

細胞増殖促進と蛋白リン酸化反応

河野通明^{a)}

岐薬紀要 (1987) 36 : 1-10

要約：種々の細胞増殖因子によって Na^+/H^+ アンチポーターのCキナーゼによる活性化（その結果細胞質内 pH が上昇する），あるいはリボソーム S 6 蛋白，細胞質 41K，43K 蛋白のリン酸化が急速に促進される。それらはいずれも増殖因子によってもたらされた細胞増殖促進情報の細胞核への伝達過程において不可欠の重要な役割を果たしていると考えられる。

索引用語：細胞増殖因子，受容体，Cキナーゼ， Na^+/H^+ アンチポーター，リボソーム S 6 蛋白，チロシンリン酸化反応，（文31）

Growth Control and Protein Phosphorylation in Fibroblasts

MICHIAKI KOHNO^{a)}*Ann. Proc. Gifu Pharm. Univ.* (1987) 36 : 1-10

Abstract : Many growth-promoting agents have been shown to activate the amiloride-sensitive Na^+/H^+ antiporter, leading to a rapid rise in cytoplasmic pH (pH_i) of 0.1-0.3 unit; it seems very likely that protein kinase C is involved in this activation process. Phosphorylation of cellular proteins such as ribosomal protein S6, and two 43000-Mr and two 41000-Mr proteins revealed by two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis, has also been commonly observed after activation of quiescent fibroblasts with a variety of growth factors. The close correlation between mitogen action and the increased phosphorylation of these proteins is consistent with the notion that phosphorylation of such a common set of specific cellular proteins in limited number might be important for some early steps of the mitogenic-signalling pathway.

Keyphases : Growth factor, protein kinase C, Na^+/H^+ antiporter, ribosomal protein S6, tyrosine phosphorylation (Ref 31)

1. はじめに

細胞増殖の制御機能を分子レベルで明らかにすることは，それに不可逆な乱れが生じた結果と考えられる細胞腫瘍

a) 岐阜薬科大学生物化学研究室
岐阜市三田洞東5丁目6-1

a) Department of Biology,
Gifu Pharmaceutical University,
6-1, Mitahora-higashi 5 chome, Gifu 502

Received February 28, 1987

The Annual Proceedings of Gifu Pharmaceutical University,

ISSN 0434-0094, CODFN : GYDKA 9

化の機構を解明する上からもきわめて重要であり、現代生物学上の最大の関心事の一つである。この問題は主として培養哺乳類細胞を用いてその解析が精力的に進められており、「細胞増殖因子」とよばれる多くのペプチド性の物質が細胞増殖促進において本質的な役割を果たしていることが明らかになってきた。近年、多くの細胞増殖因子が分離・同定され、いくつかのものについてはその一次構造も明らかにされている。各増殖因子は細胞膜上の受容体と特異的に結合することによりその作用を発現するが、その細胞増殖促進情報の伝達機構、すなわちいかなる反応が誘起されて最終的に DNA 合成、細胞分裂が惹起されるかについての詳細はほとんど分っていない。

従来より、いくつかの増殖因子が細胞膜のイノシトールリン脂質 (PI) の代謝回転を急速に促進することが知られていた。その生理的意義については長い間不明であったが、最近 PI 代謝によって産生されるジアシルグリセロール (DG) がプロテインキナーゼ (C キナーゼ) を活性化することが明らかにされた。¹⁾ 一方、上皮細胞増殖因子 (EGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF) などいくつかの細胞増殖因子の受容体がチロシン残基を特異的にリン酸化する特異な酵素活性をもつことが報告された。²⁾ これらの結果は各増殖因子が受容体と結合することによってもたらされた細胞増殖促進情報が、C キナーゼあるいは受容体キナーゼの活性化を介しての細胞蛋白質リン酸化反応の促進を経て最終的に細胞核へと伝達される可能性を示唆する。そこで本稿では細胞増殖因子によって実際に細胞内でひき起こされている細胞蛋白質リン酸化反応の変動に焦点をあてて述べ、細胞増殖制御機構におけるそれらの役割について考察したい。

2. Na^+/H^+ アンチポーターの活性化と C キナーゼ

静止期の細胞に増殖因子を添加したとき誘導される細胞内代謝反応の変動の中で最も急速に観察されるものの 1 つに細胞質内 pH (pH_i) の上昇がある。³⁾ これは細胞膜に存在して Na^+/H^+ イオンの交換にたずさわる分子 (Na^+/H^+ アンチポーター) が増殖因子添加によって活性化され、細胞質の H^+ の細胞外への流出、それと連動して細胞外からの Na^+ の細胞内への流入が促進されたことによる。この pH_i の上昇が増殖因子による細胞増殖促進において必須の反応の 1 つであることは、例えば (1) Na^+/H^+ アンチポーターの特異的阻害剤と考えられているアミロライド (3,5-diamino-6-chloro-N-(diaminomethylene) pyrazinocarboxamide) でアンチポーター活性を阻害すると増殖因子による細胞 DNA 合成促進がみられなくなり、さらに種々のアミロライド誘導体によるアンチポーター活性阻害の程度はそれらによる細胞 DNA 合成阻害の程度と完全に一致したこと、⁴⁾ (2) Na^+/H^+ アンチポーター活性を欠く変異性を用いての増殖因子による細胞 DNA 合成促進の pH_i 依存性を詳細に検討した結果^{5,6,7)} などより明らかである。

