9. $p40^{phox}$ の結晶構造

でなく、PB1ドメインを介した $p67^{phox}$ との結合も必要であることが明らかとなった(Minakami et al., 論文投稿中)。この結論を得るには、実は紆余曲折があった。このPB1ドメインを介した相互作用が、かなり低下してもファゴゾーム膜への局在はおこるからである。従って、 $p67^{phox}$ と $p40^{phox}$ の相互作用が部分的あるいは完全に抑制されてはいるが、protein integrityは損なわれていない種々の変異型タンパク質の作製が決定的であったが、それには、伊藤グループによる分子遺伝学的手法(two-hybrid法を用いた screening法)がきわめて重要な役割を果たした。

このように、 $p40^{phox}$ (即ち $p67^{phox}$ - $p47^{phox}$ - $p40^{phox}$ 複合体)のファゴゾーム膜への移行には、いくつかの相互作用が協同して働くことが必要である。すなわち、オキシダーゼ活性化を担うタンパク質($p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$ 及び Rac)による多様なタンパク質-タンパク質相互作用およびタンパク質-脂質相互作用が、ファゴサイトーシスとカップルした「活性酸素生成の時間的空間的な制御」が正確におこるために重要な役割を果たしている。

(1-3) 食胞膜に移行した後、細胞質タンパク質はどのように働くか?

食胞膜に移行した $p47^{phox}$ や $p67^{phox}$ は次にどのように働くのだろうか。

私達は、 $p47^{phox}$ の bis-SH3 ドメインによる $p22^{phox}$ との結合に加え、N 末の PX ドメインを介したホスホイノシチド (PIPs) やホスファチジルセリン (PS) などのリン脂質との結合が、 $p47^{phox}$ のファゴゾーム膜への移行に必要であることを明らかにした (Minakami et al., 論文投稿中)。一方、私

達は、 $p47^{phox}$ の2つの SH3 ドメインの更に N 末領域に、進化的に保存されたイソロイシン残基 (Ile-152) があることを見いだし (図 3.2.10)、Ile-152 をアラニンに置換すると食細胞 NADPH オキシダーゼ活性化能が消失することを明らかにした (図 3.2.10; Taura et al., 論文投稿中)。また、Thr-153 も NADPH オキシダーゼ活性化に関与することを示した。さらに、きわめて興味深いことに、Ile-152 をアラニンに置換した変異型 $p47^{phox}$ は、野生型 $p47^{phox}$ と同等に膜移行できることも見いだしている (図 3.2.11)。このように

Ile-152 を含む領域は、 $p47^{phox}$ が膜移行した後の過程、すなわち「gp91^{phox} との相互作用とそれに引き続くスーパーオキシドの生成」に重要な働きをしていると考えられる (図 3.2.12)。

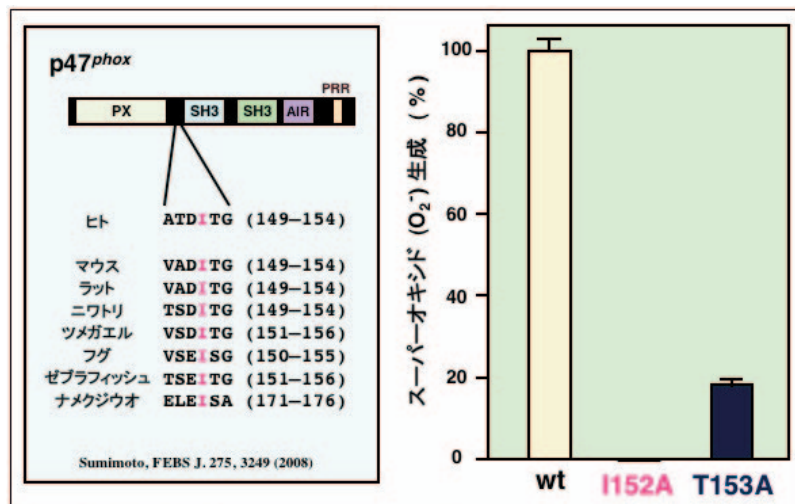


図3. 2. 10. 「 $p47^{phox}$ bis-SH3 ドメインよりも N 末の領域」の Nox2 活性化における役割

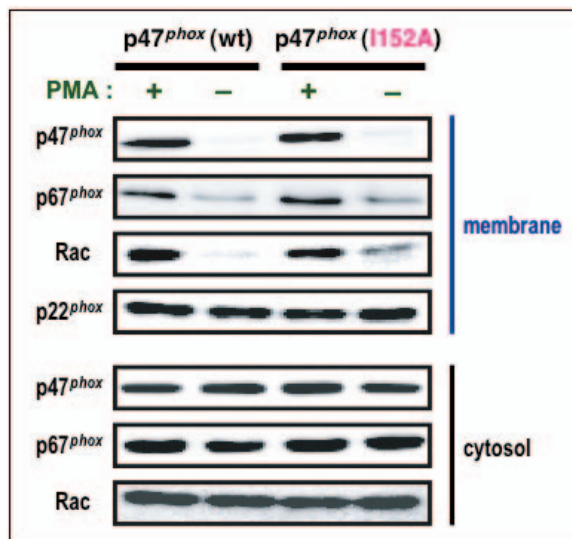


図3. 2. 11. 「 $p47^{phox}$ bis-SH3 ドメインよりも N 末の領域」の膜移行における役割

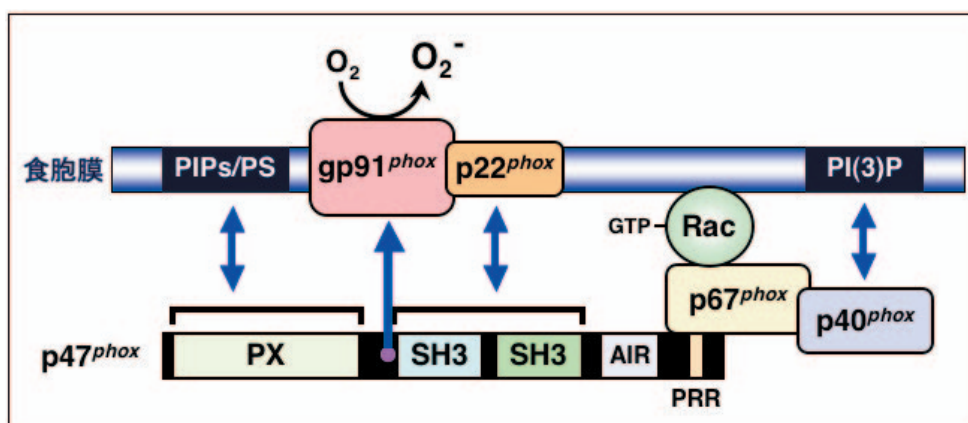


図3. 2. 12. gp91^{phox} の活性化に必要な p47^{phox} の作用機構

p67^{phox} の N 末端領域は4つの TPR(tetratricopeptide repeat) モチーフからなり、この TPR ドメインに Rac が特異的に結合する(図 3.2.2)。このオキシダーゼ活性化に必須の結合には、シグナル伝達によっておこる「Rac の GDP 結合型から GTP 結合型への変換」が必要であり、食細胞 NADPH オキシダーゼ活性化のもう1つのスイッチとして働いている。また、p67^{phox} の C 末側 SH3 ドメインは p47^{phox} との会合を担っており、この結合も膜移行やオキシダーゼ活性化に重要な役割を果たしている(Mizuki et al., 2006)。一方、p67^{phox} の TPR ドメインと N 末側 SH3 ドメインの間には、activation domain (AD) と呼ばれる領域が存在する(図 3.2.2)が、私達は、この領域が gp91^{phox} に直接結合することでスーパーオキシド生成を引き起こすことを明らかにした(図 3.2.13; 論文投稿準備中)。

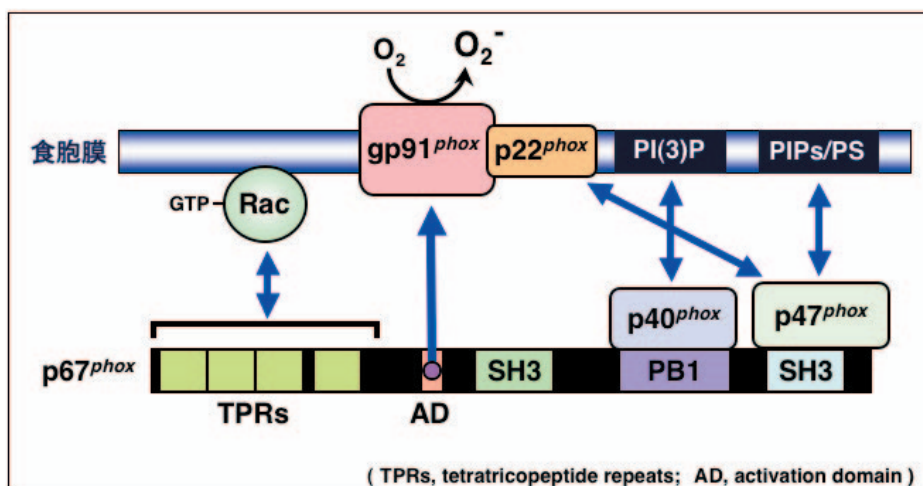


図3. 2. 13. gp91^{phox} の活性化に必要な p67^{phox} の作用機構

以上のように、多様なタンパク質-タンパク質相互作用およびタンパク質-脂質相互作用によってファゴゾーム膜に到達した p47^{phox} と p67^{phox} は、それぞれに固有の領域(p47^{phox} の bis-SH3 ドメインより N 末の領域、p67^{phox} の activation domain) (図 3.2.12 および図 3.2.13 参照)を用いて gp91^{phox} と相互作用する。この相互作用により gp91^{phox} 内の電子伝達(図 3.2.2)が誘導された結果、スーパーオキシドが生成されることが考えられ

る。

(1-4) 最後に gp91^{phox}(Nox2)に何がおこるのか？

上記のようなかたちで p67^{phox} や p47^{phox} が相互作用した後、次に gp91^{phox}(Nox2)に何がおこり、最終的にスーパーオキシド生成が誘導されるのだろうか。

この問いについては、今のところ、ほとんど何も分っていない。世界的にも全く手が付けられていない。その理由の1つは、膜タンパク質で扱いにくいことによる。しかし、私達は、本研究を遂行する過程において、この問いに対して答えるための幾つかの準備をすることができた。

gp91^{phox} は膜貫通セグメントを6つもつと予測されており、細胞質側の NADPH から受け取った電子を、FAD を経て、膜を横切って伝達し、最終的に酸素分子に渡してスーパーオキシドを生成する(図 3.2.14)。電子の膜を横切った輸送は、2つのヘムが膜平面に対して垂直に並ぶことにより、可能になっている。この様に、gp91^{phox} 分子内には「NADPH→FAD→ヘム→ヘム→O₂」という電子伝達系が存在することになる。gp91^{phox} を CHO 細胞のような培養細胞に発現させると、まず、小胞体において糖タンパク質 gp65 (分子量 65 kD)として合成され、ヘムが挿入されてから p22^{phox}と会合する。その後 Golgi 体に輸送されるが、そこで糖鎖が processing を受けて初めて gp91^{phox}(分子量 70～91 kD)となり、それから細胞膜へと輸送される(図 3.2.15)。

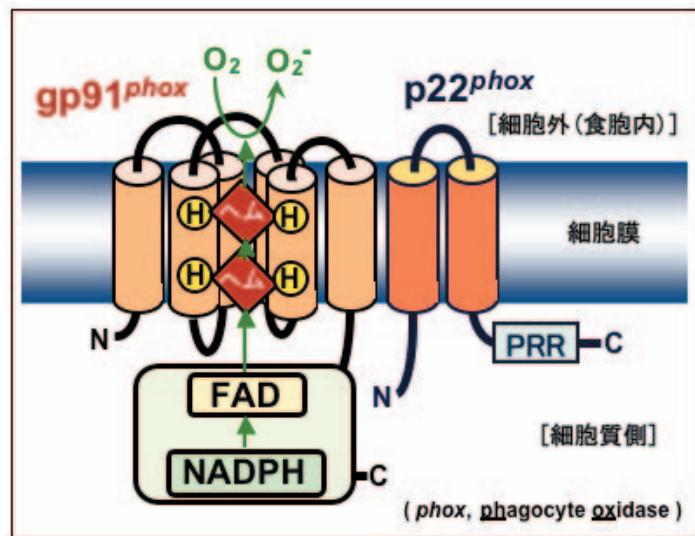


図3. 2. 14. gp91^{phox}-p22^{phox} 複合体 (シトクロムb₅₅₈)

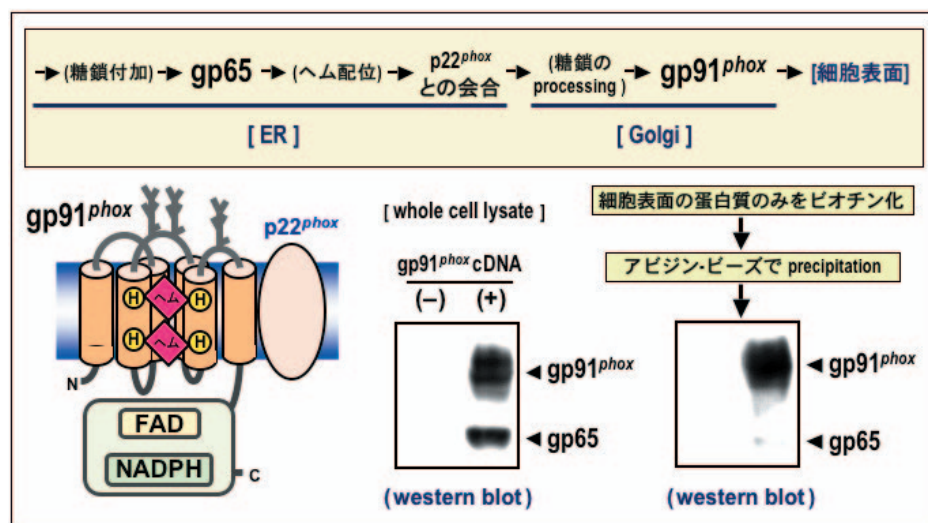


図3. 2. 15. 糖蛋白質 gp91^{phox} (Nox2) の 生合成

私達は最近、CHO 細胞に成熟型 gp91^{phox}を高発現させる系の確立に成功した(未発表)。この系を用いて gp91^{phox} 内の電子伝達機構の解析を開始している。まだ、preliminary なデータではあるが、この電子伝達系内に存在すると予測されるチロシン残基をアラニン残基に置換するとスーパーオキシドの生成が低下することを見いだしている(図 3.2.16)。このチロシン残

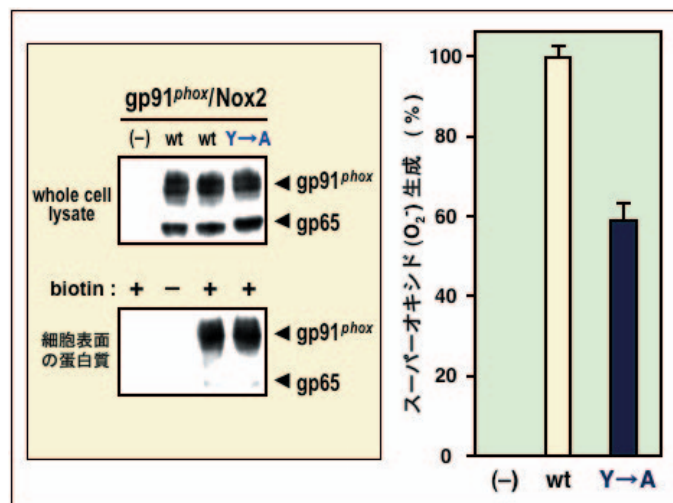


図3.2.16. gp91^{phox}(Nox2)内の電子伝達における保存されたチロシン残基の役割

基は、電子伝達に何らかの役割をはたしている可能性がある。一方、ごく最近私達は、gp91^{phox} の NADPH 結合領域の結晶構造の決定に成功した(論文投稿準備中)。この構造をもとに、NADPH と相互作用していると予測されるアミノ酸残基に変異を導入した gp91^{phox} を、上記の系を用いて解析すると、スーパーオキシド生成活性が著しく低下していることを示している(論文投稿準備中)。このように、gp91^{phox} の電子伝達機構が少しずつ明らかになりつつある。

