생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
23(2): 65~72 (1992)

# 세포내 정보전달 저해물질

김 영 호·노 재 섭*
한국과학기술연구원 유전공학연구소·충북대학교 약학대학*

# Inhibitors of Cellular Signal Transduction

Young Ho Kim and Jai-Sup Ro*
KIST, Genetic Engineering Research Institute, Taejon 305-606 and College of Pharmacy, Chungbuk National University*, Cheongju 360-763. Korea

최근 세포증식의 작용기전과 암유전자에 관한 연구의 발달로 암유전자산물의 대부분은 세포증식에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다.[1] 세포의 증식분화에 이상을 나타내는 원인은 증식인자, 수용체, 정보전달계, 핵내전사인자 중의 어느 하나에 이상이 생긴 결과이다. Fig. 1에 암유전자 산물과 증식인자에 의한 세포내 정보전달 과정이 잘 나타나 있으며, 증식인자의 정보전달을 저해하는 선택적인 화합물은 세포증식기구의 해명에 유효한 probe가 되어 새로운 형

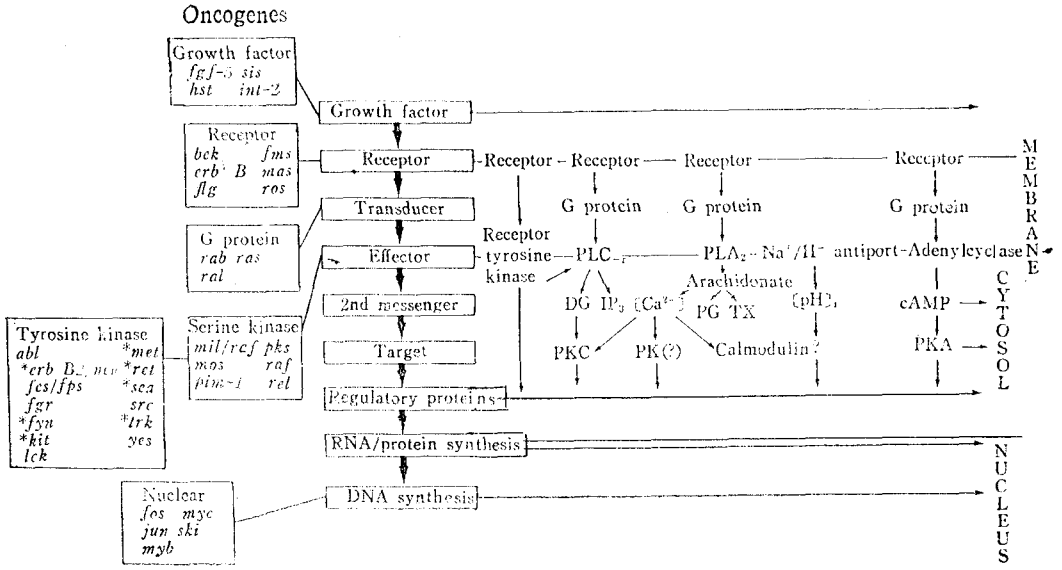



**Fig. 1.** Signalling pathways used by growth factors and oncogene products. The signalling functions of some oncogene products are shown on the left. The receptor oncogenes, except for mas, all encode protein tyrosine kinases. Oncogene tyrosine kinases marked with an asterisk may be receptors but their ligands are currently unknown. PLC-γ, phosphoinositide-specific phospholipase C; $PLA_2$, phospholipase $A_2$; DG, diacylglycerol; $IP_3$, inositol(1, 4, 5) trisphosphate; PKC, protein kinase C; PG, prostaglandin; TX, thromboxane; PKA, protein kinase A. (from Reference 3)

태의 세포성장조절제로 개발될 가능성이 많다.[2]

