特集:ソフトな相互作用による膜インターフェイスの機能制御

Na⁺/H⁺交換輸送体の機能制御機構

林 こころ, 児嶋 長次郎

Na⁺/H⁺交換輸送体は細胞内 pH や浸透圧の調整など,生物の生存に必須の機能を担う 主要なトランスポーターの一つである.高等動物の Na⁺/H⁺交換輸送体である NHE は 様々な細胞外シグナルによって活性が調節されており,カルシニューリン B 様タンパク 質(CHP)が NHE の活性化に必須である.本稿では最近我々が明らかにした NHE1 ペプ チドと CHP との複合体の NMR 構造の詳細を説明するとともに,NHE の活性調節機構を 考察する.また分解性の NHE1 ペプチドを発現させるために我々が開発した大腸菌の新 規大量発現系,pCold-GST システムについてもふれる.

1. はじめに

細胞内 pH や Na⁺濃度,浸透圧の調節は,細胞の正常な 活動に必須である.このようなイオン濃度や浸透圧の調整 といった,細胞内イオンの恒常性を保つ機能は主に Na⁺/H⁺交換輸送体が担っている.この Na⁺/H⁺交換輸送体 は形質膜,内膜を問わず細胞膜に広く存在する 12 回膜貫 通型の膜タンパク質で,細菌からカビ,酵母,植物や哺乳 類にいたるほぼ全ての生物に存在している^{1,2)}.細菌の Na⁺/H⁺交換輸送体である Na⁺/H⁺ antiporter (Nha) は 12 回膜貫通領域のみからなり,イオン輸送は Na⁺/H⁺交換輸 送体の膜貫通領域が担っていると考えられる.しかし高等 動物細胞の Na⁺/H⁺交換輸送体である Na⁺/H⁺ exchanger (NHE) では膜貫通領域だけでなく C 末端に大きな細胞質 領域を持っている.

このC末端領域は、ホルモンや増殖因子、高浸透圧な どの外部シグナルに応答した、より複雑な輸送機能の制御 に関わっているが、その分子機構の詳細には不明な点が多 い.C末端領域に関連する重要な制御因子としては、カル

The regulation mechanism of Na^+/H^+ exchanger

シニューリンB様タンパク質(calcineurin B homologous protein, CHP)が知られており,NHEの変異体を用いた実 験からNHEのC末端領域にCHPが1:1で結合するこ と,および,この結合がNHEの輸送活性に必須であるこ とが示されている³³.

最近我々はヒト NHE1 の C 末端領域のペプチドとヒト CHP1 との複合体の NMR 構造を明らかにした⁴. また国立 循環器病センターの若林博士らによって NHE1 の C 末端 領域のペプチドと CHP2 (CHP1 のアイソフォーム) との 複合体の結晶構造も決定されている⁵⁾.本稿ではこれらの 立体構造の詳細を解説するとともに,立体構造に基づいた NHE の活性制御機構について考察する.また,我々は分 解をうけやすい NHE1 ペプチドを大腸菌で発現させるこ とが可能な新規大量発現系を開発したので,これについて も説明する.

2. Na⁺/H⁺交換輸送体 NHE

NHE は哺乳類細胞に存在し、Na⁺濃度勾配を利用して細胞内のH⁺と細胞外のNa⁺を1:1で交換輸送する交換輸送体である。NHE はいくつかのアイソフォームからなり、ヒトでは1989年にNHE1 がクローニングされて以来⁶⁰,現在までにNHE1 から NHE10まで10のアイソフォームが報告されている^{2.7.8)}.この中でNHE1 から NHE5 は形質膜に存在する。NHE1 は広範な組織に発現するのに対してNHE2 から NHE5 は組織特異的に発現する。NHE2 と NHE3 は腎臓や腸の上皮の頂端膜^{9.10},NHE4 は胃⁹⁾,NHE5 は主

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 (〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5)

Kokoro Hayashi and Chojiro Kojima (Laboratory of Biophysics, Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology (NAIST), 8916–5 Takayama, Ikoma, Nara 630–0192, Japan)

に脳に発現がみられる¹¹⁾. NHE6 から NHE9 は広範な組織 のオルガネラ膜に存在すると考えられている. NHE6 は初 期リサイクリングエンドソーム⁷⁾, NHE7 はトランスゴル ジ¹²⁾, NHE8 は中期ゴルジからトランスゴルジ⁷⁾, NHE9 は後期リサイクリングエンドソームに局在している⁷⁾. NHE10 は最近, 破骨細胞に見出されたアイソフォームで ある⁸⁾.