(B)『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』

私達は、食細胞オキシダーゼの活性化タンパク質である p47^{phox} と p67^{phox} のそれぞれの新規ホモログ(Noxo1 と Noxa1)を同定・クローニングしていた。Nox1, Nox3, Nox4 などの活性化において果す役割を明らかにするために、p47^{phox}、p67^{phox}、Noxo1 と Noxa1 の種々の変異型タンパク質を作成し、これらを培養細胞系(COS-7 細胞, HEK293 細胞, CHO 細胞, HeLa 細胞, など)に発現させる再構成系を構築し(Takeya et al., Methods Enzymol., 2006)、種々の解析を行ってきた。

この系を用いて私達は、Nox1 の活性化には、Noxo1 や Noxa1 に加えて、Rac が重要な役割を果たすことを示した(図 3.2.17; Miyano et al., 2006)。Rac は Noxa1 に結合して作用するが、Rac は Noxa1 の膜移行を促進するとともに、Noxa1 の構造変化を引き起こすことを明らかにした(Miyano et al., 2006)。また、Nox1 の活性化には Noxo1 の PX ドメインも必須であることを示した(Takeya et al., 2007)。

Nox3 も $p22^{phox}$ と複合体を形成しており、この会合は (Nox1 や $gp91^{phox}/Nox2$ の時と同様に) 2 つのタンパク質をお互いに安定化することを示した (Ueno et al., 2005)。さらに、私達は、Nox1 や $gp91^{phox}/Nox2$ と異なり、 $p47^{phox}$ と $p67^{phox}$ のそれぞれの新規ホモログ (Noxo1 と Noxa1) が存在しないときも、少量ではあるがスーパーオキシドを生成することを明らかにした (Ueno et al., 2005)。ただし、この恒常的なスーパーオキシド生成活性は、 $p47^{phox}$ 、 $p67^{phox}$ 、

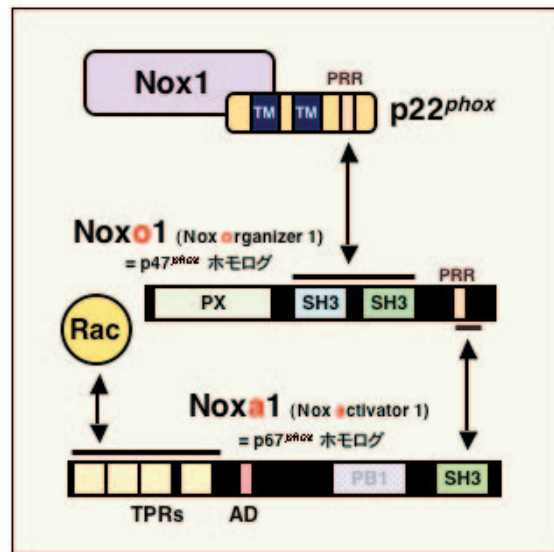


図3.2.17. Nox1 の活性化

Noxo1 などによって正に制御されうる (Ueno et al., 2005)。また、Rac は $p67^{phox}$ と結合することにより Nox3 活性化に関与し、この結合は $p67^{phox}$ の膜移行を誘導することも示した (Miyano and Sumimoto, 2007)。

Nox4 は私達が同定・クローニングした Nox ファミリーのメンバーであるが、さらに、Nox4 は血管内皮細胞に豊富に発現していることを明らかにした (Kuroda et al., 2005)。Nox4 は細胞内にのみ存在し(細胞膜には target されない)、やはり $p22^{phox}$ と複合体を形成するが、 $p47^{phox}$ 、 $p67^{phox}$ 、Noxo1、Noxa1、あるいは Rac などによっては調節されない (Kuroda et al., 2005)。また、興味深いことに、Nox4 と $p22^{phox}$ の会合は、Nox4 の安定性には寄与しない。このように、Nox4 の調節機構は未だ不明な点が多く、今後の大きな課題である。

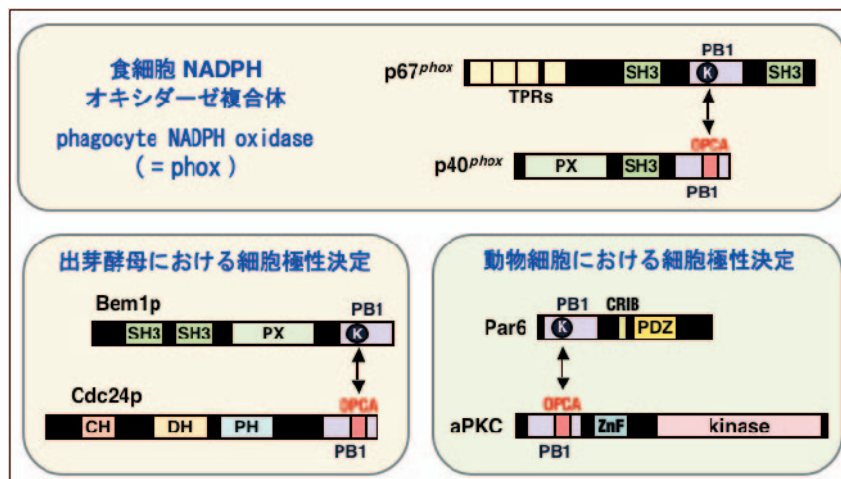


図3.2.18. PB1 ドメイン: Phox and Bem 1 ドメイン

(C)『PB1 ドメインについて』

PB1 ドメインは、2001 年に、私達が見いだした新規なタンパク質-タンパク質相互作用

用を担う modular domain である(図 3.2.18)。最初に $p67^{phox}$ や出芽酵母の極性タンパク質 Bem1 に認めたので、phox と Bem の頭文字をとって PB1 ドメインと命名した。本研究の過程で、 $p40^{phox}$ の分子内相互作用にも働くことが明らかとなり(Honbou et al., 2007)、PB1 ドメインの世界も広がった。Sience 誌電子版の STKE 欄に総説を書くように以来を受け、PB1 ドメインについて(やや野心的な)総括を行った。

(D)『アクチン重合の調節を行うタンパク質 FHOD1 について』

$p67^{phox}$ の N 末側 SH3 ドメイン(図 3.2.2)の標的タンパク質は不明である。標的タンパク質を同定する目的で two-hybrid による cDNA screening を行い、得られた候補タンパク質が FHOD1 である。FHOD1 は、FH1 ドメインと FH2 ドメインをもつ formin ファミリーのタンパク質であり、そのアクチン重合活性により細胞内のストレスファイバー形成を誘導することを示したが、残念ながら、FHOD1 は $p67^{phox}$ の標的タンパク質ではなかった。FHOD1 についてさらに研究を行い、FHOD1 は分子内結合により負に制御されているが、タンパク質キナーゼ ROCK によりリン酸化されると分子内結合が切断され「活性型」になることを明らかにした(図 3.2.19;Takeya et al., EMBO J., 2008)。

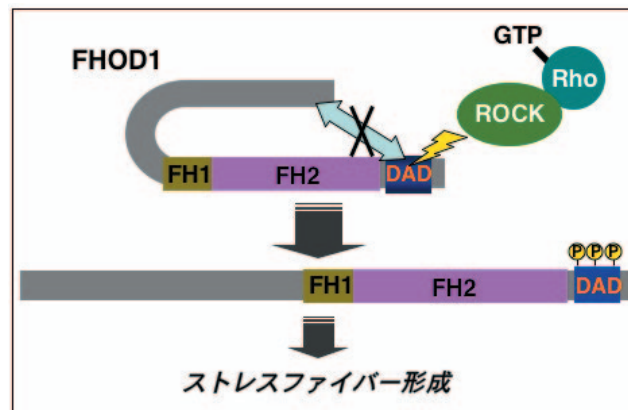


図3.2.19. FHOD1 は ROCK によりリン酸化され活性化される

さらに、血管内皮細胞をトロンビンで刺激した時に形成されるストレスファイバー形成(血管透過性の調節と関連していると考えられている)は、「ROCK→FHOD1→アクチン重合」という経路が働いていることを示した(図 3.2.20;Takeya et al., EMBO J., 2008)。

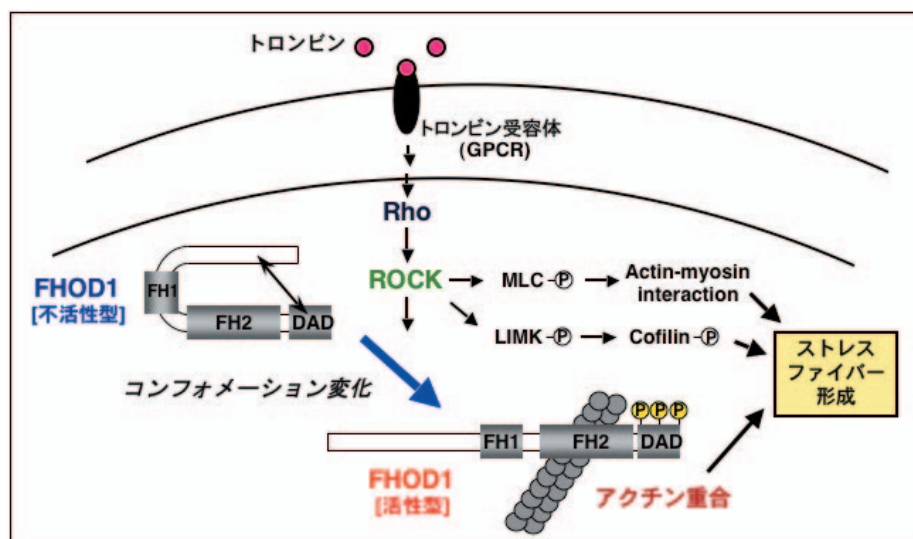


図3.2.20. トロンビン刺激による FHOD1 の活性化(コンフォメーション変化)により 血管内皮細胞のストレスファイバー形成がおこる

(2)研究成果の今後期待される効果

食細胞 NADPH オキシダーゼの活性化メカニズムの詳細が明らかになれば、ファゴサイトーシスの機構さらには感染防御の機構の理解が大きく進むと考えられる。また、炎症（炎症では食細胞 NADPH オキシダーゼが不必要に活性化されていると考えられている）あるいはアルツハイマー病やパーキンソン病などの種々の神経変性疾患（食細胞 NADPH オキシダーゼによって生成される活性酸素が、種々の神経変性疾患の増悪に関与することが知られている）など、活性酸素が関与する多様な病態を理解する上で、重要な貢献をすることが期待される。また、NADPH オキシダーゼに関する研究の1つのネックは、特異的な阻害剤が存在しないことである。本研究でなされた3次構造の解析（原子レベルの解析）は、NADPH オキシダーゼ阻害剤の開発などにも役立つであろう。それは、引いては、創薬にもつながると考えられる。

3.5 神田グループ（「構造生物学」グループ）

(1)研究実施内容及び成果

神田グループ（九州大学）では、ファゴゾーム膜への targeting において必要な「p47^{phox} の PX ドメインのリン脂質との相互作用」を明らかにする目的で、「p47^{phox} の PX ドメインとリン脂質との複合体」の3次構造を明らかにする目的で、この複合体の結晶化を試み続けてきたが、この5年間では成功しなかった。さらに、NMR を用いた複合体の解析も種々の方法で試みてきたが、解明には至らなかった。また、p47^{phox} の PX ドメインは、私達が以前明らかにしたように、分子内相互作用により負に調節されている。そこで、全長型 p47^{phox} あるいは「Pxドメイン-SH3(N)ドメイン-SH3(C)ドメイン-AIR」からなる p47^{phox} の結晶化も試み続けてきたが、やはり、この5年間では成功しなかった。これらは、いずれも残念な結果であったが、重要な課題であり、今後も結晶化に向けた努力を続けていく計画である。

p47^{phox} の2つの SH3ドメイン(bis-SH3ドメイン)は、標的である p22^{phox} をサンドイッチして協同的に結合するという「全く新しい認識機構」をもつことが明らかとなった（図 3.2.3）。ここでの詳細な結合実験には、多数の変異体タンパク質を作製し、種々の機器による結合実験（ビアコア、カロリメータなどを用いたものを含む）を行ったが、これは主として神田グループにより行われた。

(2)研究成果の今後期待される効果

食細胞 NADPH オキシダーゼの活性化に必須の結合である「p47^{phox} の2つの SH3ドメイン(bis-SH3ドメイン)と p22^{phox} の相互作用」の詳細が明らかになったことは、今後、NADPH オキシダーゼ阻害作用をもつ薬剤（現在のところ、NADPH オキシダーゼの特異的な阻害剤は知られていない）の開発などに貢献すると期待される。

3. 6 伊藤グループ(「分子遺伝学」グループ)

(1)研究実施内容及び成果

前述のように、p67^{phox}とp40^{phox}のファゴゾーム膜への targeting において「p67^{phox}とp40^{phox}の相互作用」の役割を明らかにする際、部分的あるいは完全に抑制されてはいるが、protein integrityは損なわれていない種々の変異型タンパク質の作製が決定的であり、これは伊藤グループ(東京大学)により行われた。このために、two-hybrid 法を伊藤らが modify した変法が駆使された。

p47^{phox}の bis-SH3 ドメインは分子内結合により制御されており、リン酸化によって誘導される「p47^{phox}のコンホメーション変化」は食細胞 NADPH オキシダーゼの活性化に必須のステップである。この「p47^{phox}のコンホメーション変化」を、直接経時的にモニターする方法として、伊藤グループ(東京大学)が中心となって、FRET 法を用いた解析を進めている。既に多数の「CFP-p47^{phox}-YFP」という融合タンパク質を作製し、そのうちのいくつかのタンパク質が、少なくとも in vitro ではリン酸化によって FRET 変化がおこる。また、これらが、野生型と同等に p67^{phox}や p22^{phox}と結合できること、またこのタンパク質を食細胞に発現させるとファゴゾームにきちんと target されること、などを確かめている。残念ながら、今のところ、食細胞に発現させた時には、強い FRET 変化は見られていない。これは、一般に食細胞内でのタンパク発現量が少ないことに由来すると考えられる。食細胞での発現系の更なる改良を行っているところである。このように、まだ結果は得られていないが、重要な課題であり、今後も努力を続けていく計画である。

(2)研究成果の今後期待される効果

p47^{phox}の FRET 法による解析が可能になれば、食細胞 NADPH オキシダーゼの活性化メカニズムを、時間的にも空間的にも高い解像度で明らかにすることが可能になるであろう。食細胞 NADPH オキシダーゼの活性化の動態をモニターできれば、感染防御や炎症(炎症では食細胞 NADPH オキシダーゼが不必要に活性化されていると考えられている)など種々の病態を理解する上でも、大きな貢献するものと期待される。

§ 4 研究参加者

① 藤田グループ(補体レクチン経路の分子機構の解析)

	氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
○	藤田 禎三	(公)福島県立 医科大学医学 部 免疫学講 座	教授	補体レクチン経路の解析と 全体総括	H15.10 ～H21.3
	遠藤 雄一		准教授	フィコリン欠損動物の作成 と表現型解析	H15.10 ～H21.3
	高橋 実		助教	MASP-1/3 欠損動物の 表現型解析と再構成	H17. 4 ～H21.3
	岩城 大輔		助教	MASP-2/sMAP 欠損動物 の表現型解析と再編成	H15.10 ～H21.3
	菅野 和子		技官	遺伝子改変マウスの作成 と維持	H15.10 ～H21.3
	石田 由美		技官	遺伝子改変マウスの作成 と維持	H18. 4 ～H21.3
*	高橋 百恵		研究 補助員	リコンビナント蛋白の作成	H15.10 ～H20.3
*	中澤なおみ		研究 補助員	遺伝子改変マウスの作成 と維持	H15.10 ～H20.3
*	熊 洁		研究 補助員	リコンビナント蛋白の作成	H20. 6 ～H21.3
*	佐々木敦子		研究 補助員	遺伝子改変マウスの維持 管理および事務業務	H15.10 ～H21.3

② 若宮グループ(新規膜型コレクチンの機能解析)

	氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
○	若宮 伸隆	(国)旭川医科 大学 医学部 微生物学講座	教授	CL-P1 の生化学的研究と 総括	H15.10 ～H21.3
	吉田 逸朗		准教授	CL-P1 分子微細構造の 解析	H15.10 ～H21.3
	小笠原正洋		講師	CL-P1 リコンビナント蛋白 作成と供給	H15.10 ～H18.10
	福澤 純		特 任 准 教授	CL-P1 機能の生化学的 解析	H15.10 ～H21.3

	大谷 克城	助教	CL-P1 の欠損モデル動物の作製と解析	H15.10 ～H21.3
	小山 聡	研究生	CL-P1 の血管における機能の生化学解析	H16.6 ～H19.3
	本村 亘	助教	CL-P1 の動物組織における生化学的解析	H19.4 ～H21.3
	張 成宰	特任助教	CL-P1 と相互作用する分子探索とそれら分子の生化学的解析	H15.10 ～H21.3
	福田 光子	研究生	硬骨魚類 CL-P1 の欠損モデル作製と解析	H15.10 ～H19.3
	吉崎 隆之	大学院生	CL-P1 リコンビナント・抗体作成、それらを用いた解析	H16.4 ～H20.3
	野村 直樹	大学院生	硬骨魚類 CL-P1 欠損モデルの解析	H18.4 ～H19.8
	森 健一郎	大学院生	マウス CL-P1 の欠損モデル作製と解析	H19.4 ～H21.3

③ 黒木グループ(分泌型コレクチンと Toll 様受容体による炎症制御とマクロファージ機能活性化機構)

	氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
○	黒木 由夫	(公)札幌医科大学 医学部 医化学講座	教授	総括	H15.10 ～H21.3
	佐野 仁美		助教授	コレクチンによる細菌貪食機構	H15.10 ～H18.11
	高橋 素子		准教授	コレクチンによる細菌貪食機構	H19.1 ～H21.3
	清水 健之		講師	コレクチンによる炎症制御機構	H16.10 ～H21.3
	光澤 博昭		助教	TLR の構造と機能	H16.4 ～H19.7
	西谷 千明		助教	TLR の構造と機能	H15.10 ～H21.3
	有木 茂		助教	コレクチンによる細菌貪食と感染防御	H19.8 ～H21.3

	工藤和実	助手	コレクチンによる細菌貪食機構	H15.10 ～H16.3
	百島 尚樹	大学院生	TLRの構造と機能	H15.10 ～H16.6
	山田ちえ子	大学院生	コレクチンによる炎症制御機構	H15.10 ～H18.3
	大屋 円	大学院生	コレクチンによる炎症制御機構	H15.10 ～H18.3
	山添 雅己	大学院生	コレクチンによる炎症制御機構	H18.4 ～H21.3
	澤田 格	大学院生	コレクチンによる細菌貪食と感染防御	H18.4～ H21.3

④ 住本グループ(「生化学・分子生物学」グループ)

	氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
○	住本 英樹	九州大学 大学院医学研究院	教授	生化学・分子生物学・細胞生物学・発生工学的手法による分子認識機構解明	H15.10～H21.3
	武谷 立	九州大学 大学院医学研究院	助教	細胞生物学・発生工学的手法による分子認識機構解明	H15.10～H21.3
	紙 圭一郎	九州大学 生体防御医学研究所	助手	生化学的手法による分子認識機構解明	H15.10 ～ H16.8
	鎌倉 幸子	九州大学 生体防御医学研究所	助教	細胞生物学・発生工学的手法による分子認識機構解明	H15.10 ～ H21.3
*	宮野 佳	九州大学 生体防御医学研究所	CREST 研究員	生化学的手法による分子認識機構解明	H16.4～H20.3
*	伊崎 智子	九州大学	CREST	生化学的手法による	H17.4～H17.9

		生体防御 医学研究所	研究員	分子認識機構解明	
*	西納 美奈子	九州大学 大学院医学 学研究院	テクニカ ルスタッフ	細胞生物学・発生工 学的手法による分子 認識機構解明	H16.10 ~ H21.3
*	早瀬 純也	九州大学 生体防御 医学研究所	CREST 研究補 助員	生化学的手法による 分子認識機構解明	H18.4~H19.3
	水上 令子	九州大学 大学院医学 学研究院	准教授	細胞生物学・発生工 学的手法による分子 認識	H19.4~H21.3
*	鹿毛 陽子	九州大学 大学院医学 学研究院	テクニカ ルスタッフ	細胞生物学による分 子認識機構解明	H19.4~H21.3
*	吉浦 奈津子	九州大学 大学院医学 学研究院	テクニカ ルスタッフ	生化学的手法による 分子認識機構解明	H19.4~H21.3
*	久保 奈実子	九州大学 大学院医学 学研究院	テクニカ ルスタッフ	発生工学的手法によ る分子認識機構解明	H17.4~H18.3 H19.4 ~ H19.10

⑤ 神田グループ(「構造生物学」グループ)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	神田 大輔	九州大学 生体防御 医学研究所	教授	構造生物学的手法に よる分子認識機構解 明	H15.10 ~ H21.3
	前仲 勝美	九州大学 生体防御 医学研究所	准教授	構造生物学的手法に よる分子認識機構解 明	H15.10 ~ H21.3

⑥ 伊藤グループ(「分子遺伝学」グループ)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	伊藤 隆司	東京大学 大学院新 領域創成 科学研究 科	教授	分子遺伝学的手法に よる分子認識機構解 明	H15.10 ～ H21.3
*	藤田 智子	東京大学 大学院新 領域創成 科学研究 科	CREST 研究員	分子遺伝学的手法に よる分子認識機構解 明	H16.4 ～ H18.3
	川口 典子	東京大学 大学院新 領域創成 科学研究 科	産学官連 携研究員	分子遺伝学的手法に よる分子認識機構解 明	H16.10 ～ H20.3
*	瀧沢 聖子	東京大学 大学院新 領域創成 科学研究 科	CREST 研究補助 員	分子遺伝学的手法に よる分子認識機構解 明	H20.4 ～ H21.3

§ 5 招聘した研究者等

なし

§ 6 成果発表等

藤田グループ

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌 35件)

1. Lynch, N.J., Roscher, S., Hartung, T., Morath, S., Matsushita, M., Maennel, D.N., Kuraya, M., Fujita, T., Schwaeble, W.J.
L-ficolin specifically binds to lipoteichoic acid, a cell wall constituent of Gram-positive bacteria, and activates the lectin pathway of complement.
*J. Immunol.*15:172(2):1198-1202(2004)

2. Fujita, T., Matsushita, M., Endo, Y.
The lectin-complement pathway--its role in innate immunity and evolution. *Immunol. Rev.* 198:185-202(2004)
3. Zundel, S., Cseh, S., Lacroix, M., Dahl, M.R., Matsushita, M., Andrieu, J.P., Schwaebler, W.J., Jenseniu, J.C., Fujita, T., Arlaud, G.J., Thielens, N.M.
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- 4350(2004)
4. Fujita, T., Endo, Y., Nonaka, M.
Primitive complement system- recognition and activation. *Molecular Immunol.* 41:103-111(2004)
5. Ma, Y.G., Cho, M.Y., Zhao, M., Park, J.W., Matsushita, M., Fujita, T., Lee, B.L.
Human mannose-binding lectin and L-ficolin function as specific pattern recognition proteins in the lectin activation pathway of complement. *J. Biol. Chem.* 279:25307-25312(2004)
6. 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. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:10127-10131(2004)
7. Gomi, K., Tokue, Y., Kobayashi, T., Takahashi, H., Watanabe, A., Fujita, T., Nukiwa, T.
Mannose-binding lectin gene polymorphism is a modulating factor in repeated respiratory infections. *Chest.* 126(1):95- 99 (2004)
8. 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): 1118-1128(2004)
9. Roos, A., Garred, P., Wildenberg, M.E., Lynch, N.J., Munoz, J.R., Zuiverloon, T.C., Bouwman, L.H., Schlagwein, N., Fallaux van den Houten, F.C., Faber-Krol M.C., Madsen, H.O., Schwaebler, W.J., Matsushita, M., Fujita, T., Daha, M.R.
Antibody-mediated activation of the classical pathway of complement may compensate for mannose- binding lectin deficiency. *Eur.J.Immunol.* 34(9):2589- 2598(2004)
10. 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):737-744(2004)

11. Krarup, A., Thiel, S., Hansen, A., Fujita, T., Jensenius, J.C.
L-ficolin is a pattern recognition molecule specific for acetyl groups.
J. Biol.chem. 279(46):47513-47519 (2004)
12. Aoyagi, Y., Adderson, E.E., Min, J.G., Matsushita, M., Fujita, T., Takahashi, S., Okuwaki, Y., Bohnsack, J.F.
Role of L-ficolin/ mannose- binding lectin-associated serine protease complexes in the opsonophagocytosis of type III group B streptococci.
J. Immunol. 174(1): 418-425 (2005)
13. 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)
14. Iwaki, D., Fujita, T.
Production and purification of recombinants of mouse MASP-2 and sMAP.
J. Endotoxin Res. 11(1):47-50 (2005)
15. 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. *Immunobiol.* 209(9): 689-697 (2005)
16. Berger, S.P., Roos, A., Mallat, M.J., Fujita, T., de Fijter, J.W., Daha, M.R.
Association between mannose-binding lectin levels and graft survival in kidney transplantation. *Am. J. Transplant.* 5(6): 1361-1366 (2005)
17. Hummelshoj, T., Munthe-Fog, L., Madsen, H.O., Fujita, T., Matsushita, M., Garred, P.
Polymorphisms in the FCN2 gene determine serum variation and function of Ficolin-2. *Hum. Mol. Genet.* 14(12):1651-1658 (2005)
18. 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): 1265-1273 (2005)
19. 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): 3150-3156 (2005)
20. 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- c99 (2005)
21. 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):837-844 (2005)
 22. 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): 1038-1040 (2005)
 23. 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)
 24. Endo, Y., Takahashi, M., Fujita, T.
Lectin complement system and pattern recognition. *Immunobiology*. 211:283-293 (2006)
 25. 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)
 26. Endo, Y., Liu, Y., Fujita, T.
Structure and function of ficolins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 586:265-279 (2006)
 27. Iwaki, D., Kanno, K., Takahashi, M., Endo, Y., Lynch, N.J., Schwaeble, W.J., 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)
 28. Garlatti, V., Belloy, N., Martin, L., Lacroix, M., Matsushita, M., Endo, Y., Fujita, T., Fontecilla-Camps, J.C., Arlaud, G.J., Thielens, N.M., Gaboriaud, C.
Structural insights into the innate immune recognition specificities of L- and H-ficolins. *EMBO. J.* 26(2):623-633 (2007)
 29. Hisano, S., Matsushita, M., Fujita, T., Takeshita, M., Iwasaki, H. Activation of the lectin complement pathway in post-streptococcal acute glomerulonephritis. *Pathol. Int.* 57(6):351-357 (2007)
 30. Endo, Y., Matsushita, M., Fujita, T.
Role of ficolin in innate immunity and its molecular basis. *Immunobiology*.

212(4-5):371-379 (2007)

31. Takahashi, M., Mori, S., Shigeta, S., Fujita, T.
Role of MBL-associated serine protease (MASP) on activation of the lectin complement pathway. *Adv. Exp. Med. Biol.* 598:93-104 (2007)
32. Garlatti, V., Martin, L., Gout, E., Reiser, J.B., Fujita, T., Arlaud, G.J., Thielens, N.M., Gaboriaud, C.
Structural basis for innate immune sensing by M-ficolin and its control by a pH-dependent conformational switch. *J. Biol. Chem.* 282(49): 35814-35820 (2007)
33. Unterberger, C., Hanson, S., Klingenhoff, A., Oesterle, D., Frankenberger, M., Endo, Y., Matsushita, M., Fujita, T., Schwaebler, W., Weiss, E.H., Ziegler-Heitbrock, L., Stover, C.
Stat3 is involved in control of MASP2 gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364(4):1022-1025(2007)
34. Aoyagi, Y., Adderson, E.E., Rubens, C.E., Bohnsack, J.F., Min, J.G., Matsushita, M., Fujita, T., Okuwaki, Y., Takahashi, S.
L-Ficolin/mannose-binding lectin-associated serine protease complexes bind to group B streptococci primarily through N-acetylneuraminic acid of capsular polysaccharide and activate the complement pathway. *Infect. Immun.* 76(1): 179-188(2007)
35. Takahashi, M., Iwaki, D., Kanno, K., Ishida, Y., Xiong, J., Matsushita, M., Endo, Y., Miura, S., Ishii, N., Sugamura, K., Fujita, T.
Mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease (MASP)-1 contributes to activation of the lectin complement pathway. *J. Immunol.* 180(9):6132-6138(2008)

(2)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 2 件、国際会議 2 件)

1. 藤田 禎三: The soluble pattern recognition molecules, mannose -binding lectin and ficolins, initiating the lectin complement pathway.
第 78 回日本細菌学会総会 (東京) 2005/4/5
2. 藤田 禎三: 補体レクチン経路と自然免疫
第 49 回日本医真菌学会総会(千葉) 2005/10/7
3. Fujita, T. : Ficolins are a group of the pattern recognition molecules that activate the lectin complement pathway.
VIth International Workshop on the First Component of Complement C1 and Collectins, Seeheim(Germany)2006/6/16

4. Fujita, T.: The lectin complement pathway- recognition and effector. 13th International Congress of Immunology, Rio de Janeiro (Brazil) 2007/8/25

② 口頭発表 (国内会議 3 件、国際会議 6 件)

1. Fujita, T., Takahashi, M., Iwaki, D., Matsushita, A., Matsushita, M., Endo, Y. : Characterization and cloning of lamprey mannose-binding lectin (MBL) and the lectin complement pathway in lamprey.
Interlec 21-21st International Lectin Meeting, Shonan (Japan) 2004/5/26
2. Kanno, K., Takahashi, M., Iwaki, D., Endo, Y., Fujita, T. : The significant role of small mannose-binding lectin (MBL)-associated protein (sMAP) in activation of the lectin complement pathway.
XXth International Complement Workshop, Honolulu (Hawaii) 2004/6/14
3. Fujita, T., Liu, Y., Iwaki, D., Takahashi, M., Endo, Y. : Role of the lectin complement pathway in innate immunity.
The 3rd workshop on complement Associated Diseases, Animal Models, and Therapeutics, Rods (Greece) 2005/6/9
4. Liu, Y., Endo, Y., Iwaki, D., Nakata, M., Matsushita, M., Wada, I., Munakata, M., Fujita, T. : Activation of the lectin complement pathway by human M-ficolin.
10th European Meeting on Complement in Human Disease, Heidelberg (Germany) 2005/9/11
5. Fujita, T., Liu, Y., Endo, Y.: Role of ficolin in innate defense mechanisms. 4th International Conference on Innate Immunity, Corfu (Greece) 2006/6/7
6. Fujita, T., Takahashi, M., Endo, Y.: Characterization of lamprey mannose-binding lectin (MBL).
10th International Congress International Society of Developmental and Comparative Immunology, Charleston (USA) 2006/7/2
7. 遠藤雄一、岩城大輔、高橋 実、松下 操、藤田禎三: 認識分子 Ficolin の構造と働き
第 44 回補体シンポジウム(平塚)2007/8/24
8. Fujita, T. : The collagenous lectins, mannose-binding lectin and ficolins, initiating the lectin complement pathway.
第 80 回日本生化学会大会・第 30 回日本分子生物学会合同大会(横浜) 2007/12/13
9. 藤田禎三: 補体系の分子進化 -レクチン経路と第二経路-
第 45 回補体シンポジウム(札幌)2008/7/11

③ ポスター発表 (国内会議 0 件、国際会議 6 件)

