新たに見出した好中球 NADPH oxidase の 構成成分 p40-phox

染 谷 明 正*

review article

JAPANESE JOURNAL OF INFLAMMATION

p 40-phox, a novel cytosolic component of neutrophil NADPH oxidase

The superoxide-producing NADPH oxidase consists of membrane-associated cytochrome b_{558} (gp 91-phox and p 22-phox) and cytosolic components. We purified a 260 kDa cytosolic complex which was essential for the activation of NADPH oxidase. This complex was composed of p 47-phox, p 67-phox and a novel p 40-phox. We examined the translocation of p 40-phox in a cell-free system using membrane and purified p 47-phox/p 67-phox/p 40-phox complex. p 40-phox was translocated to the membrane by arachidonic acid in a dose-dependent manner. The translocation pattern of p 40-phox was similar to those of p 47-phox and p 67-phox. Immunoprecipitation assay revealed that p 40-phox was dissociated from p 47-phox and p 67-phox during activation. Furthermore, a synthetic peptide corresponding to carboxyl-terminus of p 40-phox inhibited the activation of NADPH oxidase and translocation of p 40-phox, p 47-phox and p 67-phox. These observations suggest that p 40-phox may play a role in the activation of NADPH oxidase through interacting with p 47-phox and p 67-phox via its carboxyl-terminus.

Rec. 4/13/1998, pp 181~189

Akimasa Someya*

key words : superoxide anion, NADPH oxidase, p40-phox, neutrophil, cytosolic component

好中球は、生体防御において重要な役割を果たしている。好中球の主な機能は、生体内に侵入した細菌・微生物に向かって遊走し、これら侵入物を貪食した後、殺菌することである。

好中球の殺菌機構は、大きく酸素非依存性と酸素依存性の二つに分かれている。酸素非依存性の殺菌とは、食胞が顆粒と融合した後、顆粒内に存在する殺菌性蛋白質や蛋白分解酵素が作用して殺菌を行うことである。一方、酸素依存性の殺菌とは、貪食に伴い酸素代謝が増大し、その結果、

産生されるスーパーオキシドアニオン(O_2^-)および、その代謝産物が関与する殺菌のことをいう¹⁾。 O_2^- は NADPH oxidase とよばれるスーパーオキシド産生酵素が貪食に伴って活性化されることにより産生される。

近年、 O_2^- 産生に関する研究は、NADPH oxidase の酵素本体ならびに活性化機構について精力的に行われてきた。そして、NADPH oxidase は複数の成分から構成される複合酵素系であり、各成分どうしが刺激によって会合し、活性型の NADPH oxidase 複合体となることで、 O_2^- を産生することが明らかとなった²⁻⁵⁾。筆者らも NADPH oxidase の性質と、その活性化機構について研究を進めてきたが、その過程において、

* Department of Biochemistry, Juntendo University, School of Medicine 順天堂大学医学部第二生化学教室
Offprint requests to : Akimasa Someya, Department of Biochemistry, Juntendo University, School of Medicine, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan

表 1 好中球 NADPH oxidase の構成成分

成分	細胞膜成分 (シトクロム b ₅₅₈)		細胞質成分			
	gp91-phox	p22-phox	p47-phox	p67-phox	p21rac	p40-phox
アミノ酸数	570	195	390	526	192	339
SDS-PAGE での 分子質量	91kDa	22kDa	47kDa	67kDa	21kDa	40kDa
SH3 ドメインの数	0	0	2	2	0	1
PR 領域の数	0	2	2	1	0	0
遺伝子座	Xp21.1	16q24	7q11.23	1q25	17q21.2	22q13.1
特徴	糖鎖付加		リン酸化	リン酸化(?)	リン酸化	

ヒト好中球の構成成分について比較した

NADPH oxidase の構成成分として新規の細胞質因子である p 40-phox を発見した⁶⁾(p, protein: phox, phagocyte oxidase factor). p 40-phox は、もっとも新しく発見された構成成分であり、性質・役割など不明な点がまだ多く残されている。

