

シグナル伝達経路に影響を及ぼす新奇大気汚染物質 1,2-ナフトキノンのケミカルバイオロジー

角 大悟,* 熊谷 嘉人

Chemical Biology of 1,2-Naphthoquinone, a Novel Air Pollutant, that Affects Signal Transduction Pathways

Daigo SUMI* and Yoshito KUMAGAI

Doctoral Program in Social and Environmental Medicine, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba City 305-8575, Japan

(Received August 1, 2007)

Prolonged exposure of humans to ambient particulate matter such as diesel exhaust particles (DEP) induces a variety of adverse health effects including cardiovascular diseases, asthma and cancer. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their derivatives in DEP are thought to be potential candidates for the deleterious effects of DEP. We have identified 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ) as a novel PAH quinone that contaminates DEP. Because 1,2-NQ is covalently bound to macromolecules through reactive thiols (thiolate ions), our rationale was that cellular proteins modified by 1,2-NQ seem to act as a redox-sensor and thus the interaction of thiol proteins with 1,2-NQ may disrupt their functions. To address our hypothesis, we prepared specific antibody against 1,2-NQ bound to proteins. In this review, we introduce an inhibitor of κ B kinase β (IKK β) and protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) as target molecules for 1,2-NQ. Although IKK β activates transcription factor NF- κ B and PTP1B negatively regulates the receptor-protein tyrosine kinase, such as epidermal growth factor receptor (EGFR) in cells, covalent modification of these proteins caused by 1,2-NQ results in inhibition of NF- κ B activity and transactivation of EGFR.

Key words—chemical biology; polycyclic aromatic hydrocarbon quinone; signal transduction

1. はじめに

100年以上も前に開発されて以来、ディーゼルエンジンはその経済性と効率のために発電所、海運業及びトラックのような大型エンジンを必要とする産業において使用されている。ディーゼル車はガソリン車と比較して、燃焼効率、耐久性において優れているが、欠点として窒素酸化物と浮遊粒子状物質 (SPM) を排出するところにある。SPMの中でも粒径が 2.5 μ m 以下のもの (PM2.5) にはディーゼル車が排出する微粒子 (DEP) などが含まれ、その粒径の小ささから鼻腔を介した生体への容易な移行が問題となっている。しかしながら、排気に関しては利点もあり、二酸化炭素の排出がガソリン車に

比して 10-25% 少ないことから、地球温暖化の問題を考慮するとディーゼルエンジンの有用性を示す重要な要素である。

近年、DEP の影響に伴う疾患に、がんや呼吸器疾患とともに、心臓血管系への疾患が含まれることがアメリカの大規模疫学調査により示唆されている。行政もその規制に乗り出すなど排出阻止に躍起であるが、DEP に含まれているどのような物質が生体に影響を与えているかについては報告が少ない。DEP は、たくさんの有機化合物を吸着した炭素粒子との複雑な混合物である。炭素粒子に吸着している有機化合物として、フェナンスレンやベンツピレン骨格を持った物質に代表される多環芳香族炭化水素類 (PAHs) が挙げられるが、近年、われわれは DEP 中に PAHs に属する 1,2-ナフトキノンの同定並びに既に報告のあった同属の 9,10-フェナントラキノンの同定並びに既に報告のあった同属の 9,10-フェナントラキノンの定量化を行った。¹⁾ 本総説では、DEP 中で同定された 1,2-NQ の

筑波大学大学院人間総合科学研究科社会環境医学専攻 (〒305-8575 つくば市天王台 1-1-1)

*e-mail: sdaigo@md.tsukuba.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 127 年会シンポジウム S17 で発表したものを中心に記述したものである。

化学的特性に着目し、近年の新しい研究スタイルであるケミカルバイオロジーの視点から、タンパク質のような生体内高分子、特に転写因子との結合を介した生体応答の変動について、1,2-NQを用いたわれわれの研究成果を紹介しながら論じていきたい。

