

ウチダ コウジ
内田 浩二

共同研究者

小鹿 一

(名古屋大学大学院生命農学研究科・教授・

分子機能化学)

青木直人

(三重大学生物資源学部・准教授・食品機能

化学)

柴田貴広

(名古屋大学大学院生命農学研究科・助教・

食品機能化学)

略 歴

1988年3月 名古屋大学大学院農学研究科博士課程
(後期課程)修了

1988年4月 名古屋大学農学部・助手

1996年4月 名古屋大学農学部・助教授

1998年4月 名古屋大学大学院生命農学研究科・助教授

2003年10月～2006年3月

名古屋大学高等研究院・助教授(兼任)

2007年4月 名古屋大学大学院生命農学研究科・准教授
現在に至る

神経成長因子(NGF)の作用を活性化する食品機能性因子

Neurotrophins, such as the nerve growth factor (NGF), play an essential role in the growth, development, survival and functional maintenance of neurons in the central and peripheral systems. They also prevent neuronal cell death under various stressful conditions, such as ischemia and neurodegenerative disorders. NGF induces cell differentiation and neurite outgrowth by binding with and activating the NGF receptor tyrosine kinase followed by activation of a variety of signaling cascades. We have investigated the NGF-dependent neuritogenesis enhancer potential of a food-derived small molecule contained in *Brassica* vegetables and identified the protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) as a key regulator of the NGF receptor-initiated signal transduction. Based on an extensive screening of *Brassica* vegetable extracts for the neuritogenic-promoting activity in the rat pheochromocytoma cell line PC12, we found the Japanese horseradish, wasabi (*Wasabia japonica*, syn. *Eutrema wasabi*), as the richest source and identified 6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate (6-HITC), an analogue of sulforaphane isolated from broccoli, as one of the major neuritogenic enhancers in the wasabi. 6-HITC strongly enhanced the neurite outgrowth and neurofilament expression elicited by a low-concentration of NGF that alone was insufficient to induce neuronal differentiation. 6-HITC also facilitated the sustained-phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) and the autophosphorylation of the NGF receptor TrkA. It was found that PTP1B act as a phosphatase capable of dephosphorylating Tyr-490 of TrkA and was inactivated by 6-HITC in a redox-dependent manner. The identification of PTP1B as a regulator of NGF signaling may provide new clues about the chemoprotective potential of food components, such as isothiocyanates.

研究目的

神経成長因子 (Nerve Growth Factor; NGF) は神経細胞の分化を促進し、その生存を維持する作用のある一群のタンパク質である。NGFは成人の脳においても、神経細胞の生存を維持するのみでなく、神経回路を保全・修復し、高次機能を再生させる機能を有する。申請者の研究グループでは、これまでに植物野菜成分あるいは酸化脂脂肪酸代謝物など様々な生理活性物質の神経細胞生理作用に関する化学生物学的研究を行ってきた。この研究過程において、ある種の食品成分 (わさびに含まれるイソチオシアネート化合物、6-HITC) がNGFの作用を増強することを見いだした。この食品に含まれる“NGF作用増強因子”による神経突起伸張を指標にした神経細胞分化促進作用の詳細な分子メカニズム解析の結果、増強因子は右図においてNGFシグナル伝達における最上流に位置するNGF受容体TrkAの持続的な活性化 (チロシン残基の自己リン酸化) を亢進することを見いだした。こうした背景から、6-HITCがTrkAの脱リン酸化酵素に何らかの作用をすることでTrkAの持続的なリン酸化を引き起こし、NGFのシグナルを増強するという機構が推定され、更にそのTrkAの脱リン酸化酵素としてPTP1Bが関与することが示唆されてきた。そこで、本研究課題では、PTP過剰発現系およびPTP発現抑制系などによる基質のリン酸化レベルの影響の検討を行った。また、Substrate-trapping変異体PTPを用い、PTP1BがTrkAの脱リン酸化酵素であるかどうかの検討を行った。

研究の方法

(1) ラット副腎髄質褐色細胞腫由来PC12細胞の培養

PC12細胞は名古屋大学大学院生命農学研究科分子機能モデリング研究室の小鹿一教授より寄贈いただいた。

(2) 神経突起伸長の評価

24穴plateに細胞を 2×10^4 cells/dishとなるように播き、培養し37℃、5%CO₂で12~16時間培養した。その後、FBS0.5%を含んだDMEM培地に交換した。さらに24時間後、薬剤とNGF1.5ng/mlを投与し、8-72時間後、顕微鏡を用いて観察を行った。この時、適当な場所から約100個の細胞を選び、細胞の長径よりも長い突起を有する細胞数を測定した。1wellにつき2ヶ所で測定を行った。

(3) 発現プラスミド

PTP発現プラスミドは三重大学生物資源学部の青木直人准教授より頂いた。SHP-2発現プラスミドはMyc、その他はすべてHAもしくはGSTとの融合タンパク質として発現されるので抗Myc抗体、抗HA抗体もしくは抗GST抗体により検出することができる。

(4) siRNA

ネガティブコントロールとPTP1Bに対するsiRNAはInvitrogen社より購入した。5'-UAACGAGCCUUUCUCCAUGAUGCGG-3'

