

ギャップ結合構築に関わる新規タンパク質  
CIP150 の同定とその機能解析

秋山 元英

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 細胞増殖学講座

(竹家 達夫 教授)

平成 17 年 7 月 22 日提出

## 目次

序論	3
ギャップ結合とコネクシン	
ギャップ結合の多様性	
ギャップ結合が関わる生命現象と疾患	
卵胞発育におけるギャップ結合	
コネクシン 43 のライフサイクル	
コネクシン 43 によるギャップ結合の制御機構	
コネクシン 43 の制御機構	
本研究の要約	
材料と方法	17
結果	23
コネクシン 43 会合タンパク質の探索	
新規タンパク質 CIP150 の同定	
CIP150 は細胞内において Cx43 と会合する	
コネクシン 43 のリン酸化は CIP150 との会合に必須ではない	
コネクシン 43 C 末端領域における CIP150 結合領域の決定	
CIP150 結合領域はコネクシン 43 のギャップ結合構築に重要である	
siRNA による CIP150 の発現抑制はコネクシン 43 の細胞膜への局在 とチャネル活性を減少する	
考察	46
謝辞	54
参考文献	55

## 序論

### ギャップ結合とコネクシン

哺乳動物において、隣接した細胞は主として密着結合、接着結合、ギャップ結合という役割の全く異なった 3 種類の様式で結合している。この中で、ギャップ結合は隣接する細胞間での物質の伝達、交換を可能にし、組織の形態形成や機能、細胞の分化、増殖など様々な生命現象に関わることが報告されている。ギャップ結合発見の歴史は、1960 年代に神経や心筋などにおける細胞間での電気信号の伝達、色素などの低分子量物質の移行が観察されたことに始まるが (Kanno and Loewenstein, 1964a, b)、その実体は不明とされていた。一方、1967 年に電子顕微鏡観察で、組織において隣接する細胞の細胞膜同士が約 2-4 nm 幅という狭い隙間 (ギャップ) 構造をとった細胞接着構造が観察されていた。その後、肝臓のギャップ構造体を含む画分より分子量 28 と 21kDa のタンパク質が、次いで心臓より 43kDa のタンパク質が精製された。その後、これらのタンパク質をコードする cDNA がクローニングされ、その発現依存的なギャップ結合チャネルの形成が確認された (Paul, 1986)。このようにクローニングされた cDNA がコードするものが、ギャップ結合構成タンパク質のコネクシンである。これまでにコネクシン遺伝子は、ヒトで 20、マウスで 19 種類が確認されている (Willecke *et al.*, 2002)。コネクシンの命名法には、コネクシン 43 (Cx43) のようにタンパク質の分子量をもとにしたものと、アミノ酸配列の相同性によって、*α*、*β*、*γ* の 3 つのグループに分け、同定された順番に命名していくものがある。近年発見されたコネクシン (Cx29、Cx36 など) が、*α*、*β*、*γ* のどのグループにも当てはまらないことや、簡便性の面から前者が用いられることが多い。

コネクシンは 4 回膜貫通型の膜タンパク質であり、細胞内 N 末端および C 末端、2 つ細胞外ループ、1 つの細胞内ループ領域を有する (Goodenough *et al.*, 1996; Yeager *et al.*, 1998; Evans *et al.*, 1999; 参考図 1 A)。ギャップ結合チャネルは、コネクシンが細胞膜への輸送過程において 6 量体 (コネクソン) を形成し、コネクソンが数十から数千集合したヘミチャネルが隣接する細胞間で連結することで構築される (Beyer *et al.*, 1990; Unger *et al.*, 1999; 参考図 1 B)。コネクソンの中心に形成される親水性の微小孔は、その直径が約 1.5 nm であり、これを介してイオンや cAMP、イノシトール 3 リン酸、糖、アミノ酸、ヌクレオチドなど分子量約 1kD 以下の低分子物質が拡散する (Bruzzone *et al.*, 1996a, b; Kumar and Gilula, 1996)。3 番目の膜貫通領域は、*α*-ヘリックス

スを形成したとき親水性と疎水性の表面を持つことが予想されており、親水性表面がコネクソン中心の微小孔内面を構成していると考えられている。また、ファミリー間において、膜貫通および細胞外ループ領域において比較的相同性が高く、特に2つの細胞外ループ領域にそれぞれ3個ずつ存在するシステイン残基は、ファミリー間に例外なく保存されている。ループ間では、このシステイン残基において分子内ジスルフィド結合が形成されており、コネクソン間の連結に関与すると考えられている (Toyofuku *et al.*, 1998b)。これに対し細胞内ループ領域とC末端領域は、ファミリー間で相同性が低く長さも異なることから、それぞれのコネクシン特有の機能に重要な働きをされると考えられている (Bruzzone *et al.*, 1996a, b)。

## ギャップ結合の多様性

コネクシンは、ファミリー間で組織特異的な発現は見られるものの、ほとんどの器官や臓器の細胞では、1種類以上のコネクシンが同時に発現しており (Bruzzone *et al.*, 1996b)、複数のコネクシンによるギャップ結合の構築が可能なことも知られている。例えば、Cx43とCx40 (He *et al.*, 1999)、Cx43とCx45 (Martinez *et al.*, 2002)、Cx26とCx32 (Falk, 2000a) など異なるコネクシンがコネクソンを形成すること、またCx43からなるコネクソンとCx46からなるコネクソンがギャップ結合を構築することなどが報告されている (White *et al.*, 1994)。つまり、コネクソンを構成しているコネクシンがホモまたはヘテロの場合、細胞間でのコネクソンの連結がホモまたはヘテロの場合、それぞれの組合せで4種類のモデルが考えられる (Bruzzone *et al.*, 1996a,b; Simon and Goodenough, 1998; 参考図2)。このように、コネクシンファミリーは多数存在する上に、様々な組み合わせによりギャップ結合を構築する。

この多様性の意義は不明な点が残されているが、ギャップ結合を構成するコネクシンの違いによる透過物質の選択性が有ることが報告されている (Goldberg *et al.*, 2004)。イノシトール3リン酸のギャップ結合を介した透過活性は、Cx32がCx43の約2.5倍、Cx26の約3.5倍高いことが示されている (Niessen *et al.*, 2000)。また、Cx43はCx32よりもADPやATPの透過性が高いが、アデノシンは逆にCx32の方が高いことも報告されている (Goldberg *et al.*, 2002)。さらに、Cx26からなるコネクソンとCx32からなるコネクソンは細胞間で連結しギャップ結合を構築するが、Cx32同士に比べ蛍光色素の

透過活性が低下する (Cao *et al.*, 1998)。このようなコネクシンによる機能の違いは、Cx43 の遺伝子座を Cx40 または Cx30 で組替えたマウスでは、正常な発育をせずそれぞれ異なる表現型を示すことから推察される (Plum *et al.*, 2000)。

## ギャップ結合が関る生命現象と疾患

生体内におけるギャップ結合の機能は、各コネクシン遺伝子のノックアウトマウスの解析により多くの知見がもたらされている。Cx26<sup>-/-</sup>マウスでは、マウス特有の胎盤構造において母体からのグルコース輸送に障害が起き、胎生 11 日目で死亡することが報告されている (Gabriel *et al.*, 1998)。また、Cx45<sup>-/-</sup>マウスも胎生 10 日目で致死となり、その原因は心内膜床細胞の分化抑制であるとされている (Kruger *et al.*, 2000; Kumai *et al.*, 2000)。Cx32<sup>-/-</sup>マウスにおいては、軽度の末梢神経障害を起こすとともに、その発現が高い肝臓において細胞の異常増殖が起き肝癌が多発する (Nelles *et al.*, 1996; Temme *et al.*, 1997)。Cx40<sup>-/-</sup>マウスでは、心臓の形態は正常であるが、心筋伝達障害が観察されている (Kirchhoff *et al.*, 1998)。Cx30<sup>-/-</sup>マウスでは、蝸牛内の電位異常により難聴になることが報告されている (Teubner *et al.*, 2003)。Cx46<sup>-/-</sup> (Gong *et al.*, 1997) および Cx50<sup>-/-</sup>マウス (White *et al.*, 1998) では、ともに白内障を起こす。Cx43 は最も広範な組織発現していることが知られているが、そのノックアウトマウスでは胎生期は生存するが心臓の形態異常 (右心室出路の狭窄) のために出生直後に窒息死する (Reaume *et al.*, 1995)。また、ヘテロ接合体 (Cx43<sup>+/-</sup>) ではこれまでに心臓の形態に異常は認められていないが、心臓外膜の拍動が遅くなること (Guerrero *et al.*, 1997) 虚血により心室性不整脈が発生しやすくなるということが示されている (Lo, 2000)。

また、ヒトにおいてもコネクシン遺伝子の異常に起因すると考えられる疾患が報告されている (Kelsell *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2004)。X 型 Charcot-Marie-Tooth 病の原因遺伝子の 1 つとして Cx32 遺伝子 (Bergoffen *et al.*, 1993) が同定されて以降、Cx26 (Kelsell *et al.*, 1997)、Cx30 (Grifa *et al.*, 1999) および Cx31 (Xia *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2000) の遺伝子変異による遺伝性の非症候性難聴、Cx26 変異による遺伝性皮膚疾患である palmoplantar keratodermas (Maestrini *et al.*, 1993; Kelsell *et al.*, 2000) が報告された。遺伝性皮膚疾患においては、Cx30.3 の変異も明らかにされている (Macari *et al.*, 2000)。また、Cx46 または Cx50 の変異による先天性白内障 (Francis *et al.*,

1999) や、Cx43 の C 末端領域における点突然変異によるヒトの心臓奇形の疾患 (Britz-Cunningham *et al.*, 1999) など報告されている。

これらのノックアウトマウスの表現型や、ヒトにおける疾患の原因遺伝子としてコネクシン遺伝子が同定されていることなどから推測できるように、ギャップ結合の役割は多様で、様々な組織で重要な機能を担っていると考えられる。