2. DEPに含まれる多環芳香族炭化水素キノン類

高温のディーゼルエンジン排気が大気中で冷やされることから、球状の炭素粒子の集合体を構成成分とするディーゼル排出物の粒子フェーズにはたくさんの有機化合物（重量の10-40%）が吸着する。それらの中でも、PAHs及びその誘導体が最も多い。一般的にDEPと記す場合は、炭素粒子とそれに吸着した有機及び無機物質のことを意味する。大気中に存在するPAHsは、窒素酸化物の存在によりPAHsに比してより強い変異原性と発がん性を有するニトロ-PAHsに変換されることが知られている。PAHsは大気中での光酸化反応によってそれぞれのキノン体に変換される以外にも、生体内でチトクロムP450 (CYP) とエポキシド加水分解酵素 (EH) により *trans*-ジヒドロジオール体を経て、アルドケト還元酵素 (AKR) のような二電子還元酵素により最終的にPAHsキノン体まで代謝される。Schuetzle²⁾ は、DEP中の成分分析を行い、中度極性画分のうちPAHsキノン体が7.1%を占めることを証明した。最近、われわれはSPMに存在するPAHsキノン体を定量する方法を確立した。その結果によると、DEP 1g中に2環系PAHsの1,2-NQが14 μ g, 1,4-NQが8 μ g, 3環系PAHsの9,10-PQが24 μ g, 9,10-アントラキノン (9,10-AQ) が40 μ g含まれていた。¹⁾

1998年Fraserら³⁾は、アメリカのロサンゼルス大気中に含まれるPAHsをガス状成分及び揮発性成分に分画し測定した。その結果、ガス状成分中にフルオレンやフェナンスレンに比して、100-200倍高い濃度でナフタレンが存在していることを報告している。ナフタレンも、上述したように光酸化反応及び生体内代謝によって1,2-NQに変換される (Fig. 1)。これらのことから考えると、大気中にガス状で存在しているナフタレンから大気中光酸化及び生体内で代謝活性化により生成した1,2-NQが生体に影響を及ぼす可能性が懸念される。

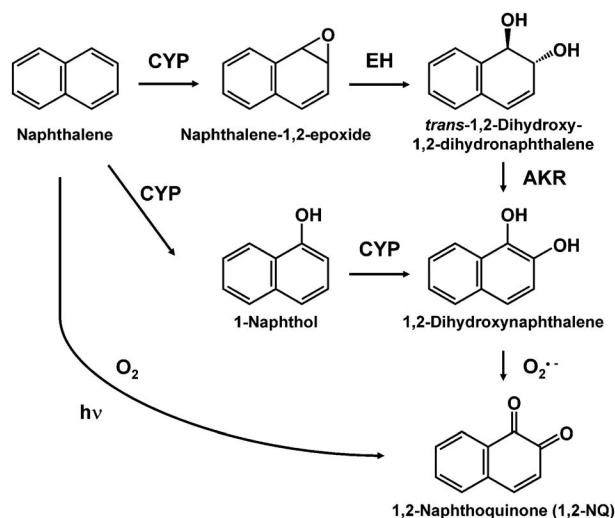


Fig. 1. Metabolic Activation of Naphthalene to 1,2-Naphthoquinone

CYP: cytochrome P450, EH: epoxide hydrolase, AKR: aldo-keto oxidoreductase.

3. ケミカルバイオロジー

近年、新しい学問として“ケミカルバイオロジー”が定着されつつある。“ケミカルバイオロジー”とは、今までの学問の主流であったバイオロジーやバイオケミストリーとは違い、化学的な性質をみつめ、それを生物学に帰着させて行く学問である。平成17年に日本ケミカルバイオロジー研究会 (<http://www.tmd.ac.jp/jcb/>)が発足したことからみても、本学問領域が注目を浴びていることが分かる。われわれは、1,2-NQの化学的特性に着目し、当該化学物質と反応性チオール基を介したタンパク質との共有結合、さらにはそれに起因する機能障害を見出すことを目的として研究を行っている (Fig. 2)。

4. 1,2-NQの化学的特性

4-1. 親電子性 1,2-NQはその構造中に α,β -不飽和カルボニル基を有する親電子性物質である。親電子性とは他の分子と求電子的に反応して共有結合を形成する性質であり、生体内に存在するとDNAやタンパク質などのような高分子と容易に結合する。タンパク質に関しては、多くの場合システイン残基のチオール基 (チオレートイオンに解離している状態) を介して不可逆的なチオエーテル結合体を形成する (Fig. 3)。