(5)細胞への遺伝子導入

過剰発現及び発現抑制実験での遺伝子の導入はリポフェクション法により行った。

研究成果

(1)PTP1B過剰発現系における神経突起伸長活性の影響

当研究室において、TrkAのリン酸化制御にPTP1Bが関与していることが示唆されてきた。またその検討の中で、PTP1B一過的過剰発現系におけるNGFによるTrkAの影響についての検討が行われている。それによると、コントロールの細胞に比べてPTP1B過剰発現細胞はTrkAのリン酸化が有意に抑制されることが確認されている。またTrkAの下流に位置するERKのリン酸化においてもTrkAと同様な結果が得られており、コントロールに比べてPTP1B過剰発現細胞はERKのリン酸化が抑制していることが確認されている。そこでPTP1Bを安定的過剰発現させたPC12細胞を用い、PTP1Bを過剰発現させたときの神経突起伸長に与える影響を確認した。高濃度NGFを投与し、投与後0-72時間、突起伸長活性について経時的に観察を行ったところ、コントロールの細胞では有意な神経突起伸長活性が認められたのに対し、PTP1B過剰発現細胞においては伸長活性がコントロールの細胞に比べて約半分の20%程度であり、低い伸長活性であった(Fig. 1)。

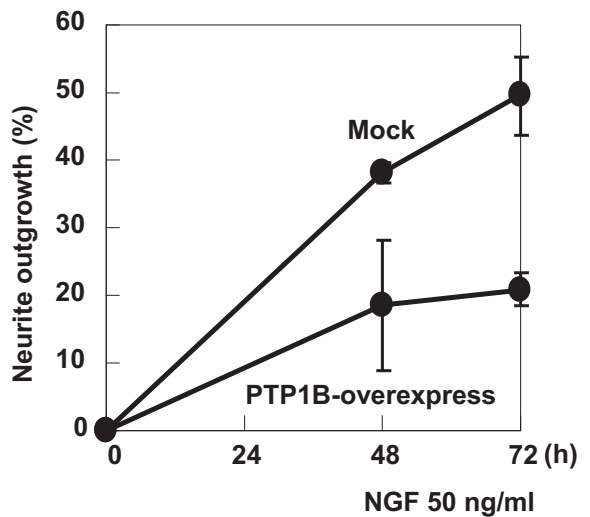


Fig. 1. PTP1B過剰発現による神経突起伸長活性の抑制

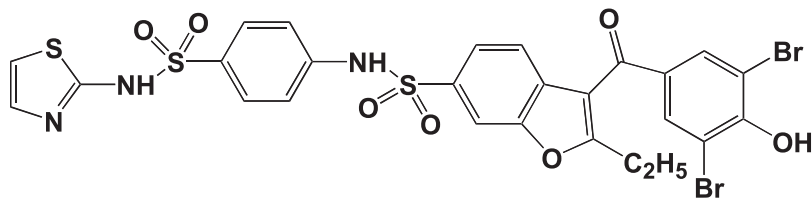
(2)PTP1B特異的阻害剤を用いた解析

これまでの検討で、PTP1Bの過剰発現系においてTrkAのリン酸化が抑制され、さらに神経突起伸長活性においても抑制することが確認され、TrkAのリン酸化とそれに伴う突起伸長にPTP1Bが関与している可能性が示唆された。しかしながらこれらの結果は、過剰発現といった通常以上のPTP1Bが細胞内に存在することに由来して引き起こされた特異性の低下による脱リン酸化作用の影響である可能性が否定できない。そこで、そういった問題を解決するために、次の検討をした。当研究室におけるこれまでの検討で、PTP1B特異的阻害剤(Fig. 2)を用いた神経突起伸長についての検討も行われている。それによると、阻害剤投与によるリン酸化TrkAへの影響は、6-HITC投与による突起伸長活性への影響と同様の結果で、低濃度NGF存在下で阻害剤の濃度依存的に神経突起伸長が観察されることが確認されている。そこで、PTP1BとTrkAの関係を明らかとするため、このPTP1Bの特異的な阻害剤を用いてTrkAのリン酸化における解析を行った。PC12細胞に低濃度NGF単独で投与した場合には、TrkAのリン酸化もレベルが弱く、また短時間のうちにTrkAのリン酸化が減少していくのに対し、低濃度NGF存在下でPTP1Bの特異的な阻害剤を投与した場合

にはTrkAのリン酸化が亢進し、60分までTrkAのリン酸化が持続することが明らかとなった。また、PTP1Bの特異的な阻害剤単独投与の場合にはTrkAのリン酸化は認められなかった (Fig. 2)。以上から、PTP1Bを阻害することでTrkAのリン酸化が持続・亢進することが明らかとなり、PTP1BがTrkAの脱リン酸化に関与していることが示唆された。

A

PTP1B inhibitor



3-(3,5-Dibromo-4hydroxy-benzoyl-2-ethyl-benzofuran-6-sulfonicacid-(4-(thiazol-2-ylsulfamyl)-phenyl)-amide