1. Liu, Y., Endo, Y., Homma, S., Kanno, K., Yaginuma, H., Fujita, T.: Ontogeny and expression sites of mouse ficolin A and ficolin B.
XXth International Complement Workshop, Honolulu (Hawaii) 2004/6/15
2. Takahashi, M., Iwaki, D., Fujita, T.: MBL-associated serine protease (MASP)-1 can initiate the complement lectin pathway without C4.
10th European Meeting on Complement in Human Disease, Heidelberg (Germany) 2005/9/11
3. Iwaki, D., Kanno, K., Takahashi, M., Endo, Y., Lynch, N.J., Schwaaeble, W.J., Matsushita, M., Okabe, M., Fujita, T.: Regulatory role of small mannose-binding lectin associated protein (sMAP) in the lectin complement pathway.
4th International Conference on Innate Immunity, Corfu (Greece) 2006/6/9
4. Endo, Y., Nakazawa, N., Kanno, K., Liu, Y., Iwaki, D., Takahashi, M., Nakata, M., Matsushita, M., Okabe, M., Fujita, T.: Ficolin A functions to eliminate pathogens through the lectin complement pathway.
XXI International Complement Workshop, Beijing (China) 2006/10/23
5. Iwaki, D., Kanno, K., Takahashi, M., Endo, Y., Matsushita, M., Fujita, T.: Roles of mannose binding lectin (MBL)-associated serine proteases (MASPs) in opsonization and phagocytosis of Staphylococcus aureus. XXI International Complement Workshop, Beijing (China) 2006/10/23
6. Takahashi, M., Iwaki, D., Endo, Y., Fujita, T.: Two routes (MASP-1 and MASP-2 routes) are present to activate the lectin complement pathway. XXI International Complement Workshop, Beijing (China) 2006/10/25

(3)特許出願 なし

(4)受賞等 なし

(5)その他特記事項

1. 藤田 禎三「補体レクチン経路の重要性」日本臨床 63(4): 93-96(2005)
2. 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):269-273 (2005)
3. 遠藤雄一、藤田 禎三「パターン認識分子としてのフィコリン」日本細菌学雑誌 63(2):399-405(2008)
4. 遠藤雄一、松下操、藤田 禎三「マンノース結合レクチン(MBL)とフィコリン(ficolin)の構造と機能」臨床検査 52(8):841-850(2008)

若宮グループ

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 件、国際(欧文)誌 9件)

1. 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, 585-590(2004).
2. 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*. 49,219-225(2005).
3. 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).
4. 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).
5. 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*. 281,11177-85(2006).
6. 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)
7. 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)
8. Ohhira M, Motomura W, Fukuda M, Yoshizaki T, Takahashi N, Tanno S, Wakamiya N, Kohgo Y, Kumei S, Okumura T.: Lipopolysaccharide induces adipose differentiation-related protein expression and lipid accumulation in the liver through inhibition of fatty acid oxidation in mice. *J Gastroenterol* 42(12):969-78.(2007)
9. Motomura W, Yoshizaki T, Ohtani K, Okumura T, Fukuda M, Fukuzawa J, Mori K, Jang SJ, Nomura N, Yoshida I, Suzuki Y, Kohgo Y, Wakamiya, N.: Immunolocalization of a novel collectin CL-K1 in murine tissues. *J Histochem Cytochem* 56(3):243-52.(2008)

(2)口頭発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 0件、国際会議 2件)

1. Koyamam S, Wakamiya N.: The membrane type collectin CL-P1 is up-regulated in ischemia/reperfusion model in rats. Inter Lec (Shoanan) 2004.5.
2. Wakamiya N.: Biological functions in collectin. Workshop Meeting between Asahikawa and New Zealand Blackcurrant Industry (Christchurch, New Zealand) 2006.2.

② 口頭講演 (国内会議 9件、国際会議 1件)

1. 大谷克城、小山 聡、福田光子、福澤 純、若宮伸隆:膜結合型コレクチンCL-P1の個体における機能解析.第 25 回日本糖質学会(大津)2005.7.
2. 福澤 純, 小山 聡, 長谷部直幸, 菊池健次郎、大谷克城、若宮伸隆:新規スカベンジャー受容体発見に関わるバイオインフォマティクスの応用. 第 53 回日本心臓病学会学術集会(大阪)2005.9.
3. 小山 聡、大谷克城、張 成宰、福 應温、小笠原正洋、福澤 純、若宮伸隆: 膜結合型レクチン CL-P1 の一過性虚血・再灌流負荷における発現動態. 第 78 回日本生化学会大会(神戸)2005.10.
4. 福田光子、伊藤愛子、吉崎隆之、佐藤秀憲、本村 亘、大谷克城、吉田逸朗、若宮伸隆: ゼブラフィッシュ CL-P1 の機能解析. 第 78 回日本生化学会大会(神戸)2005.10
5. 若宮伸隆 :コレクチンに関する臨床応用開発研究と基礎機能解析:第 3 回糖鎖コンソーシアム(東京)2005.12.
6. 滝澤万理、大谷克城、岸雄一郎、坂本隆志、鈴木定彦、若宮伸隆、本多三男: Mannose binding lectin による HIV-1 複製の非特異的抑制効果. 第 35 回日本免疫学会(横浜)2005.12.
7. 福澤純、矢尾尚之、長谷部直幸、菊池健次郎、大谷克城、若宮伸隆、板部洋之: 血液透析患者における血中酸化 LDL 値の決定因子. 第 39 回日本動脈硬化学会総会(大阪)2007.7.
8. 大谷克城、張成宰、吉崎隆之、森健一郎、本村亘、福澤純、吉田逸朗、若宮伸隆、安住薫、鈴木定彦:尾索動物ホヤのコレクチン遺伝子の検索と分子進化. 第 27 回日本糖質学会(福岡)2007. 8.
9. 若宮伸隆、大谷克城、坂本隆志、芥子宏行、福應温、張成宰、吉崎隆之、小山聡、福澤純、本村亘、吉田逸朗、鈴木定彦:新規コレクチンファミリーの発見とその役割. 第 44 回補体シンポジウム(平塚)2007. 8
10. Wakamiya N.,Ohtani K, Azumi K, Jang S-J, Mori K, Fukuzawa J,Yoshida I, Suzuki Y.: Cloning and characterization of novel Ascidian collectins. INTERLEC-23. Stirling (Scotland) 2008.7.15

③ ポスター発表（国内会議 8 件、国際会議 10 件）

『国内会議』

1. 矢尾尚之、福澤 純、小林 武、石田裕則、安済 勉、若宮伸隆、板部洋之、長谷部直幸、菊池 健次郎：血液透析(HD 患者における MTHFR 遺伝子多型、血圧、血中酸化 LDL 値と動脈硬化性疾患との関係．第 48 回日本腎臓学会学術総会(横浜) 2005.6.
2. 小山 聡、張 成宰、大谷克城、福澤 純、小笠原正洋、吉田逸郎、若宮伸隆：膜型コレクチンである新規スカベンジャー受容体 CL-P1 の虚血/再灌流負荷における動態．第 25 回日本糖質学会(大津)2005.7.
3. 福田光子、大谷克城、吉崎隆之、李 付広、本村 亘、福澤 純、若宮伸隆：CL-P1 はゼブラフィッシュの初期発生において血管形成に関与する．第 25 回日本糖質学会(大津)2005.7.
4. 福田光子、大谷克城、古川健太、内田 司、張 成宰、吉崎隆之、本村 亘、福澤純、小笠原正洋、吉田逸郎、若宮伸隆：ゼブラフィッシュを用いた膜型コレクチン CL-P1 の機能解析．第 28 回日本分子生物学会年会(福岡)2005.12.
5. 大谷克城、芥子宏行、坂本隆志、吉崎隆之、本村 亘、張 成宰、福田光子、野村直樹、佐藤秀憲、福澤 純、小笠原正洋、吉田逸郎、若宮伸隆：コレクチン CL-K1 の機能についての解析．第 26 回日本糖質学会年会(仙台)2006.8
6. 張成宰、福應温、大谷克城、福澤純、吉田逸郎、若宮伸隆：クラスリンを介したスカベンジャー受容体 CL-P1 のエンドサイトーシス．第 80 回日本生化学会大会、第 30 回日本分子生物学会（横浜）2007.12.
7. 大谷克城、安住薫、鈴木定彦、張成宰、吉崎隆之、森健一郎、本村亘、福澤純、吉田逸郎、若宮伸隆：尾索動物ホヤコレクチン遺伝子群の検索と遺伝子進化について．第 80 回日本生化学会大会、第 30 回日本分子生物学会（横浜）2007.12
8. 張成宰、大谷克城、森健一郎、本村亘、福澤純、吉田逸郎、若宮伸隆：ヒト血管内皮細胞では酵母ファゴサイトーシスは CL-P1 が担う．第 45 回補体シンポジウム(札幌)2008.7.

『国際会議』

1. Fukuda M, Furukawa K, Uchida T, Kondo Y, Motomura W, Ohtani K, Wakamiya N. : Isolation and characterization of zebra fish CL-P1 gene. 21st International Lectin Meeting (Hayama, Kanagawa) 2004.5.
2. JungC-S, Ohtani K, Ogasawara M, Yoshida I, Wakamiya N. : Scavenger receptor hCL-P1 mediated bacteria phagocytosis through adaptin m2 subunit in CHO transfectants. 21st International Lectin Meeting (Hayama, Kanagawa) 2004.5.

3. Fukuda M, Ohtani K, Ito A, Motomura W, Suzuki Y, Wakamiya N. :Molecular cloning and characterization of zebrafish CL-P1 gene. 18th. International Symposium on Glycoconjugates, Firenze (Italy) 2005.9.
4. Jang S-J, Fukuoh A, Ohtani K, Ogasawara M, Suzuki Y, Wakamiya N. :Adaptin Medium Chain 2 is involved in Scavenger Receptor CL-P1-Mediated Phagocytosis. 18th. International Symposium on Glycoconjugates, Firenze (Italy) 2005.9.
5. Suzuki Y, Takizawa M, Sakamoto T, Kishi Y, Ohtani K, Honda M, Wakamiya N. :Mannose Binding Lectin (MBL) Broadly Neutralizes HIV-1 clade B, B', E, D. 18th. International Symposium on Glycoconjugates, Firenze (Italy) 2005.9.
6. Koyam S, Ohtani K, Jang S-J, Itabe H, Fukuzawa J, Suzuki Y, Wakamiya N. :The membrane type collectin CL-P1 is up-regulated in ischemia/reperfusion condition. 18th. International Symposium on Glycoconjugates, Firenze (Italy) 2005.9.
7. Fukuzawa J, Sakuragi H, Koyama S, Yao N, Fujino T, Haneda T, Nishira J, Wakamiya N, Hasebe N, Kikuchi K.: Macrophage migration inhibitory factor stimulates ischemia-induced neovascularization by increased VEGF and MMP-9 expression mediated through macrophage accumulation. 78th Scientific sessions, American Heart Association. Dallas (USA) 2005.11.
8. Jang S-J, Ohtani K, Fukuzawa J, Motomura W, Koyama S, Wakamiya N.: CL-P1 controls the yeast phagocytosis in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. (Kyoto) 2006.6.
9. Jang S-J, Ohtani K, Koyama S, fukuda M, Motomura W, Yoshida I, Wakamiya N.: Scavenger receptor, CL-P1 mediates yeast phagocytosis in human vascular endothelial layers. XIX International Symposium on Glycoconjugates. Cairns (Australia) 2007.7
10. Ohtani K, Jang S-J, Yoshizaki T, Mori K, Fukuzawa J, Azumi K, Suzuki Y. Wakamiya N.: Cloning and characterization of novel Ascidian collectins. XIX International Symposium on Glycoconjugates. Cairns (Australia) 2007.7

(3) 特許出願

①国内出願（ 1件）

発明の名称:コレクチン活性を有する hCL-K1 ポリペプチド

発明者:若宮伸隆、芥子宏行、大谷克城、坂本隆志、岸雄一郎、

出願人:旭川医科大学、扶桑薬品工業

出願番号:特願 2006-104667 号

出願日:平成 18 年 4 月 5 日

②国外出願(1件)

発明の名称:コレクチン活性を有する hCL-K1 ポリペプチド

発見者:若宮伸隆、大谷克城、坂本隆志、岸雄一郎、芥子亜矢

出願人:旭川医科大学、扶桑薬品工業

出願番号:PCT/JP2007/057632

出願日:平成 19 年4月5日

(4)受賞等 なし

(5)その他特記事項

1. 大谷克城、若宮伸隆:補体系異常と感染. 臨床と微生物、32(3)、261-267(2005).
2. 大谷克城 鈴木定彦 若宮伸隆:コレクチンとその免疫応答における役割 臨床免疫、43(3)、266-274(2006).
3. Suzuki Y, Ohtani K, Wakamiya N.: The novel collectins, CL-L1, CL-P1 and CL-K1. Collagen-related lectins in innate immunity. 85-101. 2007.
4. 大谷克城、鈴木定彦、若宮伸隆: ヒト胎盤コレクチン1. 臨床検査 51(13):1714-1718.2007.
5. 鈴木定彦、大谷克城、張成宰、本村亘、若宮伸隆:新規コレクチン CL-L1, CL-P1, CL-K1 の構造と機能. 臨床検査 52(8):861-869, 2008.

黒木グループ

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 件、国際(欧文)誌 20 件)

1. Okusawa T, Fujita M, Nakamura JI, Into T, Yasuda M, Yoshimura A, Hara Y, Nasebe A, Golenbock DT, Morita M, Kuroki Y, Ogawa T, Shibata KI. Relationship between structures and biological activities of Mycoplasmal diacylated lipopeptides and their recognition by Toll-like receptors 2 and 6. *Infect Immun* 72:1657-1665 (2004).
2. 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).
3. 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).
4. Betsuyaku T. Kuroki Y, Nagai K, Nasuhara Y, Nishimura M. Effects of aging and

- smoking on SP-A and SP-D levels in bronchoalveolar lavage fluid.
Eur Respir J 24:964-970 (2004).
5. Hyakushima N, Mitsuzawa H, Nishitani C, Sano H, Kuronuma K, Konishi M, Himi T, Miyake K, Kuroki Y. Interaction of a soluble form of recombinant extracellular Toll-like receptor 4 (TLR4) with MD-2 enables lipopolysaccharide binding and attenuates TLR4-mediated signaling. *J Immunol* 173:6949-6954 (2004).
 6. Iwaki D, Nishitani T, 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(1):173-176 (2005).
 7. 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).
 8. Takeyama K, Mitsuzawa H, Shimizu T, Konishi M, Nishitani C, Sano H, Kunishima Y, Matsukawa M, Takahashi S, Shibata K, Tsukamoto T, Kuroki Y. The prostate cell lines secrete IL-8 in response to Mycoplasma hominis through Toll-like receptor 2-mediated mechanism. *Prostate* 66:386-391 (2006).
 9. 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* 99:1164-1174 (2005).
 10. 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).
 11. 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).
 12. 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 response: importance of supratrimeric oligomerization. *J Biol Chem* 281:21771-21780 (2006).
 13. 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).
14. 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. *J Immunol* 177:8133-8139 (2006).
 15. 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 ability of phospholipid liposome aggregation. *Biochemistry* 45:14543-14551 (2006).
 16. Takeyama K, Mitsuzawa H, Nishitani C, Shimizu T, Sano H, Kunishima Y, Takahashi S, Hotta H, Matsukawa M, Shibata K, Tsukamoto T, Kuroki Y. 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).
 17. 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).
 18. 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).
 19. Matsushima N, Tanaka T, Enkhbayar P, Mikami T, Taga M, Yamada K, Kuroki Y. Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics* 21:8;124.
 20. Takahashi T, Wada I, Ohtsuka Y, Munakata M, Homma Y, Kuroki Y. Autoantibody to alanyl-tRNA synthetase in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology* 12:642-653 (2007).

