

平成21年 5月29日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590278  
 研究課題名 (和文) 上皮細胞における新規 NADPH oxidase 活性化機構の解明  
 研究課題名 (英文) Analysis of activation mechanism of new members of NADPH oxidase family  
 研究代表者  
 上山健彦 (TAKEHIKO UEYAMA)  
 神戸大学・自然科学系先端融合研究環バイオシグナル研究センター・講師  
 研究者番号：80346254

## 研究成果の概要：

近年、上皮細胞における活性酸素の産生が報告され、続いて組織特異的に存在する新規 NADPH oxidase (Nox: 7 種類) が確認され、その生理機能やその機能異常によって引き起こされる疾患などに注目が集っている。本研究では、新規 Nox の活性化機構の詳細を、遺伝子操作マウスや操作マウス由来の細胞などを用いて解明することを試みた。

その結果、

1. 生細胞を用いて、共焦点レーザー顕微鏡下で、可視化により蛋白質相互作用を検知できる新規蛍光蛋白質システム (complementation-based method using a monomeric coral fluorescent protein: mKG system) を開発し、その有用性を Nox 複合体の相互作用を用いて証明し、報告した。
2. 遺伝子操作マウス由来の初代培養細胞とレンチウイルスを用いた Nox の再構築系の確立に成功した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医化学一般

キーワード：活性酸素, NADPH oxidase, 感染症

## 1. 研究開始当初の背景

近年、上皮細胞における活性酸素の産生が報告され、続いて組織特異的に存在する新規

Nox (7 種類) が確認され、その生理機能やその機能異常によって引き起こされる疾患などに注目が集っている。我々は、貪食細胞お

よび上皮細胞における活性酸素産生機構の  
 解明に取り組み、世界に先駆けた報告を行っ  
 てきている。

## 2. 研究の目的

本研究は、新規 NADPH oxidase の活性化機  
 構の詳細を、遺伝子操作マウスや操作マウス  
 由来の細胞などを用いて解明しようという  
 ものである。

## 3. 研究の方法

(1) 可視化により相互作用を検知で  
 ける新規蛍光蛋白質システムを確立  
 すし、Nox複合体構成因子間の相互作  
 用を解明する。

(2) 遺伝子操作マウス由来の初代培  
 養細胞とレンチウイルスを用いた  
 Nox の再構築系を確立する。

## 4. 研究成果

(1) 生細胞を用いて、共焦点レーザー顕微鏡  
 下で、可視化により蛋白質相互作用を検知で  
 ける新規蛍光蛋白質システム

(complementation-based method using a  
 monomeric coral fluorescent protein: mKG  
 system) を開発し (図1)、その有用性を Nox  
 複合体の相互作用を用いて証明し (図2)、  
 報告した。