NHEのアイソフォームの中で最もよく研究が進められ てきたものがNHE1である. ヒトNHE1は815アミノ酸 残基から成り、細胞内 pH (pHi)や細胞質内 Na⁺濃度の恒 常性、浸透圧の調節など多くの重要な機能に関わっている 特に重要なNHEである (図 la). 一般的な細胞では pHi は中性に維持されているが、この pHiの維持は NHE の持

а

つ重要な機能である. NHE1 は酸性条件下で高いイオン輸送活性を持ち,その活性はアルカリ性にシフトするにつれて低下し,pH7.5 付近ではほとんど活性がなくなることが知られている¹³⁾.これは,NHE1 あるいはその制御因子にpH センサーとしてはたらく領域が存在し,NHE1 の活性を制御しているためだと考えられる.

NHEの分子機能は、膜貫通領域によるイオン輸送能と C 末端領域による輸送調節能に加え、C 末端領域の足場と しての機能が知られている. 膜貫通領域のイオン輸送能に ついては多くの研究が行われており、その輸送機構の詳細 が明らかになりつつある. 例えば大腸菌の Na⁺/H⁺交換輸 送体である NhaA では立体構造が報告されており、NHE のイオン輸送に寄与するアミノ酸が同定されている. 一



b



図1 NHE1の概略

(a) NHE1 のイオン輸送方向と活性制御.(b) ヒトNHE1 と相互作用因 子. PIP₂:ホスファチジルイノシトール二リン酸, CHP:カルシニューリ ンB様タンパク質, ERM:エズリン・ラデキシン・モエシン, CaM:カ ルモジュリン, 14-3-3:アダプタータンパク質, ROCK I:Rhoキナーゼ I, NIK:Nck 結合キナーゼ, CaII:炭酸脱水酵素 II. 方,NHEのC末端領域については分子レベルでの研究が あまり進んでいない.既に述べたように,NHE1の活性制 御はそのC末端細胞質領域が担っていると考えられてい るが,C末端領域にはNHE1の活性化に必須な因子以外に も様々な因子が結合しており,今ではC末端領域が足場 タンパク質として機能すると考えられている(図1b).

NHE1のC末端領域に結合する因子としてはRhoキ ナーゼI(ROCK I)やプロテインキナーゼC(PKC),Nck 結合キナーゼ(NIK)などのキナーゼ,カルシウム結合タ ンパク質であるカルモジュリン(CaM)やCHPのほか, ERM タンパク質,ホスファチジルイノシトール二リン酸 (PIP₂)が存在する.この中でNHEの活性制御に関わる特 に重要な因子はCHPであり,実際にCHPと結合できない NHE 変異体ではその輸送活性が著しく減少する.また NHEの活性化に必要なpHiの値も酸性側にシフトするこ とから³,NHEのCHP結合領域またはCHP 自体がpH セ ンサーとしての機能を持つ可能性がある.

3. カルシニューリン B 様タンパク質 CHP

CHP は少なくとも 3 種類のアイソフォーム (CHP1, CHP2, CHP3)を持つカルシウム結合タンパク質であり, N 末端にミリストイル化部位 (Gly2)を持つ. CHP のア イソフォームには発現組織に特徴があり, CHP1 があらゆ る組織に普遍的に存在するのに対して CHP2 は腫瘍細胞お よび小腸に, CHP3 は主に心臓に発現する. CHP2と NHE1 の結合能は CHP1と比べて5倍程度強く¹³⁾,腫瘍細 胞では CHP2 が NHE1を恒常的に活性化することで細胞内 pH をアルカリ性側に,細胞外 pH を酸性側にシフトする と考えられている¹⁴⁾.細胞内 pH の上昇は腫瘍細胞の増殖 に,細胞外 pH の低下は腫瘍細胞の浸潤に関与することが 知られている.