Na^+/H^+ アンチポーターは血清、PDGF、スロンビンなど多くの増殖因子によって活性化されて pH_i の上昇を誘導する。最近になって C キナーゼと特異的に結合してその活性を促進することが知られている 12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート (TPA, 発癌プロモーターの一種) や前述の DG も静止期の細胞に添加すると急速にその pH_i 上昇をひき起こすことが報告された (Fig. 1-A)。^{8,9)} DG による pH_i 上昇はアミロライドによって完全に阻害される (Fig. 1-B)。¹⁰⁾ また、PDGF で pH_i 上昇を誘導した細胞にさらに TPA を加えてもそれ以上の pH_i 上昇は起らないこと (Fig. 1-C)⁹⁾ は、両者による pH_i 上昇の反応機構が同じである可能性を示唆する。ここで PDGF、スロンビン、TPA などの作用はすべて C キナーゼの活性化につながる。すなわち上記の結果は、 pH_i 上昇にかかわる分子 Na^+/H^+ アンチポーターの活性化に C キナーゼが関与している可能性を強く示唆する。

なお、 Na^+/H^+ アンチポーターが細胞増殖シグナルに誘導されて何らかの修飾を受け、分子内の H^+ 結合部周辺の立体構造に変化が生じて細胞内 H^+ に対する親和性が上昇することが、アンチポーター活性化の分子機構ではないかとする報告がある。¹¹⁾ Na^+/H^+ アンチポーター活性は生きた細胞を用いなければ測定できず、また、それに対する特

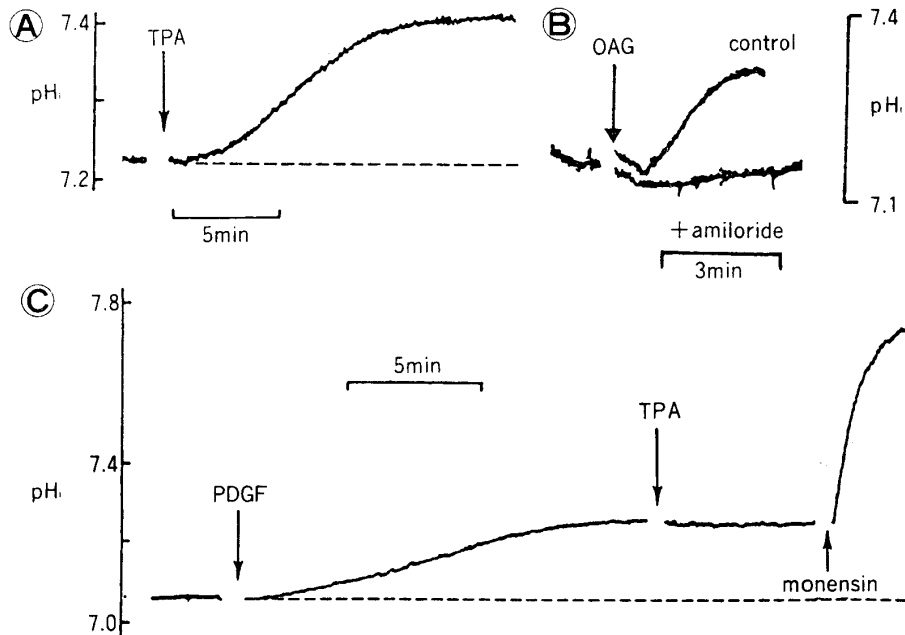


Fig. 1. Mitogen-induced increase in cytoplasmic pH (pH_i).

Quiescent cells were loaded with 2', 7' -bis(carboxyethyl)-5,6-carboxy-fluorescein (BCECF), and pH_i-dependent fluorescence was measured as described^{8,9,10)}

(A) Mouse NIE-115 neuroblastoma cells—200 ng/ml TPA.

(B) Rat tymocyte—25 μg/ml 1-oleoylacetyl-glycerol (OAG). ± 100 μM amiloride.

(C) Human fibroblast—40 ng/ml PDGF, 200 ng/ml TPA. PDGF/TPA induced pH_i increase is apparently not limited by the magnitude of the transmembrane Na⁺ and H⁺ gradients, as pH_i can be increased still further by the addition of the Na⁺/H⁺ ionophore monensin (5 μM).

