

〈特集：酸化ストレス〉

酸化ストレス応答とNoxファミリー

宮野 佳、住本 英樹

Oxidative stress and the Nox family

Kei Miyano and Hideki Sumimoto

Summary Reactive oxygen species (ROS) play a crucial role in a variety of biological processes including host defense, hormone biosynthesis, oxygen sensing, and signal transduction. Enzymes dedicated to ROS production include members of the NADPH oxidase (Nox) family, which are membrane-spanning flavocytochromes that reduce molecular oxygen to superoxide with an electron derived from NADPH. Here, we describe a current view of the involvement of Nox oxidases in oxidative stress together with the mechanism for Nox activation.

Key words: NADPH oxidase, Superoxide, Reactive oxygen species, Rac, Oxidative stress

I. はじめに

一般に、活性酸素は悪玉のイメージを持たれている。それは、代謝系の副産物である活性酸素が組織や細胞に害を及ぼすためである。一方、生体において反応性の高い活性酸素は様々な生理的な役割を果たしている^{1,2)}。例えば、生体防御に重要な好中球は種々の活性酸素を殺菌剤として用いていること、また甲状腺ホルモン合成には H_2O_2 が必須であること、さらには活性酸素がシグナル伝達分子として機能していることが知られている。活性酸素が有効に用いられるためには、その生成の「時間」、「空間」そして「量」が厳密に制御されている必要がある。そのためには、活性酸素を「制御不能な副産物」として生じる系ではなく、「真の産物」として

生成する系が必要とされる。

活性酸素を積極的に生成する酵素系としてよく知られているのが食細胞NADPHオキシダーゼである。本酵素は、好中球やマクロファージ等に発現が見られ、殺菌剤である活性酸素の生成源として機能している。食細胞NADPHオキシダーゼによる活性酸素の生成は、宿主に害を及ぼすのを避けるために厳密に制御されている。この性質は、生体が活性酸素を有効に活用するための条件である「時間」、「空間」そして「量」を満たしている。しかしながら、本酵素の発現は食細胞に限定されているため、様々な組織や細胞における活性酸素の生成源の候補からは外れてしまう。ところが、数年前に食細胞NADPHオキシダーゼのホモログが次々と見出され、NADPHオキシダーゼ (NADPH oxidase; Nox)

九州大学大学院 医学研究院 生化学分野
〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1

Department of Biochemistry, Kyushu University
Graduate School of Medical Sciences,
3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

ファミリーを形成していることが明らかになった^{1,2)}。Noxファミリーは、それぞれが多様な発現パターンを示すことから、生体の酸化ストレス応答を担う活性酸素の生成源として機能していることが考えられる。

II. Noxファミリーの構造

食細胞NADPHオキシダーゼの酵素本体は、膜タンパク質であるgp91^{phox} (phoxは「phagocyte oxidase」を意味する)である。このgp91^{phox}のホモログは、ヒトではNox1からNox5までが同定され、gp91^{phox}には別名としてNox2が与えられた。これらのNoxに加えて、遠縁のオキシダーゼとして2種類のDuox (Dual oxidase)も甲状腺ホルモンの合成に必要な活性酸素の生成源として機能している。Noxは、細胞質のNADPHから電子を受け取り、細胞外の酸素分子に電子を与えることにより、活性酸素の一種であるスーパーオキシド (O₂⁻)を生成する(図1)。Noxファミリーには共通してN末端側に6つの膜貫通セグメントと、C末端側の細胞質領域にFAD結合ドメインとNADPH結合ドメインが存在する。また、膜貫通セグメントの3番目と5番目には、ヘムが配位するためのヒスチジン残基が保存されている。すなわち、Noxには「NADPH→FAD→ヘム→O₂」の電子伝達系がすべて含まれてい

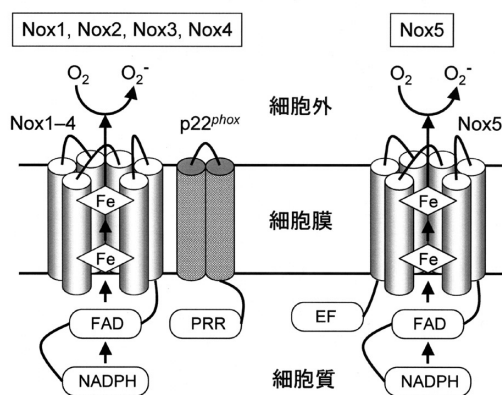


図1 Noxファミリーの構造
ヘム; Fe, FAD結合ドメイン; FAD, NADPH結合ドメイン; NADPH, プロリンリッチ領域; PRR (Proline-rich region), EF