(2)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 4件、国際会議 4 件)

1. Kuroki Y. Modulation of Toll-like receptor-mediated inflammation by surfactant protein A. International Congress: Surfactant 2004 (Berlin, Germany) 2004. 5.31-6.5
2. Kuroki Y. Modulation of Toll-like receptor-mediated inflammation and scavenger receptor A-mediated phagocytosis by lung collectins. FASEB Summer Research Conference: Lung Surfactant Cellular and Molecular Biology (Saxton River, Vermont, USA) 2004. 7.24-29

3. Kuroki Y. Collectins, innate immunity and inflammation. 29th Annual North American Cystic Fibrosis Conference. November 2-6, 2006. Denver, USA.
4. 黒木由夫 肺コレクチンによる自然免疫機構 第44回補体シンポジウム 生体防御レクチンシンポジウム、2007年8月(平塚)
5. Kuroki Y., Nishitani C, sano H. Pulmonary collectins in innate immunity of the lung. The 20th Naito Conference, October 9-12, 2007. Shonan Village, Kanagawa Japan.
6. 黒木由夫 肺コレクチン(SP-A と SP-D)による自然免疫機構 日本界面医学会特別講演 2007年10月13日(札幌)
7. 黒木由夫 肺コレクチンによる自然免疫機構 高度医療都市を創出する未来技術シンポジウム「先端テクノロジーの総合戦略:がんと感染症を考える」2008年3月17-18日(岡山)
8. 黒木由夫 肺コレクチンによる炎症制御と抗菌作用 日本生体防御学会 シンポジウム「免疫関連蛋白質の構造機能連携」2008年7月10日(札幌)

② 口頭発表 (国内会議 7 件、国際会議 1 件)

1. Nishitani C, Mitsuzawa H, Hyakushima N, Shimizu T, Sano H, Matsushima N, Fukase K, Kuroki Y. Surfactant proteins A (SP-A) and D (SP-D) directly bind to the extracellular domains of TLR2 and TLR4 through the carbohydrate recognition domain. FASEB Summer Research Conference ; Lung Surfactant: Cellular and Molecular Biology. August, 2006. Snowmass. USA
2. Nie X, Nishitani C, Shimizu T, Mitsuzawa H, Yamazoe M, Sawada K, Takahashi M, Takahashi H, Kuroki Y. Human pulmonary surfactant protein D binds to MD-2. 日本界面医学会 平成 19 年 10 月 11 日 札幌
3. Shimizu T, Nishitani C, Mitsuzawa H, Takahashi M, Ohtani K, Wakamiya N, Kuroki Y. Lung collectins and mannose binding lectins interact with Toll-like receptors by different mechanisms. 第 80 回日本生化学会 平成 19 年 12 月 13 日 横浜
4. Mikami T, tanaka Y, Kuroki Y., Yamada K, Matsushima N. Interaction of LRR-containing proteins with ligands. 第 80 回日本生化学会 平成 19 年 12 月 13 日 横浜
5. Yamazoe M, Nishitani C, Sawada K, Mitsuzawa H, Takahashi M, Takahashi H, Kuroki Y. Pulmonary surfactant protein D suppresses inflammatory cellular responses stimulated with lipopolysaccharide in alveolar macrophages. 第 80 回日本生化学会 平成 19 年 12 月 13 日 横浜
6. Nie X, Nishitani C, Shimizu T, Mitsuzawa H, Yamazoe M, Sawada K, Takahashi M, Kuroki Y. Human pulmonary surfactant protein D directly binds to MD-2 through

the carbohydrate recognition domain. 第 80 回日本生化学会 平成 19 年 12 月 13 日 横浜

7. Nishitani C, Takahashi M, Mitsuzawa H, Shimizu T, Sano H, Matsushima N, Kuroki Y. Toll like receptor region Glu24-Lys47 is a site for MD-2 binding. 第 80 回日本生化学会 平成 19 年 12 月 13 日 横浜
8. Sawada K, Yamazoe M, Nie X, Ariki S, Nishitani C, Shimizu T, Takahashi M, Yokota S, Fujii N, Takahashi H, Kuroki Y. Pulmonary collectins bind Legionella pneumophila. 第 80 回日本生化学会 平成 19 年 12 月 13 日 横浜

③ ポスター発表 (国内会議 5 件、国際会議 8 件)

1. 西谷千明、百島尚樹、佐野仁美、三宅健介、黒木由夫:可溶型 Toll 様受容体 4 と MD-2 及び LPS との相互作用の解析 第 77 回日本生化学会(横浜) 2004. 10.13-16
2. 山田ちえ子、百島尚樹、西谷千明、佐野仁美、氷見徹夫、黒木由夫:サーファクタント P ロテイン A と Toll 様受容体 4、MD-2 との相互作用の解析 第 77 回日本生化学会(横浜) 2004. 10.13-16
3. 山田ちえ子、百島尚樹、西谷千明、佐野仁美、氷見徹夫、黒木由夫:サーファクタント P ロテイン A と Toll 様受容体 4、MD-2 との相互作用の解析 第 34 回日本免疫学会総会(札幌) 2004. 12.1-3
4. 西谷千明、光澤博昭、百島尚樹、佐野仁美、松嶋範男、黒木由夫:Toll 様受容体 4 の細胞外ドメイン Glu24-Pro34 は MD-2 との結合に必須である 第 78 回日本生化学会(神戸) 2005. 10.19-22
5. 光澤博昭、西谷千明、百島尚樹、佐野仁美、深瀬浩一、黒木由夫:可溶型 Toll 様受容体 4 と MD-2 によるリポ多糖認識機構 第 78 回日本生化学会(神戸) 2005. 10.19-22
6. Uemura T, Sano H, Kato T, Kuroki Y. Importance of the kink region of surfactant protein A in oligomer formation and lipid interaction. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology June 22, 2006. Kyoto
7. Nishitani C, Mitsuzawa H, Sano H, Kuroki Y. Cys29 and Cys40 within the amino-terminal Toll-like receptor 4 region are critical for interaction with MD-2. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology June 22, 2006. Kyoto
8. Nishitani C, Mitsuzawa H, Sano H, Kuroki Y. Cys29 and Cys40 within the amino-terminal Toll-like receptor 4 region are critical for interaction with MD-2. 26th Sapporo Cancer Seminar:International Symposium. Innate Immunity in Cancer and Infectious Diseases. July 22, 2006. Sapporo
9. Mitsuzawa H, Nishitani C, Hyakushima N, Shimizu T, Sano H, Fukase K, Kuroki

- Y. Recombinant soluble forms of the extracellular Toll-like receptor (TLR) 4 domain and MD-2 inhibit the binding of lipopolysaccharide (LPS) to TLR4-expressing cells and attenuate LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. 26th Sapporo Cancer Seminar:International Symposium. Innate Immunity in Cancer and Infectious Diseases. July 22, 2006. Sapporo
10. Mitsuzawa H, Nishitani C, Hyakushima N, Shimizu T, Sano H, Matsushima N, Fukase K, Kuroki Y. Recombinant soluble forms of the extracellular Toll-like receptor 4 domain and MD-2 inhibit LPS binding on cell surface and dampen LPS-induced pulmonary inflammation. FASEB Summer Research Conference ; Lung Surfactant: Cellular and Molecular Biology. August 2006. Snowmass. USA.
 11. Kuronuma K, Mitsuzawa H, Takeda K, Kuroki Y., Takahashi H, Chiba H, Murakami S, Voelker DR, Anionic surfactant phospholipids inhibit inflammation from alveolar macrophages and U937 cells. American Thoracic Society 2007 International Conference May 18-23, 2007. San Francisco, USA.
 12. Nishitani C, Yamada C, Sano H, Kuroki Y. Surfactant protein A directly interacts with TLR4 and MD-2 and regulates inflammatory cell responses. The Awaji International Forum on Infection and Immunity. September 1-5, 2007. Awaji Island, Hyogo, Japan.
 13. Nishitani C, Takahashi M, Mitsuzawa H, Shimizu T, Sano H, Matsushima N, Kuroki Y. Toll like receptor 4 region Glu24-Lys47 is a site for MD-2 binding: importance of cysteine residues at the amino-terminus. The 20th Naito Conference, October 9-12, 2007. Shonan Village, Kanagawa Japan.

(3)特許出願 なし

(4)受賞等 なし

(5)その他特記事項

1. Sano H, Kuroki Y. The lung collectins, SP-A and SP-D, modulate pulmonary innate immunity. *Mol Immunol* 42:279-287 (2004)
2. 光澤博昭、黒木由夫. 肺サーファクタントをめぐる最近の進歩. *Annual Review 呼吸器* 45-50 (2005)
3. Matsushima N, Tachi N, Kuroki Y., Enkhbayar P, Osaki M, Kretsinger RH. Structural analysis of leucine rich repeat (LRR) variants in proteins associated with human diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62:2771-2791 (2005)
4. Takahashi H, Sano H, Chiba H, Kuroki Y.
Pulmonary surfactant proteins A and D: innate immune functions and biomarkers

- for lung diseases. *Current Pharmaceutical Design* 12:589–598 (2005)
5. Kuroki Y, Takahashi M, Nishitani C. Pulmonary collectins in Innate immunity of the lung. *Cell Microbiol* 9:1871–1879 (2007)
 6. Mitsuzawa H, Nishitani C, Kuroki Y. Immunomodulatory functions of pulmonary collectins. In *Collagen-related lectins in innate immunity*. Edited by Dave Kilpatrick. 179–190 (2007)

住本・神田・伊藤グループ

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 101 件)

1. Noda, Y., Kohjima, M., Izaki, T., Ota, K., Yoshinaga, S., Inagaki, F., Ito, T., and Sumimoto, H. Molecular recognition in dimerization between PB1 domains. ***J. Biol. Chem.* 278**, 43516–43524. 2003.
2. Yoshinaga, S., Kohjima, M., Ogura, K., Yokochi, M., Takeya, R., Ito, T., Sumimoto, H., and Inagaki, F. The PB1 domain and the PC motif-containing region are structurally similar protein binding modules. ***EMBO J.* 22**, 4888–4897. 2003.
3. Etoh, T., Inoguchi, T., Kakimoto, M., Sonoda, N., Kobayashi, K., Kuroda, J., Sumimoto, H., and Nawata, H. Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility in interventional insulin treatment. ***Diabetologia* 46**, 1428–1437. 2003.
4. Mizukoshi, T., Tanaka, T., Arai, K., Kohda, D., and Masai, H. A critical role of the 3' terminus of nascent DNA chains in recognition of stalled replication forks. ***J. Biol. Chem.* 278**, 42234–42239. 2003.
5. Shakoory, A., Fujii, G., Yoshimura, S., Kitamura, M., Nakayama, K., Ito, T., Ohno, H., and Nakamura, N. Identification of a five-pass transmembrane protein family localizing in the Golgi apparatus and the ER. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312**, 850–857. 2003.
6. Sato, S., Ito, M., Ito, T., and Yoshioka, K. Scaffold protein JSAP1 is transported to growth cones of neurites independent of JNK signaling pathways in PC12h cells. ***Gene* 329**, 51–60. 2003.
7. Mizukami, Y., Sumimoto, H., and Takeshige, K. Induction of cytochrome CYP4F3A in all-trans-retinoic acid-treated HL60 cells. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314**, 104–109. 2004.
8. Feng, S. Y., Ota, K., Yamada, Y., Sawabu, N., and Ito, T. A yeast one-hybrid system to detect methylation-dependent DNA-protein interactions. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313**, 922–925. 2004.
9. 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. 2004.
10. Oki, M., Valenzuela, L., Chiba, T., Ito, T., and Kamakaka, R. T. Barrier proteins remodel and modify chromatin to restrict silenced domains. ***Mol. Cell. Biol.* 24**, 1956–1967. 2004.

11. Kawahara, T., Kuwano, Y., Teshima-Kondo, S., Takeya, R., Sumimoto, H., Kishi, K., Tsunawaki, S., Hirayama, T., and Rokutan, K. Role of NADPH oxidase 1 in oxidative burst response to Toll-like receptor 5 signaling in large intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* **172**, 3051–3058. 2004.
12. Nagai, K., Yamaguchi, T., Takami, T., Kawasumi, A., Aizawa, M., Masuda, N., Shimizu, M., Tominaga, S., Ito, T., Tsukamoto, T., and Osumi, T. SKIP modifies gene expression by affecting both transcription and splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**, 512–517. 2004.
13. Yuzawa, S., Suzuki, N. N., Fujioka, Y., Ogura, K., Sumimoto, H., and Inagaki, F. A molecular mechanism for autoinhibition of the tandem SH3 domains of p47^{phox}, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase. *Genes Cells* **9**, 443–456. 2004.
14. Onda, M., Ota, K., Chiba, T., Sakaki, Y., and Ito, T. Analysis of gene network regulating yeast multidrug resistance by artificial activation of transcription factors: involvement of Pdr3 in salt resistance. *Gene* **332**, 51–59. 2004.
15. 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. Transcriptomic and proteomic analysis of a 14-3-3 gene-deficient yeast. *Biochemistry* **43**, 6149–6158. 2004.
16. Hashida, S., Yuzawa, S., Suzuki, N. N., Fujioka, Y., Takikawa, T., Sumimoto, H., Inagaki, F., and Fujii, H. Binding of FAD to cytochrome *b*₅₅₈ is facilitated during activation of the phagocyte NADPH oxidase, leading to superoxide production. *J. Biol. Chem.* **279**, 26378–26386. 2004.
17. Yuzawa, S., Yokochi, M., Fujioka, Y., Ogura, K., Kataoka, M., Sumimoto, H., and Inagaki, F. Sequence-specific resonance assignments of the tandem SH3 domains in an autoinhibitory form of p47^{phox}. *J. Biomol. NMR* **29**, 451–452. 2004.
18. Yuzawa, S., Ogura, K., Horiuchi, M., Suzuki, N. N., Fujioka, Y., Kataoka, M., Sumimoto, H., and Inagaki, F. Solution structure of the tandem SH3 domains of p47^{phox} in an autoinhibited form. *J. Biol. Chem.* **279**, 29752–29760. 2004.
19. Tanaka, H., Minakami, R., Kanaya, H., and Sumimoto, H. Catalytic residues of group VIB calcium-independent phospholipase A₂ (iPLA₂γ). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 1284–1290. 2004.
20. Hirano, Y., Yoshinaga, S., Ogura, K., Yokochi, M., Noda, Y., Sumimoto, H., and Inagaki, F. Solution structure of atypical PKC PB1 domain and its mode of interaction with ZIP/p62 and MEK5. *J. Biol. Chem.* **279**, 31883–31890. 2004.
21. Sasaki, Y., Ihara, K., Matsuura, N., Kohno, H., Nagafuchi, S., Kuromaru, R., Kusuhara, K., Takeya, R., Hoey, T., Sumimoto, H., Hara, T. Identification of a novel type 1 diabetes susceptibility gene, T-bet. *Hum. Genet.* **115**, 177–184. 2004.
22. Hanano, T., Hara, Y., Shi, J., Morita, H., Umebayashi, C., Mori, E., Sumimoto, H., Ito, Y., Mori, Y., and Inoue, R. Involvement of TRPM7 in cell growth as a spontaneously activated Ca²⁺ entry pathway in human retinoblastoma cells. *J. Pharmacol. Sci.* **95**, 403–419. 2004.
23. 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. Superoxide (O₂^{•−}) production at phagosomal cup/phagosome

- through β I PKC during Fc γ R-mediated phagocytosis in microglia. *J. Immunol.* **173**, 4582–4589. 2004.
24. Kojima, C., Hashimoto, A., Yabuta, I., Hirose, M., Hashimoto, S., Kanaho, Y., Sumimoto, H., Ikegami, T., and Sabe, H. Regulation of Bin1 SH3 domain binding by phosphoinositides. *EMBO J.* **23**, 4413–4422. 2004.
 25. Kamura, T., Maenaka, K., Kotoshiba, S., Matsumoto, M., Kohda, D., Conaway, R. C., Conaway, J. W., and Nakayama, K. I. VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. *Genes Dev.* **18**, 3055–3065. 2004.
 26. Okamura, K., Yamada, Y., Sakaki, Y., and Ito, T. An evolutionary scenario for genomic imprinting of *Impact* lying between nonimprinted neighbors. *DNA Res.* **11**, 381–390. 2004.
 27. Tsubouchi, H., Inoguchi, T., Inuo, M., Kakimoto, M., Sonta, T., Sonoda, N., Sasaki, S., Kobayashi, K., Sumimoto, H., and Nawata, H. 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. 2005.
 28. Takamatsu, H., Takeya, R., Naito, S., and Sumimoto, H. On the mechanism of cell lysis by deformation. *J. Biomech.* **38**, 117–124. 2005.
 29. Shioi, S., Ose, T., Maenaka, K., Shiroishi, M., Abe, Y., Kohda, D., Katayama, T., and Ueda, T. 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. 2005.
 30. Yoshizawa, S., Rasubala, L., Ose, T., Kohda, D., Fourmy, D., and Maenaka, K. Structural basis for mRNA recognition by elongation factor SelB. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 198–203. 2005.
 31. Tanabe, M., Rådmark, O., Watanabe, T., Shiose, A., and Sumimoto, H. Cloning of rat p47^{phox} and comparison with human p47^{phox}. *DNA Seq.* **16**, 65–68. 2005.
 32. Kawahara, T., Kohjima, M., Kuwano, Y., Mino, H., Teshima-Kondo, S., Takeya, R., Tsunawaki, S., Wada, A., Sumimoto, H., and Rokutan, K. *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. 2005.
 33. Rasubala, L., Fourmy, D., Ose, T., Kohda, D., Maenaka, K., and Yoshizawa, S. Crystallization and preliminary C-ray analysis of the mRNA-binding domain of elongation factor SelB in complex with RNA. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **61**, 296–298. 2005.
 34. Hirano, Y., Yoshinaga, S., Takeya, R., Suzuki, N. N., Horiuchi, M., Kohjima, M., Sumimoto, H., and Inagaki, F. Structure of a cell polarity regulator, a complex between aPKC and Par6 PB1 domains. *J. Biol. Chem.* **280**, 9653–9661. 2005.
 35. Izaki, T., Kamakura, S., Kohjima, M., and Sumimoto, H. Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 to Par3 β , a human Par3-related cell polarity protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**, 211–218. 2005.
 36. 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. Group VIB Ca²⁺-independent phospholipase A₂ γ