4-2. レドックスサイクル Figure 4に示すように、キノン化合物は一般に2つの還元代謝反応を受ける。1つはP450還元酵素などによる一電子還

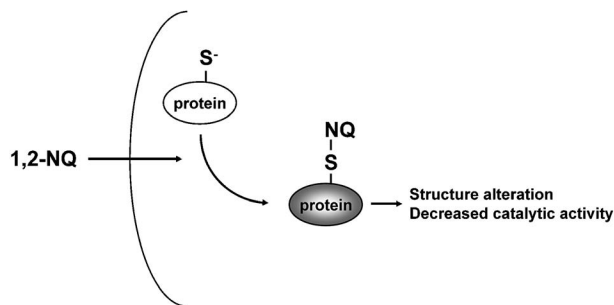


Fig. 2. Covalent Attachment of 1,2-NQ to Cellular Proteins through Thiolate Ion

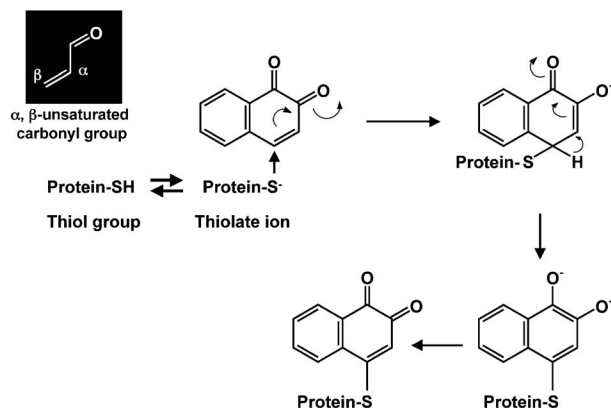


Fig. 3. Chemistry of Interaction of Protein Thiol with 1,2-NQ

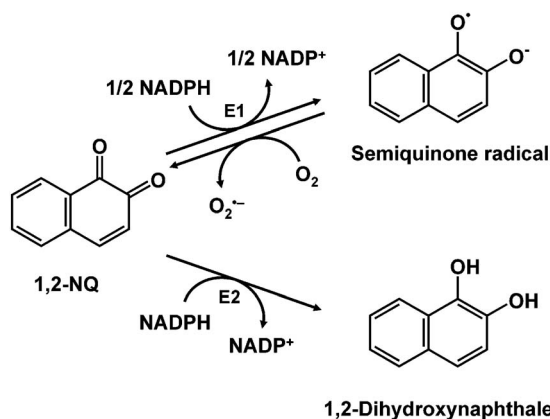


Fig. 4. Enzymatic Reduction of 1,2-NQ Involved in Redox Cycling

E1 and E2 indicate cytochrome P450 reductase and aldo-keto oxidoreductase, respectively.

元反応で、生じたセミキノンラジカルは分子状酸素と反応し、活性酸素の一種であるスーパーオキシドラジカル ($O_2^{\cdot-}$) を生成し、キノン体へ再酸化される。このように、酸化と還元を繰り返す一連の反応はレドックスサイクルと呼ばれ、微量のキノンか

ら化学量論に見合わない多量の活性酸素種を産生し得ることから、キノンによる酸化ストレスに貢献していると考えられる。もう1つは、AKRのような二電子還元酵素により生成された二電子還元体は、母骨格となるキノンによりその安定性が異なる。レドックス活性を示さない安定な二電子還元体はそれ自身が最終代謝産物となり得るが、不安定 (= 反応性の高い) な二電子還元体はさらなる解毒代謝反応としてグルクロン酸や硫酸などによる抱合反応を受け、体外へ排出される。9,10-PQ は (非) 酵素的に一電子還元反応を受け、活性酸素種を蔓延させるが、最近、われわれは 9,10-PQ の二電子還元体 9,10-PQH₂ が 9,10-PQ との不均化反応により一電子還元体であるセミキノンラジカルを生じることを明らかにした。⁴⁾ また、セミキノンラジカルから 9,10-PQ への酸化反応で生じた $O_2^{\cdot-}$ は、9,10-PQH₂ からセミキノンラジカルへの酸化反応を助長することも示された。1,2-NQ も一電子及び二電子還元反応を受けるが、その毒性及び解毒反応におけるこれらの反応の寄与の詳細は明らかにされていない。

5. 1,2-NQ と共有結合するタンパク質

1,2-NQ がタンパク質に結合するには、先に述べたようにそのタンパク質のチオール基 (R-SH) がチオレートイオン (R-S⁻) に解離している必要がある。チオール基の解離状態に関してはシステインの pKa 値が関与する。細胞内では非タンパク質チオールのグルタチオン (GSH) が通常 mM オーダーで細胞に存在する。つまり GSH が 1,2-NQ とタンパク質チオール基との結合を阻害していることが示唆される。しかしながら GSH の pKa 値は 8.66 であることから、生理学的な pH では GSH 以外の解離性チオール基を有するタンパク質が 1,2-NQ の標的分子となることが予想される。タンパク質チオール基の pKa 値の減少を引き起こす因子として、そのシステイン残基の近傍にリジンやアルギニンのような塩基性アミノ酸が存在することが挙げられる (Fig. 5)。このような状況下において、チオール基がより解離し易い状態になり、1,2-NQ との求核付加反応が成立する。