る。Noxの酵素活性は、細胞質タンパク質や膜タンパク質による制御を受けており、その詳細については後述する。

III. 酸化ストレス応答におけるNoxの役割

Noxファミリーの中でも、Nox1とNox4は様々な細胞に発現していることから、種々の酸化ストレス応答に関わっていると考えられる。血管平滑筋細胞に発現しているNox1は、アンジオテンシンII (Ang II)を介した高血圧に関与していると考えられている。実際に血管平滑筋細胞を用いたin vitroの実験で、Ang IIの刺激によりNox1の発現が転写レベルで誘導されること、Nox1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現させることにより酸化ストレス応答分子であるp38とAkt (p38とAktは、Ang IIに応答する血圧上昇に必要なシグナル分子)の活性化の程度が低下することが示されている³⁾。また、マウスへのAng IIの持続投与は、転写レベルでのNox1発現の誘導、活性酸素の生成および血圧の上昇を引き起こすが、Nox1のノックアウトマウスではAng IIによる活性酸素の生成と血圧の上昇が抑制されることが示されており⁴⁾、in vivoにおいてもAng II誘導性の高血圧を引き起こす酸化ストレス応答にNox1が関与すると考えられて

いる。活性酸素が、Ras発癌遺伝子による様々な哺乳類細胞の癌化へ関与していることが指摘されている⁵⁾。活性型のRasによりNox1の発現が転写レベルで増強されること、また、それはRas-MAPKシグナル伝達を介していることなどから⁶⁾、Ras発癌遺伝子による細胞の癌化にはNox1による活性酸素の生成が関与していると思われる。

最近、Nox1のノックアウトマウスは熱などの痛みに対する刺激の感受性が低下していることが示された⁷⁾。組織障害を招く熱は、温度受容体TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1)を活性化し、痛みに対する刺激の感受性を高める。このTRPV1活性は、ATPやブラジキニンがGタンパク質共役受容体の下流でPKC (protein kinase C)を活性化し、TRPV1をリン酸化することによりさらに増強される。Nox1の発現が見られる後根神経節ニューロンは、野生型ではブラジキニンなどの刺激によりTRPV1の活性増強が見

られるのに対して、Nox1ノックアウトマウスではその効果は見られない。さらに、Nox1ノックアウトマウスの後根神経節ニューロンでは、TRPV1のリン酸化に必要なPKCの膜移行が著しく低下していることが示された⁷⁾。このように、Nox1から生成された活性酸素はPKCの膜移行を促進し、TRPV1活性を増強し痛みに対する刺激の感受性を高めていると考えられる。

Nox4はヒト腎皮質に高発現するNoxとして同定され、腎臓において酸素センサーや細胞の増殖の制御に関わっている可能性が考えられた⁸⁾。その後、脂肪細胞に発現するNox4がインスリン刺激からグルコース取り込みまでのシグナル伝達に関与する可能性や⁹⁾、膵臓ガン細胞のアポトーシス耐性に関与していることが報告されている¹⁰⁾。膵臓ガン細胞において、Nox4のノックダウンはアポトーシスを誘導すること、細胞機能の制御に関連するAktタンパク質の活性化をブロックすることが示されている。

活性酸素は、菌体成分であるリポポリサッカライド (LPS) が toll 様受容体4 (TLR4) を介して炎症性サイトカインを誘導するシグナル伝達に関与している¹¹⁾。TLR4からサイトカインの発現誘導までは、TRAF6-ASK1-p38のシグナル経路が関与すると考えられる¹¹⁾。活性酸素は、TLR4がLPSを認識することにより生成され、ASK1に結合しているチオレドキシシン (TRX) を酸化することによりTRXをASK1から解離させ、ASK1を活性化させることでシグナルとして機能する¹⁰⁾。この酸化ストレス応答における活性酸素の生成源として、Nox4の関与が指摘されている¹²⁾。

