

活性酸素による遺伝子発現制御——Hic-5 の作用を中心に

野瀬 清

Regulation of Gene Expression by Active Oxygen Species

Kiyoshi NOSE

*Showa University School of Pharmaceutical Sciences, 1-5-8 Hatanodai,
Shinagawa-ku, Tokyo 142-8555, Japan*

(Received June 28, 2002)

Reactive oxygen species (ROS) are generated from cells stimulated by various cytokines, hormones, and stresses, and regulate cellular functions such as gene expression and cell growth. They affect activities of many types of molecular targets, including signaling molecules and transcription factors. Early-response genes (*c-fos*, *egr-1* and *JE*) that encode transcription factors are induced by ROS, and activities of their products are modulated by ROS through redox-based mechanisms. We isolated a novel gene, *hic-5*, that was induced by hydrogen peroxide and encodes a focal adhesion protein. *hic-5* was found to translocate to the nucleus in cells treated with ROS and regulates several cellular genes. We propose that *hic-5* is a key element in the transduction of signals from the cell surface to the nucleus under oxidative stress.

Key words—active oxygen; signal; *hic-5*; transcription factor

はじめに

活性酸素は、細胞内の代謝の結果から産生されると同時に、サイトカインを含む様々な刺激によっても産生が制御され、生理的機能の調節において重要な働きを行う。過酸化水素を始めとする活性酸素は、DNA、蛋白質、脂質などの生体高分子を修飾し、細胞に対して障害性を持つことは広く知られているが、遺伝子発現や細胞増殖においても生理的作用を持っていることが明らかとなっており、その結果として細胞形質の変化の調節を行う。^{1,2)}

細胞内オキシダントのレベルは、産生系と消去系のバランスで制御されているが、局所的なアンバランスが蛋白質の酸化状態の変化を起し、機能の調節を行うことになると考えられる。この影響を受ける因子は数多く存在し、従ってレドクス変化によるシグナルは古典的なリガンドと受容体により誘起されるシグナルとは質的に異なったものである。また、細胞外からの刺激（ホルモン、サイトカイン、基質蛋白質など）は細胞内シグナル伝達系の活性化

を起し、最終的には核における遺伝子発現の変化に繋がる。これらは互いにクロストークをして複雑なネットワークを形成しており、活性酸素種（reactive oxygen species, ROS）は刺激となると同時に、細胞内レドクス状態の変化によりシグナル伝達の間も形成していると考えられる。

我々は、細胞増殖を抑制するサイトカインである TGFβ が細胞からの過酸化水素産生を高め、いくつかの遺伝子発現に対してセカンドメッセンジャーとなっていることを示した。³⁾ 活性酸素のシグナルとしての機能を分子レベルで解析するために、過酸化水素で誘導される遺伝子の検索を行い、その過程で *hic-5* 遺伝子を分離した。この遺伝子はパキシリン類似の LIM ドメインを持つ蛋白質をコードし、主に細胞接着斑に局在するが、酸化ストレスにより核へ移行していくつかの標的遺伝子の発現を制御することが明らかになってきた。本稿では、最初に細胞への刺激による活性酸素の産生を概観し、その生物学的意義を *hic-5* 蛋白質を中心に考察したい。

1. 細胞への生理的刺激による活性酸素の産生

細胞へのサイトカインその他の刺激は細胞からの活性酸素の産生を一過的に上昇させる。活性酸素の種類はスーパーオキシド、ヒドロキシラジカル、過

昭和大学薬学部（〒142-8555 品川区旗の台 1-5-8）

e-mail: knose@pharm.showa-u.ac.jp

*本総説は、平成 13 年度宮田専治学術賞の受賞を記念して記述したものである。

酸化水素、脂質過酸化物質などが主なものであり、それらの大部分は細胞内の活性酸素消去系により捕捉される。残った活性酸素は種々の生体分子を修飾して細胞障害的に働くことが多いが、ある種のサイトカインではシグナルの一部を担うことが示されている。この活性酸素の産生系としては、スーパーオキシド産生に関わる NADPH oxidase が主要な系である。各種の活性酸素産生系はほとんどすべてのタイプの細胞に存在する。⁴⁾ Mohazzab-H. and Wolin はウシ動脈平滑筋、横紋筋、内皮細胞において、NADPH oxidase が主な $O_2^{\cdot-}$ 発生源であることを示した。⁵⁾ この活性化には Ras, Rac1 などの低分子 G 蛋白質が関わり、数分で起こる早い変化である。⁶⁾ 一方、TGF β 1 刺激の場合、Thannickal & Fanburg⁷⁾ はヒト繊維芽細胞で NADPH oxidase が活性化されることを示したが、この活性化には数時間かかる。TGF β 1 による活性酸素産生には RNA 合成が必要との報告もあり、⁸⁾ 間接的な反応なのであろう。