B

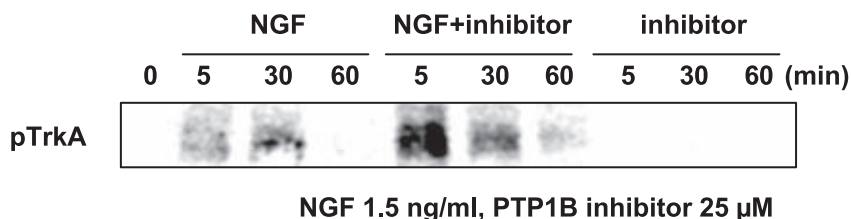


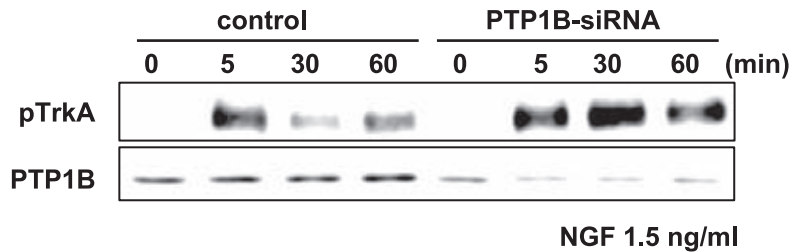
Fig. 2. PTP1B特異的阻害剤によるTrkAのリン酸化

(3)PTP1B発現抑制系におけるTrkAシグナル伝達への影響

更に、PTP1Bの関与を確かめるために次の検討をした。近年、RNA interference (RNAi)を用いた標的遺伝子の発現抑制が注目を集めている。RNAiとはshort interfering RNA (siRNA)とよばれる21-23塩基の二本鎖RNAにより配列特異的に遺伝子発現が抑制される現象のことである。この方法は、標的遺伝子 (mRNA) を破壊することで発現を抑制する為、遺伝子の機能解析に有効な方法であるといわれている。また、RNAiによる検討は、このようにもともと細胞内に存在する遺伝子の発現を抑えることから、発現ベクターを用いた過剰発現系での問題を解決できると考えられている。そこで、siRNAを用いたPTP1B抑制系において、TrkAのリン酸化について検討を行うこととした。PC12細胞にネガティブコントロールとPTP1BsiRNAをトランスフェクションし、低濃度NGFを処理し、TrkAのリン酸化の継時的変化について検討を行った。その結果、低濃度NGF処理したコントロールの細胞においては投与後5分をピークにTrkAのリン酸化が減少していく傾向にあったのに

対し、siRNAによるPTP1B発現抑制系においては、TrkAの有意なリン酸化がNGF投与後5分から60分まで持続することが明らかとなった (Fig.3)。またこの時、神経突起伸長活性についても同様にトランスフェクションし、低濃度NGF投与による伸長活性についての検討を行った。その検討の結果、siRNAによるPTP1B発現抑制した細胞はコントロールの細胞に比べてNGFの感受性が高く、濃度依存的により顕著な神経突起伸長活性が認められた (Fig.3)。以上の結果から、PTP1BはTrkAのリン酸化を抑制することで、その下流である神経突起伸長活性を負に制御していることが確認された。

A



B

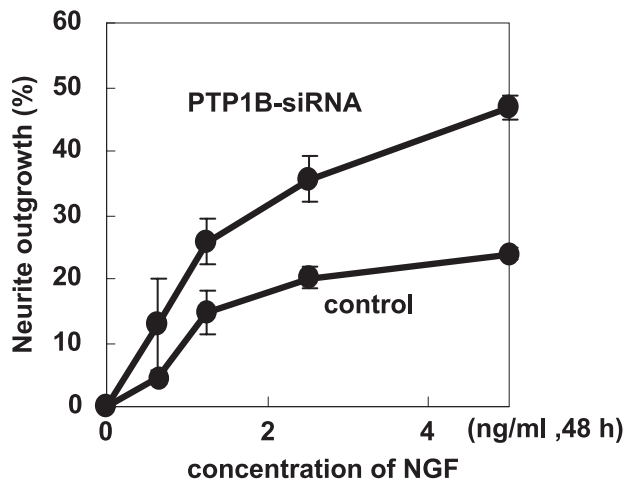


Fig. 3. PTP1BsiRNAによる発現抑制系の検討

(4) PTP1B過剰発現系におけるNGFシグナル伝達への影響

上述の検討からNGF刺激によるPTP1BがTrkAの脱リン酸化酵素であることが証明された。そこで6-HITC処理によるTrkAのリン酸化の持続亢進にもPTP1Bが関与するかどうかについて検討を行うこととした。PTP1BがTrkAのリン酸化とその下流のシグナル伝達に与える影響について解析するために、まずTrkAとPTP1Bを過剰発現させたPC12細胞を用いて、低濃度NGFと6-HITCを投与し、TrkAのリン酸化の経時的变化をウエスタンブロットングで解析した。その結果、コントロールの細胞においてはNGF投与5分後にTrkAの顕著なリン酸化が認められ、リン酸化は60分