また、大脳微小管上皮細胞¹³⁾や血管内皮細胞¹⁴⁾においてTNF- α によって引き起こされる酸化ストレス応答へNox4が関与していることが指摘された。TNF- α は、血管内皮細胞においてアテローム硬化性病変への寄与が知られており、Nox4がアデノシン受容体を介して、細胞からのTNF- α の産生を負に制御し、アテローム硬化性病変を抑制している可能性が示唆された¹⁴⁾。

IV. Noxファミリーの活性制御

NoxのO₂⁻生成活性は、タンパク質-タンパク

質間相互作用やタンパク質-脂質間相互作用により巧妙に制御されている。Noxファミリーの中でも最初に見いだされたNox2は、その活性制御機構がもっともよく研究されてきた。そこでまず、Nox2を例にして、その後Noxファミリーの活性化機構について説明したい。

1) Nox2の活性化機構

食細胞NADPHオキシダーゼの酵素本体であるNox2の重要性は、その遺伝的欠損症で幼少期より重篤な感染症を繰り返す慢性肉芽腫症で示される。Nox2は、同じく膜タンパク質であるp22^{phox}とヘテロ2量体を形成している (図1)。両者の結合は互いの安定化に必要であり、p22^{phox}の遺伝子欠損ではNox2のmRNAレベルでの発現は見られるがタンパク質レベルで存在できなくなり慢性肉芽腫症の原因となる。Nox2は、p22^{phox}と複合体を形成しただけではまったく酵素活性を持たない。その活性化には、細胞質に存在するp67^{phox}、p47^{phox}、p40^{phox}そして低分子量Gタンパク質であるRacが必要である (図2)。これらのタンパク質因子が膜移行し、Nox2と複合体を形成することにより、はじめてNox2はO₂⁻を生成することができる。

p67^{phox}は、N末端側から、Racが結合するTPRドメイン、Nox2の活性化に必須な領域である活性化ドメインが存在し、さらに2つのSH3ドメインとこれらに挟まれたPB1ドメインが存在する (図2)。p67^{phox}のPB1ドメインにはp40^{phox}が結合し、C末端側のSH3ドメインにp47^{phox}が結合する。また、N末端側のSH3ドメインは、p67^{phox}のNox2への親和性を上昇させることでNox2の活性化を正に調節している¹⁵⁾。

細胞休止時、すなわちO₂⁻の生成を必要としない状況では、p67^{phox}は細胞質に存在している。Nox2の活性化に必要なp67^{phox}の膜移行は、恒常的に結合しているp47^{phox}とp40^{phox}により制御されている (図2)。p47^{phox}は、N末端側からPXドメイン、2つのSH3ドメイン、そしてp67^{phox}のSH3ドメインに結合するプロリンリッチ領域 (PRR) が存在する。p47^{phox}のPXドメインは、ホスファチジルイノシトール3,4-ビスリン酸 (PI(3,4)P₂) などのホスホイノシチドと結合する。また、SH3ドメインは、Nox2とヘテロ2量体を

形成しているp22^{phox}のPRRと結合する^{1,2)}。p47^{phox}は、PXドメインのタンパク質-脂質間の相互作用と、SH3ドメインのタンパク質-タンパク質間の相互作用を介して膜移行できるのである。細胞休止時では、p47^{phox}のSH3ドメインはC末端側のAIR (auto-inhibitory region) と呼ばれる領域と結合することでマスクされており、標的と結合することができない。このマスクは、細胞刺激時(病原体の貪食時)のシグナル伝達によって、最終的にAIRがリン酸化され、それに伴う高次構造の変化により解除されることになる^{1,2)}。その結果、p47^{phox}は標的分子(脂質やp22^{phox})と結合し、それに伴ってp67^{phox}は膜に移行することができるようになる(図2)。このようにp47^{phox}の高次構造の変化は、Nox2活性化のスイッチの1つになっている。

p40^{phox}は、一次構造上N末端側からPXドメイン、SH3ドメイン、PB1ドメインから構成される。p40^{phox}のPB1ドメインは、p67^{phox}のPB1ドメインと結合することにより恒常的に結合している。PXドメインは、食胞膜に多く含まれるPI(3)Pと特異的に結合することが知られ、三者複合体の食胞膜への移行を促進しNox2活性を増強する(図2)^{1,2)}。また、PXドメインと脂質との結合が自己分子内制御により調節されていることが明らかにされた¹⁶⁾。PXドメインは、分子内のPB1ドメインと結合することで制御を受けているのだが、この分子内制御がどのような仕組みで解除されるかは分かっていない。