## 1. 증식인자와 수용체의 결합저해

세포의 정보전달이 저해될 수 있는 가장 초기 단계는 증식인자와 수용체의 상호작용이다. 증식인자는 세포표면 수용체에 작용하여 세포내의 정보전달 과정의 일부를 활성화하여 세포증식을 일으킨다. 증식인자의 신호전달에는 많은 경로가 있기 때문에 신경전달물질이나 hormone과 같은 정상적인 세포성장에 필요한 신호전달 과정은 영향을 주지 않고 선택적으로 증식인자와 oncogene에 의해서 활성화되는 과정을 차단함으로 세포변형을 저해하는 것도 가능하다. 세포증식 인자와 수용체의 결합을 특이적으로 저해하는 물질로는 suramin이 알려져 있다.[3] Suramin은 African trypanosomiasis를 치료하는데 오랫동안 사용해 왔던 약물로서[4], 최근 역전사 효소의 저해작용이 보고되었고[5], 현재 항암제와 AIDS의 치료제로서 임상시험 단계중에 있다.[6] Suramin은 증식인자가 그들의 수용체에 결합하는 것을 차단하며 그 저해활성은 혈소판유래증식인자(PDGF), 섬유아세포증식인자(bFGF)에 각각 $IC_{50}$ 10~50 $\mu$M, 10 $\mu$M의 강한 저해활성을, 상피증식인자(EGF)에는 약한 저해활성($IC_{50}$: 0.5 mM)을 나타내었다.[7] 현재로는 증식인자와 수용체의 결합을 저해하는 화합물이 많이 발견되지 않았으나, ligand를 방사성 label하여 수용체의 결합을 저해하는 recepter binding assay를 이용하면 증식인자와 수용체의 결합을 저해하는 화합물의 개발 가능성은 높다.

## 2. Protein tyrosine kinase의 저해제

상피증식인자(EGF), 혈소판유래증식인자(PDGF), insulin 등의 peptide성 증식인자의 수용체

**Table I.** Inhibitors of protein tyrosine kinase

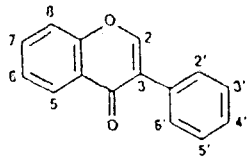
| Compound and site of action | Activity inhibited* | $IC_{50}(\mu M)^+$ | Comments |
|---|---|---|---|
| Binds at ATP site | | | |
| Bioflavonoids | EGF-R, I-R, *src*, *fes*, *fps* | 3~30 | active *in vitro* and *in vivo*, also inhibits topoisomerase II |
| $\alpha$-Hydroxymethyl phosphonates | I-R | 100~200 | active against cells in a prodrug form |
| Lavendustin A | EGF-R | 0.01 | |
| Amiloride | *src* | 50~100 | inhibitor of the $Na^+/H^+$ antiport |
| Binds at peptide site | | | |
| Erbstatins | EGF-R>PAF-R, HL-60 PTK, *src*>I-R | 1~10 | active *in vitro* and *in vivo* but unstable, also inhibits topoisomerases |
| Tyrphostins | EGF-R, PDGF-R>PAF-R ≫I-R | 0.1~10 | active *in vitro*, slow acting, possibly unstable |
| Dihydroxycinnamate | EGF-R | 0.5 | active *in vitro*, unstable |
| Cinnamamides | EGF-R, *fgr*>*src*, *fps* | 1~25 | |
| Piceatannol | p40>*lck* | 15 | |
| Unknown mechanism | | | |
| Herbimycin A | *src*>HL-60 PTK | 12 | active *in vitro*, inhibited by thiol reagents |
| Doxorubicin | *abl*>spleen PTK | 20 | multiple interaction sites on the kinase |
| *Staurosporine* | PDGF-R, I-R >EGF-R, IGF-I-R, *src* | 0.60~0.10 | active *in vitro*, also an inhibitor of PKC |
| Cibacron blue | HL-60 PTK | <10 | a nucleotide analogue |
| Thiazolidinediones | EGF-R | 1~6 | active *in vitro*, toxic *in vivo* |
| Sulfonylbenzoyl-nitrostyroles | EGF-R | 0.5 | active *in vitro* |

* R, growth factor receptor; †against most sensitive species (from Reference 3)

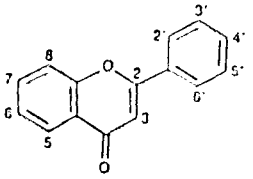
는 protein tyrosine kinase(PTK)영역을 가지며, 그 활성은 ligand가 결합하는 것에 의하여 촉진된다.[8] 상피증식인자 수용체의 tyrosine kinase 저해제로서 erbstatin[9], genistein[10], lavendustin[11] 등이 알려져 있다.