異標識試薬も開発されていない現在、アンチポーターの分子性状は知るべくもなく、その活性化機構についての最終的な結論を得るためには今後の解析を待つしかない。現時点ではCキナーゼが直接アンチポーター分子をリン酸化することによりその活性を促進しているとする説が有力である。

3. リボゾームS6蛋白のリン酸化と蛋白合成促進

静止期の細胞に血清を添加するとリボゾーム40SサブユニットのS6蛋白のセリン残基のリン酸化が促進される。¹²⁾ 血清のほか、インスリン、EGF、PDGF、スロンビンなど外くの増殖因子が、^{13,14)} さらに TPA¹⁵⁾ もS6蛋白のリン酸化を促進することが報告されている。反応は急速で増殖因子添加後数分内に起こり、それは30~60分で最高レベルに達する。多くの場合、S6蛋白リン酸化の程度は細胞DNA合成促進の程度とよく一致するが、一方、例えばインスリンはSwiss 3T3細胞においてS6蛋白リン酸化を促進するが、DNA合成は誘導しない。すなわち増殖因子によるS6蛋白リン酸化の促進は細胞増殖促進の必要条件ではあっても十分条件ではない。

S6蛋白リン酸化促進の程度が最もよく一致するのは細胞蛋白合成能の上昇である。S6蛋白中にはリン酸化されるセリン残基が5ヶ所あるが、その大部分がリン酸化されたようなS6蛋白をもつ40Sサブユニットが優先的にポリゾームを形成していることが報告されている。¹³⁾ リボゾーム40SサブユニットにおいてS6蛋白はtRNA、mRNA

との結合部位に存在しているらしい。¹⁶⁾ また、静止期の細胞ではリボゾームに結合していない mRNA が多いが、血清などで細胞を刺激するとそれらがリボゾームと結合してポリゾーム形成される。¹⁷⁾ すなわち、S 6 蛋白リン酸化の促進はリボゾーム 40 S サブユニットの mRNA, tRNA との結合をうながしてポリゾーム形成の促進、蛋白合成能の上昇につながると考えることもできる。

S 6 蛋白リン酸化反応は上記のように種々の増殖因子によって促進されるが、細胞内で直接そのリン酸化に関与するキナーゼについてはまだよく分っていない。cAMP 依存性キナーゼ、cGMP 依存性キナーゼ、¹⁸⁾ あるいは C キナーゼ¹⁹⁾ が *in vitro* で S 6 蛋白をリン酸化することが報告されている。しかし、それらによってリン酸化されるのは S 6 蛋白中に存在して *in vivo* でリン酸化される 5 ケ所のセリンのうちの 1, 2 残基にすぎない。*in vitro* の反応