p67^{phox}は、種々の構造解析の結果から「伸びた」構造を取っていると考えられており¹⁷⁾、p47^{phox}やp40^{phox}と異なり、p67^{phox}が分子内ドメイン間の相互作用により自己制御を受けていないことと一致する。これは、Nox2の活性化に必要なp67^{phox}の膜移行は、p47^{phox}とp40^{phox}の自己分子内制御によって調節されていることと対照的である。Nox2の活性化は、p67^{phox}、p47^{phox}、p40^{phox}の三者複合体の膜移行に加えてRacが必要である。細胞内シグナル伝達の結果、活性型となったRacは膜に移行し、独立に膜に移行したp67^{phox}に結合することによりNox2を活性化している。

2) Nox1とNox3活性を制御するactivatorとorganizerタンパク質

Nox1も、Nox2と同様にp22^{phox}と会合しており、それだけでは活性を持たない。その活性化には、p67^{phox}のホモログであるNox1 (Nox activator 1) とp47^{phox}のホモログであるNoxo1 (Nox organizer 1) が必要である(図3)¹⁾。Nox1は、p67^{phox}と同様にN末端側からRacが結合するTPRドメイン、活性化ドメイン、Noxo1のPRRと結合するSH3ドメインが存在する。Noxo1には、AIRが存在しないため、p47^{phox}と異なり恒常的にp22^{phox}と結合し細胞膜に局在している。さらにNox1も、Noxo1との結合を介して膜に局在していることから、細胞未刺激の状態でもNox1によるO₂⁻生成活性が認められる(図3)。ただ、細胞をPKCの活性化剤であるPMA (phorbol 12-myristate 13-

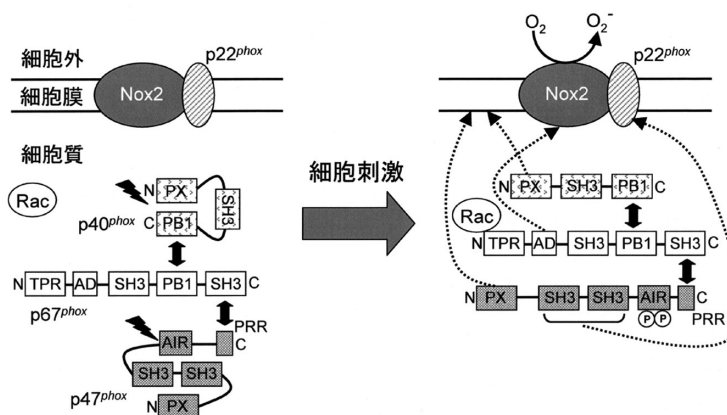


図2 Nox2の活性化機構

PXドメイン; PX, SH3ドメイン; SH3, PB1ドメイン; PB1, tetratricopeptide repeatモチーフ; TPR, 活性化ドメイン; AD, auto-inhibitory region; AIR, プロリンリッチ領域; PRR

acetate) で刺激することにより Nox1 活性が数倍に上昇すること、また Nox1 の SH3 ドメインは C 末端の PRR (Noxa1 と結合) と分子内相互作用することから¹⁸⁾、Noxa1 と Nox1 による Nox1 の活性化は制御を受けていると考えられる (図 3)。

Nox3 は、マウスでは内耳前庭器官での平衡感覚をつかさどる耳石の形成に必要なことが分かっている。ヒトでは腎臓や肝臓などのいくつか

の組織に発現が認められるが、酸化ストレス応答を含め生理的な役割は分かっていない。Nox3 も、p22^{phox} と会合しているのだが、Nox1 や Nox2 と異なり恒常的に O₂⁻ を生成している (図 4)^{19, 20)}。この Nox3 による O₂⁻ 生成活性は、activator タンパク質 (p67^{phox}、Noxa1) や organizer タンパク質 (p47^{phox}、Noxo1) によってさらに増強されることから、恒常的な Nox3 活性がさらに調節されて