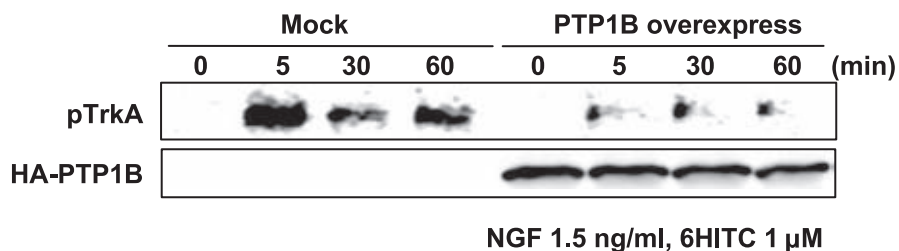
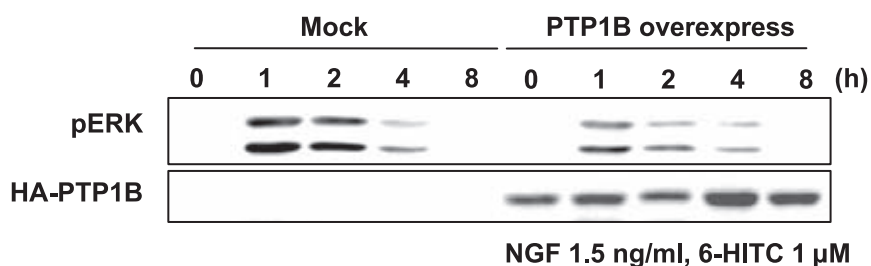
A**B**

Fig. 4. PTP1B過剰発現によるNGFシグナリングの抑制

後まで持続したのに対し、PTP1B過剰発現細胞ではわずかな程度のリン酸化しか認められなかった (Fig. 4A)。次に、その下流に位置するERKのリン酸化と、神経突起伸長についても検討を行った。PTP1Bを一過的過剰発現させたPC12細胞に低濃度NGFと6-HITC同時投与によるERKのリン酸化について検討した結果は、コントロールの細胞に比べてPTP1B過剰発現細胞はERKのリン酸化レベルが抑制されていた (Fig. 4B)。また神経突起伸長活性について、PTP1B安定的過剰発現細胞を用いて検討を行った。低濃度NGF存在下において6-HITCを0-5 μMで投与したところ、コントロールの細胞では6-HITCの濃度依存的に有意な伸長活性が認められたのに対し、PTP1B過剰発現細胞においては6-HITCの濃度依存的な活性ではあるものの、最大濃度である5 μMの6-HITC処理においてもコントロールに比べて約半分の伸長活性であった (Fig. 5)。

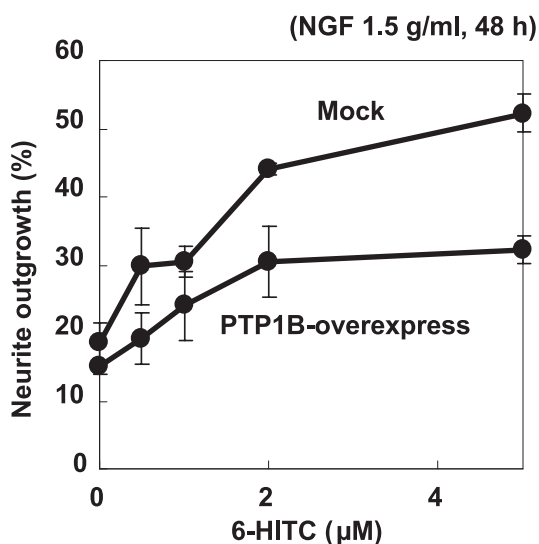


Fig. 5. PTP1B過剰発現による神経突起伸長活性の抑制

以上の検討から、PTP1Bを過剰発現させたときのTrkAのリン酸化、その下流のERKのリン酸化、さらには神経突起伸長活性への影響がNGF処理と同様の結果となり、6-HITC処理においてもPTP1Bがリン酸化TrkAに関与することが確認された。前項までの検討からPTP1BがTrkAのリン酸基を脱リン酸化することが明らかとなったことから推測すると、6-HITCはPTP1Bに何らかの作用をすることでTrkAのリン酸化を持続・亢進させていることが予測できる。

(5) Substrate-trapping法

これまでのPTP1B過剰発現による検討とsiRNAによるPTP1B発現抑制系による検討からPTP1BがTrkAのリン酸化に関与することが明らかとなり、PTP1BがTrkAの脱リン酸化酵素として作用している可能性が予想された。しかし、実際に細胞内でPTP1Bが直接TrkAと相互作用し、脱リン酸化をしているかどうかについての検討がまだ不十分である。そこで次にPTP1BがTrkAのリン酸基と直接相互作用しているかどうかについて検討を行った。その手法としてPTPの特異的基質を免疫沈降やプルダウンで単離するために使われるSubstrate-trapping変異体を用いた。そのSubstrate-trapping変異体の中でも、PTP1Bの活性中心に存在する215番目のシステインをセリンにしたC215S変異体 (PTP1B-C215S)、181番目のアスパラギン酸をアラニンに変えたD181A変異体 (PTP1B-D181A)の2種を用いた。このPTP1B-C215Sは基質が活性中心のポケットに入り込み、WPD loopが上から蓋をする形に変化する。しかし、触媒活性のシステインがセリンに変換され酵素活性が不活のため、step1 (Fig. 6)の反応を開始させることが出来ない。そのため、PTP1B-S215S