1,2-NQ と共有結合するタンパク質を検出するには、1,2-NQ を特異的に認識するプローブが必要になる。内在性親電子性物質である 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -

prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) もタンパク質との結合が知られている。⁵⁾ 本親電子性物質の場合、タンパク質との共有結合を検出する方法として 15d-PGJ₂ にビオチンを結合させたプローブを用い、アビジン-ビオチン反応が利用されている。われわれは、1,2-NQ と共有結合するタンパク質の検出のために、1,2-NQ を特異的に認識する抗体を作成した。すなわち、Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) のシステイン残基に 1,2-NQ を結合させ家兎に免疫した。得られた本抗体は 1,2-NQ 濃度依存的に結合タンパク質を認識した。さらに、本抗体はナフタレン誘導体で親電子性を持つ 1,4-NQ とタンパク質との結合を認識しなかったことから、1,2-NQ が結合しているタンパク質を特異的に認識することが明らかとなった (Fig. 6)。

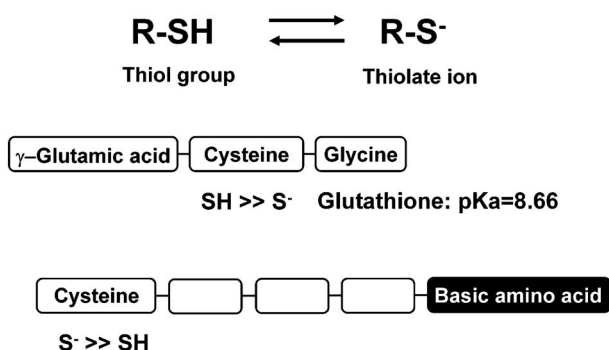


Fig. 5. Conversion of Thiol to Thiolate Ion by Basic Amino Acid Effect

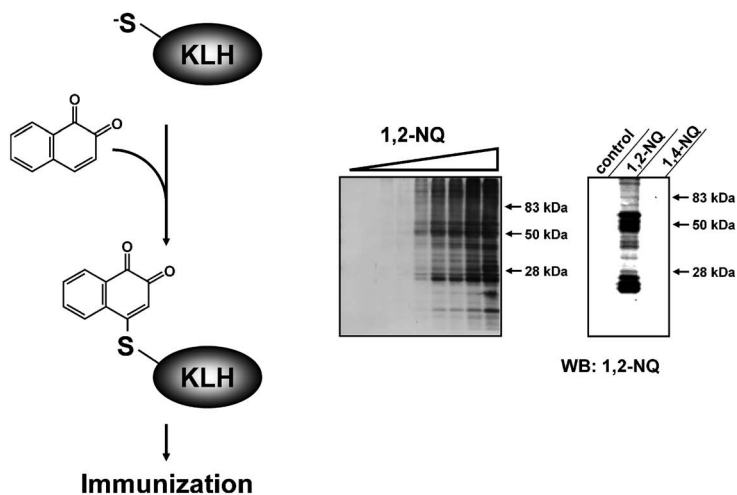


Fig. 6. Detection of Cellular Proteins that are Covalently Bound to 1,2-NQ by Western Blot Analysis with Specific Antibody against 1,2-NQ

The 9000×g supernatant of mouse liver homogenate was incubated with 1,2-NQ or 1,4-NQ for 1 h, and western blot was performed with anti-1,2-NQ antibody.

5-1. Inhibitor of κ B Kinase (IKK) 転写因子 NF- κ B の生理学的意義、活性化及び不活性化に係わるシグナル伝達経路に関し、ここ 20 年間注目され飛躍的に明らかになった。NF- κ B の生理学的意義は広範囲であるが、それらの中でも免疫応答系における役割は重要である。NF- κ B は、T 細胞受容体、B 細胞受容体、Tumor Necrosis Factor 受容体や Toll-like 受容体のような膜レセプターからのシグナル活性化を仲介することにより、サイトカイン、ケモカインや成長因子の発現を制御している。NF- κ B family (p65, RelB, c-Rel, p50/p105, p52/p100) はホモあるいはヘテロダイマーを形成し、通常状態では inhibitor of κ B (I κ B) と結合することにより、その活性は負に制御されている。細胞がいったん活性化されると、I κ B はリン酸化されることにより NF- κ B から遊離しユビキチン化され、プロテアソームによって分解される。その結果、NF- κ B は核内に移行して転写活性化能を獲得する。I κ B は、種々のシグナル伝達経路を介してリン酸化されるが、その中でも inhibitor of I κ B Kinase (IKK) はその中心的役割を果たす。IKK は、キナーゼ活性を触媒する 2 つのサブユニット (IKK α , IKK β) と本活性を制御するサブユニット (NEMO/IKK γ) の 3 量体からなる。I κ B のリン酸化は、主に IKK β が担っている (Fig. 7)。⁶⁾