本稿においては、NADPH oxidase の働きや構成成分について概説した後に、日本炎症学会奨励賞授賞論文⁷⁾の対象となった筆者らの p 40-phox に関する研究を紹介し、p 40-phox に関するこれまでの知見を含めて、p 40-phox の役割について論じたい。

NADPH oxidase とは

NADPH oxidase は、好中球のみでなく単球、好酸球、B-リンパ球などの白血球にも存在し、NADPH を電子供与体として下記の反応を触媒し、酸素を一電子還元してスーパーオキシドアニオン(O₂⁻)を生成する酵素である。

NADPH oxidase

産生された O₂⁻は、さらに、過酸化水素(H₂O₂)、ヒドロキシルラジカル(・OH)、一重項酸素(¹O₂)、次亜塩素酸(HOCl)に変換され、これらが貪食された細菌・微生物に対し殺菌作用を示す。

NADPH oxidase は、従来、無傷白血球を刺激したときにしか活性化されず、その活性は刺激した白血球の細胞膜にのみ認められたため、長い間、

膜結合性の単一酵素であると考えられていた。しかし、1984 年、好中球の細胞膜と細胞質を含むホモジネートに、アラキドン酸やドデシル硫酸ナトリウム(SDS)などの陰イオン性解離基をもった長鎖炭素分子を添加すると、NADPH oxidase が活性化されることが報告され^{8,9)}、無細胞系を用いて研究が進められるようになった。

無細胞系による NADPH oxidase の活性化の方法が確立されてから、この酵素は、細胞膜成分と細胞質成分からなる複合酵素系であることが明らかになった⁹⁻¹¹⁾。このことは、未刺激好中球から調製した膜画分だけでは NADPH oxidase 活性は得られず、膜画分と細胞質画分の両者が必要であることによって示された。その後、細胞膜および細胞質の構成成分が相次いで精製・同定された。

表 1 は、これまでに明らかになった NADPH oxidase 構成成分についてまとめたものである。

シトクロム b₅₅₈は、細胞膜に存在する構成成分として知られている¹²⁾。これはヘムやフラビンを含み、558 nm に特異的吸収をもつ。シトクロム b₅₅₈は gp 91-phox と p 22-phox からなるヘテロダイマーであり¹³⁾(gp: glycoprotein)、酸素へ電子を渡す最終的な電子伝達系成分と考えられている。

一方、細胞質成分として、p 47-phox と p 67-phox が、はじめに発見された^{14,15)}。これらは当初、それぞれ NCF-1、NCF-2(NCF: neutrophil cytosolic factor)とよばれたが、現在では p 47-phox、p 67-phox とよばれている。その後、第 3 番

図 1 刺激による NADPH oxidase 活性化の模式図

休止時には、細胞膜成分(シトクロム b_{558})と細胞質成分(p 47-phox, p 67-phox, p 40-phox, rac)は、離れて存在しているが、刺激を受けると細胞質成分が細胞膜に移行し、細胞膜シトクロム b_{558} と会合して活性型 NADPH oxidase が形成される。活性型 NADPH oxidase は細胞質の NADPH から電子を受け取り、酸素(O_2)を一電子還元してスーパーオキシドアニオン(O_2^-)を生成する。

p : protein, gp : glycoprotein, phox : phagocyte oxidase factor. 数字は構成成分の分子質量(kDa)をあらわす。

目の細胞質成分として低分子量 G-蛋白質である p 21 rac が発見された^{16,17)}(ヒトでは rac 2 が、一方、モルモットでは rac 1 が主な細胞質成分として同定されている)。p 47-phox, p 67-phox, p 21 rac は、ともに刺激に応じて細胞膜に移行し、シトクロム b_{558} と会合すると考えられている。図 1 は無刺激状態から刺激を受けたときの NADPH oxidase 構成成分の動きを模式的に示したものである。