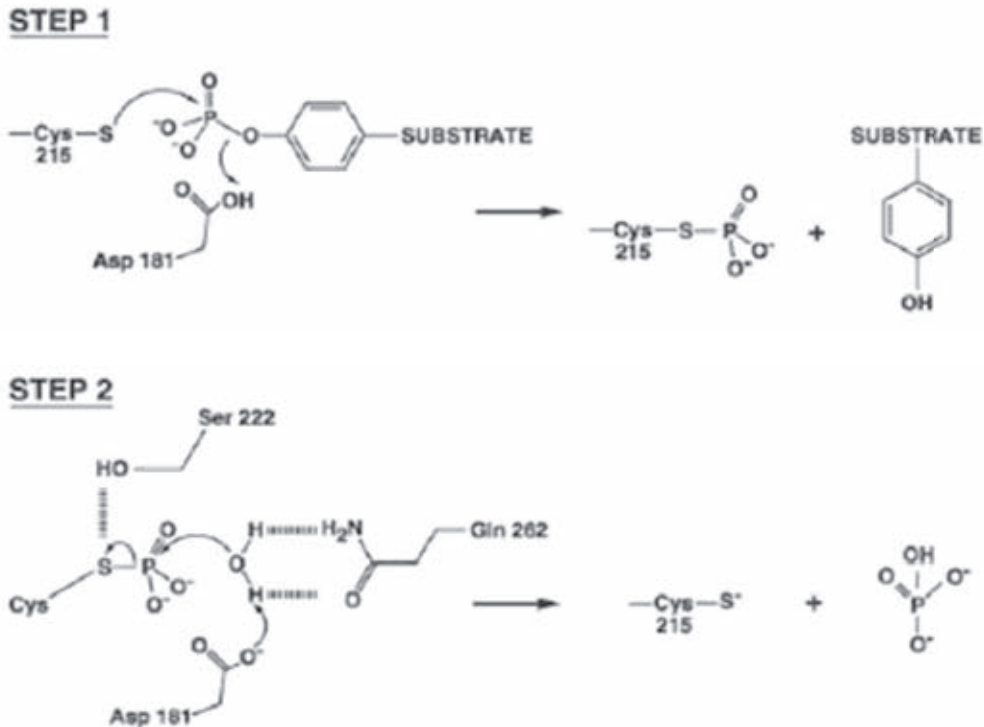


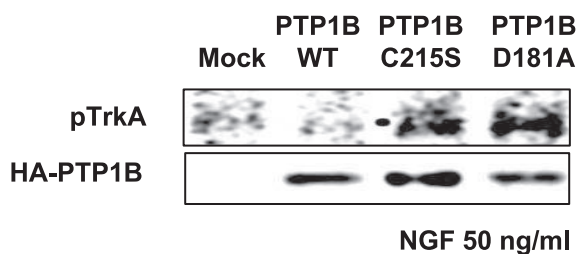
Fig. 6. PTP1Bの脱リン酸化機構

は脱リン酸化を触媒しないが基質がポケットに結合したままの状態となる。またPTP1B-D181Aについては、基質が活性中心のポケットに入り込み結合し、WPD loopが上から蓋をする形に変化する。その後、step1の反応が開始されるが、アスパラギン酸がアラニンに置換されたため、step1の反応が進まず基質が解離できない。そのため脱リン酸化反応を触媒しないが、基質がポケットに結合したままの状態となる変異体である。そのため、このPTP1B-D181Aは基質との結合力がPTP1B-C215Sより強いとされ、より効果的にPTP1Bと基質の複合体を形成して基質分子を単離することができる変異体であるとされている。

(6) TrkA安定的過剰発現細胞へのPTP1Bの一過的過剰発現

まずこれらのHA融合PTP1B発現ベクターを用いてTrkA安定的過剰発現細胞にPTP1Bを一過的に過剰発現させた。その細胞に高濃度NGFを投与し、TrkAのリン酸化について検討した。その結果、WTはコントロールの細胞と比べてTrkAのリン酸化が抑制されているのに対して、PTP1B-C215SとPTP1B-D181Aにおいてはコントロールの細胞と比べてTrkAのリン酸化が更進されていた。つまりPTP1B-C215SやPTP1B-D181Aはドミナントネガティブ変異体として作用をしていることが確認された (Fig. 7)。Fig. 7Bのグラフは3回の独立試行の平均値であり、ウエスタンブロッティングに

A



B

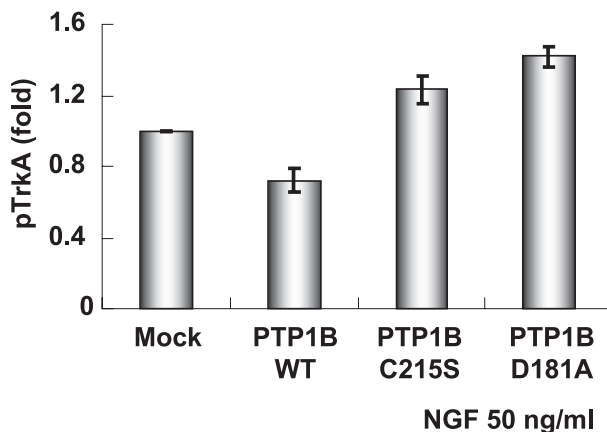


Fig. 7. Substrate trapping変異体によるTrkAのリン酸化

よって得られたコントロールのバンドを1とした時の各バンドの濃さをコントロールと比較したものである。この結果から、TrkAのリン酸化への影響はC215S変異体よりもD181A変異体の方が優れていることが確認できた。このことは上記に示した通り、PTP1B-C215Sに比べてPTP1B-D181Aの方が基質との結合力が優れていることに由来すると考えられる。