増殖因子、発がんプロモーター、放射線などによる活性酸素の産生は 20 年以上前にインスリンや SH 試薬で処理した脂肪細胞で見出されている。⁹⁾ *In vivo* では ROS スカベンジャーを用いた実験から発がんプロモーターの作用が SOD 類似体により抑制されることから示唆されている。¹⁰⁾ その後より直接的証拠が多数報告されている。血清、¹¹⁾ 腫瘍壊死因子 (TNF) - α 、¹²⁻¹⁴⁾ インターロイキン -1 (IL-1)、¹³⁾ transforming growth factor β (TGF β)、^{3,15)} 血小板由来増殖因子 (PDGF)、¹¹⁾ LPS、¹⁴⁾ リゾホスファチジン酸、¹⁶⁾ IgG、¹²⁾ ホルポールエステル^{11,17)} や X-線¹⁸⁾ などの刺激により細胞からの活性酸素産生が上昇する。

TGF β 刺激により培養細胞からの過酸化水素産生が促進され、この過酸化水素が増殖抑制に関与するだけでなく、¹⁵⁾ SRF (serum response factor) 活性化と egr-1 遺伝子発現にも関与する。³⁾ 同様の現象は血管平滑筋を PDGF 刺激した時にも見られている。¹⁹⁾ この場合、PDGF による蛋白質チロシンリン酸化、DNA 合成、ケモタキシスなどがカタラーゼにより抑制された。したがって、過酸化水素がこれらの応答のセカンドメッセンジャーになっていることが示唆された。

2. 活性酸素の細胞内標的分子

活性酸素の作用を受ける細胞内分子は、核酸、脂質、蛋白質を始め様々な分子があるが、ここでは蛋白質を中心に蛋白質がセンサーとなる活性酸素によるシグナル伝達の制御について概説したい。

まず、チロシンリン酸化レベルの上昇が活性酸素により引き起こされる例が多く知られており、その原因はチロシンキナーゼの活性化、チロシンホスファターゼの不活性化による。過酸化水素による c-Src の活性化²⁰⁻²²⁾ や Ras の活性化を起し、Fyn の活性化は、JAK2 活性化に必要である。²³⁾ その他、ヒト好中球では p55/p59hck, p72syk および p77btk が活性化されるが、²⁴⁾ *in vitro* では活性化が起きないので直接的作用ではない。Bauskin らは受容体型チロシンキナーゼ (Ltk) が ROS で活性化されることを報告している。²⁵⁾ T 細胞では H_2O_2 は ZAP-70 の活性化を起し、この活性化は下流の Erk 活性化に必要である。²⁶⁾

NADPH オキシダーゼの活性化は低分子 G 蛋白質 Rac1 の活性化が必要であり、この段階はチロシンキナーゼと共役している。低分子 G 蛋白質は ROS 産生を活性化するシグナルとなると同時に、ROS の標的ともなる。また、Ras 蛋白質の 118 番目のシステインはレドクス制御を受ける標的となっている。²⁷⁾ Rao らは過酸化水素は SHC-Grb2-Sos と受容体チロシンキナーゼとの複合体形成を促進し、Ras 及び MAPK の活性化を起すことを報告している。²⁸⁾ PAG は c-Abl と結合してその活性を抑制する蛋白質であるが、酸化ストレスによりこの結合がはずれ、c-Abl チロシンキナーゼ活性が上昇する。²⁹⁾

以上の例は ROS によるチロシンリン酸化の制御の一部の例であるが、ホスファターゼも同様の制御を受ける。ROS により活性が制御されるセリン・スレオニンキナーゼとして、酵母の Ste20 キナーゼのヒトホモログ (SOK-1) はオキシダントで活性化される。³⁰⁾ また、Guy らは TNG α や IL-1 のシグナル伝達に関わるホスファターゼがレドクス制御を受けることを報告している。³¹⁾

3. 遺伝子発現と転写因子

酸化ストレスにより誘導される遺伝子は数多く存在するが、中でも初期応答遺伝子の c-fos, c-jun, egr-1, c-myc, JE and KC は過酸化水素処理後 30 分

から1時間で強く誘導される。³²⁾ *c-fos* や *egr-1* の転写誘導では血清応答エレメント (SRE) が関与し、SRE は転写因子である SRF と TCF1 との複合体により活性化されるが、過酸化水素はシグナル系を介してこの複合体形成を促進すると考えられる。³³⁾ Werb's らはコラゲナーゼ I 遺伝子の発現にと酸素ラジカルが関わることをウサギ関節繊維芽細胞で報告している。³⁴⁾ コラゲナーゼ I 遺伝子はインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ の刺激で誘導されるが、インテグリンの下流に位置する Rac1 が活性化され、この活性化 Rac1 が活性酸素産生を促進し、NF κ B の活性化に繋がる。³⁵⁾ NF κ B は過酸化水素により活性化されるが、この活性化は間接的である。つまり、NF κ B の阻害因子である I κ B がリン酸化され、それに引きつづいて分解を起こし NF κ B が活性化される。³⁶⁾

