

低分子量 G タンパク質 RhoG によるシグナル伝達

加藤 裕 教

RhoA, Rac1, Cdc42に代表される Rho ファミリー低分子量 GTP 結合タンパク質 (G タンパク質) は、細胞の形態形成や運動性を制御するシグナル伝達の中心的な役割を担うとともに、細胞の生存・増殖にも強く影響を及ぼしている。このような Rho ファミリー G タンパク質による機能発現には、細胞内における厳密な活性調節が必要である。Rho ファミリーにはその活性調節を担う GEF や GAP, あるいは活性化されたのち下流へとシグナルを伝えるエフェクター分子が非常に数多く存在し、これらの分子が様々な刺激や細胞環境に応じて使い分けられることで、種々の細胞における多様な機能が発揮されていると考えられている。本稿では Rho ファミリーに属する G タンパク質の一つ、RhoG について、これまで明らかになった細胞機能とその活性制御との関係について概説する。

1. はじめに

細胞は、アクチンフィラメントや微小管などの細胞骨格を使ってその形態を変化させたり維持したりしている。細胞骨格は、外界からの刺激によって引き起こされる細胞内のシグナル伝達によって厳密にコントロールされており、そのシグナル伝達に重要な役割を担っているのが Rho ファミリー低分子量 G タンパク質である。Rho ファミリー G タンパク質は、GTP が結合することにより活性型に、GDP が結合することにより不活性型になることで、細胞内シグナル伝達の分子スイッチとして働いている。活性化された G タンパク質は、その活性型特異的に結合可能な標的分子 (エフェクター) に作用して、多様な細胞機能を発揮する。Rho ファミリー G タンパク質は、グアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor, GEF) の働きによって GDP-GTP 交換反応が引き起こされ活性化される一方、GTPase 活性化因子 (GTPase-activating protein, GAP) によって GTP の加水分解反応が

促進され不活性化される。Rho ファミリー G タンパク質を活性化する GEF は、Dbl ホモロジー (DH) 領域を共通に持つグループと、Dock ファミリーと呼ばれる独自の活性化領域を持つグループとの二つに大きく分類される¹⁻³⁾。哺乳類ではこれまでに、GEF 及び GAP がそれぞれ約 80 種類報告されている^{1,4,5)}。一方、個々の G タンパク質に対するエフェクター分子もそれぞれ複数存在している。このように約 20 種類の Rho ファミリー G タンパク質に対して GEF や GAP, エフェクターが数多く存在することで、様々な刺激に対する細胞の複雑かつ多様な形態変化が厳密に制御されていると考えられている。特にエフリンやセマフォリンなどのガイダンス因子は、その受容体や機能の違いによって様々な Rho ファミリー G タンパク質に対する GEF や GAP を使い分けていることが報告されており、様々な組織における発生過程に重要な役割を担っていることが知られている^{6,7)}。

2. RhoG の特徴

Rho ファミリーの一員である RhoG は、もともと繊維芽細胞において成長因子の刺激依存的に誘導される遺伝子産物として同定された分子である⁸⁾(そのため RhoG の“G”は“growth related”に由来する)。RhoG は Rac と最も高い相同性を示し (図 1A), その当時の培養細胞を用いた過剰発現系の実験から、RhoG が Rac1 と同じ機能を有するといった報告もなされていたことから、しばしば Rac サ

京都大学大学院生命科学研究所 (〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町 京都大学医学・生命科学総合研究棟 1F)

The RhoG signaling pathway

Hironori Katoh (Laboratory of Molecular Neurobiology, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Yoshidakonoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan)

本総説は 2011 年度奨励賞を受賞した。

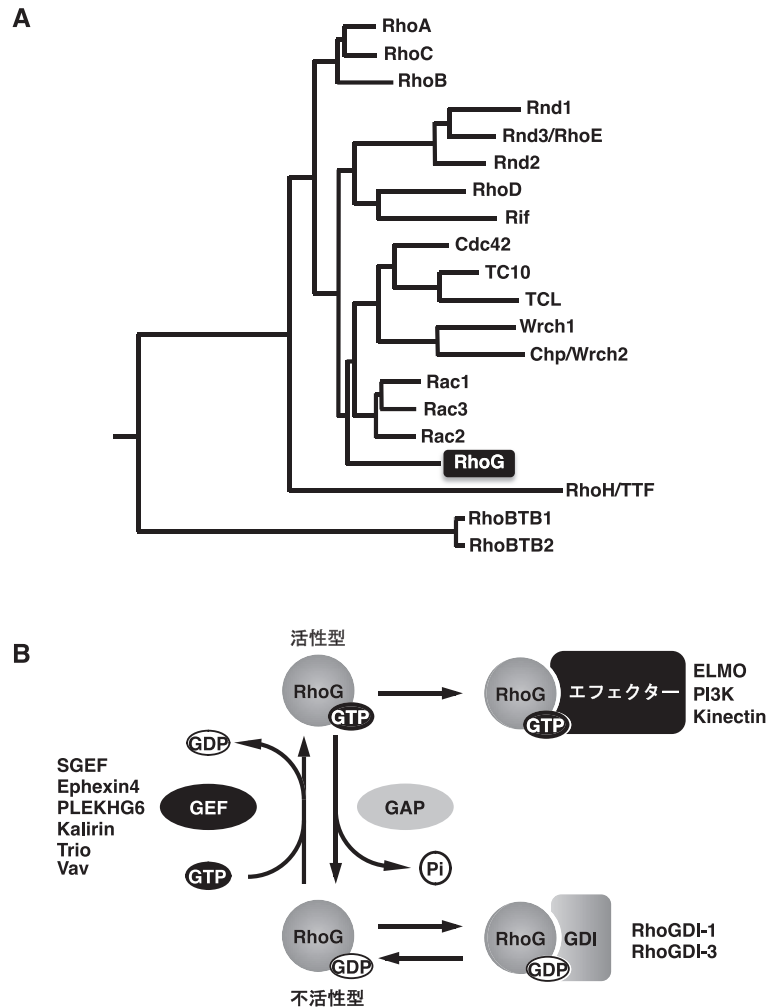


図1 Rhoファミリー G タンパク質 RhoG とその活性制御

(A) Rho ファミリー G タンパク質は哺乳動物で 20 種類報告されている。
 (B) RhoG は他の Rho ファミリー G タンパク質と同様、GEF (guanine nucleotide exchange factor) によって活性化され、GAP (GTPase activating protein) によって不活性化される。活性化された RhoG は特異的エフェクター分子と結合することで下流へとシグナルを伝達し、そのシグナル特異的な機能発現が引き起こされる。一方、不活性化された RhoG は GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor) と結合する。

ブファミリーに分類されることがある。ところが、RhoG には Rac とは異なる働きが存在することを示す証拠が幾つか見つかった。現在までに Kalirin⁹⁾、Trio^{10,11)}、及び Vav^{12,13)} が Rac と共通の GEF として報告されているが、SGEF^{14,15)}、Ephexin4^{16,17)}、PLEKHG6^{13,18)} などには RhoG を特異的に活性化する GEF として働くことが明らかにされていて、RhoG 特異的なシグナル伝達が存在すると考えられる (図 1B)。GAP については、現在までに RhoG 特異的に働く GAP が存在するとの報告はないが、細菌の感染時に働くエンテロコリチカ菌 (*Yersinia enterocolitica*) 由来のタンパク質が、RhoG に対する GAP 活性を有するとの報告がある¹⁹⁾。GDP 結合型 G タンパク質に結合するグアニンヌクレオチド解離阻害因子 (GDI) には、GDP の解離

を阻害することにより、低分子量 G タンパク質の不活性化状態を維持する機能があり、RhoGDI-1 と RhoGDI-3 が RhoG と結合することが知られている^{20,21)}。RhoGDI-3 については、RhoG の細胞内の局在をも制御しているとの報告がなされている²²⁾。一方、現在までに RhoG 特異的エフェクター分子として、ELMO と Kinectin が同定されている^{23,24)} (図 1B)。また、Rac や Cdc42 と同様に RhoG がホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) を活性化することも明らかにされている^{25,26)}。RhoG による ELMO と PI3K を介したシグナル伝達とその機能については後で詳しく述べる。

3. RhoG による Rac 活性制御

RhoG は, Rac1 と 72%, そして Cdc42 とは 62% といった高いアミノ酸配列の相同性を示す. ところが RhoG が見つかって以降, Rac1 や Cdc42 のエフェクターとして知られている Pak や WASP, IRSp53 などには RhoG が結合しないことが明らかになり, Rac や Cdc42 とは異なる機能を有している可能性が考えられた^{27, 28)}. 筆者らは, 神経細胞