한편 retrovirus 유래의 암유전자와 세포의 변형에 관한 많은 연구 결과로 여러 암유전자산물이 PTK활성을 갖는 것이 밝혀졌다.[12] Rous sarcoma virus 유래의 암유전자 v-*src*는 분자량 약 60K의 단백질을 code하고 있고 최초로 tyrosine kinase 활성의 존재가 증명된 암유전자이다. 암유전자 v-*src*으로 변형된 세포의 증식을 억제하여 정상으로 회복시키는 활성화합물로 hervimycin A가 발견되었다.[13] 많은 암유전자 산물(pp60$^{v-src}$, p90$^{gag-yes}$, p140$^{gag-fos}$, p120$^{gag-abl}$)은 tyrosine kinase 활성을 가지며, ATP의 γ-phosphate를 기질 단백질의 phenolic hydroxyl기로 옮겨준다. Phosphotransferase 활성의 발현은 세포의 변형된 형질 유지에 절대적으로 필요하며, 이러한 virus로 감염된 세포는 tyrosine의 인산화 정도가 상승되어 있다.[14] 정상적인 세포에서도 virus의 암유전자 산물에 homologue한 PTK가 존재함으로[15], PTK는 정상세포의 성장과 분화에도 중요한 역할을 한다고 생각되어진다. Retrovirus 유래의 암유전자에 의한 세포변형이나, polypeptide 증식인자에 의한 세포증식과 tyrosine의 인산화가 증가되는 관계는 세포성장의 조절에 있어서 PTK가 결정적인 역할을 한

**Table II.** Effect of flavonoids on protein-tyrosine kinase activity of EGF receptor[a]



| Compound | Position | | | | | $IC_{50}$(μg/ml) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 2 | 5 | 7 | 3′ | 4′ | PKI | RSV-3Y1 |
| Genistein | — | OH | OH | — | OH | 0.7 | 7.0 |
| Prunetin | — | OH | $OCH_3$ | — | OH | 4.2 | 25.0 |
| Daidzein | — | — | OH | — | OH | >100 | 25.0 |
| Biochanin A | — | OH | OH | — | $OCH_3$ | 26.0 | 18.0 |
| Genistin | — | OH | Glucose | — | OH | >100 | >100 |



| Compound | Position | | | | | $IC_{50}$(μg/ml) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 2 | 5 | 7 | 3′ | 4′ | PKI | RSV-3Y1 |
| Apigenin | — | OH | OH | — | OH | 25.0 | 11.0 |
| Acacetin | — | OH | OH | — | $OCH_3$ | 40.0 | 24.0 |
| Flavone | — | — | — | — | — | 50.0 | 7.0 |
| Kaempferol | OH | OH | OH | — | OH | 3.2 | 14.0 |
| Quercetin | OH | OH | OH | OH | OH | 5.0 | 12.0 |

[a] Protein kinase inhibition (PKI). RSV, Rous sarcoma virus (from Reference 18)

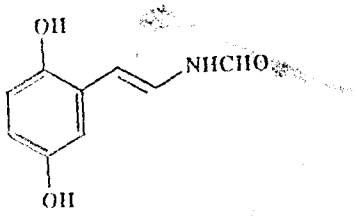
다는 것을 의미한다. 따라서 이러한 활성저해는 세포성장의 조절에 중요한 target이 되어 PTK의 저해제를 개발하려는 많은 노력이 기울여졌다. 현재까지 알려진 PTK의 저해제가 작용부위 별로 Table Ⅰ에 요약되어 있다.

### 2.1. Bioflavonoid

Bioflavonoid는 PTKs와 ATP의 결합을 경쟁적으로 저해한다. 가장 많이 연구된 이 group에는 genistein, quercetin, myricetin이 있다. Genistein은 *Pseudomonas*의 배양액으로부터 분리된 PTK의 저해제로서[16], *in vitro*에서 EGF receptor와 $pp60^{v-src}$, $pp110^{gag-fos}$의 tyrosine kinase활성을 저해하나, cAMP-dependent protein kinase와 protein kinase C, phospholylase kinase, 5′-nucleotidase 등은 거의 저해하지 않았으며, A431 세포를 이용한 *in vivo* 실험에서도 세포내의 phosphotyrosine level의 상승을 저해하였다.[17] Quercetin 역시 강력한 tyrosine kinase의 저해제이나 cAMP-dependent protein kinase나 protein kinase C, phosphorylase kinase 등의 효소에도 비특이적인 저해활성을 나타내었다. Table Ⅱ에서 보는 것처럼 구조활성 연구에 의하면 PTK에 대한 저해효과는 flavonoid의 A ring의 5번 위치에 hydroxyl group의 존재유무가 저해활성에 중요하였으며, A ring의 7번과 B ring의 4′번의 hydroxyl기도 저해활성과 밀접한 관련이 있었다.[18] Bioflavonoid의 PTK 저해활성과 세포 증식과는 밀접한 관련성은 없는 것으로 밝혀졌으나, 이러한 화합물들은 세포기능의 조절이나 PTK의 작용을 연구하는 생물학적 probe로 이용될 수 있다.