- promotes cellular membrane hydrolysis and prostaglandin production in a manner distinct from other intracellular phospholipases A₂. *J. Biol. Chem.* **280**, 14028–14041. 2005.
37. Okamura, K., Sakaki, Y., and Ito, T. Comparative genomics approach toward critical determinants for the imprinting of an evolutionarily conserved gene *Impact. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**, 824–830. 2005.
 38. Matsuo, R., Kubota, H., Obata, T., Kito, K., Ota, K., Kitazono, T., Ibayashi, S., Sasaki, T., Iida, M., and Ito, T. The yeast eIF4E-associated protein Eap1p attenuates *GCN4* translation upon TOR inactivation. *FEBS Lett.* **579**, 2433–2438. 2005.
 39. Igura, M., Ose, T., Obita, T., Sato, C., Maenaka, K., Endo, T., and Kohda, D. Crystallization and preliminary X-ray analysis of mitochondrial presequence receptor Tom20 in complexes with a presequence from aldehyde dehydrogenase. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **61**, 514–517. 2005.
 40. Yoshida, S., Ogura, K., Yokochi, M., Yuzawa, S., Horiuchi, M., Morioka, H., Sumimoto, H., and Inagaki, F. ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignments of the backbone and methyl groups of the 24 kDa tetratricopeptide repeat domain in p67^{phox}. *J. Biomol. NMR* **32**, 176. 2005.
 41. Ueno, N., Takeya, R., Miyano, K., Kikuchi, H., and Sumimoto, H. 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. 2005.
 42. Nakayama, M., Inoguchi, T., Sonta, T., Maeda, Y., Sasaki, S., Sawada, F., Tsubouchi, H., Sonoda, N., Kobayashi, K., Sumimoto, H., and Nawata, H. 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. 2005.
 43. 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. G_{α12/13}-mediated production of reactive oxygen species is critical for angiotensin receptor-induced NFAT activation in cardiac fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **280**, 23041–23047. 2005.
 44. Kanaya, H., Takeya, R., Takeuchi, K., Watanabe, N., Jing, N., and Sumimoto, H. Fhos2, a novel formin-related actin-organizing protein, probably associates with the nestin intermediate filament. *Genes Cells* **10**, 665–678. 2005.
 45. Tsubouchi, H., Inoguchi, T., Sonta, T., Sato, N., Sekiguchi, N., Kobayashi, K., Sumimoto, H., Utsumi, H., and Nawata, H. 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. 2005.
 46. Ueyama, T., Eto, M., Kami, K., Tatsuno, T., Kobayashi, T., Shirai, Y., Lennartz, M. R., Takeya, R., Sumimoto, H., and Saito, N. Isoform-specific membrane targeting mechanism of Rac during FcγR-mediated phagocytosis: positive charge-dependent and independent targeting mechanism of Rac to the phagosome. *J. Immunol.* **175**, 2381–2390. 2005.
 47. Kuroki, K., Tsuchiya, N., Shiroishi, M., Rasubala, L., Yamashita, Y., Matsuta, K., Fukazawa, T., Kusaoi, M., Murakami, Y., Takiguchi, M., Juji, T.,

- Hashimoto, H., Kohda, D., Maenaka, K., and Tokunaga, K. Extensive polymorphisms of LILRB1 (ILT2, LIR1) and their association with HLA-DRB1 shared epitope negative rheumatoid arthritis. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 2469–2480. 2005.
48. Kuroda, J., Nakagawa, K., Yamasaki, T., Nakamura, K., Takeya, R., Kuribayashi, F., Imajoh-Ohmi, S., Igarashi, K., Shibata, Y., Sueishi, K., and Sumimoto, H. The superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells. *Genes Cells* **10**, 1139–1151. 2005.
 49. Mizuki, K., Takeya, R., Kuribayashi, F., Nobuhisa, I., Kohda, D., Nunoi, H., Takeshige, K., and Sumimoto, H. 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. 2005.
 50. Miura, F., Uematsu, C., Sakaki, Y., and Ito, T. A novel strategy to design highly specific PCR primers based on the stability and uniqueness of 3'-end subsequences. *Bioinformatics* **21**, 4363–4370. 2005.
 51. Shiroishi, M., Kuroki, K., Tsumoto, K., Yokota, A., Sasaki, T., Amano, K., Shimojima, T., Shirakihara, Y., Rasubala, L., van der Merwe, P. A., Kumagai, I., Kohda, D., and Maenaka, K. Entropically driven MHC class I recognition by human inhibitory receptor leukocyte Ig-like receptor B1 (LILRB1/ILT2/CD85j). *J. Mol. Biol.* **355**, 237–248. 2006.
 52. Titz, B., Thomas, S., Rajagopala, S.V., Chiba, T., Ito, T., and Uetz, P. Transcriptional activators in yeast. *Nucleic Acids Res.* **34**, 955–967. 2006.
 53. Ogura, K., Nobuhisa, I., Yuzawa, S., Takeya, R., Torikai, S., Saikawa, K., Sumimoto, H., and Inagaki, F. 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. 2006.
 54. Izaki, T., Kamakura, S., Kohjima, M., and Sumimoto, H. Two forms of human Inscuteable-related protein that links Par3 to the Pins homologues LGN and AGS3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 1001–1006. 2006.
 55. Shiroishi, M., Kuroki, K., Ose, T., Rasubala, L., Shiratori, I., Arase, H., Tsumoto, K., Kumagai, I., Kohda, D., and Maenaka, K. Efficient leukocyte Ig-like receptor signaling and crystal structure of disulfide-linked HLA-G dimer. *J. Biol. Chem.* **281**, 10439–10447. 2006.
 56. Shiroishi, M., Kohda, D., and Maenaka, K. Preparation and crystallization of the disulfide-linked HLA-G dimer. *Biochim. Biophys. Acta* **1764**, 985–988. 2006.
 57. Nobuhisa, I., Takeya, R., Ogura, K., Ueno, N., Kohda, D., Inagaki, F., and Sumimoto, H. 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. 2006.
 58. Shiroishi, M., Kajikawa, M., Kuroki, K., Ose, T., Kohda, D., and Maenaka, K. Crystal structure of the human monocyte-activating receptor, "Group 2" leukocyte Ig-like receptor A5 (LILRA5/LIR9/ILT11). *J. Biol. Chem.* **281**, 19536–19544. 2006.
 59. Miyano, K., Ueno, N., Takeya, R., and Sumimoto, H. Direct involvement of the

- small GTPase Rac in activation of the superoxide-producing NADPH oxidase Nox1. *J. Biol. Chem.* **281**, 21857–21868. 2006.
60. Takeya, R., Taura, M., Yamasaki, T., Naito, S., and Sumimoto, H. Expression and function of Nox1 γ , an alternative splicing form of the NADPH oxidase organizer 1. *FEBS J.* **273**, 3663–3677. 2006.
 61. Yamada, Y., Shirakawa, T., Taylor, T. D., Okamura, K., Soejima, H., Uchiyama, M., Iwasaka, T., Mukai, T., Muramoto, K., Sakaki, Y., and Ito, T. A comprehensive analysis of allelic methylation status of CpG islands on human chromosome 11q: comparison with chromosome 21q. *DNA Seq.* **17**, 300–306. 2006.
 62. Cheong, J., Yamada, Y., Yamashita, R., Irie, T., Kanai, A., Wakaguri, H., Nakai, K., Ito, T., Saito, I., Sugano, S., and Suzuki, Y. Diverse DNA methylation statuses at alternative promoters of human genes in various tissues. *DNA Res.* **13**, 155–167. 2006.
 63. Honbou, K., Yuzawa, S., Suzuki, N. N., Fujioka, Y., Sumimoto, H., and Inagaki, F. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of p40^{phox}, a regulatory subunit of NADPH oxidase. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **62**, 1018–1020. 2006.
 64. Akasaki, T., Ohya, Y., Kuroda, J., Eto, K., Abe, I., Sumimoto, H., and Iida, M. Increased expression of gp91^{phox} homologues of NAD(P)H oxidase in the aortic media during chronic hypertension: involvement of renin-angiotensin system. *Hypertens. Res.* **29**, 813–820. 2006.
 65. Shiroishi, M., Kuroki, K., Rasubala, L., Tsumoto, K., Kumagai, I., Kurimoto, E., Kato, K., Kohda, D., and Maenaka, K. Structural basis for recognition of the nonclassical MHC molecule HLA-G by the leukocyte Ig-like receptor B2 (LILRB2/LIR2/ILT4/CD85d). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **103**, 16412–16417. 2006.
 66. Onohara, N., Nishida, M., Inoue, R., Kobayashi, H., Sumimoto, H., Sato, Y., Mori, Y., Nagao, T., and Kurose, H. TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *EMBO J.* **25**, 5305–5316. 2006.
 67. Miura, F., Kawaguchi, N., Sese, J., Toyoda, A., Hattori, M., Morishita, S., and Ito, T. A large-scale full-length cDNA analysis to explore the budding yeast transcriptome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **103**, 17846–17851. 2006.
 68. Uchizono, U., Takeya, R., Iwase, M., Sasaki, N., Oku, M., Imoto, H., Iida, M., and Sumimoto, H. Expression of isoforms of NADPH oxidase components in rat pancreatic islets. *Life Sci.* **80**, 133–139. 2006.
 69. Yamaguchi, Y., Ota, K., and Ito, T. A novel Cdc42-interacting domain of the yeast polarity establishment protein Bem1: implications for modulation of mating pheromone signaling. *J. Biol. Chem.* **282**, 29–38. 2007.
 70. Kawahashi, Y., Doi, N., Oishi, Y., Tsuda, C., Takashima, H., Baba, T., Mori, H., Ito, T., and Yanagawa, H. High-throughput fluorescence labeling of full-length cDNA products based on a reconstituted translation system. *J. Biochem.* **141**, 19–24. 2007.
 71. Yamamoto, A., Kami, K., Takeya, R., and Sumimoto, H. Interaction between the SH3 domains and C-terminal proline-rich region in NADPH oxidase organizer 1 (Nox1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **352**, 560–565. 2007.
 72. Satoh, S., Tanaka, H., Ueda, Y., Oyama, J. I., Sugano, M., Sumimoto, H., Mori,

- Y., Makino, N. Transient receptor potential (TRP) protein 7 acts as a G protein-activated Ca^{2+} channel mediating angiotensin II-induced myocardial apoptosis. *Mol. Cell. Biochem.* **294**, 205–215. 2007.
73. Honbou, K., Minakami, R., Yuzawa, S., Takeya, R., Suzuki, N. N., Kamakura, S., Sumimoto, H. (co-corresponding author), and Inagaki, F. (co-corresponding author) Full-length p40^{phox} structure suggests a basis for regulation mechanism of its membrane binding. *EMBO J.* **26**, 1176–1186. 2007.
 74. Ueyama, T., Tatsuno, T., Kawasaki, T., Tsujibe, S., Shirai, Y., Sumimoto, H., Leto, T. L., and Saito, N. 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. 2007.
 75. Bayarsaikhan, M., Takino, T., Gantulga, D., Sato, H., Ito, T., and Yoshioka, K. Regulation of N-cadherin-based cell-cell interaction by JSAP1 scaffold in PC12h cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **353**, 357–362. 2007.
 76. Kito, K., Ota, K., Fujita, T., and Ito, T. A synthetic protein approach toward accurate mass spectrometric quantification of component stoichiometry of multiprotein complexes. *J. Proteome Res.* **6**, 792–800. 2007.
 77. Sasaki, K., Ose, T., Tanaka, T., Mizukoshi, T., Ishigaki, T., Maenaka, K., Masai, H., and Kohda, D. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the N-terminal domain of PriA from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1764**, 157–160. 2006.
 78. Sasaki, K., Ose, T., Okamoto, N., Maenaka, K., Tanaka, T., Masai, H., Saito, M., Shirai, T., and Kohda, D. Structural basis of the 3'-end recognition of a leading strand in stalled replication forks by PriA. *EMBO J.* **26**, 2584–2593. 2007.
 79. Kuroki, K., Kobayashi, S., Shiroishi, M., Kajikawa, M., Okamoto, N., Kohda, D., and Maenaka, K. Detection of weak ligand interactions of leukocyte Ig-like receptor B1 by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Immunol. Methods* **320**, 172–176. 2007.
 80. Ose, T., Soler, N., Rasubala, L., Kuroki, K., Kohda, D., Fourmy, D., Yoshizawa, S., and Maenaka, K. Structural basis for dynamic interdomain movement and RNA recognition of the selenocysteine-specific elongation factor SelB. *Structure* **15**, 577–586. 2007.
 81. Shinohara, M., Shang, W. H., Kubodera, M., Harada, S., Mitsushita, J., Kato, M., Miyazaki, H., Sumimoto, H., and Kamata, T. Nox1 redox-signaling mediates oncogenic Ras-induced disruption of stress fibers and focal adhesions by down-regulating Rho. *J. Biol. Chem.* **282**, 17640–17648. 2007.
 82. Kakiuchi, K., Yamauchi, Y., Taoka, M., Iwago, M., Fujita, T., Ito, T., Song, SY., Sakai, A., Isobe, T., and Ichimura, T. Proteomic analysis of in vivo 14-3-3 interactions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*. **46**, 7781–7792. 2007.
 83. Tanaka, T., Mizukoshi, T., Sasaki, K., Kohda, D., and Masai, H. *Escherichia coli* PriA protein, two modes of DNA binding and activation of ATP hydrolysis. *J Biol Chem* **282**, 19917–19927. 2007.
 84. Fujii, M., Inoguchi, T., Maeda, Y., Sasaki, S., Sawada, F., Saito, R., Kobayashi, K., Sumimoto, H., and Takayanagi, R. Pitavastatin ameliorates albuminuria and renal mesangial expansion via down-regulation of NOX4 in db/db mice.