## 卵胞発育におけるギャップ結合

ギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションに関わる生命現象として、さらに、哺乳類卵巣内濾胞(卵胞)における卵子成熟機構が挙げられる。哺乳類において卵胞は、個体が性成熟を迎えるまで未成熟な初期卵胞(原始卵胞)の段階で休止しており、卵胞刺激ホルモン(FSH)の刺激により卵胞発育は再開される。卵胞発育が再開される過程では、卵母細胞を取り巻く顆粒膜細胞が増殖し、しだいに多層化(1-3次卵胞)していき、やがて卵胞内に腔を持つ胞状卵胞(グラフ卵胞)へと発達する(参考図3A)。このような卵巣内における卵胞発育の最も中心的な過程は、卵母細胞の成長にある。原始卵胞内にある卵母細胞は、減数分裂を再開する能力も、発生能もまだ持っておらず、卵胞が発育すると共に、その大きさが増大し、発生能力を獲得していく。卵胞内には内莖膜層にしか血管は存在しておらず、卵母細胞は周りを囲む顆粒膜細胞を通し栄養や、FSHなど外部からのシグナルを受け取っている。よって卵胞の発育には、卵母細胞と顆粒膜細胞との細胞間相互作用が重要な役割を果たしていると考えられてきており(Eppig, 1994)。この相互作用に関する分子レベルでのメカニズムが、明らかになってきている。顆粒膜細胞から分泌される Steel 因子は、卵母細胞表面に発現している受容体 c-kit に結合し、生存および成長に必要なシグナルを伝えることが知られており(Kissel *et al.*, 2000)。可溶性 Steel 因子を産生できない変異型マウスでは、卵胞発育は一次卵胞で停止する(Kuroda *et al.*, 1988; Huang *et al.*, 1993; Bedell *et al.*, 1995)。また、卵母細胞から産生される Growth and Differentiation factor-9 (GDF-9) は、そのノックアウトマウスで、卵胞発育が初期の段階で停止する表現型が見られており(Dong *et al.*, 1996)。GDF-9 が顆粒膜細胞に作用し、ヒアルロン酸合成やシクロキナーゼ 2 の遺伝子発現を誘導することにより、顆粒膜細胞の分化を誘導することが明らかになっている(Elvin *et al.*, 1999)。

これら液性因子に加え、卵胞発育過程において卵母細胞と顆粒膜細胞間の相互作用に、ギャップ結合も重要な役割を果たしている (Heller and Schultz, 1980; Brower and Schultz, 1982)。卵胞内においてギャップ結合は、顆粒膜細胞間、および卵母細胞と顆粒膜細胞間に存在しており (Anderson *et al.*, 1976; Gilula *et al.*, 1978; 参考図 3 B)、細胞間の代謝的共役をもたらし、卵母細胞への栄養供給や分裂再開抑制機構、あるいは顆粒膜細胞の増殖や分化に関与していると考えられている (Dekel *et al.*, 1981; Bornslaeger and Schultz, 1985; Sherizly *et al.*, 1988; Sandberg *et al.*, 1992; Carabatsos *et al.*, 2000)。卵胞内で発現しているコネクシンは、これまでに、Cx26、30.3、32、37、43、45、60 の 7 種類が同定されており、それぞれ特異的な局在を示す。Cx26、32 は、胞状卵胞内の内夾膜細胞にのみ発現が見られ、Cx30.3 は、胞状卵胞内の内夾膜細胞、顆粒膜細胞、卵丘細胞に、Cx60 は胞状卵胞内の内夾膜細胞、卵丘細胞に発現が見られる (Itahana *et al.*, 1996, 1998)。Cx43 は、卵胞発育の初期から顆粒膜細胞において発現しており (Wiesen and Midgley, 1994; Juneja *et al.*, 1999)、胞状卵胞内においても、卵母細胞を除き、広範に発現している (Itahana *et al.*, 1996)。Cx37 も卵胞発育の初期から発現しているが、その発現は卵母細胞に見られる (Simon *et al.*, 1997)。また Cx45 は、胞状卵胞内の顆粒膜細胞において Cx43 と共局在を示す (Okuma *et al.*, 1996)。これらのコネクシンのうち、Cx37<sup>-/-</sup>マウスでは、メスにおいて卵胞の成熟不全と排卵障害による不妊が確認されている (Simon *et al.*, 1997)。さらに、Cx43 のノックアウトマウスは前述したように、心臓の形態異常のため生後直後に死亡するが、卵巣を摘出し器官培養を行うと、顆粒膜細胞の増殖がほとんどみられず、原始もしくは一次卵胞で発育を停止するのが認められている (Juneja *et al.*, 1999)。このことは、卵巣を野生型マウスの腎皮膜下へ移植した場合でも、同様のことが確認されており (Ackert *et al.*, 2001)、Cx43 が卵胞発育の初期の段階から重要な機能を担っていること示唆する。

## Cx43 のライフサイクル

コネクシンファミリーの中で、Cx43 は広範な組織や様々な細胞において発現しており、早くから cDNA が単離されたことから他のコネクシンに比べ解析が進められてきた (Bruzzone *et al.*, 1996a,b)。Cx43 は、他の膜タンパク質と同様に粗面小胞体において合成され、その後ゴルジ体を通り、トランスゴルジネットワークを経て細胞膜へと輸送されギャップ結合を構築する

(Berthoud *et al.*, 2004; 参考図 4)。無細胞タンパク質合成系において、Cx43 は 1 番目の膜貫通ドメインがシグナルペプチド配列と認識され、シグナルペプチダーゼにより切断されてしまう傾向があることから、膜への組み込みにはシャペロンタンパク質が必要になる可能性が示唆されている (Falk and Gilula, 1998)。小胞体において膜に組み込まれた Cx43 は、その後トランスゴルジネットワークにおいてオリゴマー化しコネクソンを形成する (Musil and Goodenough, 1993)。一方、Cx32 ではコネクソンの形成が小胞体において起こることが報告されており (DasSarma *et al.*, 2002)、Cx43 と 32 のキメラタンパク質を用いた解析より、Cx43 の 3 番目の膜貫通領域と 2 番目の細胞外ループ領域が小胞体でのコネクソンの形成を阻害する最小のモチーフであり、中でも 153 番目のアルギニンと 173 番目のグルタミンが重要であることが示されている (Maza *et al.*, 2005)。

コネクソンを形成した Cx43 は、細胞膜へと輸送されギャップ結合を構築するが、コネクソンはまずギャップ結合周辺の細胞膜に輸送され、その後ギャップ結合内へと取り込まれるということが報告されている (Gaietta *et al.*, 2002)。このことは、4 つのシステイン残基からなるタグ配列と、これと反応することで蛍光を発する 2 つの物質 (FIAAsH-EDT<sub>2</sub> および RsAsH-EDT<sub>2</sub>) を異なるタイミングで添加するという手法により明らかにされており、ギャップ結合の崩壊は逆にその中心より起こるということも同時に示されている。また、GFP 融合型 Cx43 (Cx43-GFP) を発現している細胞と、内在性の Cx43 を発現している細胞を同時に培養したところ、Cx43-GFP を発現していない細胞の細胞質においても GFP のシグナルが観察されることから、ギャップ結合の崩壊過程において細胞間で連結しているコネクソンは、一方の細胞に取り込まれるのではないかと考えられている (Jordan *et al.*, 2001)。ギャップ結合より細胞質へと取り込まれた Cx43 は、その後タンパク質分解を受けるが、これにはユビキチン-プロテアソーム系 (Laing and Beyer, 1995) とリソソーム系 (Musil *et al.*, 2000) の 2 つの経路が関与していることが知られているが、その詳細はまだ不明な点が残されている。これまでの報告において Cx43 の半減期は 1-1.5 時間 (Laird *et al.*, 1995) というものから約 4 時間 (Yamaguchi and Ma, 2003) というものまで様々であり、他のコネクシンでは 2 日以上という報告もある (Berthoud *et al.*, 1999)。これらことから、コネクシンの分解は細胞により異なるメカニズムが存在し、これにより半減期の時間も異なるのではないかと予想される。

## Cx43 によるギャップ結合の制御機構

前述したようなライフサイクルにおいて、Cx43 は様々な段階で制御を受けており、ファミリー間でその長さが異なり相同性も低い細胞内 C 末端領域（227 番目のグルタミン酸残基から 382 番目のイソロイシン残基; Cx43-CT）のリン酸化は、この制御に深く関わる（Falk., 2000b; Cruciani and Mikalsen, 2002; Lampe and Lau, 2004; 参考図 5）。細胞内 cAMP の上昇は、PKA 依存的な Cx43 の細胞内の輸送やギャップ結合の構築を促進し、このときリン酸化の亢進も見られることが報告されている（Wang and Rose, 1995; Holm *et al.*, 1999; Falk *et al.*, 2000a; Paulson *et al.*, 2000）。顆粒膜細胞において、FSH 刺激は cAMP の細胞内濃度を上昇させることが知られており、この刺激依存的に Cx43 によるギャップ結合の構築が促進されること、Cx43-CT の 365、368、369 および 373 番目のセリン残基におけるリン酸化が亢進されることが報告されている。さらにこのリン酸化部位を全てアラニンに置換した変異体（Cx43-S4A）では、チャネル活性が著しく低下することも明らかにされている（Yogo *et al.*, 2002）。また、カセインキナーゼ 1（CK1）の酵素活性は、細胞膜へと輸送された Cx43 がギャップ結合を構築するのに重要であることが阻害剤を用いた実験から示されている。なお、CK1 によるリン酸化部位は、*in vitro* のリン酸化反応で、Cx43-CT の 325、328 または 330 番目のセリン残基であることが示されている（Cooper and Lampe, 2002）。

一方、Cx43-CT におけるリン酸化はギャップ結合の負の制御（ギャップ結合の分解やチャネル活性の阻害）にも関わることが報告されている。G<sub>2</sub>/M 期において p34<sup>cdc2</sup> キナーゼは、255 および 262 番目のセリン残基におけるリン酸化を亢進し、エンドサイトーシスの増加と分解を促進すると考えられている（Kanemitsu *et al.*, 1998）。また、PKC はホルボールエステルなどの刺激により Cx43 の 368 番目のセリン残基を（Lampe *et al.*, 2000; Rivedal and Opsahl, 2001）、上皮増殖因子や血小板由来増殖因子などの刺激により MAPK は 255、279、282 番目のセリン残基を（Warn-Cramer *et al.*, 1998; Rivedal and Opsahl, 2001）、v-Src は 247、265 番目のチロシン残基をリン酸化しチャネル活性を負に制御することが報告されている（Lin *et al.*, 2001）。c-Src も細胞間コミュニケーションの負の制御に関わり（Postma *et al.*, 1998）、265 番目のチロシン残基をリン酸化する可能性が示唆されている（Giepmans *et al.*, 2001a）。Src によるチロシンリン酸化を介した負の制御に関して、Cx43-CT に receptor protein tyrosine phosphatase  $\mu$ （RPTP $\mu$ ）が会合することが報告されており、Src による制御を阻害するのではないかと予想されている（Giepmans *et al.*,