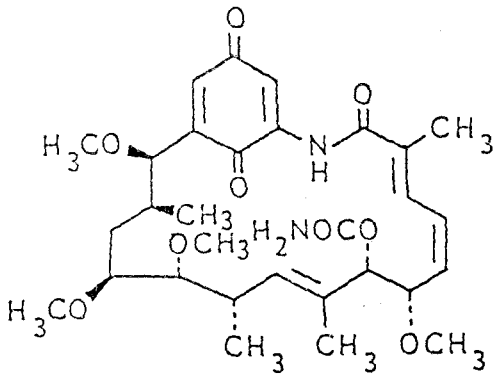
### 2.2. Erbstatin

Erbstatin은 상피증식인자 수용체 tyrosine krinase의 저해제 ($IC_{50}$: 0.55 μg/ml)로서, *Streptomyces* MH435-hF3의 배양액에서 분리되었다.[19] 이 화합물은 PKC에 대해서는 고농도에서도 저해활성을 나타내지 않았고 PKA와 phosphatidylinositol kinase에 대해서는 미약한 저해활성을 나타내었다.[20] Erbstatin의 저해양식은 ATP와 경쟁하는 genistein이나 orobol과는 달리 기질 peptide와는 길항적으로, ATP와는 비길항적으로 작용하는 특징을 나타내었다.[21] Erbstatin은 calf serum에서 쉽게 불활성화되기 때문에, 여러 안정한 erbstatin의 유도체를 합성하려는 노력의 결과 methyl 2,5-dihydroxycinnamate가 합성되었다.[22] 이 유도체는 4배 이상의 안정성을 보여주었고, 상피증식인자 수용체 tyrosine kinase에 대해서도 강한 저해활성 ($IC_{50}$: 0.15 μg/ml)을 나타내었다.




### 2.3. Hervimycin A

Hervimycin A는 benzoquinoid ansamycin계 항생제로서 방선균의 배양액에서 제초활성을 가진 화합물로 처음 분리된 후[23] v-*src* oncogene의 발현에 의한 변형된 형질을 정상적인 형태로 복귀시키는 활성화합물로 재분리되었다.[24] Hervimycin A의 작용부위는 *src* 유전자 산물인 $p60^{v-src}$이거나 tyrosine의 인산화가 형태변화를 유도하는 과정의 upstream 부위일 것으로 생각되어진다. Herbimycin A는 *src*, *yes*, *fps*, *ros*, *abl*, *erb*B와 같은 oncogenes에 의해서 변형된 세포형태를 정상으로 회복시키는 활성을 나타내었으나, *ras*, *myc*, serine/threonine kinase *raf* 등에 의해 변형된 형태에 대해서는 활성을 나타내지 않음으로 선택적인 저해활성을 보여주었다.[25]




## 3. Protein kinase C의 저해제

$Ca^{++}$, phospholipid-dependent protein kinase

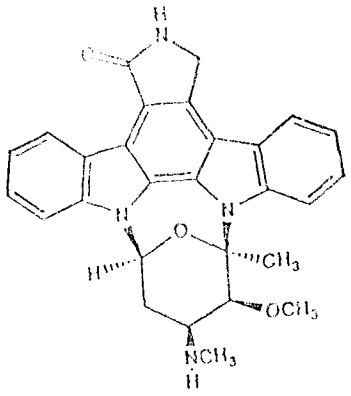
(protein kinase C, PKC)는 세포 성장과 분화, 종양형성 등을 포함한 많은 세포내의 기능을 조절하는 protein-serine/threonine kinase이다.[26] PKC의 기본적인 구조는 기질 단백질이나 ATP가 결합하는 catalytic domain과 phospholipid나 diacylglycerol(DAG), phorbol ester 등이 결합하는 regulatory domain으로 구성되어 있다.[27] PKC는 phospholipase C의 작용으로 phosphoinositides의 가수분해로 생성된 DAG에 의해서 활성화된다.[28] 한편 tumor promotor인 phorbol esters와 그 관련 화합물들은 DAG과 경쟁적으로 세포막에 intercalation하여 PKC를 직접적으로 활성화하며, phorbol ester의 다양한 생물활성은 PKC의 중계역할에 기인한다고 생각된다.[29] 1986년 이후 PKC는 복수의 분자군으로 되어 있다는 것이 밝혀졌고, 이들은 조직이나 세포분포, 활성화기구, 촉매작용도 차이가 있어 조직이나 세포에 따라 PKC의 기능이 다를 것으로 추정되어[30] 다른 cellular process에는 영향을 주지 않고 암세포의 성장만 선택적으로 저해하는 화합물이 개발될 가능성은 높다. PKC의 저해제로서 천연물에서 보고된 화합물을 Table Ⅲ에 나타내었으며, 몇몇 대표적인 화합물을 소개하면 다음과 같다.