- Kidney Int.* **72**, 473–480. 2007.
85. Miyano, K. and Sumimoto, H. Role of the small GTPase Rac in p22^{phox}-dependent NADPH oxidases. *Biochimie* **89**, 1133–1144. 2007.
 86. Igura, M., Maita, N., Obita, T., Kamishikiryo, J., Maenaka, K., and Kohda, D. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the soluble domain of the oligosaccharyltransferase STT3 subunit from the thermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **63**, 798–801. 2007.
 87. Kohda, D., Yamada, M., Igura, M., Kamishikiryo, J., and Maenaka, K. New oligosaccharyltransferase assay method. *Glycobiology* **17**, 1175–1182. 2007.
 88. Hashiguchi, T., Kajikawa, M., Maita, N., Takeda, M., Kuroki, K., Sasaki, K., Kohda, D., Yanagi, Y., and Maenaka, K. Crystal structure of measles virus hemagglutinin provides insight into effective vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 19535–19540. 2007.
 89. Saitoh, T., Igura, M., Obita, T., Ose, T., Kojima, R., Maenaka, K., Endo, T., and Kohda, D. Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states. *EMBO J.* **26**, 4777–4787. 2007.
 90. Tabata, S., Kuroki, K., Maita, N., Wang, J., Shiratori, I., Arase, H., Kohda, D., and Maenaka, K. Expression, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of human paired Ig-like type 2 receptor alpha (PILRalpha). *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **64**, 44–46. 2007.
 91. Igura, M., Maita, N., Kamishikiryo, J., Yamada, M., Obita, T., Maenaka, K., and Kohda, D. Structure-guided identification of a new catalytic motif of oligosaccharyltransferase. *EMBO J.* **27**, 234–243. 2008.
 92. Mayumi, M., Takeda, Y., Hoshiko, M., Serada, K., Murata, M., Moritomo, T., Takizawa, F., Kobayashi, I., Araki, K., Nakanishi, T., Sumimoto, H. Characterization of teleost phagocyte NADPH oxidase: Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) phagocyte NADPH oxidase. *Mol. Immunol.* **45**, 1720–1731. 2008.
 93. Tabata, S., Kuroki, K., Wang, J., Kajikawa, M., Shiratori, I., Kohda, D., Arase, H., and Maenaka, K. Biophysical characterization of O-glycosylated CD99 recognition by paired Ig-like type 2 receptors (PILR). *J. Biol. Chem.* **283**, 8893–8901. 2008.
 94. Aoki, N., Sakiyama, A., Kuroki, K., Maenaka, K., Kohda, D., Deshimaru, M., and Terada, S. Serotriflin, a CRISP family protein with binding affinity for small serum protein-2 in snake serum. *Biochim. Biophys. Acta* **1784**, 621–628. 2008.
 95. Takeya, R., Taniguchi, K., Narumiya, S., Sumimoto, H. The mammalian formin FHOD1 is activated through phosphorylation by ROCK and mediates thrombin-induced stress fibre formation in endothelial cells. *EMBO J.* **27**, 618–628. 2008.
 96. Hashiguchi, T., Kajikawa, M., Maita, N., Takeda, M., Kuroki, K., Sasaki, K., Kohda, D., Yanagi, Y., and Maenaka, K. Homogeneous sugar modification improves crystallization of measles virus hemagglutinin. *J. Virol. Methods* **149**, 171–174. 2008.
 97. Kito, K., Kawaguchi, N., Okada, S., and Ito, T. Discrimination between stable and dynamic components of protein complexes by means of quantitative

- proteomics. *Proteomics* **8**, 2366–2370. 2008.
98. Ota, K., Kito, K., Iemura, S., Natsume, T., and Ito, T. A parallel affinity purification method for selective isolation of polyubiquitinated proteins. *Proteomics* **8**, 3004–3007. 2008.
 99. Shono, T., Yokoyama, N., Uesaka, T., Kuroda, J., Takeya, R., Yamasaki, T., Amano, T., Mizoguchi, M., Suzuki, S. O., Niino, H., Miyamoto, K., Akashi, K., Iwaki, T., Sumimoto, H., and Sasaki, T. Enhanced expression of NADPH oxidase Nox4 in human gliomas and its roles in cell proliferation and survival. *Int. J. Cancer* **123**, 787–792, 2008.
 100. Fukao, M., Obita, T., Yoneyama, F., Kohda, D., Zendo, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K. Complete Covalent Structure of Nisin Q, New Natural Nisin Variant, Containing Post-Translationally Modified Amino Acids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press.
 101. Ota, K., Kito, K., Okada, S., and Ito, T. A proteomic screen reveals the mitochondrial outer membrane protein Mdm34p as an essential target of the F-box protein Mdm30p. *Genes Cells*, in press.

(2)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

④ 招待講演 (国内会議 14 件、国際会議 15 件)

1. Hideki Sumimoto. Reactive oxygen species as microbicidal agents: molecular mechanism for activation of the superoxide-producing phagocyte NADPH oxidase: The 16th Naito Conference on Innate Immunity in Medicine and Biology [I], Zushi, Japan. 10/28–10/31, 2003.
2. 住本 英樹, 武谷 立. Role of protein–protein and protein–lipid interactions in activation of the NADPH oxidases Nox1 and Nox2. シンポジウム「NADPH oxidase の新展開–その分子構造と活性化機構」第 76 回日本生化学会大会, 横浜. 10/15–10/18, 2003.
3. Hideki Sumimoto. Molecular mechanisms for activation of Nox1 and Nox4. 2nd International Conference on NADPH Oxidases, Pine Mountain, GA, USA. 3/27–3/31, 2004
4. Hideki Sumimoto. Molecular mechanisms for activation of the superoxide-producing NADPH oxidases. Chemical Biology of Metal Sensors with Switching Functions: the 4th Symposium, Yokohama, Japan. 10/12, 2004.
5. Hideki Sumimoto, Noriko Ueno, Tomoko Yamasaki, Masahiko Taura, and Ryu Takeya. Molecular mechanism underlying activation of superoxide-producing NADPH oxidases: roles for their regulatory proteins. The 4th International Peroxidase Meeting, Kyoto, Japan. 10/27–10/30, 2004.
6. Daisuke Kohda. Cracking of the targeting signal embedded in mitochondrial presequences by NMR and crystallography. CREST International Symposium “Frontier of Biological NMR Spectroscopy”, Osaka, Japan. 1/26–1/27, 2004.
7. Daisuke Kohda. Cracking of the targeting signal embedded in mitochondrial presequences by NMR and crystallography. UK–Japan Structural Genomics Conference Whither Structural Genomics? A UK/Japan Symposium, Oxford, UK. 3/23–3/25, 2004.
8. 住本英樹、武谷立、黒田淳也. 血管内皮細胞と血管平滑筋細胞におけ

- る NADPH オキシダーゼ. シンポジウム「新しい薬物療法の標的分子: 非血球型 NADPH オキシダーゼの機能と制御機構」: 第 77 回日本薬理学会年会, 大阪, 3/8-3/10, 2004.
9. 住本 英樹. 活性酸素生成型 NADPH オキシダーゼの活性化メカニズム. 大阪大学タンパク質研究所セミナー「化学と生物の融合: 生体金属科学の構築に向けて」, 豊中. 6/3-6/4, 2004.
 10. 住本 英樹. 活性酸素生成型 NADPH オキシダーゼの活性化メカニズム. シンポジウム「活性酸素・フリーラジカルの産生に関わる酵素系」: 第 26 回日本フリーラジカル学会学術集会, 山形. 6/24-6/25, 2004.
 11. 住本 英樹. 動物における NOX ファミリーの役割とその活性化機構. シンポジウム「生体防御における酸素の功罪」第 15 回日本生体防御学会学術総会, 長崎. 7/8-7/10, 2004.
 12. 住本 英樹. 好中球による活性酸素生成の分子メカニズム. ワークショップ「好中球と炎症」: 第 25 回日本炎症・再生医学会, 東京. 7/13-7/14, 2004.
 13. Daisuke Kohda. Cracking of the targeting signal embedded in mitochondrial presequences. (Invited speaker) XX Congress of the International Union of Crystallography Florence, Italy. 8/23-8/31, 2005
 14. Takashi Ito. Functional Genomic Basis for Yeast Systems Biology. Human Genome Meeting 2005, Kyoto, Japan. 4/20, 2005.
 15. 住本 英樹. 注目される新しい活性酸素産生酵素 Nox/Duox ファミリーの多彩な機能. シンポジウム「新しい時代にむけた消化管研究-他分野からの提案-」: 第 1 回日本消化管学会総会, 名古屋. 1/28-1/29, 2005.
 16. 住本 英樹, 宮野 佳, 武谷 立. 動物の Nox ファミリー NADPH オキシダーゼの調節機構. シンポジウム「生体防御の役割をになう新ファミリー NOX: 植物-動物」: 第 16 回日本生体防御学会学術総会, 東京. 8/4-8/6, 2005.
 17. 住本 英樹, 上野 紀子, 田浦 政彦, 宮野 佳, 武谷 立. Regulatory mechanism for Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. ワークショップ「レドックスシグナリングと生命機能の制御」: 第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡. 12/7-12/10, 2005.
 18. Hideki Sumimoto. Molecular mechanism for activation of superoxide-producing NADPH oxidases. The 50th Anniversary of Oxygenases: Advances and Reflections: The 14th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, Kyoto, Japan. 4/10-4/12, 2006.
 19. Hideki Sumimoto. Molecular composition and regulation of Nox1-3. Gordon Research Conferences on Nox-Family NADPH Oxidases, Les Diablerets, the Switzerland. 10/16-10/20, 2006
 20. Hideki Sumimoto. Role of Rac in Regulation of Nox1-3. The Phagosome and the Immune/Inflammatory Response: 16th Annual Workshop of Massachusetts General Hospital's Center of the Study of Inflammatory Bowel Disease, Boston, USA. 2006, 11/10-11/11, 2006.
 21. Takashi Ito. Further exploration of the budding yeast transcriptome. The 25th International Specialised Symposium on Yeasts, Espo, Finland. 6/19, 2006.
 22. 住本 英樹. 活性酸素生成型 NADPH オキシダーゼ: 活性型複合体形成の分子機構. ワークショップ「超分子タンパク質複合体の分子機構」: 第

- 6 回日本タンパク質科学会年会，京都． 4/24–4/26, 2006.
23. Hideki Sumimoto. Molecular mechanism for activation of the phagocyte NADPH oxidase. Symposium “NO/ROS in Cell Signaling”: 19th FAOBMB Seoul Conference, Seoul, Republic of Korea. 5/27–5/30, 2007.
 24. Hideki Sumimoto. Mechanism for activation of superoxide-producing NADPH oxidases. The 4th Meeting of International Redox Network, Jeju Island, Republic of Korea. 10/30–11/2, 2007.
 25. Takashi Ito. Y2H and MS approaches for annotating protein interactions and modifications. Interactome Mapping Project for Human and Model Organisms, Cold Spring Harbor, NY, USA. 4/24, 2007.
 26. 住本 英樹．（特別講演）活性酸素を作る酵素 Nox ファミリーの調節機構．第 17 回日本臨床化学会九州支部総会／第 51 回日本臨床検査医学会九州地方会，大分． 2/3, 2007.
 27. 住本 英樹．活性酸素生成酵素 NADPH オキシダーゼ (Nox) ファミリーの機能と調節機構．ワークショップ「酸化ストレスの評価方法と腎障害への応用」：第 50 回日本腎臓学会学術総会，浜松． 5/25–5/27, 2007.
 28. 住本 英樹，宮野 圭，水上 令子．活性酸素生成型 NADPH オキシダーゼの活性化の分子機構．シンポジウム「生体内ラジカル／活性酸素種による生理応答機構と病態形成」：第 81 回日本薬理学会年会，横浜． 3/17–3/19, 2008.
 29. 住本 英樹．（特別講演）活性酸素生成酵素 Nox の調節機構．第 61 回日本酸化ストレス学会学術集会，京都． 6/19–6/20, 2008.

⑤ 口頭発表 （国内会議 22 件、国際会議 7 件）

1. 神田大輔．タンパク質によるリガンドの“ゆるい”分子認識－ミトコンドリア標的シグナルの識別を例として－．平成 15 年度生体機能関連若手フォーラム「産学官からの情報発信」，熊本．2003, 10/11.
2. 神田大輔．Structure and Function of PX and SH3 Domains in the NADPH Oxidase system. シンポジウム「NADPH oxidase の新展開－その分子構造と活性化機構」：第 76 回日本生化学会大会，横浜．2003, 10/15–10/18.
3. 伊藤隆司．インタラクトーム解析からの知識発見．シンポジウム「相互作用のバイオインフォマティクス」：第 26 回日本分子生物学会年会，神戸． 2003, 12/10– 12/13.
4. Daisuke Kohda. From structure to function of PX domains in the NADPH oxidase system. 11th Hot Spring Harbor Symposium of Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University Joint with the 21st century COE program, Japan and the Kyushu University P&P. “From Genomes to Medicine”, Fukuoka. 2003, 12/15– 12/16.
5. 神田大輔．ミトコンドリア・プレ配列と Tom20 タンパク質のソフトな相互作用－分子間 S-S 結合形成を利用した新しい解析手法－．特定領域研究公開シンポジウム「生命秩序の膜インタフェースを制御するソフトな分子間相互作用」，東京． 2004, 2/9.
6. 住本 英樹．カルシウム非依存生ホスホリパーゼ A2 (VIB 型 iPLA2) の構造と機能．シンポジウム「ユニークな生物機能を有するホスホリパーゼ」：第 46 回日本脂質生化学会，熊本． 2004, 6/18– 6/19.
7. 神田大輔．ミトコンドリアへの標的シグナルを構造の観点から解読する．第 26 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム，東京． 2004, 11/25.

- 伊藤 隆司. 定量オーミックスとバイオインフォマティクス. シンポジウム「ポストゲノム時代のバイオインフォマティクス」: 第27回日本分子生物学会年会, 神戸. 2004, 12/9. 伊藤 隆司. 定量オーミックスとバイオインフォマティクス. シンポジウム「ポストゲノム時代のバイオインフォマティクス」: 第27回日本分子生物学会年会, 神戸. 2004, 12/9.
8. 伊藤 隆司. 定量オーミックスとバイオインフォマティクス. シンポジウム「ポストゲノム時代のバイオインフォマティクス」: 第27回日本分子生物学会年会, 神戸. 2004, 12/9.
 9. Takashi Ito. Structure of the yeast transcriptome: full-length cDNA analysis and absolute quantitation of mRNAs. Numbers to the Models, Gotenberg, Sweden. 2005, 6/11.
 10. 住本 英樹. Par3 α 及び Par3 β による哺乳類上皮細胞の極性決定の制御. ワークショップ「細胞極性」: 第5回日本タンパク質科学学会年会, 福岡. 2005, 6/30- 7/2.
 11. 武谷 立, 住本 英樹. Nox α 1 及び Nox α 1 による活性酸素生成型 NADPH オキシダーゼ (Nox) の活性化制御機構. 第16回日本生体防御学会学術総会, 東京. 2005, 8/4- 8/6.
 12. 神田大輔. <ゆるい>相互作用に対する構造生物学アプローチ. よこはま NMR 構造生物学会 第27回ワークショップ「細胞シグナリングの構造生物学」, 横浜. 2005, 9/21.
 13. 神田大輔. “ゆるい”相互作用に対する構造生物学的アプローチ. 第22回 NMR ユーザーズ・ミーティング (ブルカー・バイオスピン), 大阪, 東京. 2005, 10/12- 10/13.
 14. 神田大輔. シグナリング構造としての P X ドメイン. 第43回日本生物物理学会年会, 札幌. 2005, 11/23.
 15. 伊藤 隆司. 酵母の機能プロテオミクス: フォワードとリバース. シンポジウム「プロテオーム研究の最前線」: 第6回日本タンパク質科学学会, 京都. 2006, 4/24- 4/26.
 16. 神田大輔. 「ゆるい相互作用を X 線結晶解析と NMR で見る. ワークショップ「複合した手法によるタンパク質構造解析」: 第6回日本タンパク質科学学会, 京都. 2006, 4/24- 4/26.
 17. 宮野 佳, 上野 紀子, 武谷 立, 住本 英樹. スーパーオキシド生成酵素 NADPH オキシダーゼ Nox1 の活性化における低分子量 G タンパク質 Rac の役割. 第17回日本生体防御学会学術総会, 北海道. 2006, 7/27- 7/29.
 18. Ryu Takeya and Hideki Sumimoto. Phosphorylation-dependent regulation of the formin-homology protein Fhos1/FHOD1). International Symposium on Bio-nanosystems, Matsushima. 2006, 9/1- 9/3.
 19. 宮野 佳, 上野 紀子, 武谷 立, 住本 英樹. スーパーオキシド生成酵素 NADPH オキシダーゼ Nox1 の活性化における低分子量 G タンパク質 Rac の役割. 第12回 MPO 研究会, 大阪. 2006, 9/22- 9/23.
 20. Daisuke Kohda. Recognize not to discriminate: mechanism of nonselective base recognition of 3'-terminus of DNA by PriA protein. The 2nd Sapporo Conference 2006; New Trend in Structural Biology, Sapporo. 2006, 10/30- 10/31.
 21. Takashi Ito. Unexpected complexity the budding yeast transcriptome.