これら上記の 5 種類の蛋白質は、リコンビナント蛋白質や精製蛋白質を用いた無細胞系実験から、必要不可欠な構成成分とされている^{18,19)}。また、このほかに細胞膜成分として、Rap1A(低分子量 G-蛋白質の 1 種)が報告されている²⁰⁾。この蛋白質はシトクロム b_{558} とともに精製されたことから、NADPH oxidase 構成成分と推測されているが、その役割は不明である。

慢性肉芽腫症(CGD : chronic granulomatous disease)は、反復感染を示す遺伝性の疾患であり、NADPH oxidase 構成成分の異常により白血球

の活性酸素生成能が低下し、酸素依存性の殺菌機構が動かなくなっている。いままでに、細胞膜成分である gp 91-phox と p 22-phox、および細胞質成分である p 47-phox と p 67-phox のいずれかの異常による CGD が報告され、なかでも gp 91-phox の異常によるものがもっとも多い。

p 40-phox の発見と性質

筆者らは、以前から NADPH oxidase の細胞質成分の精製と同定を進めてきたが、細胞質成分は不安定なため、なるべく温和な条件で活性を保持しながら精製を行ってきた。その結果、モルモット好中球の細胞質画分から高い活性をもつ 260 kDa の高分子複合体を精製した^{6,21)}(筆者らはこの複合体を SP-1 と名付けた)。この複合体は 63 kDa, 47 kDa および 39 kDa の 3 種類の蛋白質から構成されており、ウエスタンブロットの結果から、63 kDa 蛋白はヒト p 67-phox に相当し(モルモットの p 67-phox の分子質量は 63 kDa)、47 kDa 蛋白は p 47-phox に相当することがわかつ

図2 NADPH oxidaseの活性化に必要な260 kDa細胞質複合体のSDS-PAGE, ウェスタンブロット

モルモット好中球の細胞質画分から260 kDa複合体を、陰イオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーによって精製した⁶⁾。得られた260 kDa複合体を、SDS-PAGE後、ニトロセルロース膜に転写し、抗体(抗p67-phox抗体, 抗p47-phox抗体)との反応性を調べた。

レーン左: 蛋白染色(銀染色), レーン中央: 抗p67-phox抗体, レーン右: 抗p47-phox抗体

た(図2)。

一方, 39 kDa蛋白質は抗p47-phox抗体, 抗p67-phox抗体と反応せず(図2), さらに部分アミノ酸配列を調べたところp47-phoxおよびp67-phoxと異なるアミノ酸配列をもつことがわかった。これらのことから39 kDa蛋白は新規蛋白質であることが判明した⁶⁾。また, 260 kDa複合体を, 種々の条件でクロマトグラフィーを行ったところ, 39 kDa蛋白はp67-phoxと強く会合し, p47-phoxとは弱く会合していることが推測された。

筆者らが発表してまもなく, ヒト好中球から抗p67-phox抗体で共沈する同様の蛋白が同定され, p40-phoxと名付けられた^{22,23)}。そして, ヒトp40-phoxのcDNA²²⁾, さらに遺伝子²⁴⁾がクローニングされ, この遺伝子が10のエクソンからなり, 22 q 13.1の遺伝子座に存在することが明らか

図3 p40-phox, p47-phox, p67-phoxの細胞膜への移行およびNADPH oxidaseの活性化に及ぼすアラキドン酸の影響

精製したp40-phox/p47-phox/p67-phox複合体と細胞膜画分とを各濃度のアラキドン酸で刺激した後, 細胞膜画分を不連続ショ糖密度勾配遠心法にて調製した。得られた細胞膜画分についてウェスタンブロットとNADPH oxidase活性の測定を行った⁷⁾。

A: ウェスタンブロット。細胞膜画分をSDS-PAGE後, ニトロセルロース膜に転写し, p40-phox, p47-phox, p67-phoxを抗体を用いて検出した。

B: Aで得られたウェスタンブロットの結果をデンストメーターでスキャンすることで数値化し, 250 μ Mアラキドン酸で刺激したときの移行量を100%としてあらわした。