**Table III.** Inhibitors of protein kinase C

| Site of action | Compound | $IC_{50}$($\mu$M) |
|---|---|---|
| Catalytic domain | staurosporine | 0.0027 |
| | UCN-01 | 0.0041 |
| | UCN-02 | 0.062 |
| | K252a | 0.02 |
| | sangivamycin | 11 |
| Regulatory domain | calphostin C | 0.05 |
| | polymyxin | 10 |
| | adriamycin | 50 |
| | tamoxifen | 50～250 |

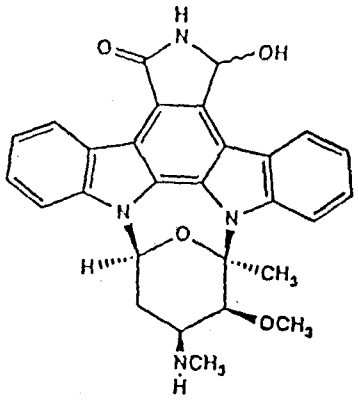
### 3.1. Staurosporine

Staurosporine은 방선균으로부터 분리된 indolo-[2,3-a]carbazole chromophore를 가지고 있는 alkaloid 화합물로 항진균 작용과 혈압강하 작용이 있는 화합물로 처음으로 보고되었다.[31] Staurosporine은 현재까지 알려진 화합물 중에서 *in vitro*에서 가장 강력한 PKC의 저해활성($IC_{50}$ : 2.7 nM)을 나타내었으며, PKA($IC_{50}$ : 8.2 nM), $p60^{v-src}$ PTK($IC_{50}$ : 6.4 nM), EGF receptor PTK ($IC_{50}$ : 630 nM) 등의 tyrosine kinase에도 저해활성을 나타내었으나[32,33], *in vivo*에서는 항암효과를 나타내지 않았다. Staurosporine은 [$^3$H] phorbol dibutyrate의 결합에 영향을 주지 않는 것으로 보아 PKC의 catalytic domain을 target으로 함을 알수 있다. Staurosporine의 여러 포유동물의 세포에 대한 독성($IC_{50}$ : Hela S3 cells <3nM, MCF cells 90 nM)과 분화 유도[34], 혈소판과 평활근에 대한 작용[35,36] 등도 PKC의 저해활성에 기인할 것으로 추정된다.



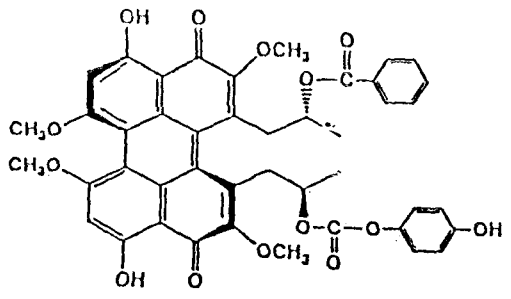
### 3.2. UCN-01과 UCN-02

UCN-01과 UCN-02는 staurosporine을 생산하는 *Streptomyces* sp. No. 126의 배양액에서 발견되었고[37], staurosporine과의 차이점은 C-7의 위치에 hydroxyl기를 가지고 있는 점이며 각각은 입체이성체이다. UCN-01은 PKC($IC_{50}$ : 4.1 nM), PKA($IC_{50}$ : 42 nM), $p60^{v-src}$ PTK($IC_{50}$ : 45 nM)에 대하여 저해활성을 나타내었고, Hela ($IC_{50}$: 230 nM), MCF세포($IC_{50}$: 310 nM) 등의 포유동물 세포에 강한 독성을 나타내었다. UCN-02는 PKC($IC_{50}$ : 62 nM), PKA($IC_{50}$ : 250 nM)에 대하여 UCN-01보다 상대적으로 낮은 저해활성을 보임으로 C-7의 입체배치에 따른 활성의 차이를 보여주었다. 특히 UCN-01은 staurosporine과는 달리 oncogene에 의해 형질변형된 세포를 포함해서 P388 murine leukemia와 같은 ***in vivo*** model에서 항암효과를 나타내었다.[38]