のモデルとして当時よく用いられていた PC12 細胞に様々な Rho ファミリー G タンパク質を過剰発現させ, その後の形態変化を G タンパク質ごとに調べたところ, RhoG を発現させた場合でのみ非常に長い神経突起が形成されることを見いだした²⁹⁾ (図 2A). この RhoG による神経突起の形成には Rac1 の活性化が必要であり, 実際に RhoG の常時活性化型変異体を PC12 細胞内に過剰発現させると細胞内の Rac1 の活性が上昇することが確認された. このことか

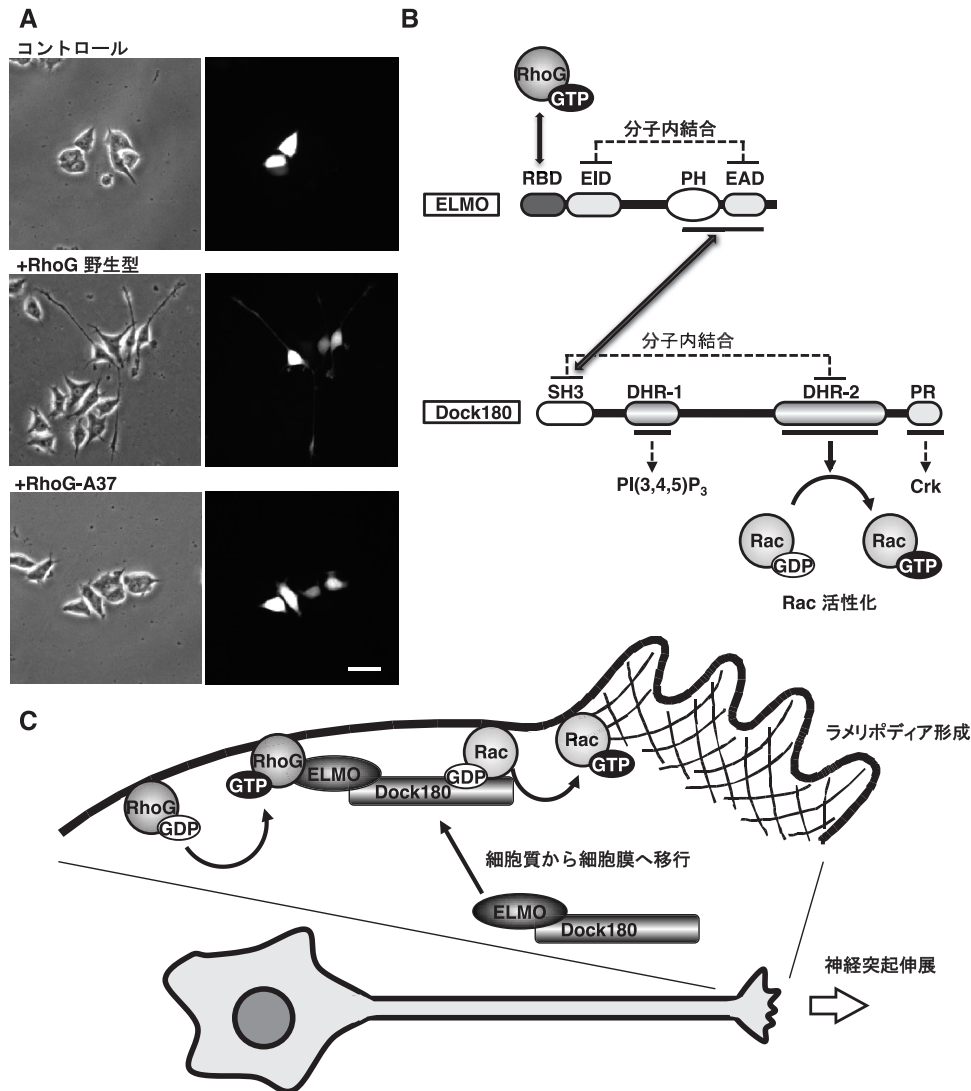


図 2 RhoG による ELMO-Dock180 を介した Rac の活性化と PC12 細胞における神経突起形成 (A) 血清存在下で増殖中の PC12 細胞に, green fluorescent protein (GFP) とともに野生型 RhoG, あるいは ELMO と結合できない変異体, RhoG-A37 をそれぞれ発現するベクターを導入した. 48 時間後, 細胞を固定したのち GFP の蛍光 (写真右側パネル) が検出される細胞の形態変化を観察した. GFP のみを発現させたコントロール細胞と RhoG-A37 発現細胞では PC12 細胞に大きな形態変化が見られなかったが, 野生型 RhoG を発現させた細胞では非常に長い神経突起の形成が見られた. Bar: 25 μ m. (B) ELMO と Dock180 の構造. RBD: RhoG-binding domain, EID: ELMO inhibitory domain, EAD: ELMO autoregulatory domain, SH3: Src homology 3 domain, DHR: Dock homology region, PR: proline-rich region, PH: pleckstrin homology domain. (C) 活性化された RhoG は ELMO と結合し, 細胞質に存在する ELMO と Dock180 の複合体を細胞膜へと移行させ, そこで局所的に Rac の活性化を引き起こす.

ら、RhoGには同じRhoファミリーに属する別のGタンパク質の活性を調節するというユニークな機能が存在することが明らかとなった。

筆者らの報告以外でも、RhoGがRacと一部同じようなシグナル経路を活性化すると報告が幾つかなされていた^{10,11,27,30}。ところが、RhoGがどのようにしてRacの活性化を引き起こしているのかについては全くわかっていなかった。特に前述したとおり、RhoGはこれまで報告のある他のRhoファミリーGタンパク質のエフェクターとはどれとも強い親和性を示さず、RhoG特異的なエフェクターの存在が強く示唆されていた。そこで筆者らは、酵母のtwo-hybrid法を用いてRhoGの活性型と結合するタンパク質の探索を行い、ELMOをRacの活性を制御するRhoGのエフェクターとして同定した²⁴。

ELMOはもともと、RacのGEFとして働くDock180の結合タンパク質として見つかったもので、哺乳動物においてはELMO1、ELMO2、ELMO3と3種類のサブタイプが存在するが、機能的な違いは今のところ確認されていない³¹。ELMOのN末端側にRhoGとの結合領域が存在し、この領域と他のRhoファミリーGタンパク質との結合は今のところ確認されていない(図2B)。このことからELMOがRhoGの特異的なエフェクターとして働いていることが考えられるが、最近になってARFファミリーに属する低分子量Gタンパク質Arl4Aが、ELMOのRhoG結合ドメインに結合しRacの活性化さらには細胞骨格の制御を引き起こすとの報告もなされている³²。ELMOには、RhoGとの結合領域以外にC末端側にDock180との結合領域が存在するが、このDock180との結合領域にはEAD(ELMO autoregulatory domain)と呼ばれる領域が存在し、この領域がRhoG結合領域のすぐ近くに存在するEID(ELMO inhibitory domain)と呼ばれる領域と分子内で結合している。ELMOはこの分子内結合によって自己抑制されていることが報告されており、活性型のRhoGが結合することによってこの自己抑制が解除される仕組みになっている³³。一方Dock180は、Dockファミリー共通に存在するDHR-1ドメインとDHR-2ドメインを持ち、DHR-2ドメインを介して直接Racを活性化する^{34,35}。DHR-1ドメインは、ホスファチジルイノシトール3-リン酸(PIP3)との結合能を有し、Dock180の細胞膜への局在に重要であるとの報告がなされている³⁶。ELMOと結合するDock180のSH3ドメインはDHR-2ドメインと分子内結合することが示されており、ELMOと同様この分子内結合によってRac活性化能が抑制されていることが示されている³⁷。したがって、Dock180とELMOが結合することによってこの自己抑制が解除される仕組みになっている。さらには、ELMOがDock180に結合することによって、Dock180がユビキチン化され分解されるのを抑制する働きもあるとさ

れている³⁸。ELMO-Dock180の複合体は、通常何も刺激のない状態では細胞質に局在している。そこへ何らかの刺激によってRhoGが活性化されると、活性化されたRhoGはELMOのN末端側に結合し、ELMO-Dock180の複合体を細胞質から細胞膜へと移行させる²⁴。細胞膜へ移行したELMO-Dock180複合体は、細胞膜上に存在するRacを活性化し、その結果、ラメリボディアの形成などアクチン細胞骨格の再構成が引き起こされる。このような分子メカニズムによってRhoGはRacの活性化を引き起こし、細胞の形態を制御していると考えられる(図2C)。