- Yeast Systems Biology Network 1st Workshop, Vienna, Austria. 2006, 11/17.
22. 伊藤隆司. 出芽酵母：ポストゲノムシーケンス 10 年の歩み. シンポジウム「プロジェクト型研究時代の生命科学の課題」：日本分子生物学会 2006 フォーラム, 名古屋. 2006, 12/8.
 23. 住本 英樹. Nox ファミリー NADPH オキシダーゼの活性化機構. シンポジウム「レドックス研究のフロンティア」：日本学術振興会レドックス生命科学第 170 委員会, 大阪. 2007, 3/12- 3/13.
 24. Takashi Ito. Two-hybrid and mass-spectrometric approaches for annotating protein interactions and modifications. Proteomics 2007, Tokyo. 2007, 3/13.
 25. Daisuke Kohda. Relaxation study reveals a dual-mode interaction mechanism for mitochondrial presequence recognition by Tom20. International Workshop on Perspectives on stable isotope aided NMR methods for protein structural analysis. Osaka. 2007, 3/30- 3/31.
 26. 武谷 立, 住本 英樹. formin 相同タンパク質 Fhos1/FHOD1 のリン酸化依存的活性化機構. ワークショップ「細胞骨格・細胞運動・細胞移動」：第 40 回日本発生生物学会／第 59 回日本細胞生物学会 合同大会, 福岡. 2007, 5/28- 5/30.
 27. 紀藤圭治, 山口佳洋, 太田一寿, 伊藤隆司. デュアルベイト逆 2 ハイブリッドシステムと PCS-MS によるタンパク質間相互作用の機能解析. シンポジウム「プロテオミクスの新技術」：日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会, 東京. 2007, 7/30.
 28. 武谷 立, 谷口 賢一郎, 成宮 周, 住本 英樹. formin 相同タンパク質 Fhos/FHOD1 のリン酸化による活性制御機構. 第 30 回日本分子生物学会年会／第 80 回日本生化学会大会合同大会 BMB2007, 横浜. 2007, 12/11- 12/15.
 29. 斉藤 貴士, 井倉 真由美, 尾瀬 農之, 前仲 勝実, 神田 大輔. 複数の結合様式を介したミトコンドリア Tom20 によるプレ配列の認識機構. 「若手奨励賞シンポジウム」：第 8 回日本タンパク質科学学会年会, 東京. 2008, 6/10- 6/12.

⑥ ポスター発表 (国内会議 24 件、国際会議 7 件)

1. Noriko Ueno, Ryu Takeya, Hideki Sumimoto. Molecular mechanism for activation of the superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox1. 第 76 回日本生化学会大会, 横浜. 2003, 10/15- 10/18.
2. Ryu Takeya, Noriko Ueno, Keiichiro Kami, Masahiko Taura, Motoyuki Kohjima, Tomoko Izaki, Hiroyuki Nunoi, Hideki Sumimoto. Novel Human Homologus of p47^{phox} and p67^{phox} Participate in Activation of Superoxide-producing NADPH Oxidases. 第 76 回日本生化学会大会, 横浜. 2003, 10/15- 10/18
3. 上野 紀子, 武谷 立, 紙 圭一郎, 住本 英樹. 活性酸素生成型 NAD(P)H オキシダーゼ Nox1 の活性化の分子機構. 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸. 2003, 12/10- 12/13.
4. 田浦 政彦, 武谷 立, 紙 圭一郎, 住本 英樹. 食細胞 NADPH オキシ

- ダーゼ活性化タンパク質 p47^{phox} の SH3 ドメイン近傍のアミノ酸残基 Ile-152 と Thr-153 の役割. 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸. 2003, 12/10- 12/13. 国府島 庸之, 住本 英樹. ヒト PAR3 の tight junction への局在機構. 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸. 2003, 12/10- 12/13.
5. 国府島 庸之, 住本 英樹. ヒト PAR3 の tight junction への局在機構. 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸. 2003, 12/10- 12/13.
 6. 武谷 立, 住本 英樹. Fhos, a mammalian formin, directly binds to F-actin via a region N-terminal to the FH1 domain and forms a homotypic complex via the FH2 domain to promote actin fiber formation. 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸. 2003, 12/10- 12/13.
 7. 武谷 立, 住本 英樹. Fhos, a mammalian formin, integrates actin and microtubule networks. 第 57 回日本細胞生物学会大会, 大阪. 2004, 5/26- 5/28.
 8. Sumimoto, H., Takeya, R., Taura, M., Ueno, N. Molecular mechanism by which p47^{phox} or its homologue activates superoxide- producing NADPH oxidases. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo. 2004, 8/30- 9/2.
 9. Tomoko Izaki, Motoyuki Kohjima, Hideki Sumimoto. An Interaction between 14-3-3 and Par3 is important in establishment of mammalian cell polarity. 第 77 回日本生化学会大会, 横浜. 2004, 10/13- 10/16.
 10. Ryu Takeya, Hideki Sumimoto. Localization of the mammalian forming Fhos to actin- based structures and microtubule networks. 第 77 回日本生化学会大会, 横浜. 2004, 10/13- 10/16.
 11. Masahiko Taura, Ryu Takeya, Keiichiro Kami, Hideki Sumimoto. The role for Ile-152 and Thr-153 of p47^{phox} in activation of the phagocyte NADPH oxidase. 第 77 回日本生化学会大会, 横浜. 2004, 10/13- 10/16.
 12. Noriko Ueno, Ryu Takeya, Kei Miyano, Hideaki Kikuchi, Hideki Sumimoto. The NADPH oxidase Nox3 produces superoxide in a p22^{phox}-dependent manner. 第 78 回日本生化学会大会, 神戸. 2005, 10/19- 10/22.
 13. Ryu Takeya, Masahiko Taura, Tomoko Yamasaki, Hideki Sumimoto. ワークショップ「ストレス 2」 Expression and function of Noxo 1 τ , an alternative splicing form of the NADPH oxidase organizer 1. 第 78 回日本生化学会大会, 神戸. 2005, 10/19- 10/22.
 14. Tomoko Izaki, Sachiko Kamakura, Motouki Kohjima, Hideki Sumimoto, Phosphorylation- dependent binding of 14-3-3 proteins to Par β , a mammalian. 第 78 回日本生化学会大会, 神戸. 2005, 10/19- 10/22.

15. Ryu Takeya, Masahiko Taura, Tomoko Yamazaki, Hideki Sumimoto, Regulation of the NADPH oxidase(Nox) by Noxo1 τ , an alternative splicing form of the Nox organizer1. 第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡. 2005, 12/7- 12/10.
16. Noriko Ueno, Ryu Takeya, Kei Miyano, Hideki Kikuchi, Hideki Sumimoto. The NADPH Oxidase Nox3 Constitutively Produces Superoxide in a p22^{phox}-dependent Manner: ITS REGULATION BY OXIDASE ORGANIZERS AND ACTIVATORS. 第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡. 2005, 12/7- 12/10.
17. Ryu Takeya, Hideki Sumimoto. The activation mechanism of the formin-homology protein Fhos1/FHOD1. 第 20 回国際生化学・分子生物学会議/第 11 回アジア・オセアニア生化学者・分子生物学者連合会議, 京都. 2006, 6/18- 6/23.
18. Sachiko Kamakura, Tomoko Izaki, Motoyuki Kohjima, Hideki Sumimoto. Human Inscuteable- related protein links Par3 to the Pins homologues LGN and AGS3 to regulate cell polarity. 第 20 回国際生化学・分子生物学会議/第 11 回アジア・オセアニア生化学者・分子生物学者連合会議, 京都. 2006, 6/18- 6/23.
19. Kei Miyano, Noriko Ueno, Ryu Takeya, Hideki Sumimoto. Direct Involvement of the Small GTPase Rac in Activation of the Superoxide-Producing NADPH Oxidase Nox1. 第 20 回国際生化学・分子生物学会議/第 11 回アジア・オセアニア生化学者・分子生物学者連合会議, 京都. 2006, 6/18- 6/23.
20. Kei Miyano, Noriko Ueno, Ryu Takeya, Hideki Sumimoto. Direct Involvement of the Small GTPase Rac in Activation of the Superoxide-Producing NADPH Oxidase Nox1. Gordon Research Conferences on Nox-Family NADPH Oxidases, Les Diablerets, the Switzerland. 2006, 10/16- 10/20.
21. 水上 令子, 本坊 和也, 湯澤 聡, 武谷 立, 鈴木 展生, 鎌倉 幸子, 稲垣 冬彦, 住本 英樹. 食細胞 NADPH オキシダーゼ細胞質因子 p40^{phox} の膜移行の制御機構. 第 18 回日本生体防御学会学術総会, 福岡. 2007, 7/26- 7/28.
22. 宮野 佳, 住本 英樹. スーパーオキシド生成酵素 Nox1~Nox3 の活性化における低分子量 G タンパク質 Rac の役割. 第 18 回日本生体防御学会学術総会, 福岡. 2007, 7/26- 7/28.
23. 山本 麻太郎, 武谷 立, 住本 英樹. NADPH オキシダーゼ活性化タンパク質 Noxo1 のリン酸化による制御. 第 18 回日本生体防御学会学術総

- 会，福岡．2007, 7/26- 7/28.
- 24.宮野 佳，住本 英樹．スーパーオキシド生成型 NADPH オキシダーゼ Nox1-Nox3 の活性化における低分子量 G タンパク質 Rac の役割．第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会 BMB2008, 横浜．2007, 12/11- 12/15.
- 25.水上 令子，本坊 和也，湯澤 聡，武谷 立，鈴木 展生，鎌倉 幸子，稲垣 冬彦，住本 英樹．p40phox の PX ドメインと PtdIns(3)P との結合は p40phox の PB1 ドメインによって負に制御されている．第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会 BMB2009, 横浜．2007, 12/11- 12/15.
- 26.山本 麻太郎，武谷 立，住本 英樹．スーパーオキシド生成酵素 Nox1 の活性化における細胞質因子 Noxo1 のリン酸化．第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会 BMB2009, 横浜．2007, 12/11- 12/15.
- 27.大木 出，真板 宣夫，前仲 勝実，神田 大輔．DNA のメチル化シグナルを見分ける分子メカニズム-メチル化および非メチル化 C p G 結合ドメインの立体構造より-．第 8 回日本タンパク質科学学会年会，東京．2008, 6/10- 6/12.
- 28.井倉 真由美，上敷領 淳，ニレンダジェイムス，前仲 勝実，神田 大輔．Asn 結合型糖鎖修飾を決定するオリゴ糖転移酵素・膜タンパク質の大腸菌による発現．第 8 回日本タンパク質科学学会年会，東京．2008, 6/10- 6/12.
- 29.田中 卓，佐々木 香織，水越 利巳，神田 大輔，正井 久雄．大腸菌 PriA タンパク質による停止複製フォーク感知と安定化の分子機構の解明：TT-pocket による DNA 3' 末端の認識．第 8 回日本タンパク質科学学会年会，東京．2008, 6/10- 6/12.
- 30.Mayumi Igura, Nobuo Maita, Jun Kamishikiryuu, James Nyirenda, Katsumi Maenaka, Daisuke Kohda. Successful expression of archaeal STT3 membrane protein in E.coli cells. XXI Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2008), Osaka. 2008, 8/23- 8/31.
- 31.Takashi Saitoh and Daisuke Kohda. Relaxation analysis of the Tom20-bound states of a mitochondrial presequence. International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (XXIII ICMRBS), San Diego, USA. 2008, 8/24- 8/29.

(3)特許出願 なし

(4)受賞等

①受賞

武谷立(九州大学生体防御医学研究所)平成 17 年度日本生体防御学会奨励賞

②新聞報道

(5)その他特記事項

英文総説論文発表

1. Takeya, R., and Sumimoto, H. Molecular mechanism for activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *Mol. Cells* **16**, 271–277. 2003.
2. Sumimoto, H., Ueno, N., Yamasaki, T., Taura, M., and Takeya, R. Molecular mechanism underlying activation of superoxide-producing NADPH oxidases: roles for their regulatory proteins. *Jpn. J. Infect. Dis.* **57**, S24–S25. 2004.
3. Kito, K., and Ito, T. Mass spectrometry-based proteomics for quantitative description of cellular events. *Curr. Genomics* **5**, 629–635. 2004.
4. Sumimoto, H., Miyano, K., and Takeya, R. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 677–686. 2005.
5. Takeya, R., Ueno, N., and Sumimoto, H. Regulation of superoxide-producing NADPH oxidases in nonphagocytic cells. *Methods Enzymol.* **406**, 456–468. 2006.
6. Okamura, K., and Ito, T. Lessons from comparative analysis of species-specific imprinted genes. *Cytogenet. Genome Res.* **13**, 159–164. 2006.
7. Takeya, R., and Sumimoto, H. Regulation of novel superoxide-producing NAD(P)H oxidases. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1523–1532. 2006.
8. Minakami, R., and Sumimoto, H. Phagocytosis-coupled activation of the superoxide-producing phagocyte oxidase, a member of the NADPH oxidase (Nox) family. *Int. J. Hematol.* **84**, 193–198. 2006.
9. Sumimoto, H., Kamakura, S., and Ito, T. Structure and function of the PB1 domain, a protein interaction module conserved in animals, fungi, amoebas, and plants. *Science STKE* **2007**, re6, 2007.
10. Kito, K., and Ito, T. Mass spectrometry-based approaches toward absolute quantitative proteomics. *Curr. Genomics* **9**, 263–274. 2008.
11. Sumimoto, H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J.* **275**, 3249–3277. 2008.

§ 7 研究期間中の主な活動

ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成 16 年 3 月 10 日	シンポジウム「新しい薬物療法の標的分子：非血球型 NADPH オキシダーゼの機能と制御機構」	大阪	200 名	第 77 回日本薬理学会年会のシンポジウムの 1 つとして、住本がもう 1 名のオーガナイザーと共に、企画・運営した。5 つの演題が発表され活発な質疑応答がなされた。
平成 17 年 10 月 15～16 日	The 11th MPO meeting	福岡	50 名	住本が開催委員長として、米国 NIH からの招待講演者（Thomas L. Leto 博士）に全国の好中球研究者を集めて行われた。英語による 20 演題が発表され活発な質疑応答がなされた。
平成 17 年 12 月 8 日	ワークショップ「レドックスシグナリングと生命機能の制御」	福岡	400 名	第 28 回日本分子生物学会のワークショップの 1 つとして、住本がもう 1 名のオーガナイザーと共に、企画・運営した。250 席以上ある会場から人が溢れるほど盛況で、極めて活発な質疑応答・討論がなされた。
平成 19 年 11 月 30 日	「感染症をめぐる宿主の応答と微生物の戦略」18th Forum in DOJIN フォーラム・イン・ドージン	熊本	200 名	2 人のオーガナイザーの 1 人として住本が、「感染症をめぐる宿主の応答と微生物の戦略」というテーマでのシンポジウムを企画・運営した。極めて活発な質疑応答・討論がなされた。

§ 8 結び

藤田、若宮、黒木グループ

本研究は、「生体防御におけるたんぱく質相互作用と機能発現機構の解析」と題して、自然免疫に関与するレクチンに焦点を絞り研究を行った。コラーゲン構造を持つレクチンとしてのコレクチン、特に新たな膜型コレクチンとコレクチンと類似のフィコリンについて、たんぱく質としての機能を明らかにできた。特に、研究代表者は、フランスとの共同研究としてフィコリンの構造解析を行うことができ、その柔軟な認識機構を明らかにした。この機構は、ちょうど自然免疫における機能発現の柔軟性を示しているかのようであった。また、最終年度になり、機能発現に関与するセリンプロテアーゼ(MASP)に関しても補体第二経路の活性化と密接に関連していることを明らかできた。

本研究グループは、福島医大の研究代表者のグループに加えて、旭川医大と札幌医大の3グループが行ったものです。この報告書に詳細に述べてあるとおり、CREST 研究のサポートをいただき、いくつかの画期的な結果を残すことができたと感じている。この3グループは、いずれも地方の単科の医科大学であるが、ビクネイムの研究者と交流ができたのは、望外の成果であった。

最後に、領域代表の大島泰郎先生はじめ、アドバイザーの先生方、および、本研究のスムーズな実施にたいへん尽力いただきました領域事務所の方々にあつく御礼申し上げます。

住本、神田、伊藤グループ

CREST の支援を得られたお陰で、「NADPH オキシダーゼ活性化の分子および原子メカニズム」について、5 年前には予想できなかった進展があったと考えている。本研究で得られた研究成果をもとに、分子レベルおよび原子レベルでの研究をさらに展開していきたいと考えている。

最後になりましたが、ご指導ご助言下さいました領域代表の大島泰郎先生と領域アドバイザーの先生方、ならびに、ひとかたならぬお世話を下さいました五十嵐孝司様はじめ領域事務所の皆様に、厚く御礼申し上げます。