2003)。

また、Cx43 によるギャップ結合の構築制御に關与するものとして、細胞外基質との結合を担うインテグリンや、接着結合分子であるカドヘリンが挙げられる (Lampe and Lau, 2000)。インテグリン  $\alpha_3\beta_1$  とその基質であるラミニニン 5 との結合は、Rho A を介して Cx43 によるギャップ結合構築を促進させることが報告されている (Lampe *et al.*, 1998)。また、接着結合、Cx43 によるギャップ結合を共に有している細胞において、カドヘリンの機能を阻害すると、ギャップ結合の構築も阻害されること (Meyer *et al.*, 1992; Frenzel and Johnson, 1996)、これに対し Cx43 は発現しているがギャップ結合を形成していない細胞において、カドヘリンを遺伝子導入し、接着結合を形成させると、ギャップ結合が構築され (Matsuzaki *et al.*, 1990; Jongen *et al.*, 1991)、Cx43 のリン酸化レベルも上昇することが報告されている (Musil *et al.*, 1990)。この詳細な機構は不明であるが、神経冠細胞において、カドヘリンの細胞内領域の  $\beta$ -カテニン結合領域と膜貫通領域との間に位置する膜近位の領域に結合することが知られている p120<sup>ctn</sup> が Cx43、N-カドヘリンそれぞれと共局在しており、p120<sup>ctn</sup> を介してこの 2 つの細胞間結合が互いに作用している可能性が示唆されている (Xu *et al.*, 2001)。また、カドヘリンによるギャップ結合構築の促進が、サイトカラシン D により阻害されることより、 $\beta$ -カテニンを介したアクチンフィラメントの形成がカドヘリンによるギャップ結合構築制御に重要であることも示されている (Hernandez-Blazquez *et al.*, 2001)。Cx43 とアクチンフィラメントとの関わりは、細胞膜への輸送に關与するという可能性が示唆されており (Murray *et al.*, 1997)、アクチン結合タンパク質である ZO-1、-2、Drebrin などが Cx43-CT を介して会合することも報告されている (Giepmans and Moolenaar, 1998; Singh and Lampe, 2003; Butkevich *et al.*, 2004)。また、これらの会合タンパク質は、Cx43 の局在制御やタンパク質の安定性に関わる可能性が示唆されている。例えば、ZO-1 は心筋細胞において、介在板付近におけるギャップ結合構築に重要である (Toyofuku *et al.*, 1998b)。一方、その結合領域を欠損しているような変異型の Cx43 が野生型に比べチャネル活性に若干の違いが見られるものの、ギャップ結合を構築することも知られており (Fishman *et al.*, 1991; Dunham *et al.*, 1992)、その重要性は未だ不明である。

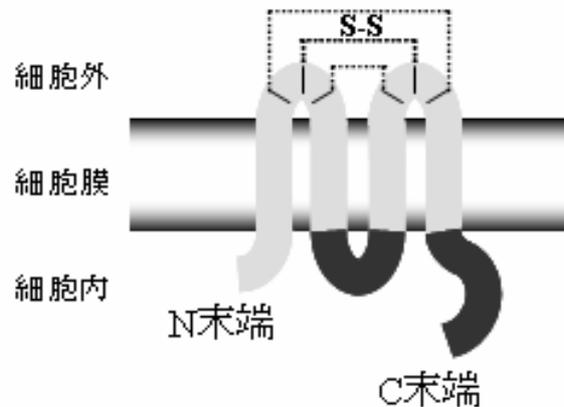
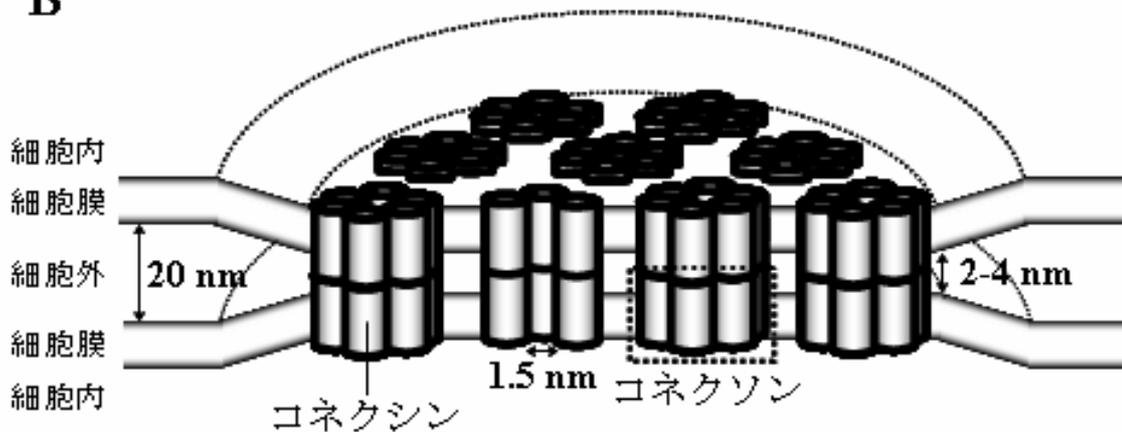
さらに、微小管がコネクソン間の連結に必要であるということが、その重合阻害剤である nocodazole で細胞を処理した実験より示唆されており (Thomas *et al.*, 2001)、Cx43-CT と または チューブリンが直接会合することも示されている (Giepmans *et al.*, 2001b, c)。しかし、Cx43-CT における

チューブリン結合領域の欠損は、ギャップ結合の構築やチャネル活性に特に影響を与えないこと、細胞種によりギャップ結合構築に対する nocodazole の作用が異なることなどから、微小管が Cx43 を制御するのではなく、Cx43 が微小管重合時に細胞膜でのアンカーとして働くのではないかという報告も存在する (Murray *et al.*, 1997; Giepmans *et al.*, 2001b)。

アクチン結合タンパク質やチューブリン以外に、これまでに Cx43-CT に会合するタンパク質として、CCN3/NOV (Cyr61/connective tissue growth factor/nephroblastoma-overexpressed: Fu *et al.*, 2004; Gellhaus *et al.*, 2004) や新規分子 CIP85 (Connexin43-Interacting Protein of 85-kDa: Lan *et al.*, 2005) などが知られている。CCN3/NOV は、Cx43 によるギャップ結合の構築依存的にその発現量が上昇するタンパク質であり、Cx43-CT と会合することで細胞の増殖を抑制することが示されているが、Cx43 の制御に寄与するかは不明である。これに対し CIP85 は、Cx43 のリソソーム依存的な分解に関わることが報告されている。

## 本研究の要約

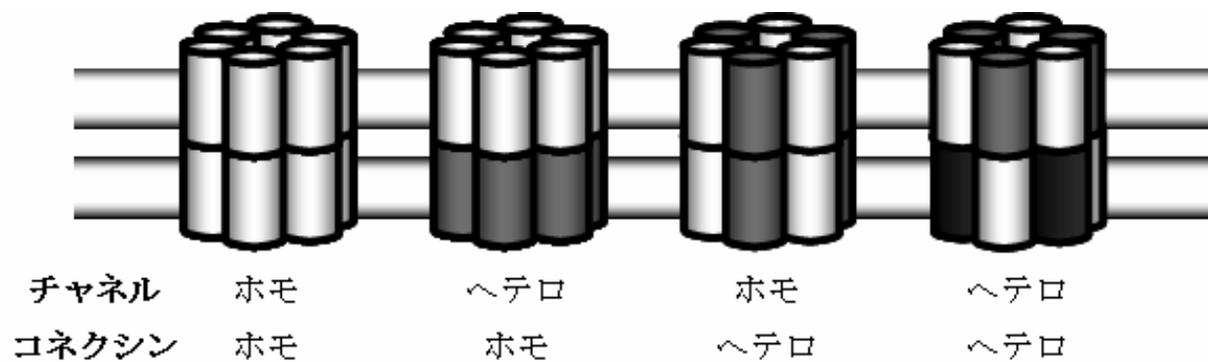
以上述べた様に、Cx43 によるギャップ結合制御機構はリン酸化やタンパク質の会合など様々な知見が示されているが、その詳細な分子制御機構は未だ解明されておらず、不明な点が多く残されている。そこで本研究では、Cx43 によるギャップ結合構築における制御機構を理解することを目的に、特に Cx43-CT に着目し、Cx43 が重要な役割を担っている卵巣の cDNA ライブラリーを用いた yeast two-hybrid 法による会合タンパク質の探索を行った。その結果、新規分子 Connexin43-Interacting Protein of 150-kDa (CIP150) を会合タンパク質として同定した。さらに、CIP150 の機能解析を行なうことにより、Cx43 の細胞内局在制御に関わる可能性を示唆する結果が得られ、ギャップ結合構築に関わる制御機構についての新しい知見を得ることが出来た。