筆者らは実際に、RhoGによる神経突起伸展作用にELMOやDock180が関与しているかどうか検討を行った。ELMOあるいはDock180のドミナントネガティブ変異体を発現させることによりRhoGによる神経突起伸展作用は強く抑制された。さらにELMOと結合できないRhoG変異体、RhoG-A37では神経突起の伸展作用が見られなかった(図1A)。また、神経成長因子(NGF)による神経突起伸展も、RhoG、ELMO、あるいはDock180のドミナントネガティブ変異体により抑制されることが示された。したがってRhoG-ELMO-Dock180-Rac1の経路が、PC12細胞の神経突起形成に関与していることが示唆された。PC12細胞の神経突起形成においては、NGF存在下でRhoGがTrioによって活性化されることも報告されている¹¹。また上頸神経節(SCG)の交感神経ニューロンではKalirinがRhoGを活性化し、軸索形成を行っているとの報告もなされている⁹。

4. RhoGによる大脳皮質神経前駆細胞の増殖制御

我々の脳は、無数の神経細胞がシナプスを介して複雑な神経回路を形成することによりその機能を発揮している。その中でも大脳皮質は、哺乳動物において特に発達しており、記憶や学習、運動などの高次機能を担う重要な部位となっている。興奮性の神経細胞は、大脳皮質の発達初期において脳室に沿った脳室帯(ventricular zone)及びそのすぐ外側の脳室下帯(subventricular zone)と呼ばれる部位で誕生する(図3A)。脳室帯には皮質に対して垂直に伸びる長い突起を持った放射状グリア細胞と呼ばれる神経前駆細胞が豊富に存在し、これらの細胞が様々な細胞外因子や転写因子などの制御を受けることで自己増殖するとともに、一部多極性を持った神経前駆細胞を生み出し、脳室下帯においてさらに増殖する^{39,40}。これらの神経前駆細胞からその後非対称分裂によって誕生した神経細胞は、中間帯(intermediate zone)を通して脳表面側へ放射状グリア細胞に沿って移動し、6層構造を持つ皮質板(cortical plate)を形成する⁴¹。その後、個々の神経細胞が神経突起を成長させそれぞれの投射先においてシナプスを形成し、複雑な神経回路ネットワークが完成される。神経前駆細胞は、一度神

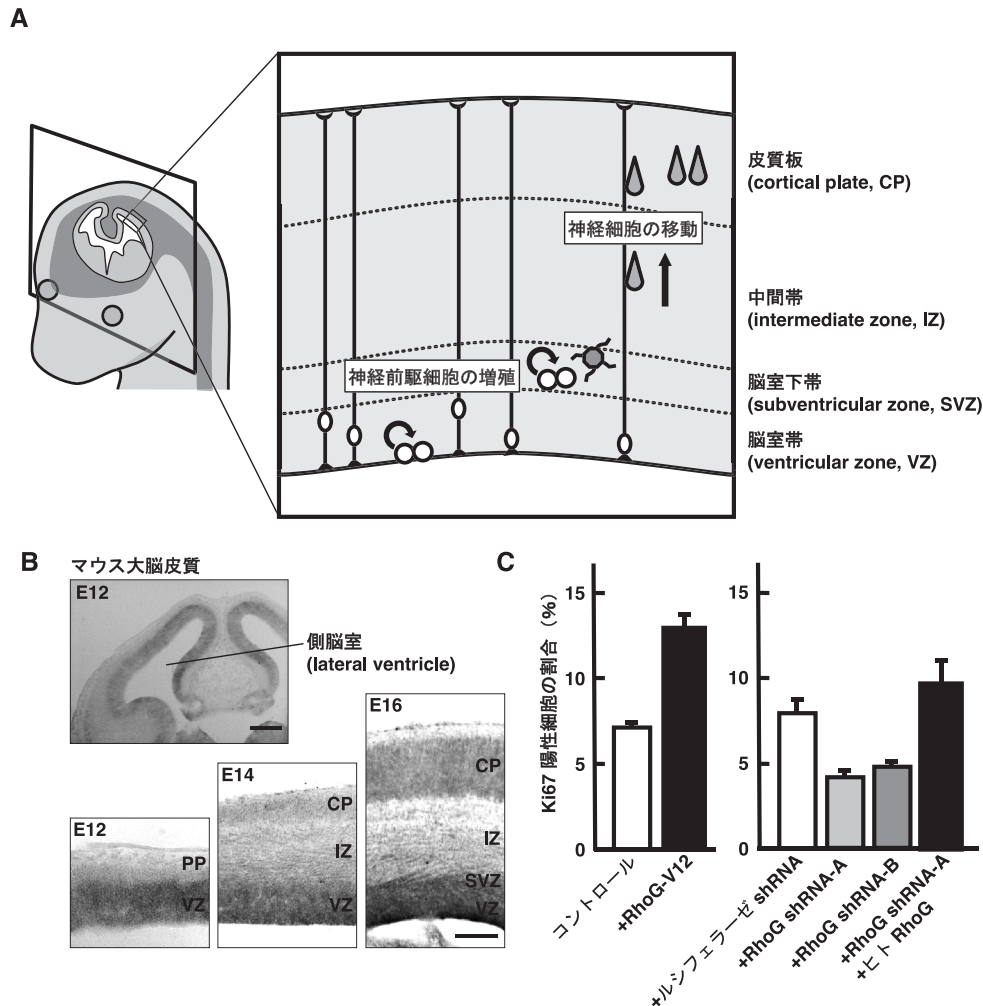


図 3 マウス胎仔期の脳皮質における RhoG の発現分布と神経前駆細胞の増殖制御への関与 (A) マウス大脳皮質における神経前駆細胞の増殖とその後分化した神経細胞の移動. (B) (上段) 胎生期 12 日齢 (E12) マウス脳の冠状切片における RhoG mRNA の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて観察した. (下段) 胎生期 12 日齢 (E12), 14 日齢 (E14), 16 日齢 (E16) の大脳皮質における RhoG mRNA の発現を拡大した画像. PP: preplate. Bar: 200 μ m (上段), 100 μ m (下段). (C) (左側) コントロールあるいは常時活性型 RhoG (RhoG-V12) を発現させるプラスミドを胎生期 14 日齢のマウス大脳皮質の神経前駆細胞に子宮内エレクトロポレーション法を用いて導入した. 胎生期 16 日齢に脳を取り出して固定後, 細胞増殖のマーカーである Ki67 に対する抗体で染色を行い, 遺伝子導入された細胞に対する Ki67 陽性細胞の割合を計数した. (右側) コントロール (ルシフェラーゼ) shRNA, RhoG に対する shRNA (A, B の 2 種類), 及びマウスの RhoG shRNA によって発現抑制を受けないヒトの野生型 RhoG を一緒に導入した神経前駆細胞において, 同様に Ki67 陽性細胞の割合を計数した.

神経細胞へと分化するとそれ以上増殖することができないため, 神経前駆細胞の増殖を制御することは, 大脳皮質の神経細胞の総数を決定し機能的な大脳皮質を形成する過程において非常に重要な要素となっている.

筆者らは, 胎仔期の脳における RhoG の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて調べ, 胎生期 12 日齢から 16 日齢のマウス大脳皮質の脳室帯及び脳室下帯にその発現が強く見られることを見いだした⁴²⁾ (図 3B). 脳室帯や脳室下帯で RhoG の発現が見られた時期は, 神経前駆細胞が豊富に存在し, 増殖が起こりつつ神経細胞へと分化す

る時期であったことから, RhoG が神経前駆細胞の増殖や分化に何らかの機能を担っている可能性が考えられた. そこで筆者らは, 大脳皮質の発生に関わる制御因子の解析において確立されている子宮内エレクトロポレーション法を用いることで, RhoG の神経前駆細胞における役割をマウスの生体内で調べることを試みた. 子宮内エレクトロポレーション法は, 生きたままのマウスの子宮内にいる胎仔の脳室に遺伝子を注入し, 電気パルスを与えることで脳室帯に存在する神経前駆細胞に遺伝子導入する手法である^{43,44)}. 胎生期 14 日齢の胎仔に遺伝子を導入し, その 2 日