(7) TrkA安定的過剰発現細胞へのPTP1B変異体の一過的過剰発現

次に、2種のPTP1B変異体のうち、よりTrkAのリン酸化に影響が確認されたPTP1B-D181Aを用いて検討を行った。プルダウン後の処理の容易さなどの理由から、これより以降の検討ではGST融合PTP1B WTおよびD181Aを用いて検討を行った。まず、上記の検討と同様にGST、GST-PTP1BWT、D181Aを過剰発現させ、リン酸化TrkAへの影響を確認した。その結果、HA融合PTP1Bを用いた時と同様にコントロールの細胞と比べてTrkAのリン酸化が更新され、PTP1B-D181Aがドミナントネガティブ変異体として作用をしていることが確認された(Fig. 8A)。

(8) Substrate-trapping を用いたTrkAとPTP1Bの相互作用の検討

続いて、GST-GSH相互作用を利用したプルダウンをして、PTP1BがTrkAのリン酸基と直接相互作用しているかどうかについて検討を行った。まず、TrkA安定的過剰発現細胞にGST、GST-

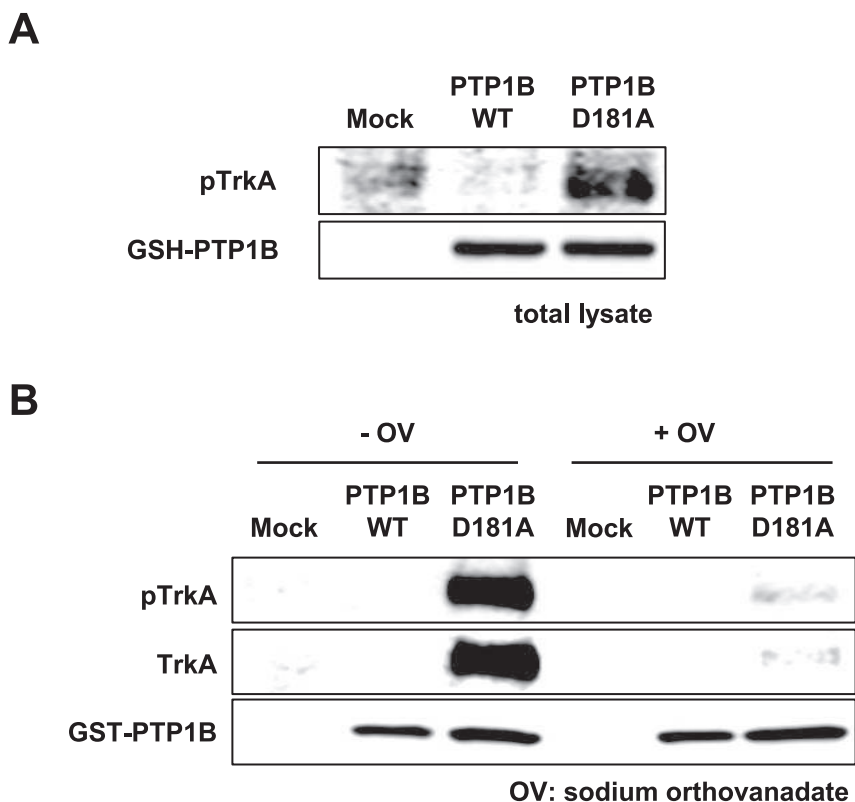


Fig. 8. Substrate trapping変異体による相互作用の検討

PTP1B-WTとD181Aを一過的に過剰発現させ、高濃度NGFを投与した。その後、(+/-) オルトバナジン酸をしたlysis bufferで回収したライセートにGSH-agarose beadsを加えて4℃で4時間振とうした。その後lysis bufferで洗浄し、SDS-PAGEサンプルバッファーを加えて加熱変性後、ウエスタンブロットングを行った。その結果、オルトバナジン酸非存在下においては、コントロールやWTのPTP1Bを過剰発現させた細胞のプルダウンしたサンプルではリン酸化TrkAが認められないのに対して、PTP1B-D181Aを過剰発現させた細胞においてはリン酸化TrkAがPTP1B-D181Aと共沈降していることが確認された (Fig. 8B)。このことより、NGFによりリン酸化されたTrkAとPTP1Bの酵素活性部位が直接相互作用していることが示唆された。一方、オルトバナジン酸存在下においては、オルトバナジン酸非存在下でPTP1B-D181Aと共沈降してくるリン酸化TrkAと比べて、有意に共沈降してくるリン酸化TrkAの量が減少していた。オルトバナジン酸はPTPの基質であるリン酸基とよく似た四面体構造をしており、PTPの活性中心に容易に入り込んで脱リン酸化反応の遷移状態の類似物として働くため、PTPの基質と競合阻害を起こす。その阻害効果のため、オルトバナジン酸存在下においては、PTPの酵素活性部位での基質との相互作用が阻害され、共沈降をしてくる基質の量がオルトバナジン酸非存在下に比べて減少する。つまり、今回の結果のように、オルトバナジン酸非存在下において確認されたリン酸化TrkAとPTP1Bの相互作用がオルトバナジン酸を共存させることで減少していたことから、PTP1Bの酵素活性部位でリン酸化TrkAと相互作用していることが示唆された。また、同時に共沈降しているTrkAの量もリン酸化TrkAと同レベルに減少していたことから酵素活性部での相互作用を裏付けている。以上の結果よりTyr490番目のリン酸化TrkAがPTP1Bの活性部位と直接相互作用していることが明らかとなった。