C: NADPH oxidase活性。アラキドン酸刺激した細胞膜画分のNADPH oxidase活性をシクロムc還元法にて測定した。

となった。

cDNAの解析から, ヒトp40-phoxは339アミノ酸残基からなることが推測された。そして, p40-phoxとp47-phoxのN-末端側の配列にお

図4 抗 p 40-phox 抗体を用いた p 47-phox, p 67-phox の免疫沈降
p 40-phox/p 47-phox/p 67-phox 複合体を 100 μ M アラキドン酸非存在下(-), または存在下(+)でインキュベートした後, 抗 p 40-phox 抗体を用いて免疫沈降を行った. 抗体で沈降した蛋白質を SDS-PAGE 後, ニトロセルロース膜に転写し, p 40-phox, p 47-phox, p 67-phox を抗体を用いて検出した. p 48-65 kDa に認められる強いバンドは IgG の H 鎖である.

図5 NADPH oxidase 構成成分の相互作用

これまでに報告されている NADPH oxidase 構成成分どうしの相互作用を模式化した²⁶⁻³⁴⁾.

SH3: src homology 3 ドメイン, PR: proline-rich 領域, PC: phox and Cdc 24 p モチーフ

いて, 22%の相同性を示すことが報告されている²²⁾. そして p 40-phox は構造上の特徴として, 蛋白質-蛋白質相互作用に参与している src homology 3(SH 3, アミノ酸の 175-225 残基部分)ドメインをもっている. この SH 3 ドメインは p 47-phox, p 67-phox にも存在し, NADPH oxidase 構成成分どうしの相互作用に寄与していると推測されている³⁻⁵⁾.

筆者らは, 未刺激好中球から調製した細胞膜と, 精製した SP-1(p 40-phox/p 47-phox/p 67-phox 複合体)を組み合わせた無細胞系を用いて, p 40-phox の細胞膜への移行と活性酸素産生との関係を検討した⁷⁾. その結果, 図3に示すように, p 40-phox は刺激剤であるアラキドン酸の濃度に依存して細胞膜に移行し, そのパターンは p 47-phox, p 67-phox の移行パターンと類似していた. そし

図 6 NADPH oxidase の活性化に及ぼす p 40-phox 由来の合成ペプチドの影響

p 40-phox/p 47-phox/p 67-phox 複合体と細胞膜画分とを、合成ペプチド(●: C-末端ペプチド, ○: C-末端以外のペプチド, ▲: C-末端ペプチドと同じアミノ酸組成で配列を変えたペプチド)で 5 分間前処理した後、アラキドン酸で刺激した。細胞膜画分を不連続ショ糖密度勾配遠心法にて調製した後、膜画分の NADPH oxidase 活性をシクロクロム c 還元法にて測定した。活性はペプチドで前処理しないものを 100% としてあらわした。

て、細胞質成分の移行に伴って NADPH oxidase 活性も上昇した。

つぎに、刺激によって p 40-phox/p 47-phox/p 67-phox 複合体が解離するかどうかを、免疫沈降法にて検討した。図 4 に示すようにアラキドン酸を加えない未刺激状態では、抗 p 40-phox 抗体によって p 40-phox とともに p 47-phox, p 67-phox も沈降したが、アラキドン酸刺激によって p 40-phox のみが抗 p 40-phox 抗体によって沈降し、p 47-phox, p 67-phox は共沈しなかった。これらのことから p 40-phox は、刺激を受けないときには p 47-phox, p 67-phox と複合体を形成して存在するが、刺激を受けると p 40-phox は、p 67-phox, p 47-phox と解離して細胞膜に移行する可能性が示唆された。

NADPH oxidase の活性化において、p 47-phox のリン酸化が NADPH oxidase 活性化と深い関わりをもつと考えられている。興味深いことに、最近、p 40-phox もリン酸化されることが報告され²⁵⁾、p 40-phox のリン酸化が NADPH oxidase の活性化に関与する可能性が示唆された。筆者らも p 40-phox が刺激によってリン酸化