後に脳を摘出して組織切片を作製したのち、細胞増殖マーカーである Ki67 に対する抗体を用いて染色を行った。その結果、活性型 RhoG を導入した細胞においてはコントロール細胞に比べて有意に Ki67 陽性細胞の割合が増加していた (図 3C)⁴²⁾。一方、マウスの RhoG に対する発現抑制効果を持つショートヘアピン RNA (shRNA) を導入した場合には、Ki67 陽性細胞の割合が有意に減少していた。このときマウスの RhoG に対する shRNA に影響を受けないヒトの野生型 RhoG を同時に導入した場合には、RhoG shRNA による Ki67 陽性細胞の減少がコントロールレベルにまで回復していた。このことから、内在性の RhoG が確かに神経前駆細胞の増殖に関与していることが確認された。このような RhoG による神経前駆細胞の増殖促進作用は、細胞周期の S 期にのみ取り込まれるプロモデオキシウリジン (BrdU) の取り込みを観察することによっても示された。また、分散培養した神経前駆細胞を用いた *in vitro* の実験系においても、RhoG による神経前駆細胞の増殖促進作用が確認された。筆者らは RhoG が神経前駆細胞から神経細胞への分化過程にも関わっている可能性について検討を行ったが、RhoG shRNA を導入したことによる神経前駆細胞、あるいは神経細胞の割合についてはコントロールと有意な差が見られなかった。このことから、RhoG は神経前駆細胞の分化過程には関与していないことが示唆された。

筆者らは次に、RhoG による神経前駆細胞の増殖促進作用に関わる下流のシグナル伝達経路について検討を行った。はじめに ELMO と結合できない変異体を用いて神経前駆細胞の増殖作用を検討したが、ELMO と結合できない活性型変異体 RhoG-V12A37 は RhoG-V12 とほぼ同程度の増殖促進作用を示した。したがって、RhoG による神経前駆細胞の増殖制御は、ELMO を介さない経路によって引き起こされていることが示唆された。筆者らは以前に、RhoG が PI3K の p85 regulatory subunit に存在する BH 領域に結合し、PI3K を活性化することを見いだしていた²⁶⁾。そこで RhoG による神経前駆細胞の増殖制御における PI3K の関与を調べたところ、常時活性型 RhoG による神経前駆細胞の増殖促進作用が、PI3K 阻害剤の処理によって抑制された。実際に PI3K の下流で働く Akt のリン酸化レベルが常時活性型 RhoG を導入した神経前駆細胞では有意に上昇していた。以上の結果から、RhoG は胎仔期の脳皮質神経前駆細胞に発現しており、その増殖を正に制御していること、また RhoG による神経前駆細胞の増殖制御には、PI3K の活性が必要であることが示された (図 4)。PI3K は、発生過程における細胞増殖を制御する主要な因子の一つであり、神経前駆細胞においても細胞周期に関連する遺伝子の発現を調節することで細胞増殖を促進していることが報告されている⁴⁵⁾。したがって RhoG が、脳皮質神経前駆

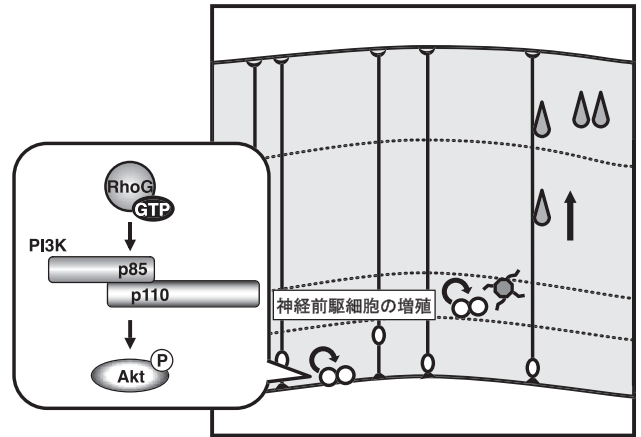


図 4 RhoG による脳皮質神経前駆細胞の増殖制御

細胞において PI3K の活性を制御する重要な因子の一つとして働いている可能性が考えられる。

5. がん細胞における RhoG

(1) RhoG によるがん細胞の運動性の制御

近年、主に神経軸索や血管の誘導因子として研究が進められてきたエフリンは、ノックアウトマウスなどを用いたこれまでの研究から、個体の発生や生理機能において非常に多くの役割を担っていることが明らかとなっている。その受容体である Eph ファミリーは、チロシンキナーゼ型膜貫通受容体としては最も大きなファミリーを構成しており、これら多くの受容体の存在がエフリンの多様な機能につながっていることが知られている。最近になって、エフリン及び Eph 受容体が、がんの進行や悪性化に関わりを持つことを示す論文が多数報告されるようになってきている。このうち EphA2 受容体は、乳がんをはじめ様々な上皮組織由来のがんで、特に悪性度の高いがん細胞に高発現している。その上、EphA2 受容体の発現量とがんの進行、悪性化との間には相関関係が存在するとの報告もなされている^{46~48)}。これらのことから、EphA2 はがん治療におけるターゲットの一つとして最近注目されてきている。悪性度の高いがん細胞における EphA2 の発現量の上昇は、がん遺伝子として知られている Ras による Raf-MAP キナーゼを介したシグナル経路によって引き起こされていることが報告されている⁴⁹⁾。しかしながら、過剰に発現した EphA2 受容体が、どのような分子メカニズムによってがん細胞の運動性や浸潤性を増大し、がんの悪性化を引き起こしているかに関しては、まだまだ不明な点が多く残されている。

EphA2 は他の Eph 受容体ファミリーと同様、細胞内の部分にチロシンキナーゼ活性を持つ領域とステライル α モチーフ (sterile α motif, SAM) 領域を持つ。リガンドであるエフリン A1 によって刺激を受けると、細胞内領域の

自己リン酸化を引き起こし下流へとシグナルが伝達され、細胞-細胞間の反発作用や増殖の制御など、様々な細胞機能を引き起こす。一方、がん細胞において過剰に発現している EphA2 は、上皮増殖因子 (EGF) などの成長因子の受容体からのシグナルを受け、リガンドであるエフリン非依存的にがん細胞の運動性や浸潤性を促進している機能が存在することが知られている⁵⁰⁻⁵²⁾ (図 5A)。逆に、がん細胞上に過剰に発現している EphA2 をエフリン A1 で刺激すると、EphA2 によるがん細胞の運動性の促進作用は抑制され、さらには EphA2 が細胞内へとエンドサイトーシスによって取り込まれたのち、分解されることも報告されている^{49, 52, 53)}。

筆者らは最近、Rho ファミリー G タンパク質の GEF の

一つ Ephexin4 が、RhoG の特異的 GEF であることを同定するとともに、EphA2 受容体と結合してそのシグナルを媒介していることを明らかにした¹⁶⁾。Ephexin4 は系統学的に近い他の五つの GEF とともに Ephexin サブファミリーを構成している。Ephexin サブファミリーは、すべての分子において Rho ファミリーの GEF としての活性を持つ DH 領域と pleckstrin ホモロジー (PH) 領域、さらに C 末側に Src ホモロジー 3 (SH3) 領域を共通に持ち、RhoA を活性化するグループである Ephexin1, Vsm-RhoGEF (Ephexin5), WGEF (Ephexin2), TIM (Ephexin3) と、RhoG を活性化するグループである Ephexin4, SGEF との二つに大きく分けられる (図 5B)。このサブファミリーのメンバーの中では Ephexin1 が最も研究が進んでいる。Ephexin1