転写因子の発現だけでなく、その DNA 結合性及び活性自体もレドクス制御を受ける。Zn フィンガー構造を持つ転写因子 (Sp-1, Egr-1, NF κ B, c-myb, p53 など) はレドクス感受性のシステイン基を持ち、システイン残基の酸化により DNA 結合能が低下する。³⁷⁻³⁹⁾ AP-1 もレドクス制御を受け、やはりシステイン残基が重要である。⁴⁰⁾

4. 活性酸素センサーとしての Hic-5

これらの知見の上に、TGF β 1 及び過酸化水素で誘導される遺伝子の cDNA クローニングを行った。この過程でいくつかの新規遺伝子を分離したが、なかでも Hic-5 は繊維芽細胞に強制発現させると細胞外基質関連蛋白質、p21 などの遺伝子発現の上昇とともに細胞が老化様形質を表して増殖が停止した。⁴¹⁾ 逆に多くのヒト癌細胞や、不死化したマウス繊維芽細胞ではその発現の顕著な減少が認められる。Hic-5 蛋白質の構造的特徴は、N-末端に LD モティーフ、C-末端に LIM ドメインを持ち、正常細胞では主に細胞接着斑に存在して、接着により細胞の伸展、運動性を調節する因子の1つであることが確実となった。⁴²⁾ 実際、Hic-5 蛋白質の Zn-フィンガー部分に相互作用する因子を two hybrid 法によるスクリーニングで検索し、細胞運動に関与する PTP-PEST (tyrosine phosphatase),⁴³⁾ 及び Arf-GAP (GIT-1) を分離した。Hic-5 は、これらの因子との結合から細胞膜の下で接着シグナルの制御に働いていると考えられる。

一方、酸化ストレス又は細胞骨格変化により、類

似体のパキシリンとは異なり Hic-5 が細胞膜から核へ移行することが見出された。核において Hic-5 は、*c-fos*, p21/WAF1 などの遺伝子の発現上昇を起こすこと、これらの遺伝子の標的転写制御領域の1つは Sp1 エlementであることを明らかにしている。これらの遺伝子領域に結合することにより Hic-5 の生物作用が発揮されると考えられる。さらに Hic-5 と Sp1 は p300/CBP と機能的な連関を持っていることが示された。酸化ストレスによる核と細胞質との移行には、Hic-5 の N-末端領域に存在する2個のシステインが関与することが明らかとなっている。このような性質から、Hic-5 は酸化ストレス下で接着と遺伝子発現との間のシグナル分子としてユニークな作用を持つと考えられる。⁴⁴⁾

5. Hic-5 蛋白質の構造的特徴

Hic-5 は細胞接着斑蛋白質として有名なパキシリンの構造類似体で、C-末端に4個の LIM ドメインを持つ。2個の Zn-フィンガーから成る LIM ドメインは、転写因子やアダプター蛋白質に広くみられる構造であり、蛋白質間相互作用に関与することが広く知られている。⁴⁵⁾ この LIM ドメインはパキシリンのそれと比較して約 70% の相同性を示す。N-末端領域にはやはり蛋白質相互作用に関与する LD ドメインが存在し、⁴⁶⁾ パキシリンでは5個だが、Hic-5 はアイソフォームにより3個又は4個存在する。これらの LD ドメインも高い相同性を示すが、それ以外の部分の類似性は低い。パキシリンのファミリーには Hic-5 の他にリンパ球特異的な Leupaxin, ショウジョウバエのホモログ、DALP,⁴⁷⁾ DPxn,⁴⁸⁾ 及び粘菌の PaxB が知られており、このファミリーは進化的に保存された蛋白質と言える (Fig. 1)。マウスゲノムの構造から、Hic-5 の N-末端領域と LIM ドメインの間には長いイントロンが存在することから、進化的に2つの異なった遺伝子が融合した結果生じたと考えられる。

Hic-5 にはパキシリンと同様の多くの相互作用因子が知られていて、チロシンキナーゼ Pyk2 (CAK β), Src の負の制御因子である Csk などのシグナル分子、及びビンキュリンやタリンなどの構造蛋白質も結合する。⁴⁹⁾ LD2 及び LD3 領域には接着斑キナーゼ (FAK) が結合し、最近 two hybrid 法による探索の結果、Hic-5 の LD3 ドメインに GAP の1つである GIT-1 が結合することが明らか