図 7 p 40-phox, p 47-phox, p 67-phox の細胞膜への移行に及ぼす p 40-phox 由来の合成ペプチドの影響

p 40-phox/p 47-phox/p 67-phox 複合体と細胞膜画分とを、図 6 と同じ方法で合成ペプチドで前処理した後、刺激し、細胞膜画分を調製した。SDS-PAGE 後、ニトロセルロース膜に転写し、p 40-phox, p 47-phox, p 67-phox を抗体にて検出した。p 40-phox (●), p 47-phox (○), p 67-phox (▲) の移行量を、ウェスタンブロットの結果をデンシトメーターでスキャンすることで数値化し、ペプチドで前処理しないときの移行量を 100% としてあらわした。

A: p 40-phox の C-末端ペプチドを用いたときの影響。挿入図は、C-末端ペプチド 0 μM または 30 μM で処理したときのウェスタンブロットの結果を示している。

B: A で使用した C-末端ペプチドと同じアミノ酸組成で、配列を変えたペプチドを用いたときの影響。

されること、さらに、リン酸化を阻害すると NADPH oxidase の活性化が阻害されることを観察している(未発表データ)。

p 40-phox の p 47-phox, p 67-phox との相互作用と NADPH oxidase の活性化

NADPH oxidase 構成成分どうしの蛋白質-蛋白質相互作用は、West-Western 法、Two-hybrid

法および表面プラズモン共鳴法によって解析されている。これらの蛋白質どうしの会合には SH3 ドメインと proline-rich (PR) 領域との相互作用が寄与している。p 47-phox と p 67-phox には SH3 ドメインがそれぞれ二つ、p 40-phox には一つ存在している。また、SH3 ドメインの会合相手である PR 領域は、p 47-phox には二つ、p 67-phox には一つ存在するが、p 40-phox には存在しない。一方、細胞膜の NADPH oxidase 構成成分であるシトクロム b_{558} の p 22-phox には、PR 領域が二つ存在している (図 5, 表 1)。

これまでの実験結果から推定されている各構成成分どうしの相互作用を 図 5 に示す。細胞膜シトクロム b_{558} と細胞質成分とが直接相互作用しているのは、p 22-phox の PR 領域と p 47-phox の SH3 ドメインであり²⁶⁾、ほかの細胞質成分 (p 67-phox, p 40-phox) は p 47-phox を介して間接的にシトクロム b_{558} と相互作用している。

p 40-phox は、その C-末端部分と p 67-phox の二つの SH3 領域にはさまれた部分とで相互作用すると考えられている^{27,28)}。一方、p 40-phox の SH3 ドメインは、p 47-phox の PR 領域と結合すると報告されている^{29,30)}。しかし、この p 47-phox の PR 領域は、p 67-phox の SH3 ドメインと結合すると報告されている^{31,32)}、このように p 47-phox の PR 領域に対して、p 40-phox と p 67-phox の SH3 ドメインが競合的に作用する可能性が示されている。なお、rac は、p 67-phox と会合すると報告されている^{33,34)}。

このように p 40-phox は、p 47-phox や p 67-phox と相互作用すると考えられるが、p 40-phox が O_2^- 産生において、実際、どのような役割を果たしているか明らかではない。精製蛋白質やリコンビナント蛋白質を用いた再構成系において、シトクロム b_{558} (gp91-phox, p 22-phox), p 47-phox, p 67-phox, p21rac によって十分量の O_2^- が生成されることから^{18,19)}、p 40-phox は、NADPH oxidase 構成成分として絶対に必要な成分ではなく、oxidase の活性調節に役立っていると考えられている。また、p 40-phox が細胞内において p 67-phox と強く会合していることや⁶⁾、p 67-

phox が欠損している CGD 患者の好中球では検出できないことから^{22,23)}、p 40-phox は p 67-phox の安定化に必要であると推測されている。