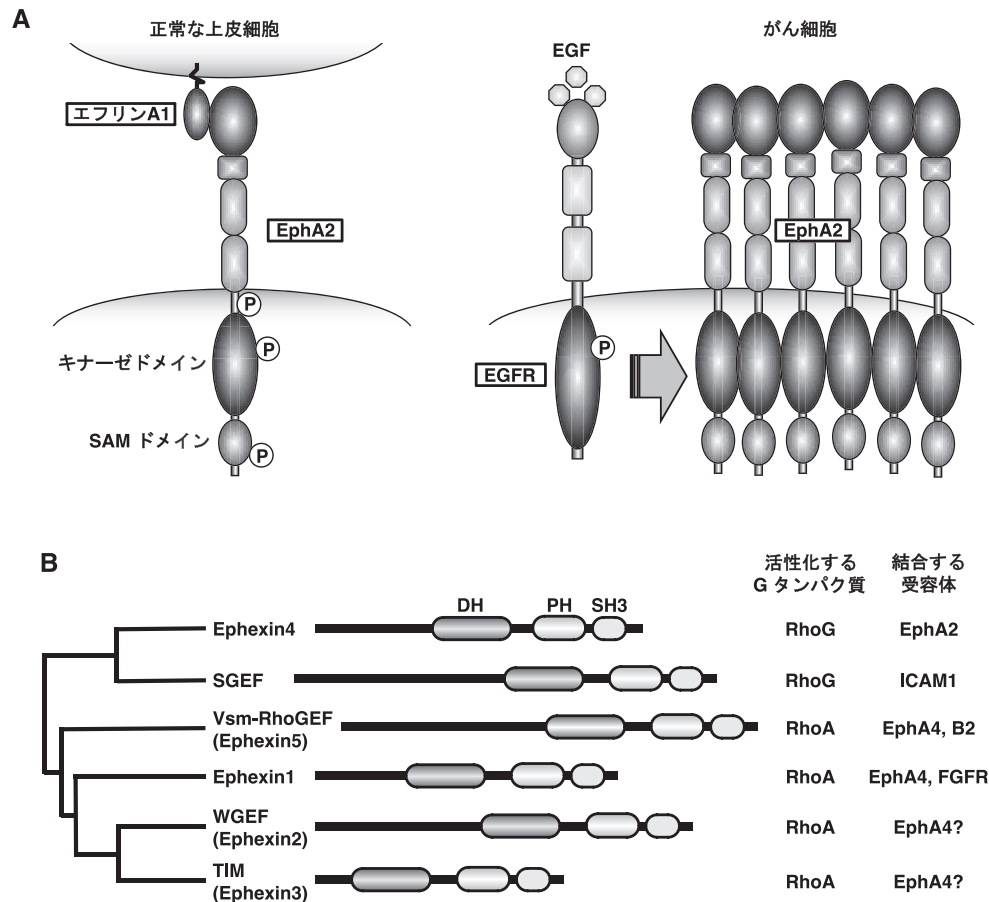


図 5 EphA2 受容体と Ephexin サブファミリー

(A) EphA2 受容体は、細胞内にチロシンキナーゼ領域と SAM (sterile α motif) 領域を有する。正常な上皮細胞では、リガンドであるエフリン A1 の刺激を受け、自身のチロシンキナーゼ活性により自己リン酸化を受けるとともに、下流へとシグナルが伝えられる。一方、一部の上皮組織由来のがん細胞では EphA2 が過剰に発現しており、EGF 受容体などの下流でエフリンリガンド非依存的に機能していることが報告されている。(B) Ephexin サブファミリーとその構造。Ephexin サブファミリーは、Dbl ホモロジー領域 (DH) と Pleckstrin ホモロジー領域 (PH) を持つ Rho ファミリー G タンパク質の GEF のサブファミリーの一つで、C 末端側に SH3 領域を共通に持つ。このうち、RhoG を活性化する Ephexin4, SGEF と、RhoA を活性化する Ephexin1, Vsm-RhoGEF, WGEF, TIM とに大きく分かれ、それぞれ様々な受容体に結合することでその機能を発揮していることが報告されている。

は神経系に多く発現が見られ, EphA4 受容体に直接結合し, エフリン刺激依存的に RhoA を活性化することで, 運動系神経回路形成における神経軸索ガイダンスや興奮性神経細胞の樹状突起スパインの形成制御に関わっていることが知られている⁵⁴⁻⁵⁶⁾. また Ephexin1 欠損マウスでは, 神経筋接合部の構造と神経伝達に異常が見られることが報告されている⁵⁷⁾. EphA4 以外に, Ephexin1 は FGF 受容体 (FGFR) とも結合することが示されている⁵⁸⁾. Vsm-RhoGEF (Ephexin5) は, 血管平滑筋細胞においては Ephexin1 と同様 EphA4 と結合し, エフリン刺激依存的に RhoA を活性化することが知られているが⁵⁹⁾, 海馬神経細胞においては EphB2 と結合し, 樹状突起におけるシナプス形成を制御しているとの報告が最近なされている⁶⁰⁾. WGEF (Ephexin2) と TIM (Ephexin3) はどちらも RhoA を活性化するが, *in vitro* において EphA4 によりチロシンリン酸化を受けるとの報告があるのみで, 実際に EphA4 の下流で機能しているかについてはいまだ明らかになっていない^{61, 62)}. 一方, RhoG を活性化する SGEF は, 血管内皮細胞において細胞接着分子 ICAM1 と結合し, リンパ球の遊走に関わっていることが報告されているものの¹⁵⁾, Eph 受容体との関係については不明である.

筆者らはこれまで何も報告がなかった Ephexin4 が, RhoG を特異的に活性化することを明らかにした上で, Ephexin4 を特異的に認識する抗体を作製し, どのような細胞で発現が見られるかについて調べた. その結果, EphA2 の発現量が強く強い浸潤能を有するヒト乳がん由来の MDA-MB-231 細胞を含め, 上皮組織由来のがん細胞に広くその発現が認められ, EphA2 と Ephexin4 が内在的

に MDA-MB-231 細胞内で結合していることを確認した¹⁶⁾. そこで筆者らは, EphA2 による乳がん細胞の運動性の増大が Ephexin4 や RhoG を介しているのではないかと考え, ヒト Ephexin4, RhoG, そして EphA2 を標的とした shRNA を作製し, これらを導入した細胞を用いてトランスウェル細胞運動アッセイを行い, 各 shRNA による MDA-MB-231 細胞の運動性への影響を評価した. その結果, いずれの shRNA 導入細胞においても, EGF 刺激に対する MDA-MB-231 細胞の運動性は有意に抑制された. さらに, shRNA に影響を受けない変異体を用いた様々なレスキュー実験を組み合わせることで, MDA-MB-231 細胞における運動能の促進に EphA2-Ephexin4-RhoG の経路が大きく関与していることを示した. 実際に EGF 刺激による RhoG の活性化が, EphA2 あるいは Ephexin4 のノックダウンにより抑制されることも明らかになっている. 一方, EphA2-Ephexin4 を介して活性化された RhoG は, その下流のエフェクター分子である ELMO2 と, Dock180 と構造がよく似た Rac GEF, Dock4 の複合体を細胞質から細胞膜へと移行させ, EphA2-Ephexin4 と ELMO2-Dock4 を含めたシグナル分子の複合体が形成される. その結果, EphA2 が存在するところで局所的に Dock4 による Rac1 の活性化, さらにはアクチン細胞骨格の再構成が引き起こされて, EphA2 が過剰に発現している MDA-MB-231 細胞の運動性が増大していることが考えられた (図 6). そこで筆者らは, 実際にトランスウェル膜細孔内を移動している MDA-MB-231 細胞における EphA2, Dock4, 及び RhoG の細胞内局在を免疫染色法により調べた. 移動または浸潤しているがん細胞では, アクチンが豊富に存在する突起が形

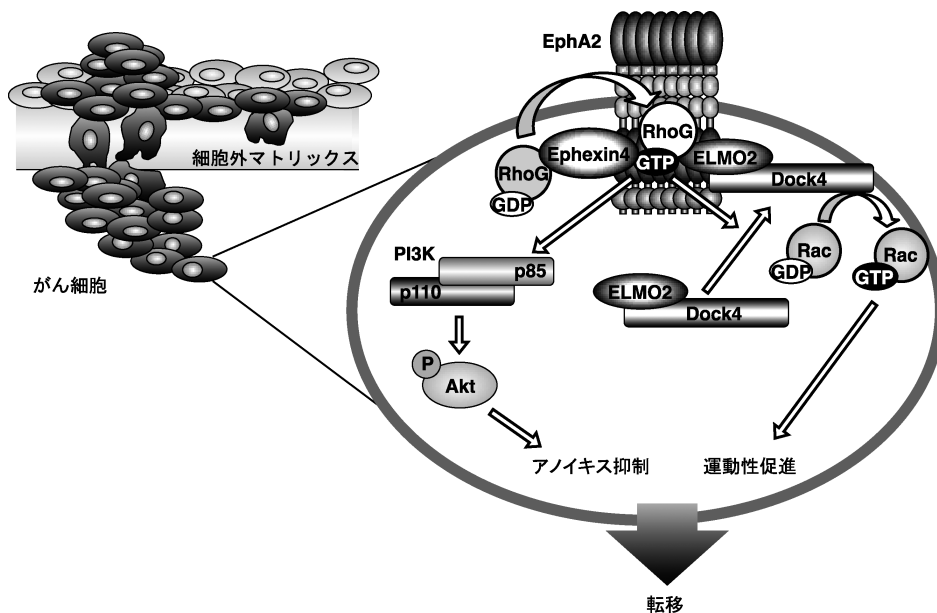


図 6 EphA2 受容体によるリガンド非依存的ながん細胞の運動性促進とアノキス抑制の分子メカニズム

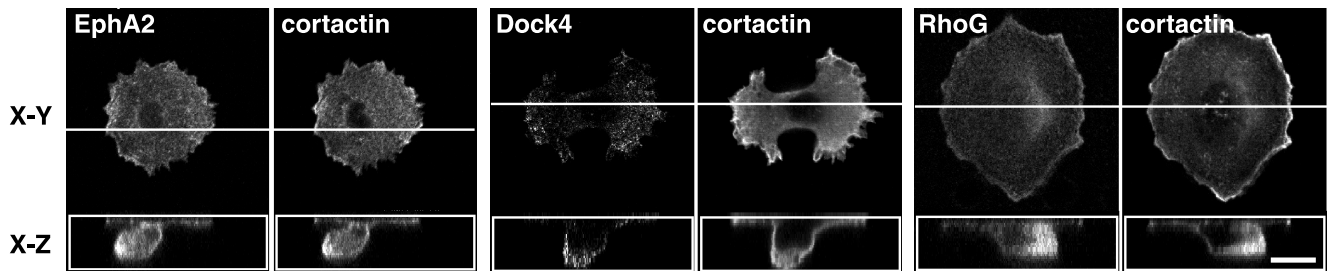


図7 トランスウェルを移動中のMDA-MB-231細胞におけるEphA2, Dock4, RhoGの局在

下層に10 ng/ml EGFを加えたトランスウェル上にMDA-MB-231細胞をまいて2時間後、細胞を固定し各抗体で細胞染色を行った。各画像の下側の像は、X-Y面における白線の部分のX-Z面の画像である。EphA2, RhoG, Dock4は、それぞれ移動中の細胞の突起先端部分でcortactinと共局在している。Bar: 10 μ m.