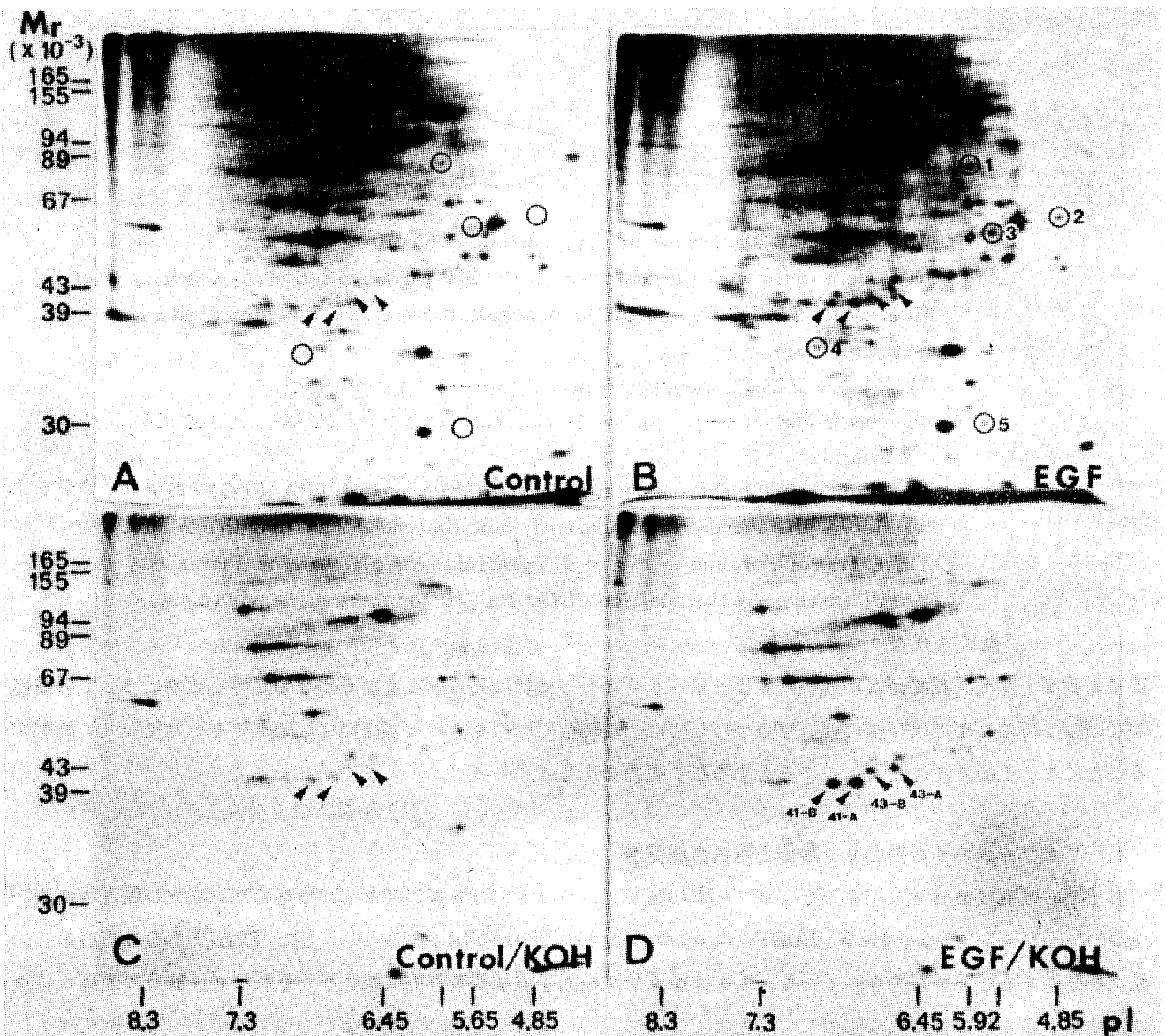


Fig. 2. Phosphoproteins of human fibroblasts. Growth-arrested human skin fibroblasts were labeled with [^{32}P]orthophosphate and stimulated with EGF (50 ng/ml) for 15 min. The cells were lysed and analyzed by two-dimensional gel electrophoresis as described²³⁾. The gels were fixed, stained with Coomassie Blue, dried, and exposed to film using an intensifying screen (A, B). The gels were rehydrated in 1 M KOH, incubated at 55°C for 2h, neutralized, dried, and exposed again as above (C, D).

で *in vivo* と同様に 5 残基のセリンをすべてリン酸化したのは、プロテアーゼ依存性キナーゼ II (protease-activated kinase II) である。^{20,21)} なお、このキナーゼの活性化に関与するプロテアーゼは Ca^{2+} 依存性であるらしい。²²⁾ すなわち、細胞内では増殖因子による PI 代謝促進の結果細胞質へ動員された Ca^{2+} がある種のプロテアーゼを活性化し、次にこれが上記キナーゼに作用してその活性を促進することにより S 6 蛋白がリン酸化される可能性が示唆される。

4. 細胞質41K, 43K 蛋白のチロシンリン酸化反応の促進

前項までに述べたもののほかに、機能は不明であるが増殖因子によってそのリン酸化が促進される細胞蛋白がある。それらは静止期の細胞に種々の増殖因子を添加した際に新たに出現するリン酸化蛋白として検出される。なお機能が不明であるだけに、それらのリン酸化の促進が本当に細胞増殖につながるかどうかは慎重に検討される必要がある。細胞と増殖因子の組み合わせによっては、あるいは細胞の状態によっては増殖因子を添加しても細胞 DNA 合成が有意な程度にまで誘導されないことがある。実際に細胞蛋白リン酸化反応の解析を行った条件下で、増殖因子によって誘導される蛋白リン酸化と細胞 DNA 合成促進の程度の間相互に密接な関連があることは、それら細胞蛋白のリン酸化反応の促進が細胞増殖において意味のある反応であるための必要最低条件である。次に上記の条件を満たしていると思われる細胞蛋白のリン酸化について筆者らの得た実験結果を中心に紹介する。²³⁾

静止期のヒト繊維芽細胞を [^{32}P] 正リン酸で標識した後 EGF を添加し、15分後に細胞を集めてその全細胞蛋白を二次元電気泳動法によって解析した結果、Fig. 2-A, B に示したように少なくとも 9 個の蛋白質のリン酸化が EGF によって再現性よく促進されることがわかった。それらのみかけ上の分子量、等電点は① (85,000, 6.00), ② (60,000, 4.85), ③ (56,000, 5.75), 43K-B (43,000, 6.74), 43K-A (43,000, 6.60), 41K-B (41,000, 6.95), 41K-A (41,000, 6.82), ④ (35,500, 7.03), ⑤ (30,000, 5.85) である。ゲルをアルカリ処理 (この処理で主にセリンに結合したリン酸基が分解され、チロシンあるいはスレオニンに結合したリン酸基をもつリン酸化蛋白の検出が容易になる) と、Fig. 2-C, D に示したように 43K-B, 43K-A, 41K-B, 41K-A の 4 個のリン酸化蛋白がアルカリ抵抗性、すなわちチロシンあるいはスレオニンがリン酸化されている可能性が示唆された。

残り 5 個のリン酸化蛋白はいずれもセリンあるいはスレオニンがリン酸化されていた。それらのリン酸化の促進は EGF のほか、PDGF, FGF など多くの増殖因子により、またラット繊維芽細胞などにおいて広く共通に認められ、細胞増殖促進においてそれぞれ重要な役割を果たしている可能性がある。しかし Fig. 2-A, B に示したように増殖因子によって最も顕著にそのリン酸化が促進されたのは分子量 43,000, 41,000 の各 2 個の蛋白質であり、また、筆者らの当初の目的は受容体チロシンキナーゼの標的蛋白の同定にあったこともあり、これら 5 個のリン酸化蛋白についての解析はこれ以上行っていない。