CHP の立体構造としては、ラット CHP1 の結晶構造が 報告されている¹⁵⁾. このラット CHP1 は 10 本のα ヘリッ クスから成っており、その全体構造はカルシニューリン B と類似している.最近、我々はヒト NHE1 の C 末端細胞 質領域ペプチドとの複合体としてヒト CHP1 の NMR 構造 を報告した^{4,16)}.またヒト CHP2 の結晶構造が NHE1 ペプ チドとの複合体として報告されている⁵⁾.全体構造は3者 とも類似しており、NHE1 との複合体形成によるドラス ティックな構造変化はなく、アイソフォーム間でも大きな 構造の差は見られない.複合体の立体構造の詳細について は後で詳しく述べる.

CHP にはカルシウム結合モチーフとして知られる EF ハ ンドモチーフが四つ存在するが, CHP1, 2 では四つの EF ハンドのうち, N 末端側の二つ (EF1 と EF2) はカルシウ ム結合能がないのに対し, C 末端側の二つ (EF3 と EF4) はカルシウム結合能がある.またラット CHP1 の結晶構造 においてはカルシウムイオンが EF3 と EF4 にのみ結合し ていることが示されている¹⁵⁾. また, CHP1 へのカルシウ ムイオンの結合を阻害すると NHE1 の活性調節が部分的 に阻害されるが, カルシウムイオンの CHP1 に対する親和 性は NHE1 と結合した状態では解離定数約 1-3 nM と非常 に高いため, カルシウムが NHE1 の活性を制御している というより, むしろ CHP の構造の安定化に寄与している と考えられている^{17,18}.

CHP は二つのドメインから成っており,それぞれN末 端がNローブ,C末端側がCローブと呼ばれている. CHP の構造における特徴は,NローブとCローブをつな いでいる長いループ領域の存在である.このようなループ は CHP と相同性を持つカルシニューリンBやリカバリン には存在しない領域であり,CHP に特徴的であることか ら CHP ループ(あるいは CHP unique region)と呼ばれて いる.この CHP ループは NHE1 の活性化には必須ではな いものの,その欠失により NHE1 の輸送活性の pHi 依存 性が酸性側にシフトする⁵⁰.

4. CHP1/NHE1 ペプチド複合体の NMR 構造解析

我々が行った CHP1/NHE1 ペプチド複合体の NMR 構造 解析では, CHP1 および NHE1 (503-545)の共発現系を用 いてサンプル調製を行った.これは NHE1 ペプチドが発 現精製の段階で著しい断片化を受け精製できなかったこと に起因する.後に述べる我々が開発した大腸菌発現系 pCold-GST システムを用いることで,最終的に NHE1 ペプ チドの発現精製に成功した.共発現によるサンプル調製は NMR スペクトルの改善に大きな役割を果たした.すなわ ち, CHP1 単体では溶液中で非特異的な凝集を起こし,解 析可能なシャープな NMR 信号が得られなかったが,共発 現で調製した複合体では非特異的な凝集が抑えられ分離の よい良好な NMR スペクトルが得られた.

CHP1/NHE1ペプチド複合体は分子量約27kDaであり, これは一般的なNMR構造解析法で構造決定可能とされる タンパク質の分子量上限に近い.またPDBに登録されて いるNMR構造で分子量25kDa以上のものは全体の1% をはるかに下回る.一般に,分子量が増大するとNMR信 号の幅広化や,分子量の増大により観察されるピークの数 が増え,NMR信号の帰属が難しくなる.そのため CHP1/NHE1ペプチド複合体の立体構造解析では,通常の 立体構造解析で用いる¹³C/¹⁵N標識サンプルに加え,NMR 信号の幅広化を抑えるための²H(重水素)標識を加え た²H/¹³C/¹⁵N標識サンプルを用いた.また核間距離情報を 取得するためのNOESY スペクトルの解析では,構造計算 プログラム CYANA に含まれる nuclear Overhauser effect (NOE) ピークの自動帰属プログラムである CANDID を用 いることで高分解能での立体構造決定に成功した.これは