### 3.3. Calphostin C

Calphostin과 그 유도체들은 진균인 *Cladosporium cladosporioides*의 배양액에서 분리되었으며[39], calphostin의 유도체 중에서 calphostin C가 생물학적 활성이 가장 강하였다. Calphostin C는 0.05 μM에서 PKC에 대한 $IC_{50}$를 나타내었으나, PKA와 p60 v-*src*의 PTK에 대해서는 50 μM에서도 저해활성을 보이지 않음으로서, PKC에 대한 특이적이고 강력한 저해제임을 암시하였다.[40] 더욱이 calphostin C는 PKC의 catalytic domain을 저해하지 않고, [$^3$H]phorbol dibutylate의 결합을 부분적으로 저해하는 것으로 보아 regulatory domain에 작용하는 PKC의 specific한 저해제이다. Calphostin C는 포유동물 세포의 성장에 독성효과($IC_{50}$ : 0.23 μM/Hela S3 cells, 0.18 μM/MCF-7 cells)를 나타내었으며, *in vitro*에서 DNA와 작용하지 않음으로서 calphostin C의 항세포활성은 PKC의 저해작용에 기인함을 암시하였다.

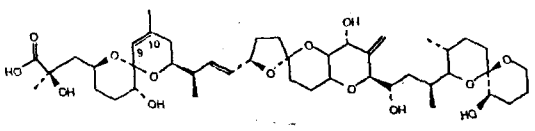


## 4. Protein phosphatase의 저해제

세포내 정보전달에는 단백질의 인산화와 함께 탈인산화도 중요하다는 것이 알려졌다. 단백질의 serine/threonine에 결합하고 있는 인산기를 탈인산화하는 phosphatases(PPs)는 glycogen이나 지방산 합성 등의 체내 대사 조절뿐만 아니라, 세포증식 조절에도 관여한다.[41] PPs는 catalytic subunit의 성질과 저해제에 대한 감수성에 따라 몇몇 형태로 분류된다(PP1, PP2A, PP2B, PP2C 등).[42] 이러한 PPs는 포유동물의 여러 조직에 널리 분포하고 있는 것으로 보아, 세포기능의 조절에 깊이 관여하고 있음을 알 수 있다.[43] 이와 더불어 tyrosine에 결합하고 있는 인산기를 탈인산화하는 protein tyrosine phosphatase(PTPase)도 알려져 있다. 이들은 세포 증식에 관여하는 정보전달의 초기단계에 작용하여 동물세포의 형태변화나, insulin 작용, 혈소판 활성화와 같은 세포기능의 조절에도 관여할 것으로 생각되며, 이들의 아미노산 배열은 PPs와는 다른 homology를 보임으로 그 자체의 독특한 기능을 갖고 있을 것으로 추정된다.[44] 단백질의 인산화 정도는 kinase와 phosphatase의 상대적인 활성에 좌우됨으로 이들의 활성을 조절하는 화합물은 세포내 정보전달과 세포 증식을 조절하는 것이 가능하다.

### 4.1. Okadaic acid

Okadaic acid는 black sponge인 *Harichondria okadaii*로부터 분리된 marine toxin으로, 많은 polyether linkage를 가진 복잡한 지방산 유도체이다.[45] 이 화합물은 급성 설사를 일으킬뿐만 아니라, mouse skin bioassay에서 tumor promoter로서 작용하였으나 PKC는 활성화 하지 않았으며[46], protein phosphatase 1($IC_{50}$ : 10 nM)과 protein phosphatase 2A($IC_{50}$ : 0.1 nM)를 저해하였다.[47] Phosphatase의 중요성이 널리 인식된데 반해 상대적으로 많은 연구의 진전이 없었던 것은 그동안 저해제가 많이 밝혀지지 않은 이유도 있다. Okadaic acid의 발견 이후, 이 분야의 연구가 급속히 발전하였으며, 이러한 phosphatase 저해제의 개발은 앞으로 세포내의 신호전달과



세포의 증식을 조절하는 활성물질로서의 역할뿐만 아니라 세포의 작용기전 연구에도 크게 기여할 것으로 기대된다.