**A****B**

### 参考図 1 コネクシンとギャップ結合の模式図

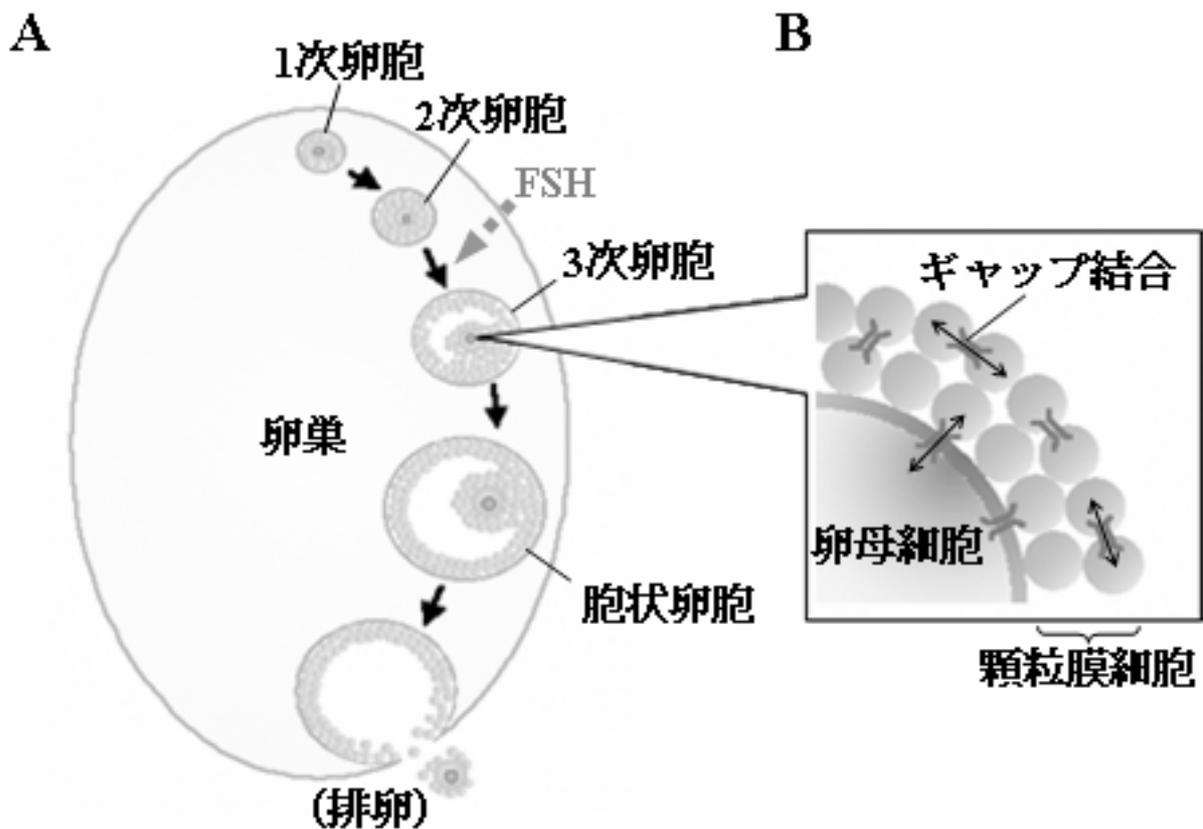
A. コネクシンは 4 回膜貫通型の膜タンパク質であり、細胞内 N 末端および C 末端、2 つ細胞外ループ、1 つの細胞内ループ領域を有する。ファミリー間において、膜貫通および細胞外ループ領域において比較的相同性が高く、細胞外ループ領域に 3 個ずつ存在するシステイン残基は例外なく保存されている。ループ間では、このシステイン残基において分子内ジスルフィド結合が形成される。細胞内ループ領域と C 末端領域は、ファミリー間で相同性が低く長さも異なる。

B. ギャップ結合チャンネルは、コネクシンがコネクソを形成し、コネクソンが数十から数千集合したヘミチャンネルが細胞間で連結する事で構築される。コネクソンの中心に形成される親水性の微小孔は、その直径が約 1.5 nm である。



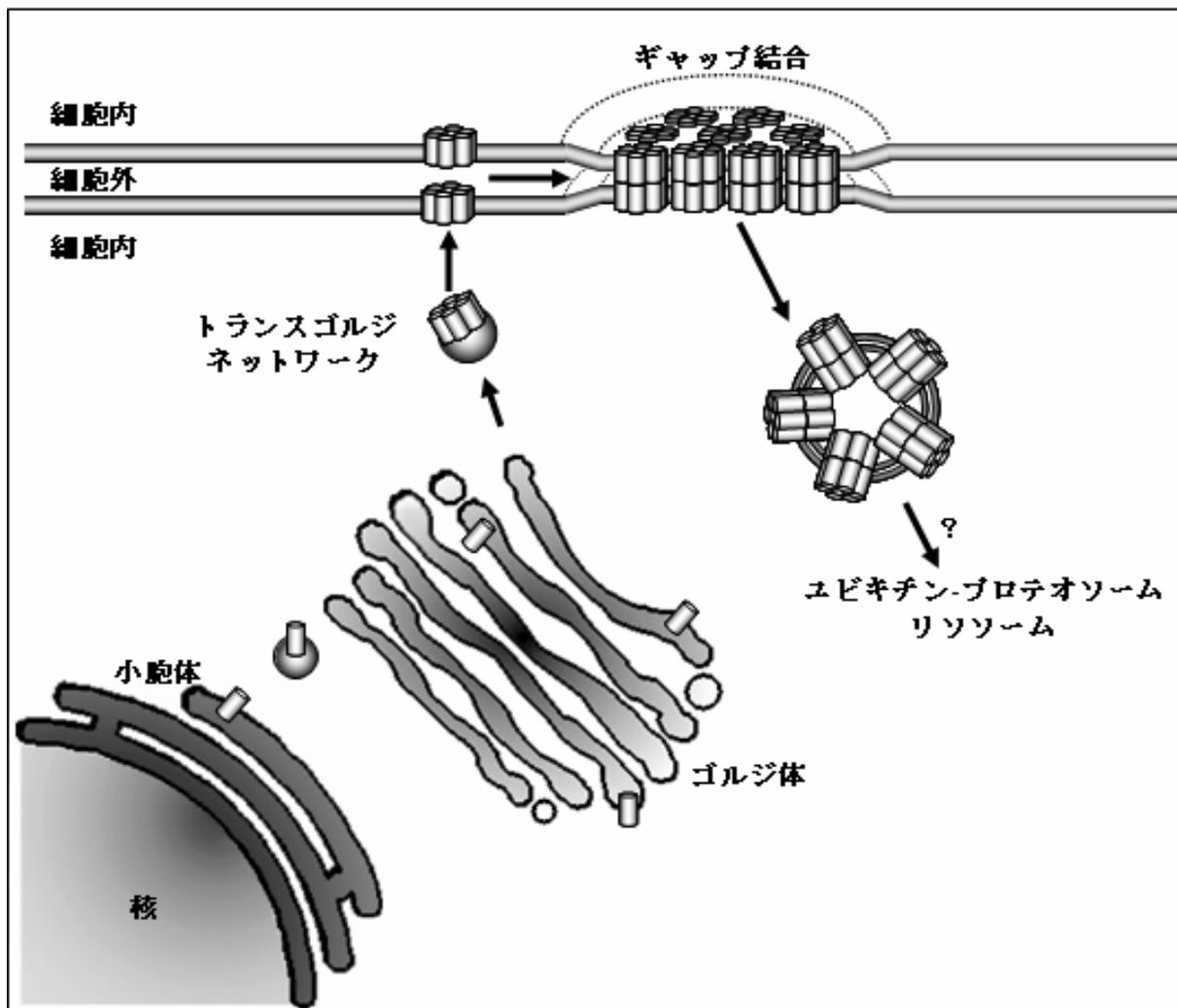
**参考図 2 複数のコネクシンによるギャップ結合の構築**

コネクソンは、複数のコネクシンより形成され、構成するコネクシンが異なるコネクソン間でも連結する。つまり、コネクシンがホモまたはヘテロの場合、細胞間でのコネクソンの連結がホモまたはヘテロの場合、それぞれの組合せで4種類のモデルが考えられる。



### 参考図 3 卵胞発育におけるギャップ結合

A. 哺乳類において、個体が性成熟を迎えると脳下垂体より卵胞刺激ホルモン (FSH) が分泌され、この刺激により卵胞発育は再開される。卵胞は発育する過程で、卵母細胞を取り巻く顆粒膜細胞が増殖し、しだいに多層化 (1-3次卵胞) していき、やがて卵胞内に腔を持つ胞状卵胞 (グラーフ卵胞) へと発達した後、排卵が起こる。B. 卵胞内においてギャップ結合は、顆粒膜細胞間、および卵母細胞と顆粒膜細胞間に存在しており、卵母細胞への栄養供給や分裂再開抑制機構、あるいは顆粒膜細胞の増殖や分化に関与していると考えられている。



参考図 4 Cx43 ライフサイクルの模式図

細胞内において Cx43 は、他の膜タンパク質と同様に粗面小胞体において合成され、その後ゴルジ体を通り、トランスゴルジネットワークを経て細胞膜へと輸送されギャップ結合を構築する。この過程において Cx43 は、トランスゴルジネットワークにおいてオリゴマー化しコネクソンを形成する。コネクソンを形成した Cx43 は、ギャップ結合周辺の細胞膜に輸送され、その後コネクソンが細胞間で連結し、ギャップ結合内へと取り込まれる。ギャップ結合の崩壊は逆にその中心よりコネクソンが連結したまま起こり、その後ユビキチン-プロテアソーム系経路またはリソソーム系経路においてタンパク質分解を受ける。



参考図 5 Cx43-CT におけるリン酸化部位

これまでに報告されている Cx43-CT のリン酸化部位を示した。配列の上に表示してある矢印は、 ↓ が正の制御、 ↑ が負の制御に関わることを示している。配列の下には関与する（直接的または間接的）酵素名を示した。

## 材料と方法

### Yeast two-hybrid スクリーニング

Yeast two-hybrid スクリーニングは CLONTECH 社の MATCHMAKER two-hybrid システムを用い行なった。GAL4 DNA 結合領域をコードする配列を持つ pAS2 にラット Cx43-CT 配列を組み込んだ pAS2-Cx43-CT (bait) を構築し、酵母 Y190 株にトランスフォームした。Bait を導入した酵母 Y190 株に、Gal4 の転写活性化領域をコードする配列を持つ pGAD GH にラット卵巣 cDNA を組み込んだライブラリー (prey) をトランスフォームし、ヒスチジン を欠如した培地で培養した。生育したコロニーに対してフィルターアッセイを行ない、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を調べた。そして活性のあったクローンから prey を回収し、その塩基配列を解析した。