図2 CHP/NHE1 ペプチド複合体の 立体構造

CHP の N-ローブを青色, C-ローブ をピンク色, CHP-ループを灰色, NHE1 ペプチドを緑色で示す. NHE ペプチドは (516-540) の領域を表 示した.(左) CHP1/NHE1 ペプチ ドの溶液構造 (PDB ID:2E30). (右) CHP2/NHE1 ペプチドの結晶 構造 (PDB ID:2BEC). CHP-ルー プの点線は構造が決定されていない 領域.



b



図3 CHP1とCHP2の表面電荷マップ CHP/NHE1 複合体における CHP の表面電荷を示す.正電荷は青,負電荷は赤.緑色のリボン構造は NHE1ペプチドを示す.黄色い点線は CHP1と CHP2 で電荷が反転している領域.(a) CHP1/NHE1ペ プチド複合体,(b) CHP2/NHE1ペプチド複合体. 国内で決定された複合体 NMR 構造の中では新規構造とし て最大である.信号の重なりが激しいタンパク質の構造決 定では NOE の自動帰属プログラムが不可欠である.この プログラムは理化学研究所に所属していた Güntert 博士が 開発したものであり,すでに世界的に普及しつつある.今 後はこのプログラムを用いた分子量 25 kDa 以上の NMR 構造解析例が急増する可能性がある.少なくとも,このプ ログラムの普及により,解析対象の分子量に関係なく, NMR 構造決定のスピードが格段に向上したことは間違い ない.

CHP1/NHE1ペプチド複合体のような信号の重なりが激 しい高分子量サンプルでは,決定された立体構造の信頼度 は低くなる.この問題に対処するため,我々は残余双極子 カップリング (residual dipolar coupling, RDC) 法を用いた. これは液晶などの媒体共存下でタンパク質を磁場配向させ て測定する NMR 実験であり,RDC 値からは磁場に対す るタンパク質主鎖のアミド基 NH の結合軸の方向を決定す ることができる.このようにして得られた NH の結合軸方 向を得られた立体構造と比較することで立体構造を評価す ることができる.この RDC 法を CHP1/NHE1ペプチド複 合体に適用したところ,決定された NMR 構造は十分な信 頼度を有する確度の高い構造であった.最終的に決定され た CHP1/NHE1ペプチド複合体の NMR 構造を図2(左)に 示す.

5. CHP1/NHE1 ペプチド複合体と CHP2/NHE1 ペプチド複合体

我々が溶液 NMR によって決定したヒト CHP1/ヒト NHE1 (503-545) 複合体の立体構造"とX線結晶構造解析 によって決定されたヒト CHP2/ヒト NHE1 (503-545) 複 合体の立体構造"を図2に示す(左が CHP1/NHE1, 右が CHP2/NHE1). CHP1 および CHP2 には中央に大きな疎水 ポケットがあり,両者ともその領域に NHE1 ペプチドが 結合する. CHP1/NHE1 では NHE1 (518-537) が, CHP2/ NHE1 では NHE1 (516-540) 領域がそれぞれαヘリック ス構造を形成して CHP と結合しており, CHP の C ローブ 側に NHE1 ヘリックスの N 末端側が, CHP の N ローブ側 に NHE1 ヘリックスの C 末端側が結合する. NHE1 ペプチ ドは両親媒性ヘリックスを形成しており, このヘリックス の疎水性面が CHP の疎水性ポケットにはまりこんでいる.

CHP1とCHP2は両者ともNHE1へリックスと疎水性相 互作用で結合しており、立体構造上、大きな差異は見られ ない.表面電荷はCローブ側で類似しているものの、N ローブ側ではCHP1とCHP2で電荷が反転している領域が 存在する(図3).CHP2/NHE1の結晶構造では、NHE1ペ プチドのC末端付近に位置するCHP2の領域が正に荷電 しているのに対し、CHP1ではその領域が負に荷電してい る. この電荷を帯びた領域は NHE1 ペプチドに近接して おり, CHP2/NHE1 では NHE1 ペプチドのαヘリックス C 末端に存在するヒスチジンの主鎖 C=Oと CHP2 の2番目 のαヘリックスに存在するアルギニンの側鎖 NH₂ は水素 結合している. このように, CHP2 の正に帯電した領域は NHE1 ペプチドとの結合に重要であり, この領域における 表面電荷の違いが NHE1 に対する CHP1 と CHP2 の結合力 の差, すなわち, CHP2 が CHP1 より強く結合する根拠と なっている.