## 5. 그 외의 정보전달 저해제

세포의 정보전달에 중요한 요소로서 앞에서 열거한 것 외에 세포막상의 수용체와 세포질인자와의 가교역할을 하는 G 단백질이 알려져 있다. 정보전달에 중요한 역할을 하는 G 단백질의 일종으로 암유전자 *ras*의 산물이 알려져 있으며, *ras*로 변형된 세포의 형태를 정상으로 복귀시키는 화합물도 세포증식에 관여할 것으로 생각된다.[48] $Ca^{++}$은 세포내 정보 전달에 중요한 역할을 담당하고 있으며 그 세포내 농도는 calmodulin 등의 $Ca^{++}$ 결합단백질에 의하여 제어됨으로 calmodulin의 저해제를 찾으려는 노력도 계속되고 있다.[49] Phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphate를 가수분해하여 inositol 1,4,5-triphosphate와 diacylglycerol을 만드는 phosphoinositide-specific phospholipase C의 저해제도 세포 기능에 영향을 줄 것으로 기대된다.[50] 세포막의 수용체에 도달된 증식 신호는 최종적으로 세포핵에 도달해서 DNA합성을 자극한다. c-*fos*, c-*myc*, v-*jun* 등의 유전자 산물은 핵에서 세포의 증식, 분화의 스위치 역할을 한다고 추정되어, 이러한 유전자를 표적으로한 저해제의 탐색도 가능성이 높다.[51] 한편 암유전자에 의해서 변형된 세포의 형태를 정상형태로 복귀시키는 것을 지표로 한 스크리닝에서도 몇몇 화합물이 발견되었으며[52], 상세한 작용기전은 밝혀지지 않았지만 세포의 증식 및 분화에 관여할 것으로 추정되어 좋은 target이 되고 있다.

## 문 헌


1. Goustin, A.S., Leof, E.B., Shipley, G.D. and Moses, H.: *Cancer Res.* **46**, 1015 (1986).
2. Osada, H.: *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **65**, 1735 (1991).
3. Powis, G.: *TIPS* **12**, 188 (1991).
4. Seewald, M.J., Olsen, R.A. and Powis, G.: *Cancer Lett.* **49**, 107 (1989).
5. Jentsch, K.T., Hunsmann, G., Hartmann, H. and Nickel, P.: *J. Gen. Vilol.* **68**, 2183 (1987).
6. Stein, C.A., LaRocca, R.V., Thomas, R., McAtee, N. and Myers, C.E.: *J. Clin. Oncol.* **1**, 499 (1989).
7. Seewald, M.J., Schlager, J.J., Olsen, R.A., Melder D.C. and Powis G.: *Cancer Commun.* **1**, 151 (1989).
8. Osada, H. and Isono, K.: *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **63**, 56 (1989).
9. Umezawa, H., Imoto, M., Sawa, T., Isshiki, K., Matsuda, N., Uchida, T., Iinuma, H., Hamada, M. and Takeuchi, T.: *J. Antibiot.* **39**, 170 (1986).
10. Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S.-I., Itoh, N., Shibuya, M. and Fukami, Y.: *J. Biol. Chem.* **262**, 5592 (1987).
11. Onoda, T., Iinuma, H., Sasaki, Y., Hamada, M., Isshiki, K., Naganawa, H., Takeuchi, T., Tatsuta, K., Umezawa, K.: *J. Nat. Prod.* **52**, 1252 (1989).
12. Hunter, T. and Cooper, J.A.: *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 897 (1985).
13. Uehara, Y., Murakami, Y., Mizuno, S. and Kawai, S.: *Virology* **164**, 294 (1988).
14. Sefton, B.M., Hunter, T., Beemon, K. and Eckhart, W.: *Cell* **20**, 807 (1980).
15. Bishop, J.M.: *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 301 (1983).
16. Ogawara, H., Akiyama, T., Ishida, J., Watanabe, S.-I. and Suzuki, K.-I.: *J. Antibiot.* **39**, 606 (1986).
17. Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S.-I., Itoh, N., Shibuya, M. and Fukumi, Y.: *J. Biol. Chem.* **262**, 5592 (1987).
18. Ogawara, H., Akiyama, T., Watanabe, S.-I., Ito, N., Kobori, M. and Seoda, Y.: *J. Antibiot.* **42**, 340 (1989).
19. Umezawa, H., Imoto M., Sawa T., Isshiki, K., Matsuda, N., Uchida, T., Iinuma, H., Hamada, M. and Takeuchi, T.: *J. Antibiot.* **39**, 170 (1986).
20. Hunter, T. and Sefton, B.M.: Methods in Enzymology, Vol. 200, Academic Press, Inc., pp. 379-385 (1991).