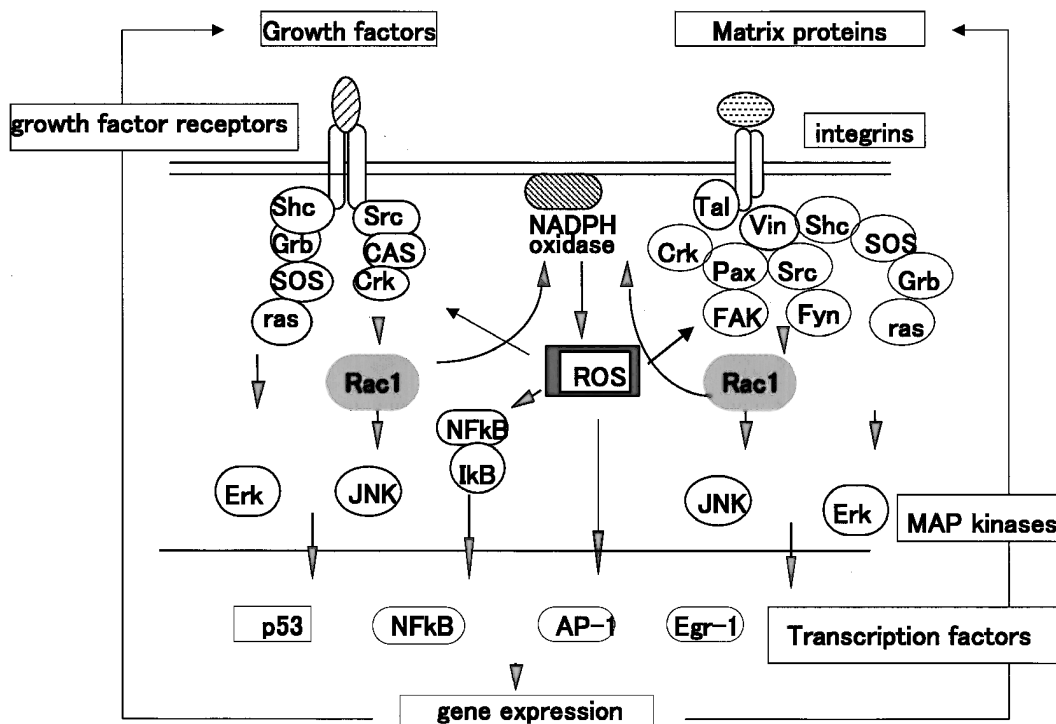


Fig. 1. Production of Reactive Oxygen Species (ROS) and Signal Pathways

Stimulation of cells with growth factors and extracellular matrix proteins elicit activation of receptor-type tyrosine kinases, and small G proteins. Production of ROS largely depends on NADPH oxidase activity, but this activity itself is regulated by a small G protein, Rac 1. ROS affect other signaling molecules as well as transcription factors, and these factors cross-talk each other.

となり、また PKL (paxillin kinase linker) もこのドメインに結合する。一方 LIM3 にはチロシンホスファターゼ PTP-PEST が結合することが明らかとなった。⁴³⁾ これらの因子は Hic-5 とパキシリンに共通する相互作用因子であるが、Src 及び Crk はパキシリンには結合するが、Hic-5 には結合しない。これはパキシリンに見られる Y40, Y31, Y118 が Hic-5 に存在しないためと考えられる。また、GIT-1 との結合は Hic-5 の方がパキシリンよりも強力である。最近インテグリン $\alpha 4$, $\alpha 9$ 及び $\beta 3$ の細胞質ドメインがパキシリンと結合していることが明らかとなり、恐らく Hic-5 にも同様の結合活性があると予想される (Fig. 2)。⁵⁰⁾

パキシリンは SH2, SH3 の結合ドメインを持ち、接着や増殖刺激により高度にチロシンリン酸化される蛋白質であるが、Hic-5 では SH3 結合ドメインが見られず、チロシンリン酸化レベルもはるかに低い。パキシリン及び Hic-5 は、相互作用因子との結合により Src その他のシグナル分子の細胞内局在を変化させ、アダプター分子として接着斑からのシグナルの制御に関与すると考えられるが、以上の構造

的相違点から互いに拮抗的に作用する可能性が想像される。

6. 細胞接着における Hic-5 蛋白質の機能

細胞接着斑は、細胞外基質 (ECM) とその受容体であるインテグリンが結合して細胞内に形成される複合体であり、数多くのシグナル分子が会合している。さらに増殖因子受容体からのシグナルとクロストークをして、細胞運動、増殖、生存、分化など様々なシグナルを発生させる。^{45,50)} パキシリンはこの接着斑においてアダプターとして働く因子と考えられているが、Hic-5 は構造の類似性と共通の相互作用因子を持つことから、やはりアダプター分子としての機能が予想される。パキシリン、p130CAS への Crk の結合は、細胞運動の活性化に重要で、PTP-PEST によるチロシン脱リン酸化とカップルしてリン酸化レベルの代謝回転に関わると考えられる。そこで我々は、繊維芽細胞の基質蛋白質への接着によるシグナル伝達において、Hic-5 が果たす役割に関して解析した。⁴²⁾ Hic-5 の発現ベクターを NIH 3T3 細胞に導入しフィブロネクチン上に細胞を播いて、接着による細胞の初期応答としての細胞