(9) *in vitro*におけるTrkAの脱リン酸化実験

これまでの検討からPTP1BがTrkAのリン酸化Tyr-490脱リン酸化酵素であることが示唆された。そこで実際にPTP1Bがリン酸化TrkAに対して脱リン酸化作用を有するのか知るために、活性ドメインのリコンビナントPTP1Bを用いて*in vitro*脱リン酸化実験を行うこととした。まず、リン酸化TrkAを多く含むlysateを用意した。そのためには、まず細胞内のPTPの活性を阻害し、PTPによるPTKの制御をさせない状態にするためにTrkA安定的過剰発現細胞にオルトバナジン酸と過酸化水素を前処理した。このオルトバナジン酸と過酸化水素の混合により過オルトバナジン酸が産生され、オルトバナジン酸よりも強く、不可逆的な阻害効果を発揮することが知られている。次に、細胞内のリン酸化レベルを上昇させるために高濃度NGFを投与した。このようにして細胞内のTrkAのリン酸化を引き起こし、その状態を維持させることでリン酸化TrkAが豊富に存在する状態にした。またEDTAを含んだlysis bufferで回収することで前処理に用いたオルトバナジン酸のPTP阻害効果を不活性化させ、さらにIAAを加えることで細胞内に存在する多くのCysteine-Based PTPを不活性化させた。その後、DTTを加えて未反応のIAAを不活性化させた。このようにしてNGF刺激によるTrkAのリン酸化レベルが維持されたlysateに、リコンビナントPTP1Bを任意の時間・濃度で処理した。これらをTrkAのTyr490のリン酸化についてウエスタンブロットングを用いて解析を行った。その結果、60分のコントロールサンプルについては0分のコントロールサンプルと同レベルのTrkAのリン酸化が保持することが確認されたのに対し、PTP1Bを1.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加えたサンプルについては、PTP1Bの処理時間依存的にTrkAのリン酸化が減少した (Fig. 9A)。またリコンビナント

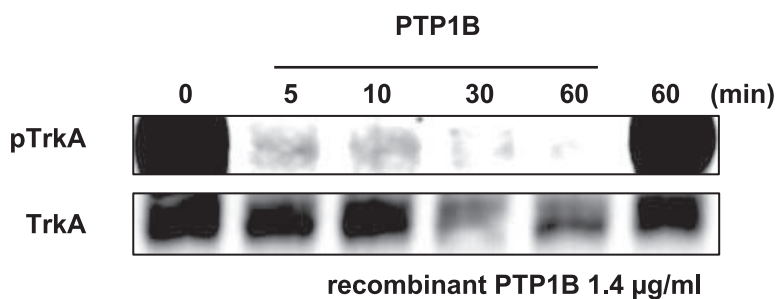
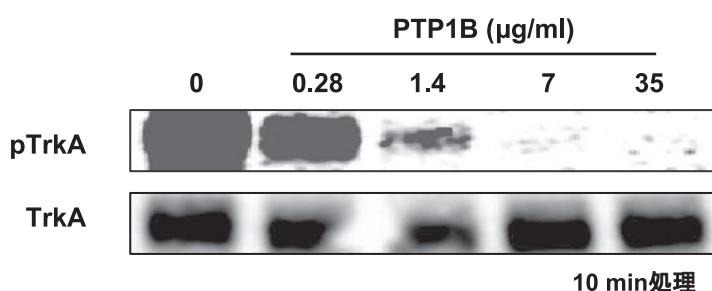
A**B**

Fig. 9. リコンビナントPTP1Bを用いたin vitro脱リン酸化実験

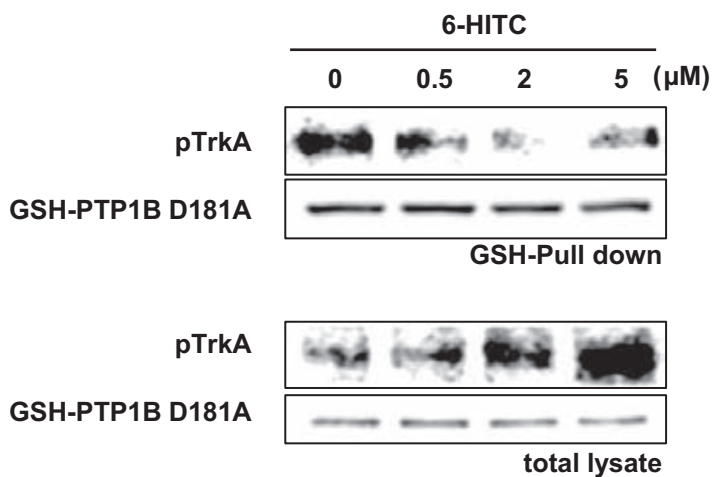
PTP1Bを0-35µg/mlになるように加えたサンプルについては、PTP1Bの処理濃度依存的にリン酸化TrkAが脱リン酸化されていることが確認された (Fig. 9B)。以上のことからin vitroにおいて活性ドメインのリコンビナントPTP1BはTrkAのリン酸化Tyr-490を基質として認識し、脱リン酸化することが確認された。これらのことから、細胞内におけるPTP1BがTrkAのリン酸基を直接脱リン酸化している可能性が示唆された。