1,2-NQ と同様に親電子性物質であるベンゾキノン⁷⁾ や 15d-PGJ₂⁸⁾ による NF- κ B の阻害機構に

IKK β が関与していることが報告されている。また、その阻害作用に IKK β のシステイン残基 (179 番目) の修飾が示唆されていることから、われわれは 1,2-NQ が IKK β に直接結合することにより、NF- κ B の転写活性化を阻害するのではないかと推

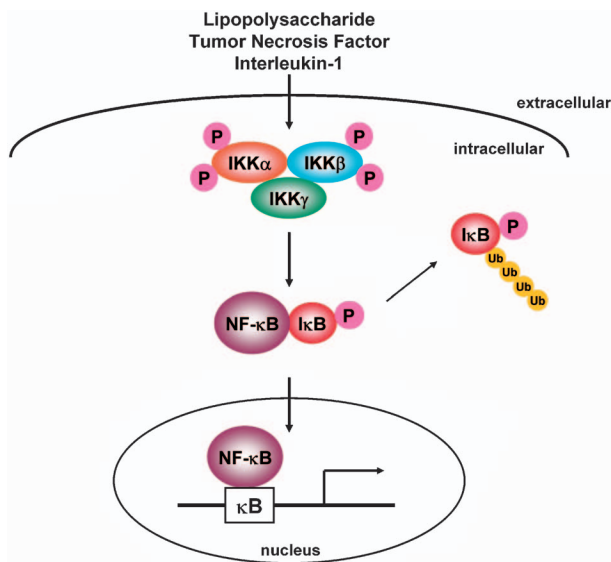


Fig. 7. NF- κ B Signaling Pathway

NF- κ B: nuclear factor- κ B, I κ B: inhibitor of κ B, IKK: I κ B kinase, Ub: Ubiquitin

測した。本研究には、リポ多糖 (LPS) による NF- κ B 活性化の経路がよく研究されているマウスマクロファージ細胞株 (RAW 264.7) を用いた。その結果、20 μ mol/l の 1,2-NQ の曝露は、LPS (1 μ g/ml) により誘導される NF- κ B の活性化を阻害した (Fig. 8(A), ゲルシフト法; Fig. 8(B), ルシフェラーゼ法)。NF- κ B の阻害作用に一致して、その上流である I κ B のリン酸化の抑制に伴い、I κ B の分解作用も阻害されていた (Fig. 8(C))。また、1,2-NQ の曝露により、IKK β の活性は顕著に減少していた (Fig. 8(D))。さらに、1,2-NQ による IKK β 活性阻害作用において、1,2-NQ と IKK β の結合に起因するか否かを検討した。Figure 9 に示す通り、どちらの細胞においても 1,2-NQ と IKK β との共有結合が検出された。リコンビナント IKK β を用いた検討においても、同様な結果が認められた。1,2-NQ と IKK β との共有結合は、過剰のジチオスレイトールの存在により減弱したことから、本結合は IKK β のチオール基の関与が示唆された。