成され、そこにアクチン結合タンパク質であるcortactinが集積することから、cortactinはこの突起のマーカータンパク質となっている。cortactinは、この突起の構成タンパク質であると同時に、細胞運動や浸潤に重要な役割を持っていることが知られている^{63,64}。免疫染色の結果から、トランスウェルの細孔内を移動中のMDA-MB-231細胞において、EphA2, RhoG, Dock4がそれぞれ細胞の突起先端部分でcortactinと共局在していることが明らかとなった(図7)。これまでの報告から、Racの活性化は浸潤しているがん細胞の運動能や突起形成に必要不可欠であり、cortactinの細胞内局在についても活性化されたRac1によって制御されているとも報告されている⁶⁵。したがって、EphA2を中心として形成されたシグナル分子の複合体は、そこで局所的にRacを活性化し、その結果cortactinが豊富に存在する細胞突起が形成され、細胞極性や運動の促進が誘導されると考えられる。さらにこれまでの筆者らの結果から、がん細胞ではエフリン非依存的に働くEphA2が、EGFからのシグナル伝達の足場として機能していることを示している。

(2) がん細胞のアノイキス耐性におけるRhoGの関与

上皮細胞が細胞外マトリックス(ECM)に接着することは、細胞の増殖、生存、及び細胞死の制御に重要な役割を果たしている。細胞がECMと結合する際、マトリックス受容体であるインテグリンは、細胞をECMに接着させるだけでなく、細胞外増殖因子に応答した成長や増殖を促進する。正常な上皮細胞は、ECMとの接着を喪失するとアノイキスと呼ばれるプログラム細胞死におちいることが知られており、アノイキスは組織の恒常性や発達の制御に重要であると考えられている^{66,67}(図8)。一方、上皮組織由来のがん細胞ではアノイキスに対する耐性が獲得されており、この耐性はがん細胞が原発巣から他の組織へと転移していく過程で必要不可欠であると考えられている^{68,69}。これまでの研究から、がん細胞特異的に引き起こされるアノイキス耐性の獲得に関わるシグナル伝達経路として、

PI3Kとその下流の標的分子であるAktを介したシグナル経路が重要であることが明らかになっている。

筆者らは、RhoGがPI3Kを介してAktを活性化する作用を有することから^{25,26,42}、EphA2によるEphexin4を介したRhoG活性化のシグナル伝達が、がん細胞のアノイキス耐性の獲得にも関与している可能性を検討した。そこでアノイキス耐性能を持つHeLa細胞を用いて細胞を浮遊条件下で培養し、アノイキスを引き起こした細胞の割合を指標として、アノイキス耐性作用を評価した。shRNAによって内在性Ephexin4をノックダウンしたHeLa細胞を浮遊状態で培養すると、アポトーシスを起こした細胞の割合が増加し、アノイキス耐性能の抑制が確認された¹⁷。またEphexin4をノックダウンした細胞では、活性型RhoG及びリン酸化Aktの割合が減少していることが示された。また同様の手法を用いてEphA2に対するshRNAの影響を調べたところ、浮遊条件下の培養によってHeLa細胞のアノイキス耐性能の抑制が見られた。一方、それぞれのshRNAに影響を受けない野生型のEphA2あるいはEphexin4を用いてレスキュー実験を行うとアノイキス耐性能の回復が見られたが、PI3KあるいはAktの阻害剤を同時に処理しておくとその回復が見られなかった。以上の結果から、EphA2はEphexin4を介してRhoGを活性化し、下流にあるPI3K/Aktシグナル経路を介してがん細胞においてアノイキスの抑制を引き起こしていることが示された(図6)。Aktは、プロアポトーシスBcl-2ファミリータンパク質のリン酸化を制御することで、細胞の生存制御において重要な役割を果たしていることが報告されている^{67,70,71}。このBcl-2ファミリータンパク質は、Aktの活性依存的にリン酸化を受けることでカスパーゼ-3の活性化を抑制し、アポトーシスを抑制していることが知られている^{66,69}。

以上、がん細胞において過剰に発現しているEphA2受容体によるがん悪性化に関して、EphA2はRhoGのGEFであるEphexin4と結合していることで、リガンドであるエフリン非依存的にRhoGを活性化し、ELMO2-Dock4を介してRacを活性化することで細胞の運動性や浸潤性を

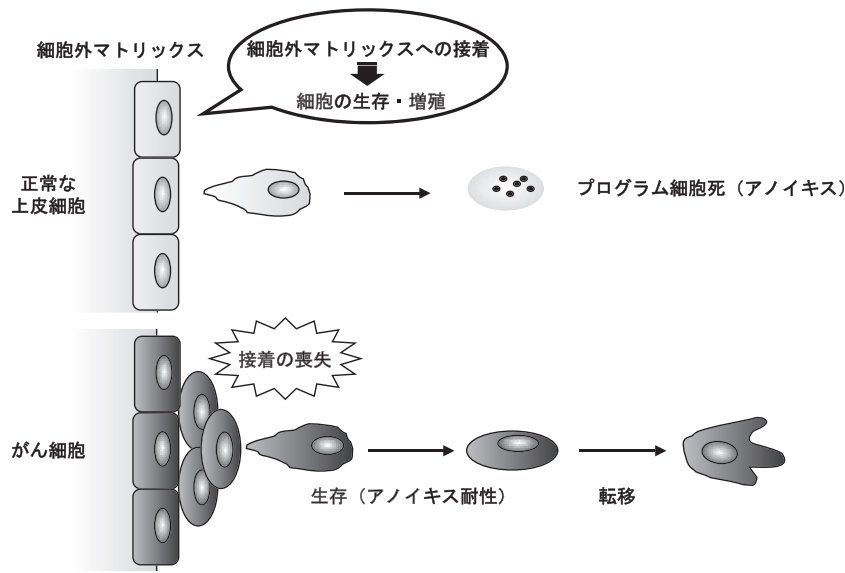


図8 がん細胞のアノイキス耐性

正常な上皮細胞では、細胞-細胞外マトリックス間の接着が喪失するとアノイキスと呼ばれるプログラム細胞死を引き起こすことが知られており、組織の恒常性や発生過程において重要な役割を担っていることが明らかになっている。一方、がん細胞はアノイキス耐性能を獲得しているため、細胞外マトリックスとの接着非依存的に生存・増殖することが可能となっており、このことががんの転移に関わっていることが示唆されている。

促進する一方で、この経路とは別にPI3Kを介してAktの活性化を引き起こし、アノイキスを抑制していることが明らかとなった。これらのシグナル経路がEphA2によるがんの悪性化の一端を担っている可能性が考えられる。

6. RhoGと細菌感染

RhoGを介したシグナル伝達が、しばしば病原性を持った細菌の感染に利用されていることが明らかになってきている。非常に病原性の高い赤痢菌(*Shigella*)は、水や食料などから経口的に感染し、大腸に到達すると菌は上皮細胞内に侵入し、その結果粘血性の激しい下痢を引き起こすことが知られている。赤痢菌は上皮細胞内に分泌装置を使ってエフェクターと呼ばれる菌由来の様々なタンパク質を分泌し、上皮細胞による菌の取り込みを誘導している。このエフェクタータンパク質の一つ、IpgB1が上皮細胞内に分泌されると、活性化されたRhoGの機能を模倣して上皮細胞内のELMOと結合し、ELMO-Dock180複合体を介してRacの活性化を引き起こす。その結果、活性化されたRacにより細胞膜のラフリングが形成され、上皮細胞による菌の取り込みを促進するシステムが働くことが報告されている⁷²⁾。また、食中毒を引き起こすサルモネラ菌(*Salmonella enterica*)も、同じように腸管の上皮細胞に積極的に侵入することで感染することが知られている。サルモネラ菌の場合は、SopBと呼ばれる別のエフェクタータンパク質を上皮細胞内に分泌し、このSopBが上皮細胞内