21. Imoto, M., Umezawa, K., Isshiki, K., Kunimoto, S., Sawa, T., Takeuchi, T. and Umezawa, H.: *J. Antibiot.* **40**, 1471 (1987).
22. Umezawa, K., Hori, T., Tajima, H., Imoto, M., Isshiki, K. and Takeuchi, T.: *FEBS Lett.* **260**, 198 (1987).
23. Omura, S., Iwai, Y., Takahashi, Y., Sadakane, N., Nakagawa, A., Oiwa, H., Hasegawa, Y. and Ikai, T.: *J. Antibiot.* **32**, 255 (1979).
24. Uehara, Y., Hori, M., Takeuchi, T. and Umezawa, H.: *Jpn. J. Cancer. Res.* (Gann) **76**, 672 (1985).
25. Uehara, Y., Murakami, Y., Mizuno, S. and Kawai, S.: *Virology* **164**, 294 (1988).
26. Nishizuka, Y.: *Science* **233**, 305 (1986).
27. Nishizuka, Y.: *Nature* **334**, 661 (1988).
28. Berridge, M.J.: *Biochem. J.* **220**, 345 (1984).
29. Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y.: *J. Biol. Chem.* **257**, 7847 (1982).
30. Kikkawa, U., Kishimoto, A. and Nishizuka, Y.: *Ann. Rev. Biochem.* **58**, 31 (1989).
31. Omura, S., Iwai, Y., Hirano, A., Nakagawa, A., Awaya, J., Tsuchiya, H., Takahashi, Y. and Masuma, R.: *J. Antibiot.* **30**, 275 (1977).
32. Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M. and Tomita, F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **135**, 397 (1986).
33. Nakano, H., Kobayashi, E., Takahashi, I., Tamaoki, T., Kuzuu, Y. and Iba, H.: *J. Antibiot.* **40**, 706 (1987).
34. Sako, T., Tauber, A.I., Jeng, A.Y., Yuspa, S.H. and Blumberg, P.M.: *Cancer Res.* **48**, 4646 (1988).
35. Watson, S.P., McNally, J., Shipman, L.J. and Godfrey, P.P.: *Biochem. J.* **249**, 345 (1988).
36. Matsumoto, H. and Sasaki, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **158**, 105 (1989).
37. Takahashi, I., Saitoh, Y., Yoshida, M., Sano, H., Nakano, H., Morimoto, M. and Tamaoki, T.: *J. Antibiot.* **42**, 571 (1989).
38. Takahashi, I., Kobayashi, E., Asano, K., Yoshida, M. and Nakano, H.: *J. Antibiot.* **40**, 1782 (1987).
39. Kobayashi, E., Ando, K., Nakano, H., Iida T., Ohno, H., Morimoto, M. and Tamaoki, T.: *J. Antibiot.* **42**, 1470 (1989).
40. Kobayashi, E., Nakano, H., Morimoto, M. and Tamaoki, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 548 (1989).
41. Cohen, P.: *Ann. Rev. Biochem.* **58**, 453 (1989).
42. Ingebritsen, T.S. and Cohen, P.: *Science* **221**, 331 (1983).
43. Cohen, P., Holmes, C.F.B. and Tsukitani, Y.: *Trends Biochem. Sci.* **15**, 98 (1990).
44. Golden, A., Nemeth, S.P. and Brugge, J.S.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. **83**, 852 (1986).
45. Tachibana, K., Scheuer, J., Tsukitani, Y., Kikuchi, H., Van Enden, D., Clardy, J., Gopichand, Y. and Schmitz, J.: *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 2469 (1981).
46. Suganuma, M., Fujiki, H., Suguri, H., Yoshizawa, S., Hirota, M., Nakayasu, M., Ojika, K., Wakamatsu, K., Yamado, K. and Sugimura, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. **85**, 1768 (1988).
47. Bialojan, C. and Takai, A.: *Biochem. J.* **256**, 283 (1988).
48. S.-Tsuchiya, K., Moriya, Y., Yamazaki, K., Hori, M., Hosogawa, N., Sawa, T., Iinuma, H., Naganawa, H., Imada, C. and Hamada, M.: *J. Antibiot.* **43**, 1489 (1990).
49. Matsuda, Y., Asano, K., Kawamoto, I. and Kase, H.: *J. Antibiot.* **40**, 1092 (1987).
50. Gabev, E., Kasianowicz, J., Abbott, T. and McLaughlin, S.: *Biochim. Biophys. Acta* **979**, 105 (1989).
51. Kelly, K., Cochran, B.H., Stiles, C.D. and Leder, P.: *Cell* **35**, 603 (1983).
52. Itazaki, H., Nagashima, K., Sugita, K., Yoshida, H., Kawamura, Y., Yasuda, Y., Matsumoto, K., Ishii, K., Uotani, N., Nakai, H., Terui, A., Yoshimatsu, S., Ikenishi, Y. and Nakagawa, Y.: *J. Antibiot.* **43**, 1524 (1990).