Maeda ら⁹⁾は、IKK β の肝臓特異的欠損マウスを作成し、ジエチルニトロソアミンによる化学発がんが亢進されることを示している。今回の検討によ

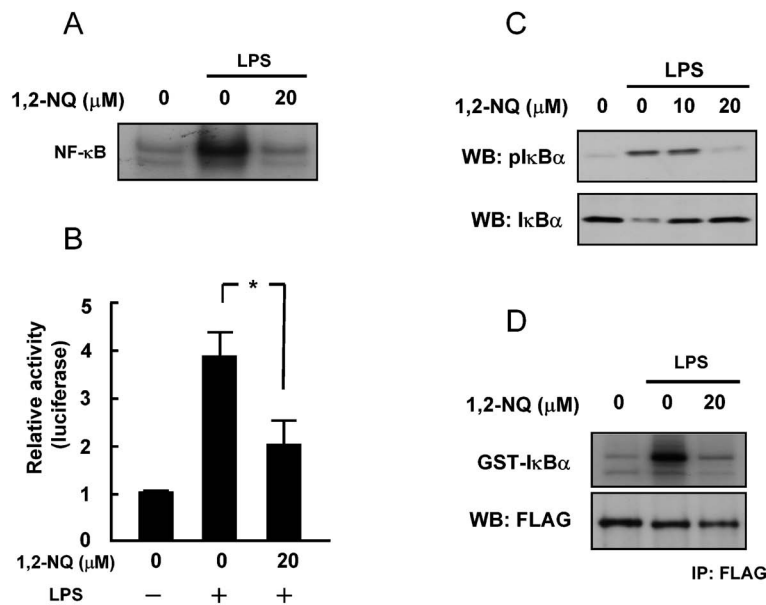


Fig. 8. 1,2-NQ Inhibits IKK β Activity, Leading to Inhibition of NF- κ B

A. RAW 264.7 cells were exposed to 1,2-NQ for 15 min prior to stimulation with LPS (1 μ g/ml) for 30 min. Nuclear extracts were subjected to gel shift assay. B. NF- κ B luciferase cDNA transfected-RAW 264.7 cells were exposed to 1,2-NQ for 15 min prior to stimulation with LPS (1 μ g/ml) for 4 h. Luciferase assay was performed. C. RAW 264.7 cells were exposed to 1,2-NQ for 15 min prior to stimulation with LPS (1 μ g/ml) for 5 min. Western blot was performed with anti-phospho-I κ B or I κ B antibody. D. FLAG-IKK β cDNA transfected-RAW 264.7 cells were exposed to 1,2-NQ for 15 min prior to stimulation with LPS (1 μ g/ml) for 5 min. FLAG-IKK β was immunoprecipitated, and kinase activity in the immune complexes was assayed by using GST-I κ B α as a substrate. Each value is the mean \pm S.D. of three determinations. * p <0.05, vs. control.

り、大気中に存在する 1,2-NQ のような親電子物質が IKK β に結合し、その活性を阻害する可能性が示唆された。PAHs の中でもベンゾ [a] ピレンによる肺での発がん作用はよく知られているが、その作用において発がんの防御因子として働く IKK β の活性を 1,2-NQ のような親電子性環境化学物質が抑制してしまうことは、ベンゾ [a] ピレンによる発がん作用をより進行させるかもしれない。

5-2. Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B)

われわれは、大気中に存在する 1,2-NQ が生体どのような影響を与えるかについて、1,2-NQ の標的器官である気管のリング標本を用いて検討を行った。¹⁰⁾ 摘出したモルモット気管リングに 1,2-NQ を曝露したところ、濃度依存的に気管支の収縮作用が観察された (Fig. 10(A)). 1,2-NQ による気管収縮作用の機序を明らかにするために、上皮成長因子受容体 (EGFR) の活性化を検討した。EGFR の活性

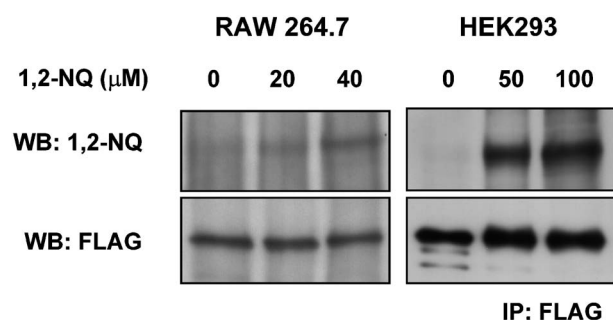


Fig. 9. Covalent Binding of 1,2-NQ to IKK β

FLAG-IKK β cDNA transfected-RAW 264.7 and HEK293 cells exposed to 1,2-NQ for 15 min. FLAG-IKK β was immunoprecipitated, and western blot was performed in the pellets with anti-1,2-NQ or FLAG antibody.

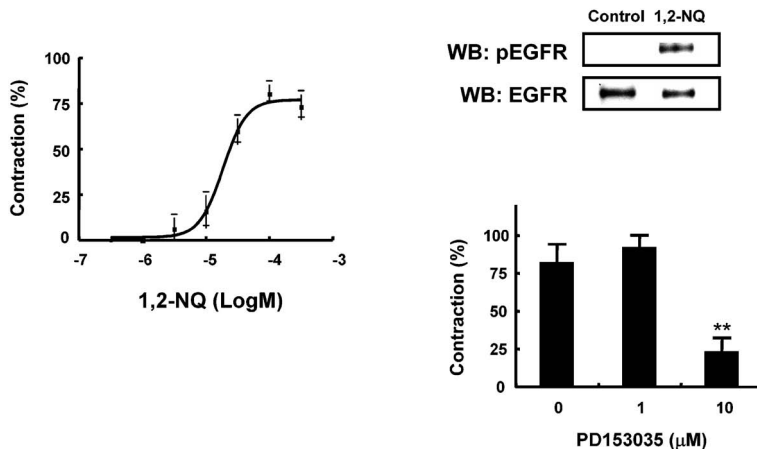


Fig. 10. 1,2-NQ Stimulates Tracheal Contraction through EGFR Phosphorylation in Guinea Pig
This figure is adapted from Ref. 10).