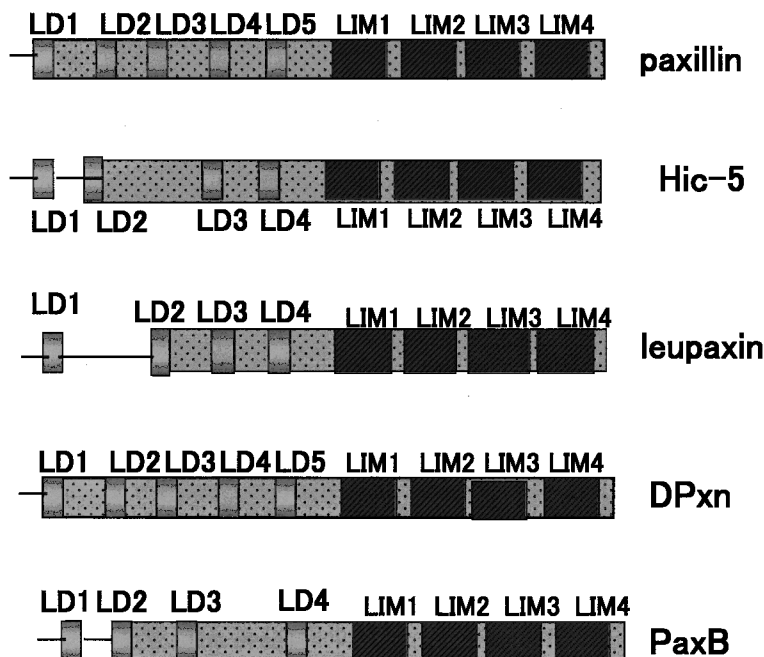


Fig. 2. Paxillin and Hic-5 Family Members

The proteins contained in this family contain the LIM domain in their C-terminal half, and amino acid sequences show high homology. Cytoplasmic localization of these proteins is mainly focal adhesions.

接着と伸展の変化を見たところ、Hic-5の発現により細胞伸展が抑制された。この抑制はパキシリンでは見られなかった。Hic-5は接着刺激によるパキシリン及びFAKのチロシンリン酸化も抑制した。Hic-5の各種変異体を発現させた実験から、N-末端のLD3ドメインがこれらの抑制に必要であることが示された。また、FAK欠損マウス由来の繊維芽細胞では細胞伸展の抑制が見られなかったことから、Hic-5はインテグリンシグナルの中でもFAKを介した応答に関与すると考えられる。この抑制は活性型のCdc42又はRac1の発現により解除されたことから、Hic-5はこれら低分子G蛋白質の活性化を上流で制御していることが示唆された。以上の結果から、接着斑におけるHic-5の機能として、FAKをパキシリンと競合することが考えられた。これらの性質は、細胞の運動性や方向性を決める場合の制御にHic-5が何らかの役割を果たしていることを示している。

7. 核におけるHic-5の機能

接着装置に結合している蛋白質が、核での転写制御にも関わる例が最近いくつか見つかってきたことは非常に興味深い。細胞膜から核へ移行する蛋白質としては、 β -カテニン、Stat, Erk, c-Abl, JAB1

など数多くのものが知られており、刺激に応じて細胞内局在が変化して核での機能を果たす。⁵¹⁾ これら以外に、LIMドメインを持つ蛋白質の中でも細胞質・核の間をシャトルするものとして、zyxin及び類似の細胞骨格蛋白質LPP,⁵²⁾ 甲状腺ホルモン受容体結合因子のTrip6などが知られていて、Rev類似の核移行シグナルを持つ。しかし、これらの因子の核移行がどのような刺激又はシグナルで制御されているか、またそれらの核での機能もまだ不明である。

最近我々は、Hic-5が酸化ストレスにより可逆的に核へ移行することを見出した。酸化ストレスとしては、過酸化水素やSH剤であるN-ethylmaleimideで同様な効果があり、酸化ストレス以外に、ホルボールエステルやサイトカラシンによっても核移行が見られた。生理的刺激で核移行を起こすかどうかは現在検討中であるが、いくつかのサイトカインによっても同様な変化が認められている。同じ条件でパキシリンは核へ集積しない。接着斑に局在するHic-5は、細胞をレプトマイシンBで処理すると核に集積することから、Crm-1依存的な核排出シグナル(NES)を持つことが予想された。これらの結果から、Hic-5は細胞接着斑と核の間をシャトルすることにより細胞形質の調節に重要な役割を果た