CHP は NHE1 の活性化に重要な因子であるが、CHP/ NHE1 複合体が pH の変化に応じてどのように NHE1 の輸 送活性を制御しているのかという問題は依然として明らか にされてない.細胞質領域を持たない大腸菌のアンチポー ターである NhaA では、細胞質側のループ領域に存在する 荷電残基が pH センサーとしてはたらいていることが示唆 されている¹⁹⁾. NHE1 でも膜貫通ドメインの細胞質領域近 傍に存在するアルギニンの重要性が指摘されており、特に 10番目と11番目の膜貫通へリックスをつなぐループ (IL5)(図1b)に位置するR440の変異体は,CHP2にお いて CHP ループを欠失させたときと同様に輸送活性の pHi 依存性を酸性側にシフトする^{20,21)}.また架橋実験の結 果から, CHP2のCHPループ(図1)とNHE1のIL5は近 距離に存在していると考えられており5,このことから CHP ループと NHE1 細胞質ループの荷電残基がクラスタ を形成して pH センサーとなっている可能性がある. CHP はNHE1の膜直下の領域に結合するが(図1b),これは NHE1の細胞質領域に特定の構造を与えると同時に CHP 自身を NHE1の膜貫通領域近傍に配置し、CHP ループと NHE1 細胞質ループの荷電残基からなるクラスタの形成を 促進する役割を果たしているのかもしれない.

6. pCold-GST ベクターと NHE1 細胞質領域

最近,筆者らはコールドショックベクターを改変した pCold-GST ベクターの開発に成功し,NHE1のC末端細胞 質領域を含め,これまでの大腸菌大量発現系では困難で あったタンパク質の発現精製を成功させた²²⁾.

このベクターは、従来の発現システムにおいて可溶性タ グとして用いられていたグルタチオンS-トランスフェ ラーゼ(GST)と、2004年にニュージャージー医科歯科 大学の井上博士らによって開発されたコールドショックベ クター²³⁾の一つである pCold I ベクターを組み合わせた発 現ベクターである. pCold I ベクターは組換えタンパク質 のN末端に His タグを融合発現するように設計された コールドショックベクターであり、大腸菌のコールド ショック遺伝子である *cspA* のプロモーター配列の下流に、 発現を制御するための *lac* operator が挿入されている(図 4a). そのため、15℃ という低温条件下で IPTG 誘導する



図4 pCold ベクターのプラスミドマップ 左にプラスミドマップ,右に得られる発現タンパク質を示す. (a) pCold I ベクター,(b) pCold-GST ベクター.

ことにより、目的タンパク質を高効率に得ることができ る.筆者らが開発したベクターは、pCold Iベクターのマ ルチクローニングサイトと His タグ配列の間に GST タグ 配列を挿入したもので、pCold-GST ベクターと呼んでいる (図 4b).また、pCold-GST ベクターでは、pCold Iベク ターで His タグ配列の下流に存在する Factor Xa による切 断サイトに加え、きわめて特異性の高いプロテアーゼであ る human rhinovirus 3C protease (HRV3C) による切断サイ トを GST タグの下流に挿入している.HRV3C は GST 融 合タンパク質の状態で PreScission protease として市販され ており、容易に入手可能である.この pCold-GST を用い てタンパク質の大量発現を試みたところ、現在までに従来 の発現システムで発現困難であったタンパク質を含む 67 種類のタンパク質のうち、61 種類のタンパク質を可溶性 画分に発現させることに成功した.この pCold-GST は 我々のグループから配布している.興味のある方は児嶋 (kojima@bs.naist.jp) までコンタクトしていただきたい.

NHE1 (503-545) のような不安定なペプチドでは,筆 者らが開発した pCold-GST ベクターを用いても分解産物 を生じる.だが,N 末端だけでなくC 末端にも His タグ配 列を付加することで,N 末端タグの切断後に His タグ配 いたアフィニティー精製が可能になり,分解物との分離を 容易に行うことができた (図 5a, 5b).精製した NHE1 (503-545)は極めて安定であり,室温で1週間程度の NMR 測定に耐える.図 5c に主鎖信号の帰属を示す.この NMR スペクトルの解析結果から NHE1 ペプチドが単体で特定 の構造をとっておらず,CHP と複合体を形成してはじめ て α ヘリックス構造を形成することがわかった⁴.