化に着目した理由として、1) EGFR がリン酸化されると、下流に位置する mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) 及び mitogen-activated protein kinase (ERK) が活性化され、炎症性タンパク質の発現上昇や細胞の増殖を促すこと、¹¹⁾ 2) 重度気管支喘息患者の気管上皮細胞においてチロシンリン酸化の顕著な亢進が認められること¹²⁾が挙げられる。収縮がみられた条件下において、気管中タンパク質を用い検討した結果、1,2-NQ の曝露によって EGFR のリン酸化が生じた (Fig. 10(B)). さらに、これらの EGFR のリン酸化が気管収縮作用に介在するか否かについて EGFR 阻害剤 (PD153035) を用い検討したところ、1,2-NQ による気管収縮作用は 10 μmol/l の PD153035 添加により減弱した (Fig. 10(C)). これらの結果から、1,2-NQ による気管収縮作用において EGFR の活性化が介在していることが明らかになった。

次にわれわれは、1,2-NQ による EGFR のリン酸化亢進の機序を明らかにするために protein tyrosine phosphatases (PTPs) に着目した。生体にとってリン酸化を介したシグナル活性化と同時に脱リン酸化によるシグナル伝達の沈静化も応答反応として重要である。¹³⁾ 脱リン酸化反応は、種々の脱リン酸化酵素により行われているが、その中でも PTP1B は、EGFR の脱リン酸化を触媒する酵素としてよく研究されている。この PTP1B はシステイン残基 (215 番目) がその活性発現の中心を担うことが知られており、さらにこのシステイン残基の pKa 値が 5.4 であることから、生理学的な pH ではほとん

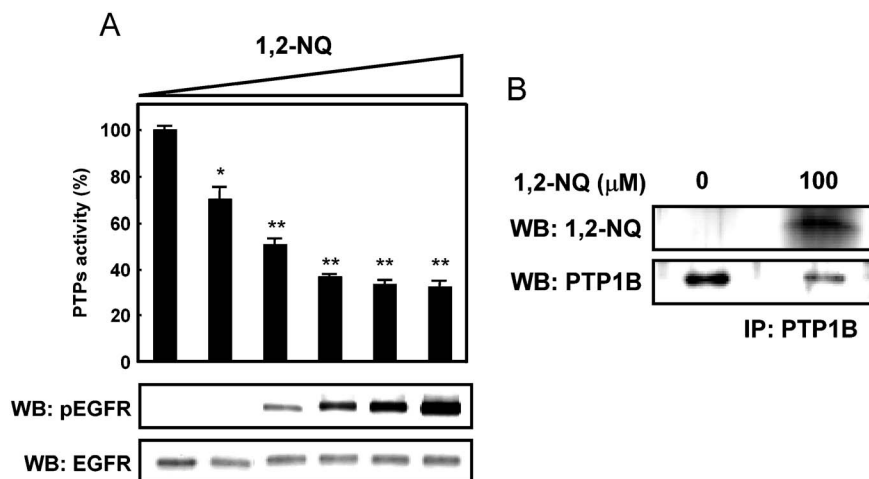


Fig. 11. Transactivation of EGFR Coupled to Reduction of PTPs Activity and Covalent Modification of PTP1B in A431 Cells during Exposure to 1,2-NQ

A. A431 cells were exposed to 1,2-NQ for 10 min. PTPs activity in the cell lysates was determined with *p*-nitrophenyl phosphate as a substrate. Western blot was performed with anti-phospho-EGFR or EGFR antibody. Each value is the mean \pm S.E. of three determinations. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control. B. 1,2-NQ exposed-A431 cells were immunoprecipitated with anti-PTP1B antibody, and western blot was performed in the pellets with anti-1,2-NQ or PTP1B antibody.