### RT-PCR とクローニング

First strand cDNA は、ISOGEN(ニッポンジーン)を用い単離した全 RNA を鋳型とし、oligo (dT) プライマー (LIFE TECHNOLOGIES) を用い、逆転写酵素 SUPERSCRIT II (LIFE TECHNOLOGIES) により合成した。

*CIP150* 全長配列は、*KIAA1432* (GenBank accession No. BC023535) と *DKFZp434D105* (GenBank accession No. AL136875) 両塩基配列によりカバーされる領域を 3 つの断片に分け、ヒト胎盤の cDNA を鋳型とした PCR により増幅し、これらの断片を継ぎ合わせることで得た。それぞれの断片を増幅するのに以下のようなプライマーを用いた。*CIP150* の開始コドンより 1307 番目の塩基までを含む断片 1 ; forward [5'-agaattcTGAATGGAGGCCAGATAGTACC-3']、reverse [5'-CCAAACTTGCAACCACAG-3']。1226 から 2734 番目の塩基を含む断片 2 ; forward [5'-CCTATCTAGAGAGCAATTGGCC-3']、reverse [5'-CAGATTCTCCAGAGCCAATGG-3']。2659 番目の塩基から終止コドンまでを含む断片 3 ; forward [5'-GCACTAGAACAAGGCAAGTGG-3']、reverse [5'-atggtaccACAACGTACTGAGCTGCACG-3']。断片 1 の forward には *EcoRI*、断片 3 の reverse には *KpnI* の認識配列が付加してあり (小文字の配列)、この配列と *CIP150* の 1270 から 1275 番目に存在する *HindIII*、2687 から 2692 番目に存在する *SalI* の認識配列を利用し、3 つの断片は pBluescript II KS<sup>+</sup>上

で継ぎ合わせ全長配列とした。また *CIP150* 全長配列は、ヒト胎盤の cDNA を鋳型とし、DKFZp434D105 の予想される開始コドン（下線部）を含むプライマー [5'-TGAATGGAGGCCAGATAGTACC-3'] および KIAA1432 の予想される終止コドン（下線部）を含むプライマー [5'-GATGGAACCTCACTGTTAGG-3'] を用いた PCR により増幅した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により分離、精製した後に、その塩基配列を決定した。*CIP150* のラット顆粒膜細胞における発現は、forward が [5'-AGTTCAGCTGCGTTATCTGC-3']、reverse が [5'-GTCCTCTTCATCTGCTTGTG-3'] という配列のプライマーを用い確認した。

## 抗体作製

*CIP150* に対する 3 種類の抗体を以下の方法で作製した。*CIP150* の中間領域を認識するウサギポリクローナル抗体（抗 *CIP150*-M 抗体）の作製には、His<sub>6</sub> を付加したヒト *CIP150* のアミノ酸配列 783-1024 番目までのポリペプチドを大腸菌で発現、精製したものを抗原として用いた。免疫は、ニュージールランドホワイト、11 週齢、メスのウサギ（オリエンタルバイオサービス）に隔週で初回に 100 μg、2 回目以降 50 μg ずつ計 13 回、背中に皮下注射することで行なった。採血により得られた血清中の抗体は、抗原を CNBr-active Sepharose に架橋したカラムを用い精製した。

*CIP150* の N 末端および C 末端領域を認識するマウスポリクローナル抗体（抗 *CIP150*-N または -C 抗体）は、抗原として N 末端の 109 アミノ酸、C 末端の 88 アミノ酸のポリペプチドをそれぞれ、GST 融合組換えタンパク質として大腸菌で発現、精製したものを免疫し作製した。9 週令、メスの BALB/cA Jc1 マウス（日本クレア）に抗原 50 μg を隔週で計 3 回、腹腔内に免疫を行った。心臓採血により得た血清は、大過剰量の GST と反応することで抗 GST 抗体を取除いた後、抗体として用いた。

マウス抗  $\beta$ -actin モノクローナル抗体（AC-74）と抗 FLAG モノクローナル抗体（M2）、ウサギ抗 Cx43 ポリクローナル抗体は SIGMA から、マウス抗 GFP モノクローナル抗体（JL-8）は Clontech Laboratories より購入した。また 2 次抗体として用いた、Horse radish peroxidase (HRP) が結合した Protein-A、抗マウス抗体、Texas Red が結合した抗ウサギ Ig 抗体は Amersham Biosciences から購入した。

## 発現プラスミドと siRNA

Yeast two-hybrid スクリーニングにより得た陽性クローンの遺伝子配列は、N 末端に FLAG-tag を付加する pFLAG-CMV2 (SIGMA) の *EcoRI* 部位にサブクローニングした。CIP150 の全長配列は pFLAG-CMV2 の *EcoRI*-*KpnI* 部位にサブクローニングした。ラット野生型 Cx43 および Cx43-S4A 変異体は、CMV プロモーターを持つ pMH の *KpnI*-*NotI* 部位にクローニングした。また、Cx43 および Cx43-CT の欠損変異体は、PCR により作製した。2 種類の CIP150 に対する siRNA 発現ベクターである pSUPER-siCIP150-1 および-2 は、OligoEngine 社の手引書に従い作製した。なお、標的配列は pSUPER-siCIP150-1 が [5'-AACCCAGTTCAAGTGGTGGAT-3']、pSUPER-siKDN-2 が [5'-AAGCAGCAATATGGTCAGCCG-3'] である。

## 細胞培養と遺伝子導入

COS7、HEK293、HeLa、NRK 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、T47D 細胞は RPMI-1640、KGN 細胞は DMEM-Ham's F12 (DMEM/F12) に 10% の牛胎児血清を加えたものを基本培地とし、37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。細胞を Brefeldin A (BFA) で処理時は、基本培地に終濃度 5 μg/ml となるように添加し、さらに 6 時間培養後、解析に用いた。

ラット顆粒膜細胞の初代培養細胞は既報に従い調製した (Yogo *et al.*, 2002)。雌の 21 日齢 SD ラット (日本 SLC) に、ゴマ油に溶解した Diethylstilbestrol (DES) 2mg を 4 日間連続投与し、最終投与から 48 時間後、卵巣を摘出した。摘出後、20 μg/ml Gentamycin および 0.5 μg/ml Fungizone 含有 DMEM/F12 で洗浄後、脂肪組織や結合組織をハサミで除去した。次に DMEM/F12 中で卵巣を 26G 注射針で刺すことにより、卵胞を破裂させ顆粒膜細胞を取り出し、細胞懸濁液をセルストレイナー (孔 70 μm) に通し、余分な組織を取り除いた。さらに細胞を 0.25% Trypsin、50 μg/ml DNaseI で 37℃、1 分間処理することにより分散させ、50mg/ml Trypsin inhibitor (GIBCO BRL) で 37℃、5 分間処理し trypsin を失活させた後、DMEM/F12 で 2 回洗った。その後、基本培地である 5 μg/ml Insulin (GIBCO BRL)、5 μg/ml Transferrin (GIBCO BRL)、0.1% BSA、20 μg/ml Gentamycin、0.5 μg/ml Fungizone 含有 DMEM/F12 (DMEM/F12-ITB) に 5 μg/ml Fibronectin を添加した培地に懸濁し、poly-D-lysine コートした培養皿に 1cm<sup>2</sup> あたり 5 × 10<sup>5</sup> 個の細胞を播種し、

24 時間 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。24 時間培養後、細胞を PBS で一度洗い、基本培地に 100ng/ml FSH ( Vitro Diagnostics ) を添加し、さらに 24 時間培養し解析に用いた。

細胞への遺伝子導入は、COS7 細胞はリン酸カルシウム法 ( Chen-Okayama 法 ) により、HeLa 細胞は LIPOFECTAMINE PLUS Reagent package、HEK293 細胞は LIPOFECTAMINE 2000 ( Invitrogen ) をそれぞれ用いた。

## ウエスタンブロットおよび免疫染色

細胞抽出液は、細胞を氷冷した PBS で洗浄後に lysis buffer ( 0.5% NP 40、50mM Tris-HCl ( pH 8.0 )、120mM NaCl、1mM EDTA、1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、20mM NaF、1mM PMSF、1mM dithiothreitol、100KIU/ml Aprotinin ) で 10 分間溶解し、15,000rpm で 5 分間遠心した上清を回収することで調製した。細胞抽出液は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分離し、これを PVDF メンブレンに転写した。メンブレンを PBS で洗浄後に 5% Skim milk を含む PBS ( 5% Milk/PBS ) でブロッキング反応を室温で 1 時間行った。一次抗体は 5% Bovine Serum Albumin ( BSA ) を含む PBS で希釈し、室温で 2 時間反応させた。メンブレンを洗浄後、5% Milk/PBS で希釈した horseradish peroxidase 結合 2 次抗体または protein-A で 45 分反応させ、シグナルは ECL ( Amersham Biosciences ) にて検出した。

免疫染色は、以下の方法で行なった。カバーガラス上 ( HEK293 細胞の場合は poly-D-lysine でコートした ) で培養した細胞を PBS で 3 回洗浄し、PBS に溶かした 2% パラホルムアルデヒド ( 2% PFA/PBS ) で 30 分間、室温で固定した。細胞を PBS で洗浄後、0.2% Triton X-100 を含む PBS で 10 分間処理し、5% Milk/PBS でブロッキング反応を室温で 1 時間行った。5% Milk/PBS で希釈した 1 次抗体溶液を室温で 1 時間反応させ、細胞を洗浄後に 5% Milk/PBS で希釈した 2 次抗体溶液でさらに 1 時間反応させた。PBS で洗浄後 VECTASHIELD を用いスライドガラス上にマウントし、LSM410 共焦点顕微鏡 ( ZEISS ) にて検鏡した。

## 1% Triton X-100 buffer による細胞分画

1% Triton X-100 buffer による細胞分画は既報に準じて行なった ( Musil and

Goodenough, 1991)。氷冷した PBS で細胞を 3 回洗浄後、Triton lysis buffer( 1% Triton-X 100、50mM Tris-HCl( pH 7.4 )、150mM NaCl、2mM EDTA、2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、20mM NaF、2mM PMSF、10mM N-ethylmaleimide、100KIU/ml Aprotinin ) を加え氷上で 10 分インキュベートした。この後、スクレイパーで細胞をよく剥ぎ取りエッペンチューブに移し、26G 注射針に 25 回通しゲノム DNA をせん断した。これを氷上に 30 分間、10 分毎にボルテックスをかけながらインキュベートした。この細胞溶解液の半量を別のチューブに保存し、これを全細胞抽出液とした。残りの細胞溶解液を 100,000g、4 で 50 分超遠心し、細胞溶解液を分画した。超遠心後、上清を Triton 可溶性画分、沈澱物を同量の Triton lysis buffer に懸濁したものを Triton 不溶性画分とした。