に存在するSGEFを介してRhoGを活性化することで、菌の取り込みを行っているとの報告もある⁷³⁾。一方、赤痢菌やサルモネラ菌と同じ通性嫌気性グラム陰性桿菌の腸内細菌科に属するエンテロコリチカ菌(*Yersinia enterocolitica*)及び仮性結核菌(*Yersinia pseudotuberculosis*、感染すると結核様の症状を引き起こす)は、自然界に広く分布する菌で、ヒトに感染すると腸間膜リンパ節炎や敗血症などを引き起こす。特にエンテロコリチカ菌は腸炎エルシニア菌とも呼ばれ、食中毒の原因にもなっている。これらの菌が感染する際、宿主細胞の細胞膜に存在するインテグリンと結合し、その結果宿主細胞内でRhoGの活性化が引き起こされることが明らかとなっている^{19,74)}。またこれらの菌はRhoGに対してGAP活性を持つタンパク質を宿主細胞へと分泌することもわかっている。このように、様々な病原性を持つ細菌が宿主細胞へと侵入する際、RhoGを介したシグナル伝達経路を利用していることが明らかになってきている。

7. おわりに

これまでのRhoファミリーGタンパク質の研究は、RhoA, Rac1, Cdc42に関する研究が先行しており、筆者らがRhoGの研究を始めた頃はRhoGについてはほとんど何もわかっていなかった。筆者らは、RhoGに関して主にシグナル伝達を中心としてこれまで研究を行ってきたが、一方で2004年にはRhoGの遺伝子を欠損したマウスにつ

いての論文が発表され、RhoG 欠損マウスはほぼ正常に発達することが報告された⁷⁵⁾。ところが最近になって、RhoG 欠損マウスでは皮膚に付けた傷口の治りが悪いとの報告がなされた⁷⁶⁾。また、RhoG 欠損マウスから得られた T 細胞は、抗原提示細胞からの MHC (主要組織適合遺伝子複合体) の取り込みに異常が見られるとの結果も報告されている⁷⁷⁾。先にも述べたように、RhoG はがんや細菌感染などの我々の身近な病気とも密接に関わっていることから、今後 RhoG に関する個体を用いた研究がさらなる展開へとつながっていく可能性が強いとともに、このような研究から様々な疾患に対する新たな治療法の開発につながる事が期待される。

謝辞

本稿で紹介した筆者の研究は、京都大学大学院生命科学研究所・生体システム学分野で行われたもので、本研究に一貫して温かいご指導を賜りました根岸学教授に心より感謝申し上げます。また、学生の頃から様々な場面でご指導とご助言を賜った市川厚教授 (武庫川女子大学) に深く感謝いたします。国立成育医療センター研究所の山内淳司先生には研究の取り組み方について貴重なご指導をいただきました。また、東京大学の紺谷園二先生、梶保博昭先生、国立感染症研究所の前濱朝彦先生、国立循環器病センター研究所の福原茂朋先生、筑波大学の長谷川潤先生、山形大学の小原祐太郎先生、京都大学の布施直之先生、自治医科大学の多胡憲治先生、九州大学の仲矢道雄先生には、G タンパク質研究についての貴重な助言をいただきました。最後に、本研究は生体システム学分野の多くの大学院生の皆様によって支えられ進めることができました。この場を借りて皆様に深く御礼申し上げます。

文 献

- Rossman, K.L., Der, C.J., & Sondek, J. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 167–180.
- Côté, J.F. & Vuori, K. (2007) *Trends Cell Biol.*, **17**, 383–393.
- 加藤裕教 (2009) 生化学, **81**, 711–716.
- 根岸 学, 加藤裕教 (2006) 蛋白質 核酸 酵素, **51**, 693–698.
- Moon, S.Y. & Zheng, Y. (2003) *Trends Cell Biol.*, **13**, 13–22.
- Hall, A. & Lalli, G. (2010) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, a001818.
- 根岸 学, 加藤裕教 (2004) 蛋白質 核酸 酵素, **49**, 331–336.
- Vincent, S., Jeanteur, P., & Fort, P. (1992) *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 3138–3148.
- May, V., Schiller, M.R., Eipper, B.A., & Manis, R.E. (2002) *J. Neurosci.*, **22**, 6980–6990.
- Blangy, A., Vignal, E., Schmidt, S., Debant, A., Gauthier-Rouvière, C., & Fort, P. (2000) *J. Cell Sci.*, **113**, 729–739.
- Estrach, S., Schmidt, S., Diriong, S., Penna, A., Blangy, A., Fort, P., & Debant, A. (2002) *Curr. Biol.*, **12**, 307–312.
- Schuebel, K.E., Movilla, N., Rosal, J.L., & Bustelo, X.R. (1998) *EMBO J.*, **17**, 6608–6621.
- Samson, T., Welch, C., Monaghan-Benson, E., Hahn, K.M., & Burridge, K. (2010) *Mol. Biol. Cell*, **21**, 1629–1642.
- Ellerbroek, S.M., Wennerberg, K., Arthur, W.T., Dunty, J.M., Bowman, D.R., DeMali, K.A., Der, C., & Burridge, K. (2004) *Mol. Biol. Cell*, **15**, 3309–3319.
- van Buul, J.D., Allingham, M.J., Samson, T., Meller, J., Boulter, E., Garcia-Mata, R., & Burridge, K. (2007) *J. Cell Biol.*, **178**, 1279–1293.
- Hiramoto-Yamaki, N., Takeuchi, S., Ueda, S., Harada, K., Fujimoto, S., Negishi, M., & Katoh, H. (2010) *J. Cell Biol.*, **190**, 461–477.
- Harada, K., Hiramoto-Yamaki, N., Negishi, M., & Katoh, H. (2011) *Exp. Cell Res.*, **317**, 1701–1713.
- D'Angelo, R., Aresta, S., Blangy, A., Maestro, L.D., Louvard, D., & Arpin, M. (2007) *Mol. Biol. Cell*, **18**, 4780–4793.
- Roppenser, B., Röder, A., Hentschke, M., Ruckdeschel, K., & Aepfelbacher, M. (2009) *J. Cell Sci.*, **122**, 696–705.
- Zalcman, G., Closson, V., Camonis, J., Honoré, N., Rousseau-Merck, M.F., Tavitian, A., & Olofsson, B. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 30366–30374.
- Elfenbein, A., Rhodes, J.M., Meller, J., Schwartz, M.A., Matsuda, M., & Simons, M. (2009) *J. Cell Biol.*, **186**, 75–83.
- Brunet, N., Morin, A., & Olofsson, B. (2002) *Traffic*, **3**, 342–358.
- Vignal, E., Blangy, A., Martin, M., Gauthier-Rouvière, C., & Fort, P. (2001) *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 8022–8034.
- Katoh, H. & Negishi, M. (2003) *Nature*, **424**, 461–464.
- Murga, C., Zohar, M., Teramoto, H., & Gutkind, J.S. (2002) *Oncogene*, **21**, 207–216.
- Yamaki, N., Negishi, M., & Katoh, H. (2007) *Exp. Cell Res.*, **313**, 2821–2832.
- Gauthier-Rouvière, C., Vignal, E., Mérian, M., Roux, P., Montcourier, P., & Fort, P. (1998) *Mol. Biol. Cell*, **9**, 1379–1394.
- Wennerberg, K., Ellerbroek, S.M., Liu, R.Y., Karnoub, A.E., Burridge, K., & Der, C.J. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 47810–47817.
- Katoh, H., Yasui, H., Yamaguchi, Y., Aoki, J., Fujita, H., Mori, K., & Negishi, M. (2000) *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 7378–7387.
- Prieto-Sánchez, R.M. & Bustelo, X.R. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 37916–37925.
- Gumienny, T.L., Brugnera, E., Tosello-Tramont, A.C., Kinchen, J.M., Haney, L.B., Nishiwaki, K., Walk, S.F., Nemer-gut, M.E., Macara, I.G., Francis, R., Schedl, T., Qin, Y., Aelst, L.V., Hengartner, M.O., & Ravichandran, K.S. (2001) *Cell*, **107**, 27–41.
- Patel, M., Chiang, T.C., Tran, V., Lee, F.J.S., & Côté, J.F. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 38969–38979.
- Patel, M., Margaron, Y., Fradet, N., Yang, Q., Wilkes, B., Hofmann, K., & Côté, J.F. (2010) *Curr. Biol.*, **20**, 2021–2027.
- Côté, J.F. & Vuori, K. (2002) *J. Cell Sci.*, **115**, 4901–4913.
- Brugnera, E., Haney, L., Grimsley, C., Lu, M., Walk, S.F., Tosello-Tramont, A.C., Macara, I.G., Madhani, H., Fink, G. R., & Ravichandran, K.S. (2002) *Nat. Cell Biol.*, **4**, 574–582.
- Côté, J.F., Motoyama, A.B., Bush, J.A., & Vuori, K. (2005) *Nat. Cell Biol.*, **7**, 797–807.
- Lu, M., Kinchen, J.M., Rossman, K.L., Grimsley, C., Hall, M., Sondek, J., Hengartner, M.O., Yajnik, V., & Ravichandran, K.