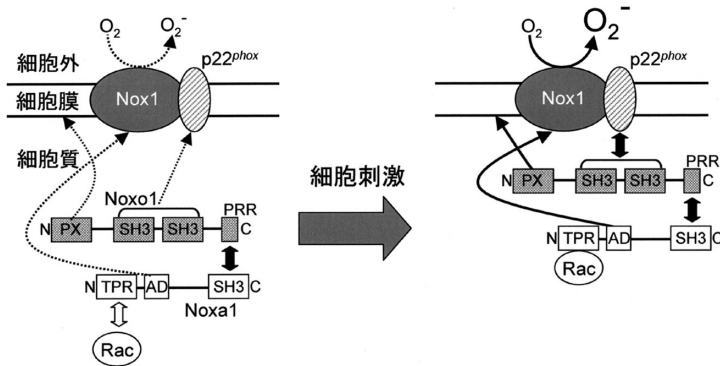


図 3 Nox1 の活性化機構

PX ドメイン; PX, SH3 ドメイン; SH3, プロリンリッチ領域; PRR, tetratricopeptide repeat モチーフ; TPR, 活性化ドメイン; AD

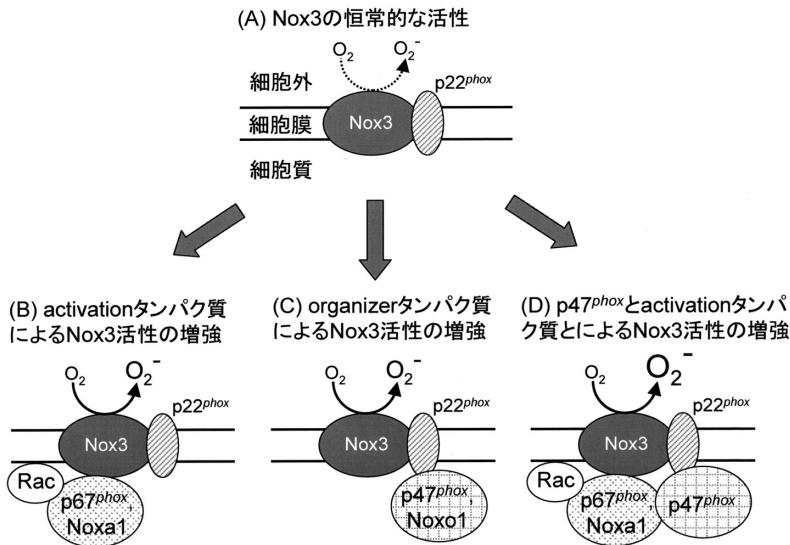


図 4 Nox3 の活性調節

Nox3 は、p22^{phox} と複合体を形成し恒常的に O₂⁻ を生成している (A)。Nox3 活性は、activator タンパク質の p67^{phox} または Noxa1 により増強される。この際、Rac が関与している (B)。また、Nox3 活性は、organizer タンパク質の p47^{phox} または Noxo1 によっても増強される (C)。さらに、p47^{phox} と p67^{phox} または p47^{phox} と Noxa1 の組み合わせによって、Nox3 による O₂⁻ 生成は強く促進される (D)。

いるものと考えられる (図4)。

p47^{phox}やNoxo1のSH3ドメインのN末端側近傍のアミノ酸配列は、Nox1~Nox3の活性化に重要な役割を果たしている²¹⁾。この領域の中でも特に152番目のイソロイシンをアラニンへ置換した変異体は、Nox2をまったく活性化できないが、p47^{phox}やp67^{phox}の膜移行には影響を及ぼさない。そのためこの領域は、p47^{phox}とp67^{phox}がNox2と複合体を形成した後、Nox2の電子伝達を引き起こす過程に関わっているのかもしれない。さらに、このイソロイシンはNoxo1にも存在し、実際にNoxo1のイソロイシンをアラニンへ置換した変異体は、Nox1活性化能を失うことになる²¹⁾。また、Nox3活性はactivatorタンパク質 (p67^{phox}やNoxa1) の非存在下においてp47^{phox}やNoxo1により増強される (図4 (B))。これまでp47^{phox}やNoxo1は、p67^{phox}やNoxa1を膜移行させる機能のみが注目されていたが、実際はNoxの「activator」タンパク質として重要な役割を果たしていると考えられる。