(10)6-HITC処理によるTrkAとPTP1Bの相互作用の解析

これまでのSubstrate-trapping変異体を用いた検討などから、NGFの処理によりリン酸化したTrkAがPTP1Bと相互作用していることが明らかとなっている (data not shown)。また、NGFシグナリングと同様に、6-HITC処理によるTrkAのリン酸化にもPTP1Bの関与が示唆された。そこで6-HITC処理によってリン酸化TrkAとPTP1Bの相互作用にどのような影響があるかについて検討した。まず、TrkA安定的過剰発現細胞にPTP1B-D181Aを一過的過剰発現させ、低濃度NGFと6-HITCを任意の濃度で投与した。その後、lysis bufferで回収したlysateにGSH-agarose beadsを加えて4時間振とうした。lysis bufferで洗浄し、SDS-PAGE sample bufferを加えて加熱変性後、ウエスタンブロッティングを行った。その結果、低濃度NGFを単独処理したものに比べて6-HITCを同時処理したサンプルは、6-HITCの濃度依存的にPTP1B-D181Aと共沈降してくるリン酸化TrkAの量が減少した (Fig. 10)。つまり、6-HITCを処理することでPTP1Bとリン酸化TrkAの相互作用する量が減少したことが分かり、6-HITCが何らかの作用をして、PTP1Bとリン酸化TrkAの相互作用

を阻害していることが示唆された。

A



B

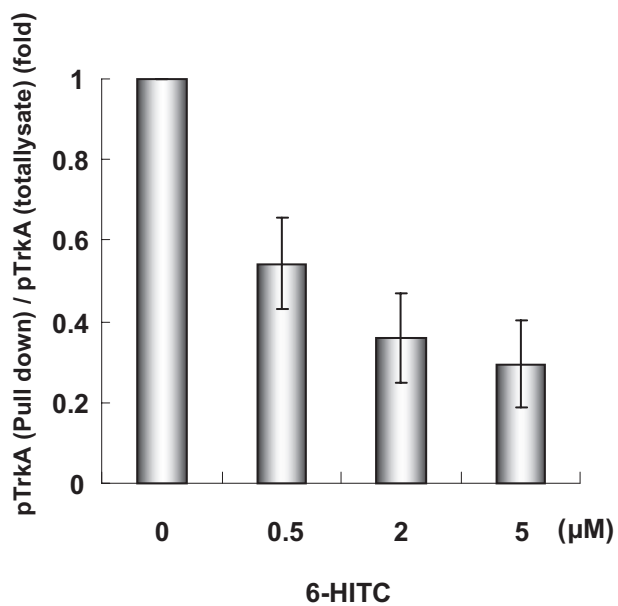


Fig. 10. 6-HITC処理によるPTP1BとTrkAの相互作用の変化

主な発表論文等

1. Shibata, T., Nakahara, H., Kita, N., Matsubara, Y., Han, C., Morimitsu, Y., Iwamoto, N., Kumagai, Y., Nishida, M., Kurose, H., Aoki, N., Ojika, M., and Uchida, K. (2008) A food-derived synergist of NGF signaling: Identification of protein tyrosine phosphatase 1B as a key regulator of NGF receptor-initiated signal transduction. *J. Neurochem.* 170, 1248-1260.
2. Takahashi, N., Mizuno, Y. Kozai, D., Yamamoto, S., Kiyonaka, S., Shibata, T., Uchida, K., and Mori, Y. (2008) Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators. *Channels*, in press.
3. Kawai, K., Nishikawa, T., Shiba, Y., Saito, S., Murota, K., Shibata, N., Kobayashi, M., Kanayama, M., Uchida, K., and Terao, J. (2008) Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: Implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *J. Biol. Chem.* 283, 9424-9434.
4. Kusano, Y., Horie, S., Shibata, T., Satsu, H., Shimizu, M., Hitomi, E., Nishida, M., Kurose, H., Itoh, K., Kobayashi, A., Yamamoto, M., and Uchida, K. (2008) Keap1 regulates the constitutive expression of GST A1 during differentiation of Caco-2 cells via the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Biochemistry* 47, 6169-6177.
5. Iwamoto, N., Sumi, D., Ishii, T., Uchida, K., Cho, A. K., Froines, J. R., and Kumagai, Y. (2007) Chemical knockdown of protein tyrosine phosphatase 1B by 1,2-naphthoquinone through covalent modification causes persistent transactivation of epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 282, 33396-33404.
6. Kobayashi, A., Kang, M.-I., Shibata, T., Uchida, K., and Yamamoto, M. (2006) Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of the Keap1-Clu3 complex. *Mol. Cell. Biol.* 26, 221-229.
7. Shibata, T., Iio, K., Kawai, Y., Shibata, N., Kawaguchi, M., Toi, S., Kobayashi, M., Kobayashi, S., Yamamoto, K., and Uchida, K. (2006) Identification of a lipid peroxidation product as a potential trigger of the p53 pathway. *J. Biol. Chem.* 281, 1196-1204.
8. Vindis, C., Escargueil-Blanc, I., Elbaz, M., Marcheix, B., Grazide, M.-H., Uchida, K., Salvayre, R., and Nègre-Salvayre, A. (2006) Desensitization of platelet-derived growth factor receptor-b by oxidized lipids in vascular cells and atherosclerotic lesions. Prevention by Aldehyde Scavengers. *Circ. Res.* 98, 785-792.