### 免疫沈降および Pull-down アッセイ

細胞抽出液に抗体 2 μg、BSA を終濃度 0.5% で加え、4 で終夜反応させた。抗体に結合したタンパク質複合体は protein-A (ウサギ抗体使用時) または-G Sepharose(マウス抗体使用時) ビーズを 20 μl 加え 4 で 2 時間攪拌し、lysis buffer で 5 回洗浄することで回収した。

Pull-down アッセイは、大腸菌で発現、精製した GST 融合型の組換えタンパク質 10 μg を細胞抽出液に加え、4 で 2 時間インキュベートした後に Glutathione Sepharose 4B ビーズで回収した。

### 正リン酸による細胞標識

細胞をリン酸不含培地で 3 回洗浄した後、リン酸不含培地で 1 時間培養し、1mCi/ml となるように培地に <sup>32</sup>P 正リン酸 (NEN) を加え、さらに 4 時間培養し細胞を標識した。細胞を PBS で洗浄後、RIPA buffer( 50mM Tris-HCl( pH 7.2 )、150mM NaCl、1mM EDTA( pH 8.0 )、1% Sodium deoxycholate、1% Triton X-100、0.1% SDS、2mM PMSF、100KUI/ml Aprotinin ) で溶解し、スクレイパーで細胞を剥ぎ取り細胞溶解液をエッペンチューブに移した。これを、26G 注射針に 20 回通すことによりゲノム DNA をせん断し、15,000rpm 4 で 10 分間遠心し上清を回収した。回収した上清より Cx43 を免疫沈降により精製し、SDS-PAGE により分離した後にゲルを乾燥させ、X 線フィルムによりシグナルを検出した。

## Scrape-loading 色素透過アッセイ

Cx43 発現細胞における、ギャップ結合を介したチャネル活性は、既報に準じて Scrape-loading 色素透過アッセイにより検定した (Yogo *et al.*, 2002)。カバーガラス上でコンフルエントになるまで培養した細胞を、PBS で 2 回洗浄した。PBS を除去後、0.25% Lucifer yellow (LY ; 分子量 476Da)、0.75% Rhodamine dextran (RD ; 分子量 10kDa) /PBS 溶液中で細胞を直線状に 27G の注射針で傷つけて色素を取り込ませた。室温で 10 分間インキュベートした後、PBS で 3 回洗浄し、2% PFA/PBS で固定し、スライドガラス上にマウントした。LSM410 共焦点顕微鏡にて、傷口から取込まれた色素の細胞間での移行を検鏡した。色素の透過活性は、共焦点顕微鏡にて取込んだ画像上で、細胞を傷つけた線から垂直方向に色素が移行した最も遠い細胞までの距離を Scion Image Beta 4.02 ( Scion Corporation ) で測定することで定量化した。3 回の独立した実験を行い、各実験区あたり 4 枚の任意の画像を取込み、それぞれの画像において 10 ヶ所距離を測定し、平均距離の算出と有意差検定を行った。

## 結果

### Cx43 会合タンパク質の探索

Cx43-C 末端領域(Cx43-CT)を bait、ラット卵巣 cDNA ライブラリーを prey としたスクリーニングを行った結果、30 の陽性クローンを得た。各クローンが有するインサート配列をシーケンシングにより解析した結果、7 種類の遺伝子を候補遺伝子として得た(表 1)。次にこれらの候補が細胞内においても Cx43-CT と会合するかを確認するために、各候補遺伝子の断片配列の上流に FLAG タグを付加し、Cx43-CT と共に COS7 細胞において過剰発現した。Cx43-CT を認識する抗 Cx43 抗体により免疫沈降した結果、Eleven-nineteen Lysine rich Leukemia (ELL)、Triosephosphate isomerase (TPI)、KIAA1432 の 3 つの候補クローンに関して細胞内での会合が確認された(図 1)。次に TPI の全長配列をクローニングし、Cx43 全長との会合を解析した。COS7 細胞に N 末端に FLAG タグを付加した TPI と Cx43 を過剰発現し、抗 Cx43 および FLAG 抗体それぞれで免疫沈降した後、ウエスタンブロットによりシグナルを検出した。その結果、これら 2 つの全長同士の共沈は見られなかった(図 2 A)。また、KIAA1432 はその全長配列が報告されていないため、Yeast two-hybrid で得られた 164 アミノ酸からなる KIAA1432 の C 末端領域 (KIAA1432-CT)の配列を用い、Cx43 全長配列との会合を確認した。HEK293 細胞に FLAG タグを付加した KIAA1432-CT (FLAG-1432-CT) および Cx43 を過剰発現し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降した結果、細胞内において KIAA1432-CT と Cx43 が会合していることが確認された(図 2 B)。なお、ELL は RNA polymerase II 伸長因子であり細胞内局在が核であること、Cx43-CT との会合が弱いことより解析は行なわなかった。

### 新規タンパク質 CIP150 の同定

KIAA1432 (GenBank accession No. AB037853) は、かずさ DNA 研究所のヒト完全長 cDNA プロジェクトにおいて報告された配列であるが、前述したように予想される開始コドンを含んでおらず、Cx43 との会合を解析するために、その全長配列の決定を行った。まず、全長配列を決定するにあたり、NCBI-BLASTにおいて KIAA1432 に対して相同性を有する配列を探索した結果、KIAA1432 の 5'配列と高い相同性を示す配列 DKFZp434D105 (GenBank

accession No. AL136875) が報告されていることが明らかとなった。しかし、DKFZp434D105 の cDNA 配列は、予想される開始コドンを含んでいたが、同時に KIAA1432 の ORF 配列の中央あたりに終止コドンが存在していた(図 3)。そこでこの 2 つの配列の関係を明らかにするために、DKFZp434D105 および KIAA1432 の開始コドンと終止コドンをそれぞれ含むプライマーを設計し、これを用いヒト胎盤 cDNA を鋳型とした PCR を行なった。その結果、約 4kbp の PCR 産物が増幅され、このバンドを精製したものを鋳型とし、シーケンシングによりその配列を確認した結果、DKFZp434D105 の 5' 領域、DKFZp434D105 と KIAA1432 で相同性のある領域、KIAA1432 の 3' 領域を持つ配列が確認された(図 3)。この ORF 配列より予想されるタンパク質分子量は約 150-kD であり(図 4) この新規分子を CIP150(Connexin43-Interacting Protein of 150-kDa; GenBank accession No. AB205401) と命名した。

次に、予想された CIP150 のアミノ酸配列を基に CIP150 の N 末端、中央、C 末端を認識する 3 種類の抗体(抗 CIP150-N、抗 CIP150-M、抗 CIP150-C 抗体; 図 4) を作製し、これを用い哺乳類の細胞における CIP150 の発現を確認した。細胞抽出液より、抗 CIP150-M 抗体で免疫沈降し、作製したこれら 3 種類の抗体でプロットした結果、用いたすべての細胞において、予想された 150-kDa のバンドが検出された(図 5 A)。また、この 150-kDa バンドは、作製した 3 種類の抗体すべてで共通して検出されたことから、PCR により得られた配列がコードするタンパク質が細胞内に存在することが明らかとなった。また、Cx43 は卵巣内において主に顆粒膜細胞で発現しており、卵巣 cDNA ライブラリーより単離、同定された CIP150 が、同様に顆粒膜細胞において発現しているかを RT-PCR により解析した。ラット顆粒膜細胞より調製した cDNA を鋳型とし、Yeast two-hybrid により得られた KIAA1432-CT の配列を増幅した結果、顆粒膜細胞における CIP150 の発現が確認された(図 5 B)。なお、Cx43 は FSH の刺激により、RNA レベルで発現量が上昇することが知られているが(Yogo *et al.*, 2001)、CIP150 の発現量に顕著な差は見られなかった。

## CIP150 は細胞内において Cx43 と会合する

次に、CIP150 と Cx43 との会合を確認するために、CIP150 配列の N 末端に FLAG タグを付加し、Cx43 と共に HEK293 細胞に強制発現した。HEK293 細胞は、内在性のコネクシン遺伝子の発現量が低いことが知られているが、

図 5 A で示したように CIP150 は発現している。抗 FLAG 抗体を用い免疫沈降を行ない、Cx43 の共沈を確認した結果、強制発現した細胞において CIP150 と Cx43 との会合が見られた (図 6 A)。さらに、内在性の CIP150 と Cx43 が発現しており、ギャップ結合を介したチャネル活性が高いことが知られている NRK 細胞において、抗 CIP150-M 抗体を用い免疫沈降した結果、Cx43 の共沈が見られた。このことより、これら 2 つのタンパク質は内在性の発現レベルで会合することが明らかとなった (図 6 B)。その際、CIP150 と共沈してくる Cx43 は、全細胞抽出液中のシグナルに対し、バンドがシフトすることが見られ、ウエスタンブロットにおいて Cx43 は、リン酸化レベルが高いものほどバンドがシフトすることから、CIP150 はリン酸化の高い Cx43 と会合していると考えられた。そこで抗 CIP150-M 抗体で共沈してくる Cx43 をアルカリホスファターゼで処理しウエスタンブロットを行なったところ、バンドのシフトが見られなくなったことより、リン酸化レベルが高い Cx43 と CIP150 が会合していることが確認された (図 6 C)。