分子量 43,000, 41,000 の蛋白質のアルカリ抵抗性リン酸化反応は EGF のほか、FGF, PDGF, FCS あるいは TPA など、細胞 DNA 合成を促進しうるすべての増殖因子によって促進された。反応の促進は急速で、増殖因子添加後 2 分ですでに認められ、5 分後にはほぼ最高レベルに達してしばらくそのレベルを維持し、30 分後からそれらは徐々に減少した。リン酸化は 43K-B, 41K-B ではチロシン、セリン、一方 43K-A, 41K-A ではチロシン、セリン、スレオニンに認められた。なお 41K-B, 41K-A の蛋白質部分は同じであり、二次元電気泳動上での荷電の差はスレオニン残基のリン酸化の有無によることが明らかになった。43K-B, 43K-A についても同様の関係がある可能性が示唆される。

41K, 43K 蛋白のリン酸化はマウス、ラット、ハムスターなどの細胞において、それらの DNA 合成が促進される条件下では常に観察され、一方、対数増殖期の細胞、あるいはその発癌遺伝子産物 pp60^{src} がチロシンキナーゼ活

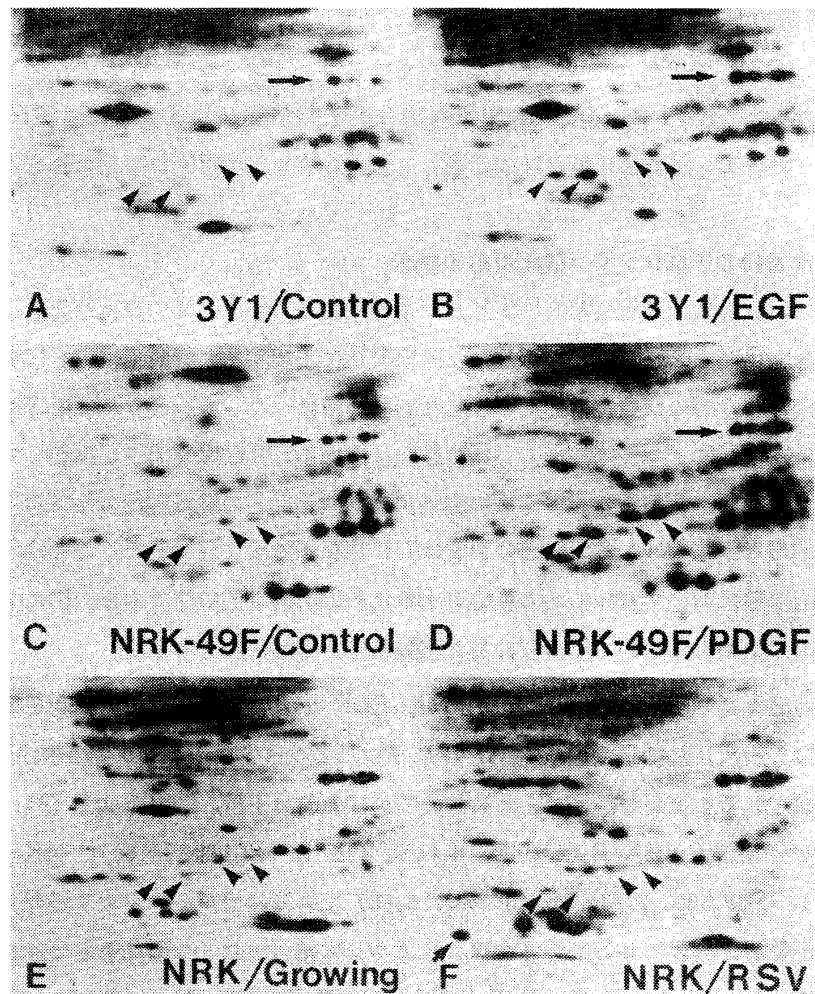


Fig. 3. Alkali-resistant phosphoproteins of 3Y1, NRK-49F, and BH-NRK cell. 3Y1 cells and NRK-49F cells were growth-arrested and labeled with ^{32}P i. 3Y1 cells were either mock-treated (A), or treated with 50 ng/ml of EGF for 15 min (B). NRK-49F cells were either mock-treated (C), or treated with 50 ng/ml of PDGF for 15 min (D). Exponentially growing normal rat fibroblasts (NRK) (E) and RSV-transformed NRK cells (F) were labeled with ^{32}P i. Labeled phosphoproteins were analyzed by two-dimensional gel electrophoresis, and the gels were treated with 1 M KOH. Arrowheads indicate the positions of the two Mr=43000 proteins and two Mr=41000 proteins.