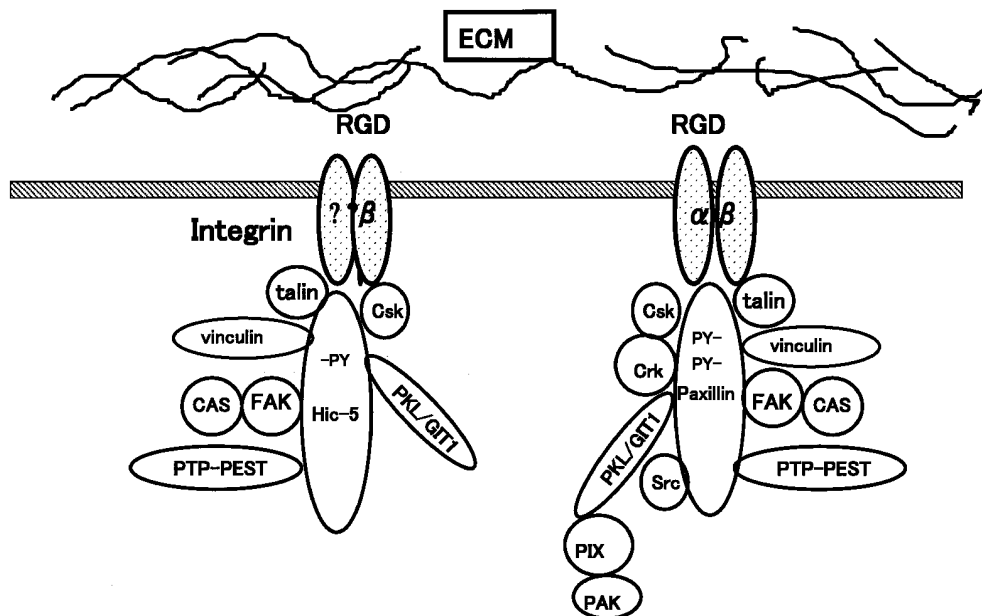


Fig. 3. Protein Complexes in the Focal Adhesions

Cytoplasmic domain of integrins associates with cytoskeletal proteins as well as signaling molecules, and paxillin and Hic-5 are involved in the formation of these complexes. Paxillin and Hic-5 shear some common interacting proteins, but paxillin binds to Crk, but Hic-5 does not.

すことが考えられる。Hic-5 とパキシリンのキメラ蛋白質の発現系を作製して検討した結果、C-末端の LIM ドメインは Hic-5、パキシリンのいずれも核移行能を持つことから、N-末端が細胞質への保持に関わることが示された。Hic-5 の核排出シグナルの同定のために、各種の変異体を作成して検討した結果、N-末端領域の LD3 ドメインが NES として機能することが明らかになった。また、酸化ストレスに反応して核へ移行するためには、LD2 付近に存在する Hic-5 特異的な 2 個の Cys が必要であることも示された。⁴⁴⁾ この周辺のアミノ酸配列は、酸化ストレスで核へ移行する酵母の転写因子 Yap-1 と相同性が見られる (Fig. 3)。

8. 転写因子との関連

核内での Hic-5 の機能の 1 つは標的遺伝子の転写制御と考えられるが、Hic-5 の核での標的遺伝子を強制発現した細胞で検索したところ、*c-fos* 及び *p21* 遺伝子の発現が上昇することが明らかとなった。特に *c-fos* 遺伝子の発現に関しては、正常ヒト繊維芽細胞で過酸化水素で誘導される誘導が dominant negative Hic-5 (LIM-4 欠損) により抑制されたため、酸化ストレス下の内在性 *c-fos* の転写制御に Hic-5 が関与することが考えられる。

c-fos, *p21* 遺伝子の 5' 上流を持つレポーターを用

いて解析した結果、核移行シグナルを付加した Hic-5 はこれらのレポーター活性を上昇させたが、パキシリンには NLS を付加してもそのような効果は見られなかった。*c-fos* では Hic-5 応答領域は 5' 上流約 1.5 kb にあり、血清応答エレメントとは異なる新しい転写制御領域が同定できた。ここには多くの転写エレメントが存在するが、それぞれの点突然変異体を作製して詳細な検討を行った結果、Sp1 エレメントが少なくとも 1 つの標的となっていることが明らかになっている。また、*p21* 遺伝子レポーターを用いた検討からも Sp1 エレメントの関与が示された。この転写活性化は E1a で抑制され、p300 との結合能を失った E1a 変異体では効果が見られなかったことから、p300 の機能的関与が推定された。Hic-5 と転写因子との相互作用に関して、免疫沈降とウェスタンブロットにより解析したところ、Hic-5 は Sp1, p300 と直接結合している証拠は得られていないが、Smad3 と細胞内で複合体を形成していることが明らかとなっている。一方、ステロイドホルモン受容体のコアクティベーターとして見つかった ARA55 は Hic-5 と同一の蛋白質であり、⁵³⁾ Hic-5 は核において他の転写因子と相互作用してそれらの活性の制御に関わると考えられる。最近、パキシリンが poly(A)⁺RNA 結合蛋白質 1 と