我々の CHP/NHE1 ペプチド複合体の立体構造解析から, CHP の結合によって NHE1 の細胞質領域にαヘリックス

931

а





図5 NHE1 (503-545)の発現と精製

Mr:分子量マーカー (kDa). (a) GST-NHE1 ペプチドのアフィニティー精製の結果 (SDS-PAGE). S:破砕・超遠心後の 上清画分, P:破砕・超遠心後の沈殿画分, W:アフィニティーレジン洗浄画分, E:アフィニティーレジン溶出画分. 黒 矢印は GST-NHE1 の分子量を示す. (b) GST タグ切断・精製後の NHE1 ペプチド (最終精製物) の SDS-PAGE. 黒矢印は NHE1 の分子量を示す. (c) 500 MHz NMR で測定した NHE1 ペプチドの¹H-¹⁵N HSQC スペクトル. スペクトル中に帰属さ れた主鎖のアミノ酸残基名を示す.

構造が誘起されることが明らかとなった.しかし,NHE1 の細胞質領域は約300アミノ酸残基にも及び,CHPだけ でなく PIP₂や ERM タンパク質,カルモジュリンなど多く の因子と相互作用することから,相互作用因子と結合する ことで特定の立体構造をとって機能する領域が CHP 結合 領域以外に存在する可能性は高い.

7. NHE と 疾 患

NHE1 は様々な疾患に関わっていることが知られており、実際に心疾患を含む様々な疾病のリスクファクターになるほか、NHE1 ノックアウトマウスでは歩行性運動失調症やてんかん性痙攣発作を示すことが知られている²⁴⁾.このため、NHE1 の阻害剤は様々な疾患の治療薬として研究されており、実際に NHE1 阻害剤の投与によって心機能の改善や過収縮の回避、梗塞範囲の軽減、不整脈の頻度減少など強力な心筋保護作用がみとめられたという報告がある^{25~27)}.また、moloney sarcoma virus によって腫瘍化し、 浸潤仮足をのばしている細胞に NHE1 阻害剤を加えると 浸潤仮足が縮小するほか¹⁴⁾、筋ジストロフィーを発症したマウスを用いた実験では NHE 阻害剤が筋変性の改善効果を持つ²⁶⁾という報告がある.

我々が決定した NHE1/CHP1 複合体の NMR 構造は, NHE1/CHP2 複合体の結晶構造とともに NHE1 の輸送活性 をより効率的に抑制する薬剤を開発するための大きなヒン トを与えている.例えば,NHE1 と CHP との相互作用の 阻害による NHE1 の輸送活性抑制はその一例である. NHE1 は全組織で発現するため NHE1 阻害剤の投与は重大 な副作用を引き起こすリスクがあるが,CHP2の発現は腫 瘍細胞などに限定されているため,NHE1 と CHP2 との相 互作用を選択的に阻害できれば副作用のリスクは低く抑え られる.また NHE1 と CHP との pH 依存的な相互作用を 阻害するのもよい方法かもしれない.

8. おわりに

本稿では NHE1/CHP 複合体の立体構造に基づき NHE1 の C 末端細胞質領域による Na⁺/H⁺輸送活性の制御機構を 解説した.しかし輸送活性の制御機構解明には C 末端領 域での他の制御因子との相互作用や C 末端領域自身の二 量体形成,リン酸化など,これから解明すべき点が数多く 残されている.今後の研究の一層の進展が待たれる.

本稿に記載した研究成果は,三島正規博士(現首都大学 東京准教授),国立循環器病センター研究所の若林繁夫先 生との共同研究によって得られたものです.米山桃子,木 下紘子,安場朗子の各氏をはじめ,本研究に携わった全て の研究者・学生・技術員の方々に感謝します.

文 献

 Wakabayashi, S., Shigekawa, M., & Pouyssegur, J. (1997) *Physiol. Rev.*, 77, 51–74.