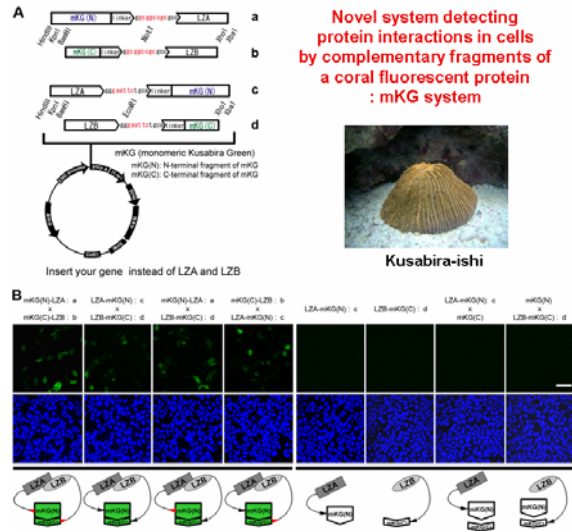


図1 : mKG システム

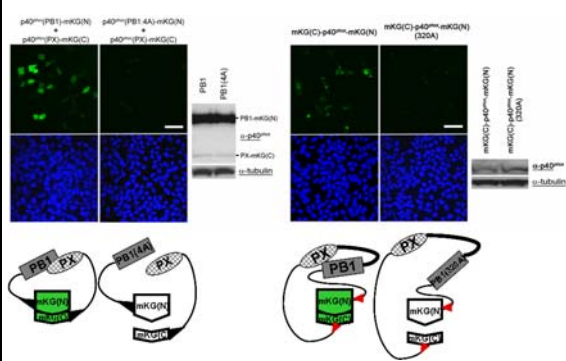


図2 : mKG システムを用いた Nox 構成分子内の結合 (PX-PB1 間の結合) の証明

(2) マウス由来の初代培養細胞にレンチウ  
 イルスベクターを用いて Cre recombinase や  
 shRNA などを発現させることにより、Nox の  
 活性化機構の詳細を解明できる Nox の再構  
 築系の確立に成功した。今後は、このシステ  
 ムと遺伝子操作動物を用いた解析を行う予  
 定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- 1) Ueyama T, Kusakabe T, Karasawa S, Kawasaki T, Shimizu A, Son J, Leto TL, Miyawaki A, Saito N: Sequential binding of cytosolic phox proteins to phagosomes through regulated adaptor proteins: evaluation using the novel monomeric Kusabira-Green system and live imaging of phagocytosis, *J Immunol.* 181, 629-640, 2008
- 2) Adachi N, Kobayashi T, Takahashi H, Kawasaki T, Shirai Y, Ueyama T, Matsuda T, Seki T, Sakai N, Saito N. Enzymological analysis of mutant protein kinase C gamma causing spinocerebellar ataxia type 14 and dysfunction in Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *J Biol Chem*, 283, 19854-19863, 2008
- 3) Kawasaki T, Kobayashi T, Ueyama T, Shirai Y, Saito N: Regulation of clathrin dependent endocytosis by diacylglycerol kinase delta-importance of kinase activity and binding to AP2alpha, *Biochem J*, 409, 471-479, 2008
- 4) Ashida N, Ueyama T, Rikitake K, Shirai Y, Eto M, Kondoh T, Kohmura E, Saito N: Ca<sup>2+</sup> oscillation induced by P2Y2 receptor activation and its regulation by a neuron-specific subtype of PKC

(・PKC), *Neurosci Lett*, 446, 123-128, 2008

- 5) 上山健彦, 齋藤尚亮: 新規アダプター蛋白質 (Noxo1, Noxal) の構造と機能, G. I. Research, 16, 208-213, 先端医学社, 2008

[学会発表] (計 3 件)

- 1) Ueyama T, Kusakabe T, Karasawa S, Kawasaki T, Shimizu A, Son J, Leto TL, Miyawaki A, Saito N: Sequential binding of cytosolic phox complex to phagosomes through regulated adaptor proteins, Gordon Research Conferences (NADPH oxidase), June 1-7, 2008, Colby-Sawyer College, NH, USA
  - 2) 上山健彦 他 8 名: Nox2 活性化時における phox 蛋白複合体の食胞膜へのターゲティング機構, 第 81 回日本薬理学会年会, 平成 20 年 3 月 19 日, パシヒコ横浜
  - 3) Ueyama T, Tatsuno T, Kawasaki T, Leto TL, Saito N: A regulated adaptor function of p40<sup>phox</sup>: Intramolecular interaction (PX-PB1 domain) within p40<sup>phox</sup>, Gordon Research Conferences (Phagocytes), June 10-15, 2007, Bryant University, Smithfield, RI, USA
- ## 6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
上山健彦 (TAKEHIKO UYAMA)  
神戸大学・自然科学系先端融合研究環バイオシグナル研究センター・講師  
研究者番号: 80346254

(2) 研究分担者  
該当なし

(3) 連携研究者  
該当なし