結合し、mRNAの核からdense ER及びフィロポディアへの移行に関わっている可能性が示された。⁵⁴⁾

Zyxin, パキシリンファミリーの蛋白質が細胞接着斑と核とをシャトルすることの意味については不明な点が多いが、1つの蛋白質が細胞内でかけ離れた部位に局在することは、働くべきタイミングの厳密な制御のために重要なのかも知れない。あるいは、これらの蛋白質はパキシリンで示されたように、核と細胞質間の物質輸送カーゴとして機能しているのかも知れない。一方Hic-5は、*c-fos*の誘導、AP-1転写因子の活性を介して、細胞外基質関連蛋白質 (ECM) 及び接着関連遺伝子の発現を制御している可能性が出つつある。細胞接着斑は細胞表層のシグナルだけでなく、核での遺伝子発現の制御にも関与している。Hic-5は表層シグナルと核での転写活性を包括的に制御する役割を担っているのかも知れない。ECMの変化は接着シグナルの質的变化をもたらし、さらに新しい遺伝子発現の制御に繋がると思われる。このような細胞のreciprocal dynamismは、発生過程や組織の再構築、がん細胞の浸潤・転移にも重要な役割を果たしていると考えられ、今後*in vivo*の解析と合わせて新しい細胞形質制御機構の解明とその応用に繋がることが期待している。

謝辞 本稿で紹介した我々の研究成果は、柴沼質子博士、西谷直之博士、石野敬子、金山朱里博士及び多くの大学院生の協力で得られたものです。

REFERENCES

- Finkel T., *Curr. Opin Cell Biol.*, **10**, 248–253 (1998).
- Nose K., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 897–903 (2000).
- Ohba M., Shibamura M., Kuroki T., Nose K., *J. Cell Biol.*, **126**, 1079–1088 (1994).
- Wolin M. S., Mohazzab-H. K. M., “Mediation of Signal Transduction by Oxidants. in Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses,” Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1997, pp. 21–48.
- Mohazzab-H. K. M., Wolin M. S., *Am. J. Physiol.*, **266**, H2568–H2572 (1994).
- Sandaresan M., Yu Z. X., Ferrans V. J., Sulciner D. J., Gutkind J. S., Irani K., Goldschmidt-Clermont P. J., Finkel T., *Biochem. J.*, **318**, 379–383 (1996).
- Thannickal V. J., Fanburg B. L., *J. Biol. Chem.*, **270**, 30334–30338 (1995).
- Thannickal V. J., Aldweib K. D. L., Fanburg B. L., *J. Biol. Chem.*, **273**, 23611–23615 (1998).
- Mukherjee S. P., Lane R. H., Lynn W. S., *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 2589–2594 (1978).
- Kenzler T. W., Bush D. M., Kozumbo W. J., *Science*, **221**, 75–77 (1983).
- Shibanuma M., Kuroki T., Nose K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **144**, 1317–1323 (1987).
- Satoriano J. A., Shuldiner M., Hora K., Zing Y., Shan Z., Schlondorff D., *J. Clin. Invest.*, **92**, 1564–1571 (1993).
- Meier B., Radeke H. H., Solle S., Younes M., Sie H., Reshc K., Habermehl G.G., *Biochem. J.*, **263**, 539–545 (1989).
- Feng L., Zia Y., Garcia G. E., Hwang D., Wilson C. B., *J. Clin. Invest.* **95**, 1669–1675 (1995).
- Shibanuma M., Kuroki T., Nose, K., *Cell Growth & Differ.*, **2**, 583–591 (1991).
- Chen Q., Olashaw N., Wu J., *J. Biol. Chem.*, **270**, 28499–28502 (1995).
- Lo Y. Y., Cruz T. F., *J. Biol. Chem.*, **270**, 11727–11730 (1995).
- Stevenson M. A., Pollock S. S., Coleman C. N., Calderwood S. K., *Cancer Res.*, **54**, 12–15 (1994).
- Sandarresan M., Yu Z.-X., Ferrans V. J., Irani K., Finkel T., *Science*, **270**, 296–299 (1995).
- Devary Y., Gottlieb R.A., Smeal T., Karin M., *Cell*, **71**, 1081–1091 (1992).
- Abe J., Takahashi M., Ishida M., Lee J.-D., Berk B.C., *J. Biol. Chem.*, **272**, 20389–20394 (1997).
- Aikawa R., Komuro I., Yamazaki T., Zou Y., Kudoh S., Tanaka M., Shiojima I., Hiroi Y., Yazaki Y., *J. Clin. Invest.*, **100**, 1813–1821 (1997).
- Abe J., Berk B. C., *J. Biol. Chem.*, **274**, 21003–21010 (1999).
- Brumell J. H., Burkhardt A. L., Bolen J. B., Grinstein S., *J. Biol. Chem.*, **271**, 1455–1461