#### Cx43 のリン酸化は CIP150 との会合に必須ではない

これら 2 つのタンパク質の会合と、Cx43 のリン酸化との関係を解析するために、Cx43-S4A 変異体を用い CIP150 との会合を確認した。この変異体は、細胞内においてギャップ結合を構築するがリン酸化による修飾をほとんど受けず、物質透過活性を示さないことが報告されている (Yogo *et al.*, 2001)。HEK293 細胞と同様、内在性のコネクシン遺伝子の発現量は低いが CIP150 は発現している HeLa 細胞に、野生型または S4A 変異体の Cx43 を遺伝子導入し、内在性の CIP150 との会合を調べた。その結果、S4A 変異体は CIP150 と会合することが示された (図 7 B)。また、<sup>32</sup>P 正リン酸により細胞をラベルし、Cx43-S4A と野生型とのリン酸化レベルを確認した結果、S4A 変異体はリン酸化レベルが低いこと (図 7 A)、免疫蛍光染色により、野生型および S4A 変異体は細胞間にギャップ結合を構築していることも確認された (図 7 C)。これらの結果より、Cx43 のリン酸化は CIP150 との会合に必須ではない可能性が示唆された。

次に、ARF-GEF の阻害剤であり、ゴルジ体の構造を破壊することでタンパク質の輸送を阻害する BFA で細胞を処理し、Cx43 の細胞内局在が CIP150 との会合に与える影響を解析した。まず、BFA 存在下で NRK 細胞を 6 時間培養し、1% Triton X-100 buffer による細胞分画を行い、Cx43 によるギャッ

プ結合構築が阻害されているか確認した。この手法はギャップ結合を構築している Cx43 は、非イオン性の界面活性剤に対し不溶性を示すことを利用したものである (Musil and Goodenough, 1991)。1% Triton X-100 buffer により細胞を溶解し、細胞抽出液を超遠心により分画した結果、BFA 処理をした細胞において Triton 不溶性画分のリン酸化された Cx43 のバンドが減少することが確認された (図 8 A)。また、免疫蛍光染色により、細胞間におけるギャップ結合のシグナルが減少し、Cx43 の局在が細胞質へと移行することも観察され (図 8 B)。BFA 処理により、Cx43 の細胞膜への輸送が阻害されていることが確認された。そこで、この条件下における Cx43 と CIP150 との会合を調べた結果、CIP150 と共沈する Cx43 が減少し、Cx43 の細胞膜への輸送はこの会合に重要であることが示された (図 9)。

以上の結果から、CIP150 と Cx43 との会合は、細胞膜またはその輸送過程において起こること、この時、Cx43 は高いリン酸化を受けているがリン酸化そのものは CIP150 との会合に必須でないことが明らかとなった。

### Cx43-CT における CIP150 結合領域の決定

次に、Cx43 と CIP150 との会合をさらに詳しく解析するために、Cx43-CT における CIP150 の結合部位の決定を GST pull down 法により行なった。GST 融合型 Cx43-CT および、20 アミノ酸 (1 は 16 アミノ酸) の欠損を有する変異体 (Cx43-CT 1-8; 図 10 A) の組換えタンパク質を大腸菌で発現、精製した。また、COS7 細胞に FLAG-1432-CT を過剰発現し、細胞抽出液を回収した。この細胞抽出液中に精製した組換えタンパク質を加え、GST 融合 Cx43-CT と会合してくる FLAG-1432-CT をウエスタンブロットにより検出した。その結果、野生型および 1 以外の変異型 Cx43-CT において KIAA1432-CT との会合が確認され (図 10 B)、1 領域 (227-242) が重要である可能性が示唆された。そこで、CIP150 結合領域を欠損した変異型 Cx43 (Cx43<sup>227-242</sup>) を作製し、細胞内で CIP150 との会合を確認した。HEK293 細胞に Cx43<sup>227-242</sup> を遺伝子導入し、抗 CIP150-M 抗体で免疫沈降した結果、野生型 Cx43 で見られる会合が、Cx43<sup>227-242</sup> では確認されなかった (図 10 C)。これらの結果から、この 2 つのたんぱく質は、KIAA1432-CT にあたる CIP150 の C 末端 164 アミノ酸と Cx43-CT の膜貫通領域下流 16 アミノ酸 (227-242) を介して会合していることが示された。

## CIP150 結合領域は Cx43 のギャップ結合構築に重要である

CIP150 が Cx43 のギャップ結合制御機構においてどのような機能を担うかを解析するために、まず CIP150 の結合領域を欠損している Cx43<sup>227-242</sup> の細胞内での挙動を解析した。図 10 C において、Cx43<sup>227-242</sup> はウエスタンブロットにより検出した時、バンドのシフトが見られなかったことから、この変異体はリン酸化による修飾を受けないことが予想された。そこでまず、この変異体を HeLa 細胞に遺伝子導入し、<sup>32</sup>P 正リン酸ラベルによりそのリン酸化レベルを調べた。その結果、野生型 Cx43 を発現した細胞で見られるリン酸化のシグナルが、Cx43<sup>227-242</sup> ではほとんど検出されなかった(図 11 A)。また、免疫染色により細胞内における局在を HeLa 細胞において解析した結果、Cx43<sup>227-242</sup> は細胞内においてギャップ結合を構築せず細胞質に局在することが見られた(図 11 B)。さらに、この細胞質における局在を調べるために、HeLa 細胞に Cx43<sup>227-242</sup> を遺伝子導入し、小胞体を染色することが知られているレクチンの 1 つ、コンカナバリン A (ConA) と Cx43 との二重染色を行なった(図 12)。その結果、ConA により染色されたシグナルは、核の周辺を中心に顆粒状にみられ(図 12 C)、Cx43<sup>227-242</sup> が共局在することが観察された(図 12 D)。しかし、Cx43<sup>227-242</sup> はそれ以外の場所にも局在を示しており、少なくとも小胞体から他の細胞器官に輸送されていることが予想された。次に、Cx43<sup>227-242</sup> がギャップ結合を構築しないことが示されたが、これに伴い物質透過活性も消失するかを確認するために、Scrape-loading 法による色素透過活性の定量を行なった。HEK293 細胞に野生型 Cx43、Cx43<sup>227-242</sup> をそれぞれピューロマイシン耐性遺伝と共に遺伝子導入し、ピューロマイシンで選別を行い、コンフルエントになるまで培養した細胞を用い、チャネル活性を測定した。その結果、野生型を発現している細胞で観察された細胞間での色素の移行が、この変異体では認められず、チャネル活性を持たないことが示された(図 13)。これらの結果より、Cx43-CT における CIP150 結合領域は、リン酸化による修飾、ギャップ結合の構築およびチャネル活性に重要であることが示された。

## siRNA による CIP150 の発現抑制は Cx43 の細胞膜への局在とチャネル活性を減少する

Cx43 欠損変異体において見られた表現型が、CIP150 との会合が阻害された結果によるものかを解析するために、CIP150 に対する siRNA を作製し、

その発現抑制時における Cx43 細胞内での挙動を調べた。まず CIP150 を標的とした 2 種類の siRNA 発現ベクター (siCIP150-1、-2) を作製し、その発現抑制効果を HEK293 細胞において調べた。ピューロマイシン耐性遺伝と共に siRNA 発現ベクター、GFP 発現ベクターを遺伝子導入し、1 日選別を行った。CIP150 の発現量を免疫沈降後、ウエスタンブロットにより確認した結果、siCIP150-1 は強い発現抑制が見られ、シグナル強度をデンシトメーターで定量した結果、コントロールに比べ 27%まで発現量の低下が見られた(図 14)。また、siCIP150-2 発現細胞においても発現が 55%まで抑制されていた。なお、遺伝子導入効率とタンパク質量の内部標準としてそれぞれ用いた GFP とアクチンの差は認められなかった。次に、これら 2 つの siRNA 発現ベクターを用い、CIP150 発現抑制時における Cx43 の細胞内局在を免疫蛍光染色により確認した。その結果、Cx43 と共に siRNA 発現ベクターを遺伝子導入した細胞において、細胞間にギャップ結合の構築が認められるものの、コントロールに比べそのシグナルは弱く、ぼやけていた(図 15 A)。また、コントロールでは認められない細胞内における Cx43 のシグナルも観察された。この細胞内のシグナルが見られる細胞の割合を、各実験区あたり独立した 2 回の実験を行い、100 個の細胞を数えることで定量した結果、CIP150 を発現抑制した細胞ではコントロールに比べ、明らかに Cx43 の細胞質における局在が増加していることが確認された(図 15 B)。さらに、CIP150 発現抑制細胞において、Cx43 が構築するギャップ結合を介したチャネル活性が低下するかを調べるために、Scrape-loading 法による色素透過活性の定量を行なった(図 16)。その結果、Cx43 発現細胞に比べ CIP150 発現を抑制した細胞はギャップ結合を介した色素透過活性は有意に低下していた。以上の結果より、細胞内において CIP150 は Cx43 の局在制御に関わっており、特にギャップ結合の構築に重要ではないかと考えられた。

表 1 Yeast two-hybrid により得られた候補遺伝子

候補遺伝子名	独立クローン数
Eleven-nineteen Lysine rich Leukemia (ELL)	7
RanBPM homolog	1
Ub-like protein	14
MHC class I like	2
Triosephosphate isomerase (TPI)	2
PIPK type II $\gamma$	1
KIAA1432 homolog	3

Yeast two-hybrid により得られた陽性クローの遺伝子名とクローン数を表にまとめた。スクリーニングは、ラット Cx43-CT を bait、ラット卵巣 cDNA ライブラリーを prey とし行なった。