筆者らは、p 40-phox の NADPH oxidase 活性化における役割を調べるため、合成ペプチドを用いて無細胞系で阻害実験を行った⁷⁾。

C-末端部分に相当するペプチドの、NADPH oxidase 活性および細胞質成分の細胞膜への移行に対する影響を調べたところ、NADPH oxidase 活性 (図 6) と p 40-phox, p 47-phox, p 67-phox の細胞膜への移行 (図 7) が C-末端ペプチドによって阻害されることがわかった。なお、C-末端以外のペプチドや、C-末端ペプチドと同じアミノ酸組成で配列を変えたペプチドは、NADPH oxidase 活性や、p 40-phox, p 47-phox, p 67-phox の細胞膜への移行に影響しなかった。p 40-phox の C-末端部分が p 67-phox に作用すること^{27,35)}、また、p 67-phox が p 47-phox の膜への会合を調節していることがすでに報告されている³⁶⁾。したがって p 40-phox は、その C-末端領域を介して p 67-phox の機能を調節することで、p 47-phox, p 67-phox の膜への移行を制御している可能性が考えられる。他の研究グループも、p 40-phox の C-末端を認識する抗体で NADPH oxidase 活性が阻害されることを報告している³⁷⁾。

p 40-phox 研究の新しい展開

p 47-phox や p 67-phox の発現は O_2^- を産生する細胞 (好中球, 単球, B-リンパ球, 好酸球) に限定されている。しかし、p 40-phox は O_2^- を産生する細胞³⁸⁾だけでなく、 O_2^- をほとんど産生しない細胞 (肥満細胞, 好塩基球系細胞, 形質細胞および T-細胞) にも発現していることが明らかにされた^{24,39)}。さらに、in situ ハイブリダイゼーションの結果から、マウス脳の神経細胞にも p 40-phox が存在していることが報告されている³⁹⁾。これらのことから、p 40-phox は NADPH oxidase の活性化だけでなく、その他の細胞機能にも関与している可能性が考えられる。

最近、p 40-phox の C-末端部分のアミノ酸配列に Cdc24p, MEK5, p 60 などの細胞内シグナル伝

達分子と相同性を示す部分が見出され、その配列が *phox* and *Cdc24p* (PC) モチーフと名付けられた⁴⁰⁾。今後、このモチーフが、蛋白質-蛋白質相互作用においてどのように働くか、解明が期待される。

おわりに

p 40-*phox* の役割には、いまだ不明な点が多く残されている。また、p 40-*phox* は NADPH oxidase の活性化のみでなく、その他の細胞機能にも関与する可能性が考えられる。今後さらに、p 40-*phox* について研究が進められることを期待する。