どのチオール基がチオレートイオンに解離していることが示唆される。¹⁴⁾そこでわれわれは、1,2-NQが存在するとPTP1Bに結合することにより活性が失われ、それに付随してEGFRが活性化されるかについて検討した。ヒト扁平上皮細胞(A431細胞)に1,2-NQを曝露すると、濃度依存的に細胞内PTPs活性が阻害され、それに伴い顕著なEGFRのリン酸化が亢進した(Fig. 11(A))。PTP1B抗体による免疫沈降と1,2-NQを認識する特異的抗体を用いたウエスタンブロット分析により、1,2-NQがA431細胞中のPTP1Bと共有結合していることが明らかとなった(Fig. 11(B))。

大気中にたくさん存在している環境化学物質のうち、どの化合物が呼吸器疾患を引き起こすのか、またその機序に関しての分子レベルでの解析を扱った報告は少ない。われわれの研究成果は、大気中に存在するあるいは生体内代謝によって産生される1,2-NQのような親電子環境物質がPTPsを阻害し、EGFRのリン酸化を促進することにより気管リングを収縮させるという分子機構を示唆している。

6. おわりに

本稿では、PAHsの中でも1,2-NQの親電子性がゆえに転写因子活性に影響を与える分子としてIKK β 及びPTP1Bに着目し、それに起因する生体反応について報告した。われわれが作成した抗1,2-NQ抗体は、1,2-NQが生体内に侵入した際に特異的に結合するタンパク質を検出するだけでなく、

ELISAなどの方法によって標的タンパク質に結合する1,2-NQを定量することが可能になる。このような研究展開は1,2-NQだけに留まらず、他の親電子性環境化学物質による毒性を分子生物学的な側面からアプローチする際に応用できる。親電子性環境化学物質を認識するプローブを作成することにより、標的となる生体高分子(タンパク質、DNA)の同定が可能となり、対象となる親電子性環境化学物質の量的な動態を探ることにもつながる。

謝辞 本稿で紹介したすべての研究は、筑波大学大学院人間総合科学研究科及び環境科学研究科において熊谷嘉人教授の指導の下、岩本典子、菊野庄太、秋森雅子大学院生によって行われたものです。ここに深く感謝致します。また、FLAG-IKK β cDNAを提供して頂いた順天堂大学中野裕康先生に深く感謝致します。

REFERENCES

- 1) Cho A. K., Stefano E., You Y., Rodriguez C. E., Schmitz D. A., Kumagai Y., Miguel A. H., Eiguren-Fernandez A., Kobayashi T., Avol E., Froines J., *Aerosol Sci. Technol.*, **38**, 1-14 (2004).
- 2) Schuetzle D., *Environ. Health Perspect.*, **47**, 65-80 (1983).
- 3) Fraser M. P., Cass G. R., Simoneit B. R. T., Rasmussen R. A., *Environ. Sci. Technol.*, **32**,

- 1760–1770 (1998).
- 4) Taguchi K., Fujii S., Yamano S., Cho A. K., Kamisuki S., Nakai Y., Sugawara F., Froines J. R., Kumagai Y., *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 789–799 (2007).
 - 5) Shibata T., Yamada T., Ishii T., Kumazawa S., Nakamura H., Masutani H., Yodoi J., Uchida K., *J. Biol. Chem.*, **278**, 26046–26054 (2003).
 - 6) Hayden M. S., Ghosh S., *Genes Dev.*, **18**, 2195–2224 (2004).
 - 7) Niwa M., Nakamura K., Kitajima M., Ueda Y., Tsutsumishita S., Futaki S., Takaishi Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **239**, 367–371 (1997).
 - 8) Rossi A., Kapahi P., Natoli T., Takahashi T., Chen Y., Karin M., Santoro M. G., *Nature*, **403**, 103–108 (2000).
 - 9) Maeda S., Kamata H., Luo J. L., Leffert H., Karin M., *Cell*, **121**, 977–990 (2005).
 - 10) Kikuno S., Taguchi K., Iwamoto N., Yamano S., Cho A. K., Froines J. R., Kumagai Y., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **210**, 47–54 (2005).
 - 11) Hackel P. O., Zwick E., Prenzei N., Ullich A., *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 184–189 (1999).
 - 12) Hamilton L. M., Puddicombe S. M., Dearman R. J., Kimber I., Sandstrom T., Wallin A., Howarth P. H., Holgate S. T., Wilson S. J., Davies D. E., *Eur. Respir. J.*, **25**, 978–985 (2005).
 - 13) Tiganis T., *IUBMB Life*, **53**, 3–14 (2002).
 - 14) Peters G., Frimurer T. M., Olsen O. H., *Biochemistry*, **37**, 5383–5393 (1998).