3) RacによるNox1、Nox2、Nox3の活性化機構

がん細胞を含む種々の非食細胞でRac依存性に活性酸素が生成されることは知られていたが、その分子機構は不明なままであった。以前からNox2の活性化にRacが必須であることは分かっていたが、ここ数年間でNox1やNox3の活性化にもRacが関与していることが明らかにされた^{20, 22, 23)}。RacはRhoサブファミリーに属し、ヒトではRac1、Rac2、Rac3の3種類のアイソフォームが存在する。ヒト好中球は主としてRac2を発現しており、Nox2の活性化に必須である。Nox1やNox3の活性化には、様々な細胞に発現が見られるRac1が関与していると考えられるが、Rac3でもNox1~Nox3を活性化できる²⁴⁾。Racは、細胞内シグナル伝達の結果、GTPが結合し活性型となる。活性型のRacは、switch I領域を介してp67^{phox}やNoxa1のTPRドメインに結合する^{1,2)}。この結合により、p67^{phox}の活性化ドメインの構造変化を誘導されNox2が活性化されると考えられている (図5 (A))。

以前、このswitch I領域に加え、Rhoサブファミ

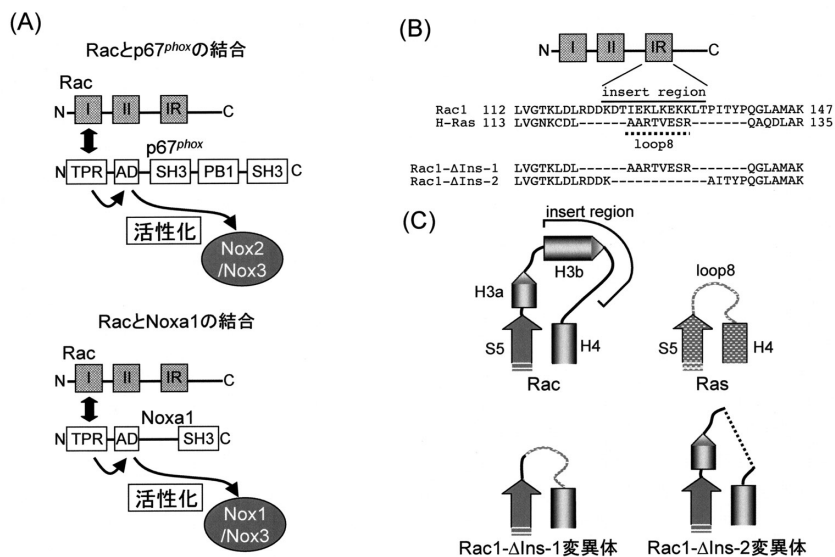


図5 RacによるNox1、Nox2、Nox3の活性化機構

(A) switch I 領域; I, switch II 領域; II, insert region; IR, tetratricopeptide repeatモチーフ; TPR, 活性化ドメイン; AD, SH3ドメイン; SH3, PB1ドメイン; PB1

(B, C) Rac1のinsert regionのアミノ酸配列とinsert regionを欠くRac変異体を示す。タンパク質の安定性を保つために、Racのinsert regionをRasのloop8と入れ換える (図中 (C) Rac1-ΔIns-1変異体)。一方、insert regionを除いただけでは、図中 (C) のRac1-ΔIns-2変異体の破線で示した部分が欠失してしまい、タンパク質の構造が不安定になると考えられる。

リーに特異的な領域「insert region」がNox2の活性化に必要であると報告された(図5(B))^{25, 26)}。一方で、insert regionはNox2の活性化に必須ではないという指摘もあり²⁷⁾、その必要性は不明なままであった。最近、筆者らはinsert regionがNox2の活性化に関与していないこと、またNox2だけでなくNox1やNox3の活性化にも関与していないことを報告した²⁴⁾。必要性を主張していたグループが示した実験結果は、使用したinsert regionを欠く変異体タンパク質の構造の一部が崩れたために、Nox2活性化能が低下したためだったものと考えられる。実際に、筆者らはタンパク質の安定性を維持するために、insert regionをRasの対応する領域(loop8)と入れ換えた変異体(Rac1-ΔIns-1)を作成した(図5(B, C))。このRac1-ΔIns-1は、培養細胞を用いたNox2活性の再構成系で、野生型とタンパク質レベルでの発現、およびNox2の活性化能が同等であることを示した。一方、insert regionを除いただけの変異体(Rac1-ΔIns-2)を作成したところ、野生型に比べてタンパク質の安定性が著しく低下していた(図5(B, C))²⁴⁾。同じRhoサブファミリーのCdc42のinsert regionはホスホリパーゼD1の活性化や、RhoAのinsert regionはRhoによるRhoキナーゼの活性化や細胞の形質転換に関与するとの報告がなされている。Racは様々なシグナル伝達に関わっていることから、今後ヒトRacのinsert regionの生理的な役割が明らかにされるかもしれない。