最後に、本総説の機会を与えて下さいました第18回日本炎症学会会長 市川陽一先生、御推薦いただきました安倍千之先生、ならびに御指導いただきました山下辰久先生、長岡 功先生に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Babior BM : Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N. Engl. J. Med.* 298 : 659-668, 1978.
- 2) Morel F, Doussiere J, Vignais PV : The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells : physiological, molecular and pathological aspects. *Eur. J. Biochem.* 201 : 523-546, 1991.
- 3) Thrasher AJ, Keep NH, Wientjes F, Segal AW : Chronic granulomatous disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1227 : 1-24, 1994.
- 4) DeLeo FR, Quinn MT : Assembly of the phagocyte NADPH oxidase : molecular interaction of oxidase proteins. *J. Leukocyte Biol.* 60 : 677-691, 1996.
- 5) Leusen JHW, Verhoeven AJ, Roos D : Interactions between the components of the human NADPH oxidase : intrigues in the *phox* family. *J. Lab. Clin. Med.* 128 : 461-476, 1996.
- 6) Someya A, Nagaoka I, Yamashita T : Purification of the 260 kDa cytosolic complex involved in the superoxide production of guinea pig neutrophils. *FEBS lett.* 330 : 215-218, 1993.
- 7) Someya A, Nagaoka I, Nunoi H, Yamashita T : Translocation of guinea pig p40-*phox* during activation of NADPH oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1277 : 217-225, 1996.
- 8) Bromberg Y, Pick E : Unsaturated fatty acids stimulate NADPH-dependent superoxide production by cell-free system derived from macrophages. *Cell. Immunol.* 88 : 213-221, 1984.
- 9) Heyneman RA, Vercauteren RE : Activation of a NADPH oxidase from horse polymorphonuclear leukocytes in a cell-free system. *J. Leukocyte Biol.* 36 : 751-759, 1984.
- 10) McPhail LC, Shirley PS, Clayton CC, Snyderman R : Activation of the respiratory burst enzyme from human neutrophils in a cell-free system : evidence for a soluble cofactor. *J. Clin. Invest.* 75 : 1735-1739, 1985.
- 11) Curnutte JT : Activation of human neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced (triphosphopyridine nucleotide, reduced) oxidase by arachidonic acid in a cell-free system. *J. Clin. Invest.* 75 : 1740-1743, 1985.
- 12) Segal AW, Jones OTG : Novel cytochrome *b* system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature* 276 : 515-517, 1978.
- 13) Parkos CA, Allen RA, Cochrane CG, Jesaitis AJ : Purified cytochrome *b* from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000. *J. Clin. Invest.* 80 : 732-742, 1987.
- 14) Nunoi H, Rotrosen D, Gallin JI, Malech HL : Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol factors. *Science* 242 : 1298-1301, 1988.
- 15) Volpp BD, Nauseef WM, Clark RA : Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. *Science* 242 : 1295-1297, 1988.
- 16) Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG, Segal AW : Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21^{rac1}. *Nature* 353 : 668-670, 1991.
- 17) Mizuno T, Kaibuchi K, Ando S, Musha T, Hiraoka K, Takaishi K, Asada M, Nunoi H, Matsuda I, Takai Y : Regulation of the superoxide-generating NADPH oxidase by a small GTP-binding protein and its stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins. *J. Biol. Chem.* 267 : 10215-10218, 1992.
- 18) Rotrosen D, Yeung CL, Leto TL, Malech HL, Kwong CH : Cytochrome *b*₅₅₈ : the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* 256 : 1459-1462, 1992.
- 19) Abo A, Boyhan A, West I, Thrasher AJ, Segal AW : Reconstitution of neutrophil NADPH oxidase activity in the cell-free system by four components : p 67-*phox*, p 47-*phox*, p 21^{rac1}, and cytochrome *b*₂₄₅. *J. Biol. Chem.* 267 : 16767-16770, 1992.
- 20) Quinn MT, Parkos CA, Walker L, Orkin SH, Dinanier MC, Jesaitis AJ : Association of a Ras-related protein with cytochrome *b* of human neutrophils. *Nature* 342 : 198-200, 1989.
- 21) Someya A, Yamashita T : Cytosolic factors involved in the activation of NADPH oxidase from guinea pig neutrophils. *Arch. Biochem. Biophys.* 284 : 17-21, 1991.
- 22) Wientjes FB, Hsuan JJ, Totty NF, Segal AW : p 40^{phox}, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain *src*