- (1996).
- 25) Bauskin A. R., Alkalay I., Ben-Neriah Y., *Cell*, **66**, 685–696 (1991).
- 26) Griffith C. E., Zhang W., Wange R. L., *J. Biol. Chem.*, **273**, 10771–10776 (1998).
- 27) Landers H. M., Hajjar D. P., Hempstead B. L., Mirza U. A., Chait B. T., Campbell S., Quilliam L. A., *J. Biol. Chem.*, **272**, 4323–4326 (1997).
- 28) Rao G. N., *Oncogene*, **13**, 713–719 (1996).
- 29) Wen S.-T., van Etten R. A., *Genes & Develop.*, **11**, 2456–2467 (1997).
- 30) Pombo C. M., Bonventre J. V., Molnar A., Kyriakis J., Force T., *EMBO J.*, **15**, 4537–4546 (1996).
- 31) Guy G. R., Cairns J., Ng S. B., Tan Y. H., *J. Biol. Chem.*, **268**, 2141–2148, (1993).
- 32) Shibamura M., Kuroki T., Nose K., *Oncogene*, **5**, 1025–1032 (1990).
- 33) Price M. A., Cruzalegui F. H., Treisman R., *EMBO J.*, **15**, 6552–6563 (1996).
- 34) Kheradmand F., Werner E., Tremble P., Symons M., Werb Z., *Science*, **280**, 898–902 (1998).
- 35) Sulciner D. J., Irani K., Yu Z.-X., Ferrans V. J., Goldschmidt-Clermont P., Finkel T., *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 7115–7121 (1996).
- 36) Schreck R., Rieber P., Baeuerle P. A., *EMBO J.*, **10**, 2247–2258 (1991).
- 37) Huang R., Adamson E. D., *DNA Cell Biol.*, **12**, 265–273 (1993).
- 38) Guehmann S., Vorbrueggen G., Kalkbrenner F., Moelling K., *Nucleic Acids Res.*, **20**, 2279–2286 (1992).
- 39) Hainaut P., Milner J., *Cancer Res.*, **53**, 4469–4473 (1993).
- 40) Abate C., Patel L., Rausher III F. J., Curran T., *Science*, **247**, 1157–1161 (1990).
- 41) Shibamura M., Mochizuki E., Maniwa R., Mashimo J., Nishiya N., Imai S., Takano T., Oshimura M., Nose K., *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 1224–1235 (1997).
- 42) Nishiya N., Tachibana K., Shibamura M., Mashimo J., Nose K., *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 5332–5345 (2001).
- 43) Nishiya N., Iwabuchi Y., Shibamura M., Cote J.-F., Tremblay M. L., Nose K., *J. Biol. Chem.*, **274**, 9847–9853 (1999).
- 44) Shibamura M. (submitted).
- 45) Turner C. E., *Nature Cell Biol.*, **2**, E231–E236 (2000).
- 46) Brown M. C., Curtis M. S., Turner C. E., *Nature Str. Biol.*, **5**, 677–678 (1998).
- 47) Hu Y., Cascone P. J., Cheng L., Sun D., Nambu J. R., Schwartz L. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 10218–10223 (1999).
- 48) Yagi R., Ishimura S., Yano H., Gaul U., Hanafusa H., Sabe H., *EMBO Reports.*, **2**, 814–820 (2001).
- 49) Thomas S. M., Hagel M., Turner C. E., *J. Cell Sci.*, **112**, 181–190 (1999).
- 50) Liu S., Thomas S. M., Woodside D. G., Rose D. M., Kiosses W. B., Pfaff M., Ginsberg M. H., *Nature*, **402**, 676–681 (1999).
- 51) Aplin A. E., Juliano R. L., *J. Cell Biol.*, **155**, 187–191 (2001).
- 52) Petit M. M. R., Fradelizi J., Golsteyn R. M., Ayoubi T. A. Y., Menichi B., Louvard D., van de Ven W.J.M., Friederich E., *Mol. Biol. Cell*, **11**, 117–129 (2000).
- 53) Fujimoto N., Yeh S., Kang H.-Y., Inui S., Chang H.-C., Mizokami A., Chang C., *J. Biol. Chem.*, **274**, 8316–8321 (1999).
- 54) Woods A. J., Roberts M. S., Choudhary J., Barry S. T., Mazaki Y., Sabe H., Morley S. J., Critchley D. R., Norman, J. C., *J. Biol. Chem.*, **277**, 6428–6437 (2002).