- Orlowski, J. & Grinstein, S. (2004) Pflugers Arch., 447, 549– 565.
- Pang, T., Su, X., Wakabayashi, S., & Shigekawa, M. (2001) J. Biol. Chem., 276, 17367–17372.
- Mishima, M., Wakabayashi, S., & Kojima, C. (2007) J. Biol. Chem., 282, 2741–2751.
- Ammar, Y.B., Takeda, S., Hisamitsu, T., Mori, H., & Wakabayashi, S. (2006) *EMBO J.*, 25, 2315–2325.
- Sardet, C., Franchi, A., & Pouyssegur, J. (1989) Cell, 56, 271–280.
- Nakamura, N., Tanaka, S., Teko, Y., Mitsui, K., & Kanazawa, H. (2005) J. Biol. Chem., 280, 1561–1572.
- Lee, S.H., Kim, T., Park, E.S., Yang, S., Jeong, D., Choi, Y., & Rho, J. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 369, 320– 326.
- Orlowski, J., Kandasamy, R.A., & Shull, G.E. (1992) J. Biol. Chem., 267, 9331–9339.
- Noel, J., Roux, D., & Pouyssegur, J. (1996) J. Cell Sci., 109 (Pt 5), 929–939.
- Baird, N.R., Orlowski, J., Szabo, E.Z., Zaun, H.C., Schultheis, P.J., Menon, A.G., & Shull, G.E. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 4377–4382.
- 12) Numata, M. & Orlowski, J. (2001) J. Biol. Chem., 276, 17387–17394.
- 13) Pang, T., Wakabayashi, S., & Shigekawa, M. (2002) J. Biol. Chem., 277, 43771–43777.
- 14) Cardone, R.A., Casavola, V., & Reshkin, S.J. (2005) Nat. Rev. Cancer, 5, 786–795.
- 15) Naoe, Y., Arita, K., Hashimoto, H., Kanazawa, H., Sato, M., & Shimizu, T. (2005) J. Biol. Chem., 280, 32372–32378.
- Shimizu, T. & Mishima, M. (2006) 蛋白質 核酸 酵素, 51, 363-369.
- 17) Pang, T., Hisamitsu, T., Mori, H., Shigekawa, M., & Wakabayashi, S. (2004) *Biochemistry*, 43, 3628–3636.
- 18) Wakabayashi, S., Hisamitsu, T., Ben Ammar, Y., Nakamura-Nishitani, T.Y., & Iwata, Y. (2007) 生化学, 79, 579-587.
- 19) Hunte, C., Screpanti, E., Venturi, M., Rimon, A., Padan, E., & Michel, H. (2005) *Nature*, 435, 1197–1202.
- 20) Wakabayashi, S., Hisamitsu, T., Pang, T., & Shigekawa, M. (2003) J. Biol. Chem., 278, 11828–11835.
- 21) Wakabayashi, S., Hisamitsu, T., Pang, T., & Shigekawa, M. (2003) J. Biol. Chem., 278, 43580–43585.
- 22) Hayashi, K. & Kojima, C. (2008) Protein Expr. Purif., in press.
- 23) Qing, G., Ma, L.C., Khorchid, A., Swapna, G.V., Mal, T.K., Takayama, M.M., Xia, B., Phadtare, S., Ke, H., Acton, T., Montelione, G.T., Ikura, M., & Inouye, M. (2004) Nat. Biotechnol., 22, 877–882.
- 24) Bell, S.M., Schreiner, C.M., Schultheis, P.J., Miller, M.L., Evans, R.L., Vorhees, C.V., Shull, G.E., & Scott, W.J. (1999) *Am. J. Physiol.*, 276, C788–795.
- 25) Hashimoto, K. (2001) 日本薬理学雑誌, 118, 363-370.
- 26) Engelhardt, S., Hein, L., Keller, U., Klambt, K., & Lohse, M.J. (2002) Circ. Res., 90, 814–819.
- 27) Kilic, A., Velic, A., De Windt, L.J., Fabritz, L., Voss, M., Mitko, D., Zwiener, M., Baba, H.A., van Eickels, M., Schlatter, E., & Kuhn, M. (2005) *Circulation*, 112, 2307–2317.
- 28) Iwata, Y., Katanosaka, Y., Hisamitsu, T., & Wakabayashi, S. (2007) Am. J. Pathol., 171, 1576–1587.