- S. (2005) *Curr. Biol.*, **15**, 371–377.
- 38) Makino, Y., Tsuda, M., Ichihara, S., Watanabe, T., Sakai, M., Sawa, H., Nagashima, K., Hatakeyama, S., & Tanaka, S. (2006) *J. Cell Sci.*, **119**, 923–932.
 - 39) Götz, M. & Huttner, W.B. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 777–788.
 - 40) Dehay, C. & Kennedy, H. (2007) *Nat. Rev. Neurosci.*, **8**, 438–450.
 - 41) Kawauchi, T. & Hoshino, M. (2008) *Dev. Neurosci.*, **30**, 36–46.
 - 42) Fujimoto, S., Negishi, M., & Katoh, H. (2009) *Mol. Biol. Cell*, **20**, 4941–4950.
 - 43) Saito, T. & Nakatsuji, N. (2001) *Dev. Biol.*, **240**, 237–246.
 - 44) Tabata, H. & Nakajima, K. (2001) *Neuroscience*, **103**, 865–872.
 - 45) Mairé-Coello, G., Tury, A., & DiCicco-Bloom, E. (2009) *J. Neurosci.*, **29**, 775–788.
 - 46) Merlos-Suarez, A. & Batlle, E. (2008) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **20**, 194–200.
 - 47) Wykosky, J. & Debinski, W. (2008) *Mol. Cancer Res.*, **6**, 1795–1806.
 - 48) Pasquale, E.B. (2010) *Nat. Rev. Cancer*, **10**, 165–180.
 - 49) Macrae, M., Neve, R.M., Rhodriguez-Viciano, P., Haqq, C., Yeh, J., Chen, C., Gray, J.W., & McCormick, F. (2005) *Cancer Cell*, **8**, 111–118.
 - 50) Zelinski, D.P., Zantek, N.D., Stewart, J.C., Irizarry, A.R., & Kinch, M.S. (2001) *Cancer Res.*, **61**, 2301–2306.
 - 51) Brantley-Sieders, D.M., Zhuang, G., Hicks, D., Fang, W.B., Hwang, Y., Cates, J.M.M., Coffman, K., Jackson, D., Bruckheimer, E., Muraoka-Cook, R.S., & Chen, J. (2008) *J. Clin. Invest.*, **118**, 64–78.
 - 52) Miao, H., Li, D.Q., Mukherjee, A., Guo, H., Petty, H., Cutter, J., Basilion, J.P., Sedor, J., Wu, J., Danielpour, D., Sloan, A.E., Cohen, M.L., & Wang, B. (2009) *Cancer Cell*, **16**, 9–20.
 - 53) Larsen, A.B., Pedersen, M.W., Stockhausen, M.T., Grandal, M. V., van Deurs, B., & Poulsen, H.S. (2007) *Mol. Cancer Res.*, **5**, 283–293.
 - 54) Shamah, S.M., Lin, M.Z., Goldberg, J.L., Estrach, S., Sahin, M., Hu, L., Bazalakova, M., Neve, R.L., Corfas, G., Debant, A., & Greenberg, M.E. (2001) *Cell*, **312**, 233–244.
 - 55) Sahin, M., Greer, P.L., Lin, M.Z., Poucher, H., Eberhart, J., Schmidt, S., Wright, T.M., Shamah, S.M., O’Connell, S., Cowan, C.W., Hu, L., Goldberg, J.L., Debant, A., Corfas, G., Krull, C.E., & Greenberg, M.E. (2005) *Neuron*, **46**, 191–204.
 - 56) Fu, W.Y., Chen, Y., Sahin, M., Zhao, X.S., Shi, L., Bikoff, J. B., Lai, K.O., Yung, W.H., Fu, A.K.Y., Greenberg, M.E., & Ip, N.Y. (2007) *Nat. Neurosci.*, **10**, 67–76.
 - 57) Shi, L., Butt, B., Ip, F.C.F., Dai, Y., Jiang, L., Yung, W.H., Greenberg, M.E., Fu, A.K.Y., & Ip, N.Y. (2010) *Neuron*, **65**, 204–216.
 - 58) Zhang, Y., Sawada, T., Jing, X., Yokote, H., Yan, X., & Saka-guchi, K. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 31103–31112.
 - 59) Ogita, H., Kunimoto, S., Kamioka, Y., Sawa, H., Matsuda, M., & Mochizuki, N. (2003) *Circ. Res.*, **93**, 23–31.
 - 60) Margolis, S.S., Salogiannis, J., Lipton, D.M., Mandel-Brehm, C., Wills, Z.P., Mardinly, A.R., Hu, L., Greer, P.L., Bikoff, J. B., Ho, H.Y.H., Soskis, M.J., Sahin, M., & Greenberg, M.E. (2010) *Cell*, **143**, 442–455.
 - 61) Wang, Y., Suzuki, H., Yokoo, T., Tada-Iida, K., Kihara, R., Miura, M., Watanabe, K., Sone, H., Shimano, H., Toyoshima, H., & Yamada, N. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **324**, 1053–1058.
 - 62) Xie, X., Chang, S.W., Tatsumoto, T., Chan, A.M., & Miki, T. (2005) *Cell Signal.*, **17**, 461–471.
 - 63) Weaver, A.M. (2008) *Cancer Lett.*, **265**, 157–166.
 - 64) DesMarais, V., Yamaguchi, H., Oser, M., Soon, L., Moune-imne, G., Sarmiento, C., Eddy, R., & Condeelis, J. (2009) *Cell Motil. Cytoskeleton*, **66**, 303–316.
 - 65) Weed, S.A., Du, Y., & Parsons, J.T. (1998) *J. Cell Sci.*, **111**, 2433–2443.
 - 66) Valentijn, A.J., Zouq, N., & Gilmore, A.P. (2004) *Biochem. Sci.*, **32**, 421–425.
 - 67) Reddig, P.J. & Juliano, R.L. (2005) *Cancer Metastasis Rev.*, **24**, 425–439.
 - 68) Rennebeck, G., Martelli, M., & Kyprianou, N. (2005) *Cancer Res.*, **65**, 11230–11235.
 - 69) Simpson, C.D., Anyiwe, K., & Schimmer, A.D. (2008) *Cancer Lett.*, **272**, 177–185.
 - 70) Duronio, V. (2008) *Biochem. J.*, **415**, 333–344.
 - 71) Chiarugi, P. & Giannoni, E. (2008) *Biochem. Pharmacol.*, **76**, 1352–1364.
 - 72) Handa, Y., Suzuki, M., Ohya, K., Iwai, H., Ishijima, N., Koleske, A.J., Fukui, Y., & Sasakawa, C. (2006) *Nat. Cell Biol.*, **9**, 121–128.
 - 73) Patel, J.C. & Galán, J.E. (2006) *J. Cell Biol.*, **175**, 453–463.
 - 74) Mohammadi, S. & Isberg, R.R. (2009) *Infect. Immun.*, **77**, 4771–4782.
 - 75) Vigorito, E., Bell, S., Hebeis, B.J., Reynolds, H., McAdam, S., Emson, P.C., McKenzie, A., & Turner, M. (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 719–729.
 - 76) Bass, M.D., Williamson, R.C., Nunan, R.D., Humphries, J.D., Byron, A., Morgan, M.R., Martin, P., & Humphries, M.J. (2011) *Dev. Cell*, **21**, 681–693.
 - 77) Martínez-Martín, N., Fernández-Arenas, E., Cemerski, S., Delgado, P., Turner, M., Heuser, J., Irvine, D.J., Huang, B., Bustelo, X.R., Shaw, A., & Alarcón, B. (2011) *Immunity*, **35**, 208–222.