- homology 3 domain. *Biochem J.* 296 : 557-561, 1993.
- 23) Tsunawaki S, Mizunari H, Nagata M, Tatsuzawa O, Kuratsuji T : A novel cytosolic component, p 40^{phox}, of respiratory burst oxidase associates with p 67^{phox} and is absent in patients with chronic granulomatous disease who lack p 67^{phox}. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199 : 1378-1387, 1994.
 - 24) Zhan S, Vazquez N, Zhan S, Wientjes FB, Budarf ML, Schrock E, Ried T, Green ED, Chanock SJ : Genomic structure, chromosomal localization, start of transcription, and tissue expression of the human p 40-phox, a new component of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase complex. *Blood* 88 : 2714-2721, 1996.
 - 25) Fuchs A, Bouin AP, Rabilloud T, Vignais PV : The 40-kDa component of the phagocyte NADPH oxidase (p 40 phox) is phosphorylated during activation in differentiated HL60 cells. *Eur. J. Biochem.* 249 : 531-539, 1997.
 - 26) Sumimoto H, Kage Y, Nunoi H, Sasaki H, Nose T, Fukumaki Y, Ohno M, Minakami S, Takeshige K : Role of Src Homology 3 domains in assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *Proc. Natl. Acad. USA* 91 : 5345-5349, 1994.
 - 27) Fuchs A, Dagher MC, Vignais PV : Mapping the domains of interaction of p 40^{phox} with both p 47^{phox} and p 67^{phox} of the neutrophil oxidase complex using the two-hybrid system. *J. Biol. Chem.* 270 : 5695-5697, 1995.
 - 28) Fuchs A, Dagher MC, Fauré J, Vignais PV : Topological organization of the cytosolic activating complex of the superoxide-generating NADPH-oxidase : pinpointing the sites of interaction between p 47phox, p 67phox and p 40phox using the two-hybrid system. *Biochim. Biophys. Acta* 1312 : 39-47, 1996.
 - 29) Ito T, Nakamura R, Sumimoto H, Takeshige K, Sakaki Y : An SH3 domain-mediated interaction between the phagocyte NADPH oxidase factors p 40^{phox} and p 47^{phox}. *FEBS lett.* 385 : 229-232, 1996.
 - 30) Sathyamoorthy M, Mendez ID, Adams AG, Leto TL : p 40^{phox} down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. *J. Biol. Chem.* 272 : 9141-9146, 1997.
 - 31) Finan P, Shimizu Y, Gout I, Hsuan J, Truong O, Butcher C, Bennett P, Waterfield MD, Kellie S : An SH3 domain and proline-rich sequence mediate an interaction between two components of the phagocyte NADPH oxidase complex. *J. Biol. Chem.* 269 : 13752-13755, 1994.
 - 32) Leto TL, Adams AG, Mendez ID : Assembly of the phagocyte NADPH oxidase : binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 10650-10654, 1994.
 - 33) Diekmann D, Abo A, Johnston C, Segal AW, Hall A : Interaction of rac with p 67^{phox} and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science* 265 : 531-533, 1994.
 - 34) Nisimoto Y, Freeman JLR, Motalebi SA, Hirshberg M, Lambeth JD : Rac binding to p 67^{phox} : structural basis for interactions of the rac1 effector region and insert region with components of the respiratory burst oxidase. *J. Biol. Chem.* 272 : 18834-18841, 1997.
 - 35) Wientjes FB, Panayotou G, Reeves E, Segal AW : Interactions between cytosolic components of the NADPH oxidase : p 40^{phox} interacts with both p 67^{phox} and p 47^{phox}. *Biochem. J.* 317 : 919-924, 1996.
 - 36) Uhlinger DJ, Taylor KL, Lambeth JD : p 67-phox enhances the binding of p 47-phox to the human neutrophil respiratory burst oxidase complex. *J. Biol. Chem.* 269 : 22095-22098, 1994.
 - 37) Tsunawaki S, Kagara S, Yoshikawa K, Yoshida LS, Kuratsuji T, Namiki H : Involvement of p 40^{phox} in activation of phagocyte NADPH oxidase through association of its carboxyl-terminal, but not its amino-terminal, with p 67^{phox}. *J. Exp. Med.* 184 : 893-902, 1996.
 - 38) Someya A, Nishijima K, Nunoi H, Irie S, Nagaoka I : Study on the superoxide-producing enzyme of eosinophils and neutrophils : comparison of the NADPH oxidase components. *Arch. Biochem. Biophys.* 345 : 207-213, 1997.
 - 39) Mizuki K, Kadomatsu K, Hata K, Ito T, Fan QW, Kage Y, Fukumaki Y, Sakaki Y, Takeshige K, Sumimoto H : Functional modules and expression of mouse p 40^{phox} and p 47^{phox}, SH3-domain-containing proteins involved in the phagocyte NADPH oxidase complex. *Eur. J. Biochem.* 251 : 573-582, 1998.
 - 40) Nakamura R, Sumimoto H, Mizuki K, Hata K, Ago T, Kitajima S, Takeshige K, Sakaki Y, Ito T : The PC motif : a novel and evolutionarily conserved sequence involved in interaction between p 40^{phox} and p 47^{phox}, SH3 domain-containing cytosolic factors of the phagocyte NADPH oxidase. *Eur. J. Biochem.* 251 : 583-589, 1998.