性をもつラウス肉腫ウイルス(RSV)で腫瘍化した細胞においてはそれらのリン酸化反応の促進はみられない(Fig.3). また, Fig. 4 に示すようにそれらのリン酸化の程度は, 同条件下で細胞を刺激したときに誘導される細胞 DNA 合成促進とよく一致している。これらの結果は 41K, 43K 蛋白のリン酸化の促進が細胞増殖促進へ向けての初期過程において重要な役割を果たしている可能性を, 特に対数増殖期, 腫瘍細胞中においてこれら蛋白質のリン酸化の促進がみられないことより, その反応の促進が細胞の $G_0 \rightarrow G_1$ 期への活性化に関与している可能性を強く示唆するものである。

なお, その受容体が, ①チロシンキナーゼ活性をもつ EGF や PDGF, ②Cキナーゼ(セリン/スレオニン特異的キナーゼ)である TPA, ③キナーゼ活性をもたないスロンビン²⁴⁾をはじめとする多くの増殖因子によっても, 41K,

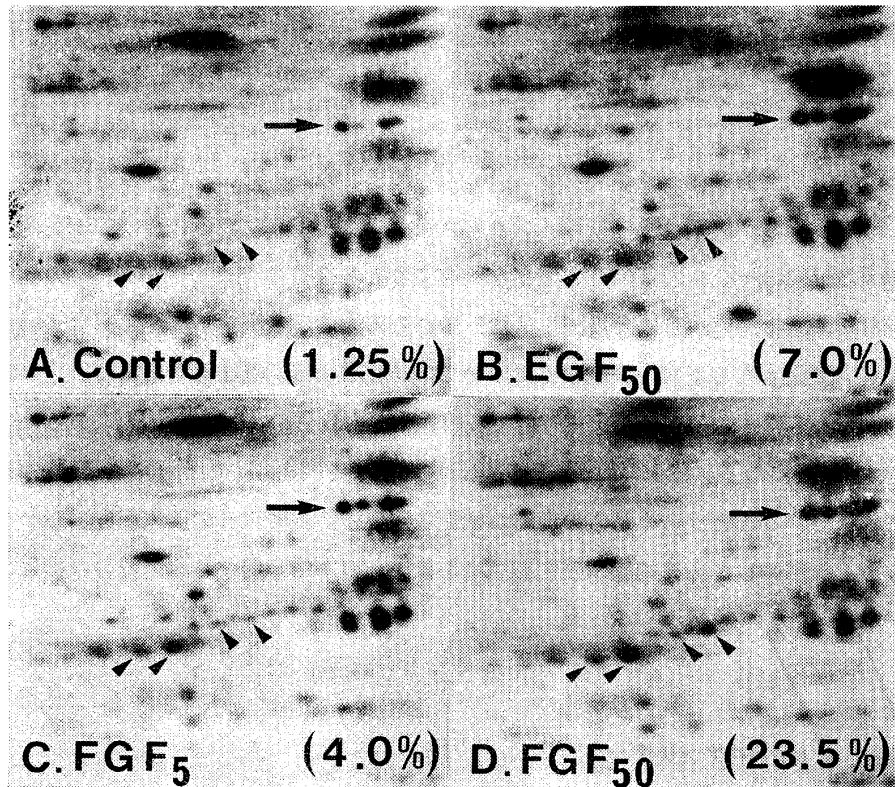


Fig. 4. Correlation between increased alkali-resistant phosphorylation and DNA synthesis in 3T3 cells. 3T3 cells were growth-arrested and labeled with ^{32}P i. Cells were mock-treated(A), or treated for 15 min with 50 ng/ml of EGF(B), 5 ng/ml of FGF (C), and 50 ng/ml of FGF(D). Labeled proteins were analyzed by two-dimensional gel electrophoresis, and the gels were treated with 1 M KOH. Arrowheads indicate the positions of the two $M_r=43000$ proteins and two $M_r=41000$ proteins. Values for the percentage of labeled nuclei are in parenthesis.

43K蛋白のチロシン、セリン、さらにスレオニン残基のリン酸化が誘導され、しかも各蛋白質のリン酸化は用いた増殖因子によらず、それぞれすべて同じ部位の各アミノ酸上にひきおこされていた。すなわち、それぞれの増殖因子受容体が直接的に各蛋白質のリン酸化に関与しているのではなく、むしろ各増殖因子がその機構は不明であるが最終的には同じキナーゼ（複数？）を活性化して 41K、43K 蛋白のリン酸化を促進していると考えられる。

最近41K、43K 蛋白はいずれも細胞質に局在する蛋白質であることが明らかになった。²⁵⁾ それらの機能については現在全く不明であるが、41K、43K 蛋白がリン酸化されることにより細胞質内での局在部位が変動して核の方へ移行する、すなわち増殖因子によってもたらされた細胞増進情報が上記蛋白質のリン酸化反応を介して直接細胞核へと伝達される可能性もあろう。

同様の物理化学的性状をもつ細胞蛋白リン酸化の促進は、種々の細胞において数多くの増殖因子によって誘導されることが他のいくつかのグループによっても報告されている。^{26,27,23,28)} すなわち、分子量 4 万前後の蛋白質のリン酸化反応の促進は、静止期の細胞において DNA 合成が再開される際に誘導されるべき必須の初期反応の一つとしてその重要性は多くの人に認められてきた。しかし現在明らかなのはリン酸化される蛋白の分子量、等電点のみである。