4) Nox4とNox5の活性化機構

Nox4は、Nox1~Nox3のようにp22^{phox}と複合体を形成する(図1)²⁸⁾。しかし、p22^{phox}はNox4の安定化および活性化には必要でないため、その結合の役割については今のところ不明である。Nox4活性は、activatorタンパク質やorganizerタンパク質さらにRacによる制御は受けておらず、恒常的にO₂⁻を生成していると考えられている。

Nox5は、Nox1~Nox4と異なりp22^{phox}と複合体を形成しない。ほかのNoxと共通する領域に加えて、膜貫通セグメントのさらにN末端側にCa²⁺結合モチーフであるEFハンドが存在する(図1)。Nox5は、EFハンドの存在から予想されるように細胞刺激時に細胞質のCa²⁺濃度の上昇

に伴って活性化される²⁹⁾。Nox5は、今のところ生理的な役割は不明である。

V. おわりに

酸化ストレス応答と活性酸素の生成源であるNoxファミリーについて、最近の知見をもとに概説した。Nox1~Nox3の活性制御については明らかにされてきたが、依然としてNox4の活性制御機構については不明なままである。また、Nox5はヒトの精子、脾臓やリンパ節に発現が見られるが、その生理的な役割は不明である。これらの残された疑問を解明することが、今後の課題である。

文献

- 1) Sumimoto H: Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. FEBS J., 275: 3249-3277, 2008
- 2) 宮野 佳, 住本 英樹: 好中球による活性酸素産生の分子機構 感染・炎症・免疫, 38: 194-203, 2008
- 3) Lasségue B, Sorescu D, Szöcs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK: Novel gp91^{phox} homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. Circ. Res., 88: 888-894, 2001
- 4) Matsuno K, Yamada H, Iwata K, Jin D, Katsuyama M, Matsuki M, Takai S, Yamanishi K, Miyazaki M, Matsubara H, Yabe-Nishimura C: Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. Circulation, 112: 2677-2685, 2005
- 5) Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, Sundaresan M, Finkel T, Goldschmidt-Clermont PJ: Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. Science, 275: 1649-1652, 1997
- 6) Mitsushita J, Lambeth JD, Kamata T: The superoxide-generating oxidase Nox1 is functionally required for Ras oncogene transformation. Cancer Res., 64: 3580-3585, 2004
- 7) Ibi M, Matsuno K, Shiba D, Katsuyama M, Iwata K, Kakehi T, Nakagawa T, Sango K, Shirai Y, Yokoyama T, Kaneko S, Saito N, Yabe-Nishimura C: Reactive oxygen species derived from NOX1/NADPH oxidase enhance inflammatory pain. J. Neurosci., 28: 9486-9494, 2008
- 8) Shiose A, Kuroda J, Tsuruya K, Hirai M, Hirakata H, Naito S, Hattori M, Sakaki Y, Sumimoto H: A novel

- superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J. Biol. Chem.*, 276: 1417-1423, 2001
- 9) Mahadev K, Motoshima H, Wu X, Ruddy JM, Arnold RS, Cheng G, Lambeth JD, Goldstein BJ: The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol. Cell. Biol.*, 24: 1844-1854, 2004
 - 10) Mochizuki T, Furuta S, Mitsushita J, Shang WH, Ito M, Yokoo Y, Yamaura M, Ishizone S, Nakayama J, Konagai A, Hirose K, Kiyosawa K, Kamata T: Inhibition of NADPH oxidase 4 activates apoptosis via the AKT/apoptosis signal-regulating kinase 1 pathway in pancreatic cancer PANC-1 cells. *Oncogene*, 25: 3699-3707, 2006
 - 11) Matsuzawa A, Saegusa K, Noguchi T, Sadamitsu C, Nishitoh H, Nagai S, Koyasu S, Matsumoto K, Takeda K, Ichijo H: ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nature Immunol.*, 6: 587-592, 2005
 - 12) Chiang E, Dang O, Anderson K, Matsuzawa A, Ichijo H, David M: Apoptosis-regulating signal kinase 1 is required for reactive oxygen species-mediated activation of IFN regulatory factor 3 by lipopolysaccharide. *J. Immunol.*, 176: 5720-5724, 2006
 - 13) Basuroy S, Bhattacharya S, Leffler CW, Parfenova H: Nox4 NADPH oxidase mediates oxidative stress and apoptosis caused by TNF- α in cerebral vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 296: C422-432, 2009
 - 14) St Hilaire C, Koupenova M, Carroll SH, Smith BD, Ravid K: TNF- α upregulates the A2B adenosine receptor gene: The role of NAD(P)H oxidase 4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 375: 292-296, 2008
 - 15) Maehara Y, Miyano K, Sumimoto H: Role for the first SH3 domain of p67^{nox} in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 379: 589-593, 2009
 - 16) Honbou K, Minakami R, Yuzawa S, Takeya R, Suzuki NN, Kamakura S, Sumimoto H, Inagaki F: Full-length p40^{nox} structure suggests a basis for regulation mechanism of its membrane binding. *EMBO J.*, 26: 1176-1186, 2007
 - 17) Yuzawa S, Miyano K, Honbou K, Inagaki F, Sumimoto H: The Domain Organization of p67^{nox}, a Protein Required for Activation of the Superoxide-Producing NADPH Oxidase in Phagocytes. *J. Innate. Immun.*, in press
 - 18) Yamamoto A, Kami K, Takeya R, Sumimoto H: Interaction between the SH3 domains and C-terminal proline-rich region in NADPH oxidase organizer 1 (Noxo1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 352: 560-565, 2007
 - 19) Ueno N, Takeya R, Miyano K, Kikuchi H, Sumimoto H: The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22^{nox}-dependent manner: its regulation by oxidase organizers and activators. *J. Biol. Chem.*, 280: 23328-23339, 2005
 - 20) Ueyama T, Geiszt M, Leto TL: Involvement of Rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases. *Mol Cell Biol.*, 26: 2160-2174, 2006
 - 21) Taura M, Miyano K, Minakami R, Kamakura S, Takeya R, Sumimoto H: A region N-terminal to the tandem SH3 domain of p47^{nox} plays a crucial role in the activation of the phagocyte NADPH oxidase. *Biochem J.*, 419: 329-338, 2009
 - 22) Miyano K, Ueno N, Takeya R, 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
 - 23) Miyano K, Sumimoto H: Role of the small GTPase Rac in p22^{nox}-dependent NADPH oxidases. *Biochimie*, 89: 1133-44, 2007
 - 24) Miyano K, Koga H, Minakami R, Sumimoto H: The insert region of the Rac GTPases is dispensable for activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *Biochem. J.*, 422: 373-382, 2009
 - 25) Freeman JL, Abo A, Lambeth JD: Rac "insert region" is a novel effector region that is implicated in the activation of NADPH oxidase, but not PAK65. *J. Biol. Chem.*, 271: 19794-19801, 1996
 - 26) Diebold BA, Bokoch GM: Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat. Immunol.*, 2: 211-215, 2001
 - 27) Toporik A, Gorzalczyk Y, Hirshberg M, Pick E, Lotan O: Mutational analysis of novel effector domains in Rac1 involved in the activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced) oxidase. *Biochemistry*, 37: 7147-7156, 1998
 - 28) Kuroda J, Nakagawa K, Yamasaki T, Nakamura K, Takeya R, Kuribayashi F, Imajoh-Ohmi S, Igarashi K, Shibata Y, Sueishi K, Sumimoto H: The superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells. *Genes. Cells*, 10: 1139-1151, 2005
 - 29) Bánfi B, Tirone F, Durussel I, Knisz J, Moskwa P, Molnár GZ, Krause KH, Cox JA: Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *J. Biol. Chem.*, 279: 18583-18591, 2004