これら蛋白の機能を明らかにすることは細胞増殖制御機構を分子レベルで解明する上でどうしても避けて通ることのできない重要なステップの一つである。

5. おわりに

以上述べたことを筆者の希望的観測をまじえながら Fig. 5 にまとめてみた。これらは主に各動物の繊維芽細胞などを用いて解析した結果であるが、筆者らは最近インターロイキン 2 が T リンパ球において細胞増殖を促進する際に細胞質の分子量 67,000 の蛋白のセリン残基のリン酸化を促進することを明らかにした。^{30,31)} このように細胞増殖促進過程において細胞蛋白リン酸化反応が重要な役割をはたしている可能性を示唆する情況証拠は多いが、一方、それら反応の詳細、あるいはリン酸化される蛋白の機能などについての研究はまだ未熟な段階にある。しかし、細胞増殖因子添加直後に Na^+/H^+ アンチポーターの C キナーゼによる活性化を介しての pH_i の上昇、あるいはリポソーム S 6 蛋白、細胞質 41K、43K 蛋白のリン酸化の促進が、細胞、増殖因子を問わず、細胞 DNA 合成の誘導がみられる条件下で常に広く観察されていることは、それらの反応が細胞増殖促進情報の核への伝達過程において不可欠の重要な役割をはたしていることを示唆し、今後細胞増殖制御機構を分子レベルで解明するうえでの糸口になるものと考えら

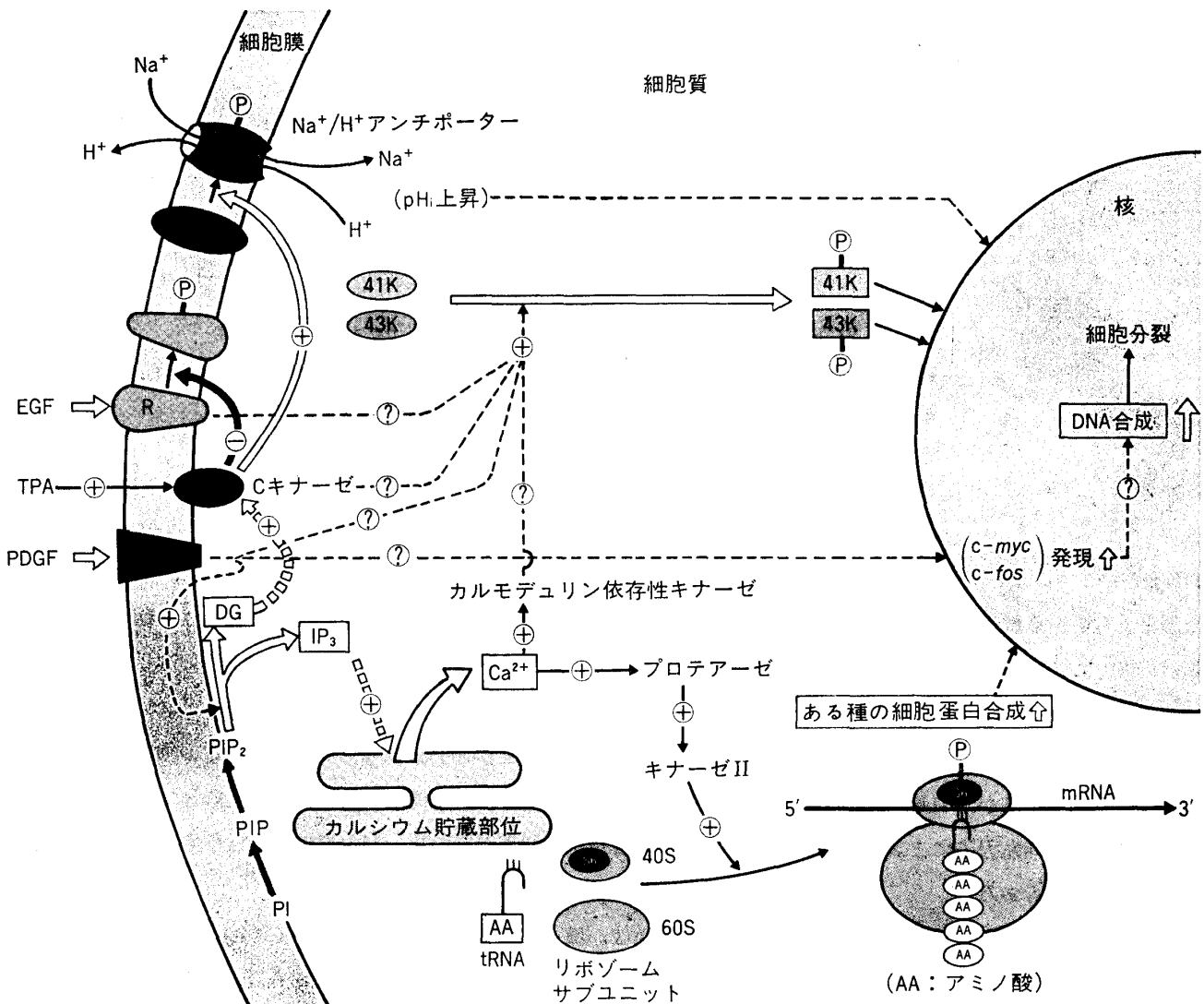


Fig. 5. Mitogen-induced phosphorylation of cellular proteins and their possible role in the control of cell proliferation.

れる。これら各蛋白質のリン酸化機構の詳細、さらにそれらの機能の解明が待たれる。なお、例えば41K, 43K 蛋白がリン酸化されても、細胞質 pH の上昇がおこらないような条件下では細胞 DNA 合成の促進はみられない。²⁴⁾ すなわち実際に細胞増殖の促進に至るには、少なくとも上で紹介したすべての細胞蛋白リン酸化反応の促進を含めてさまざまな経路で細胞増殖促進情報が細胞核に伝達される必要がある。当然のことながら細胞増殖因子の作用機構を蛋白リン酸化反応だけで説明することは不可能で、近年とくに注目を集めている増殖因子の種々の発癌遺伝子 (c-myc, c-fos など) との関連も含めてそれは今後さらに多方面から検討されるべき大きな研究課題である。

引用文献

- 1) Y. Nishizuka, *Nature*, **308**, 693 (1984).
- 2) C. H. Heldin and B. Westermark, *Cell*, **37**, 9 (1984).
- 3) J. Pouyssegur, A. Franchi, M. Kohno, G. L'Allemain and S. Paris, in "Current Topics in Membrane and Transport", Vol. 26, Na⁺-H⁺ Exchange, Intracellular pH, and Cell Function (eds. P. S. Aronson & W. F. Boron) pp. 201, 1986, Academic Press.
- 4) G. L'Allemain, A. Franchi, E. Cragoe, Jr. and J. Pouyssegur, *J. Biol. Chem.*, **259**, 4313 (1984).
- 5) J. Pouyssegur, C. Sardet, A. Franchi, G. L'Allemain and S. Paris, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **81**, 4833 (1984).
- 6) G. L'Allemain, S. Paris and J. Pouyssegur, *J. Biol. Chem.*, **259**, 5809 (1984).
- 7) J. Pouyssegur, A. Franchi, G. L'Allemain and S. Paris, *FEBS Lett.*, **190**, 115 (1985).
- 8) J. M. Besterman and P. Cuatrecasas, *J. Cell Biol.*, **99**, 340 (1984).
- 9) W. H. Moolenaar, L. G. Tertoolen and S. W. de Laat, *Nature*, **312**, 371 (1984).
- 10) S. Grinstein, S. Cohen, J. D. Goetz and A. Rothstein, *J. Cell Biol.*, **101**, 269 (1985).
- 11) S. Paris and J. Pouyssegur, *J. Biol. Chem.*, **259**, 10989 (1984).
- 12) G. Thomas, M. Sigman and J. Gordon, *Proc Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**, 3952 (1979).
- 13) G. Thomas, J. Martin-Perez, M. Siegman and A. M. Otto, *Cell*, **30**, 235 (1982).
- 14) J. C. Chambard, A. Franchi, A. Le Cam and J. Pouyssegur, *J. Biol. Chem.*, **258**, 1706 (1983).
- 15) J. M. Trevisan, R. K. Kulkarni and C. V. Byus, *J. Biol. Chem.*, **259**, 897 (1984).
- 16) D. R. Tolan and R. R. Traut, *J. Biol. Chem.*, **256**, 10129 (1981).
- 17) P. S. Rudland, S. Weil and A.R. Hunter, *J. Mol. Biol.*, **96**, 745 (1975).
- 18) R. W. Del Grande and J. A. Traugh, *Eur. J. Biochem.*, **123**, 421 (1982).
- 19) C. J. Le Peuch, R. Ballester and O. M. Rosen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **80**, 6858 (1983).
- 20) O. Perisic and J. A. Traugh, *J. Biol. Chem.*, **258**, 13998 (1983).
- 21) J. M. Trevisan, O. Perisic, J. A. Traugh and C. V. Byus, *J. Biol. Chem.*, **260**, 3041 (1985).
- 22) S. M. Tahara and J. A. Traugh, *Eur. J. Biochem.*, **126**, 395 (1982).
- 23) M. Kohno, *J. Biol. Chem.*, **260**, 1771 (1985).
- 24) M. Kohno and J. Pouyssegur, *Biochem. J.*, **238**, 451 (1986).
- 25) M. Kohno, (投稿準備中)
- 26) J. A. Cooper, D. F. Bowen-Pope, E. Raines, R. Ross and T. Hunter, *Cell*, **31**, 263 (1982).

-
- 27) K. D. Nakamura, R. Martinez and M. J. Weber, *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 380 (1983).
 - 28) T. Gilmore and G. S. Martin, *Nature*, **306**, 487 (1983).
 - 29) J. A. Cooper, B. M. Sefton and T. Hunter, *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 30 (1984).
 - 30) M. Kohno, S. Kuwata, Y. Namba and M. Hanaoka, *FEBS Lett.*, **198**, 33 (1986).
 - 31) T. Ishii, M. Kohno, M. Nakamura, Y. Hinuma and K. Sugamura, *Biochem. J.*, **242**, 211 (1987).