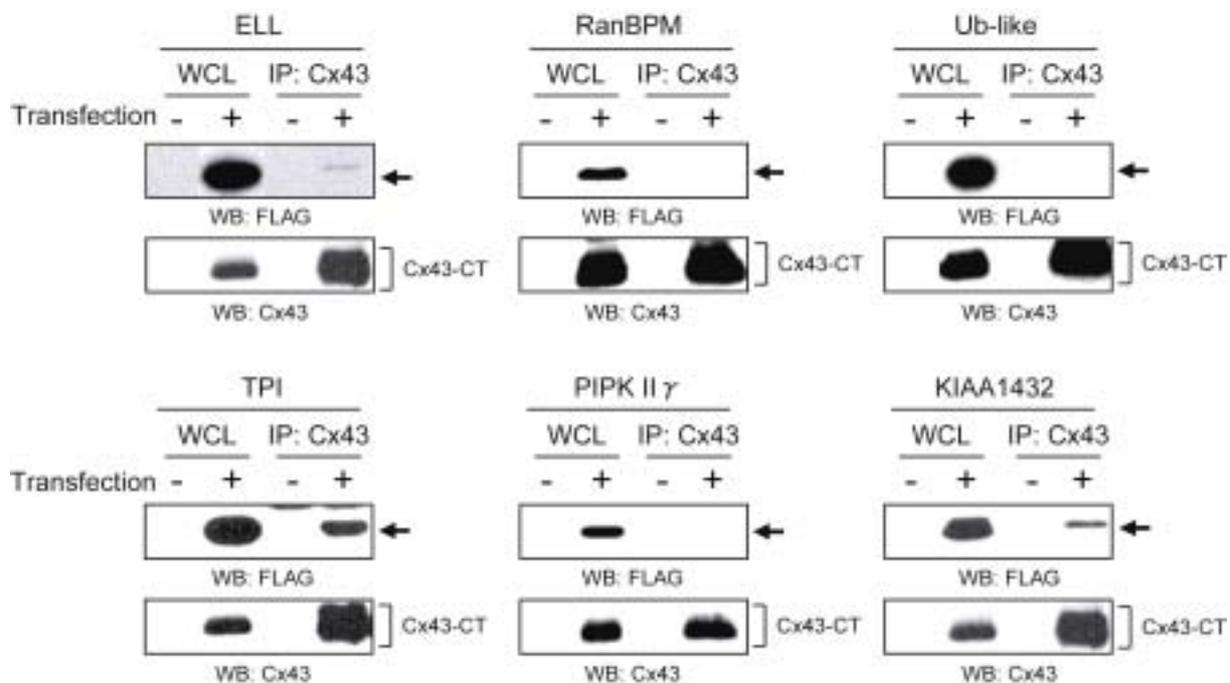
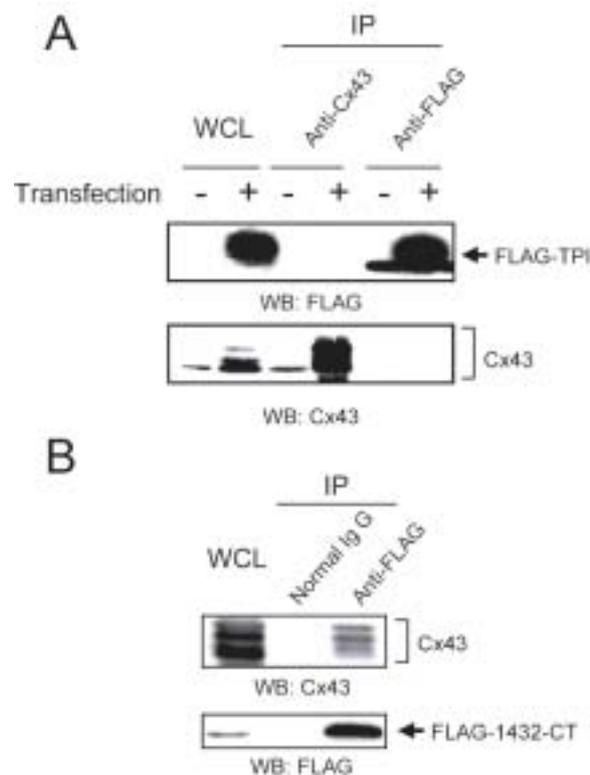


図 1 候補遺伝子産物と Cx43-CT との細胞内での会合

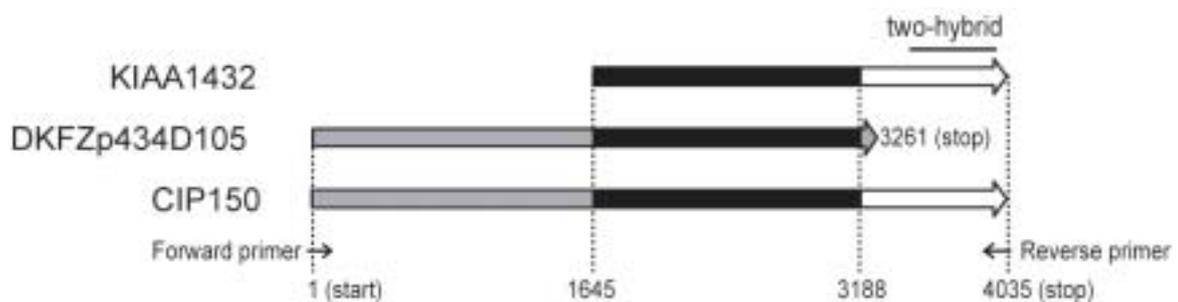
Yeast two-hybrid により得られた各候補遺伝子の断片配列の上流に FLAG タグを付加し、Cx43-CT と共に COS7 細胞において過剰発現した。Cx43-CT を認識する抗 Cx43 抗体で免疫沈降後、抗 FLAG または Cx43 抗体でウエスタンブロットを行なった。WCL: whole cell lysates。



## 図 2 候補遺伝子産物と Cx43 との細胞内での会合

A. COS7 細胞に N 末端に FLAG タグを付加した Triosephosphate isomerase (TPI) と Cx43 を過剰発現し、抗 Cx43 および FLAG 抗体それぞれで免疫沈降し、各抗体でウエスタンブロットを行なった。

B. HEK293 細胞において N 末端に FLAG タグを付加した KIAA1432 の C 末端領域 (FLAG-1432-CT) と、Cx43 全長配列とを過剰発現し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、抗 Cx43 および FLAG 抗体それぞれでウエスタンブロットを行なった。



**図 3 KIAA1432 および DKFZp434D105 の ORF の比較**

KIAA1432 および DKFZp434D105 の ORF を比較すると、DKFZp434D105 の 3' 側と KIAA1432 の 5' 側は相同な配列 (1646-3188) を有していた。DKFZp434D105 の開始コドン (Forward primer) および KIAA1432 の終止コドン (Reverse primer) をそれぞれ含むプライマーを設計し、これを用いた PCR を行ない、ヒト胎盤 cDNA より CIP150 全長配列を得た。

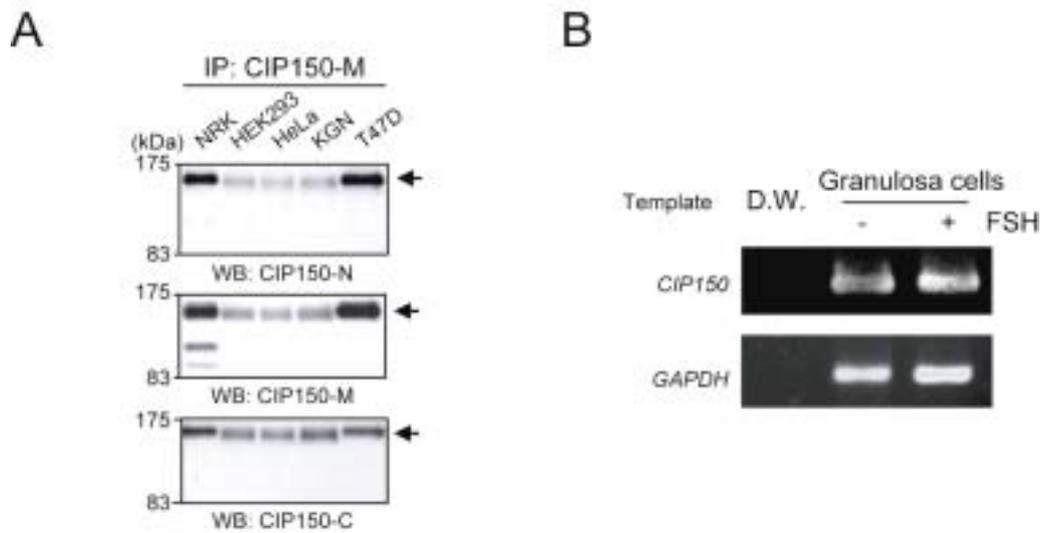
```

1  MIAVSTANGY  ILFFHITSTR  GDKYLYEPVY  PKGSPQMKGT
41  PHFKEEQCAP  ALNLEMRKIL  DLQAPIMSLO  SVLEDLLVAT
81  SDGLLHLIHW  EGMTNGRKAI  NLCTVPPSYD  LQSSRVGSFL
121 GFTDVHIRDM  EYCATLDGFA  VVFNDGKVGf  ITPVSSRFTA
161 EQLHGWWPQD  VVDGTCVAVN  NKYRLMAFGC  VSGSVQVYTI
201 DNSTGAMLLS  HKLELTAKQY  FDIWNKTGAV  KLMRWSPDNS
241 VVIVTMEYGG  LSLMSVFGAQ  LICTLGGDFA  YRSDGTKKDP
281 LKINSMSWGA  EGYHLWVISG  FGSQNTIEIS  DLRSVVKQPS
321 ILLFQFIKSV  LTVNPMCSNQ  EQVLLQGEDR  LYLNCGEASQ
361 TQNPRSSSTH  SEHKPSREKS  PFADGGLESQ  GLSTLLGHRH
401 NHVVQISSSTY  LESNMPIRFS  AIDKLGQNTA  VVGKFGFAHY
441 SLLTKNKLF  GNITQEQNNI  VTGGLAWWND  FMVLACYNIN
481 DRQEELRVYL  RTSNLDNAFA  HVTKAQAETL  LLSVFDNMVI
521 VFRADCSICL  YSIERKSDGP  NTTAGIQVLQ  EVSMSRYIPH
561 PFLVSVTLT  SVSTENGITL  KMPQQARGAE  SIMLNLAGQL
601 IMMQRDRSGP  QIREKDSNPN  NQRKLLPFCP  FVVLAQSVEN
641 VWTTCRANKQ  KRHLLEALML  SCGGAGMKVM  LPLFPRDHRK
681 PHSFLSQRIM  LPPHINIYPL  AVLFEDALVL  GAVNDTLLYD
721 SLYTRNNARE  QLEVLFPFCV  VERTSQIYLH  HILRQLLVRN
761 LGEQALLLAQ  SCATLPYFPH  VLRLMLHEVL  EEEATSREPI
801 PDPLPTVAK  FITEFPLELQ  TVVHCARKTE  YALWNYLFAA
841 YGNPKDLFEE  CIMAQDLDTA  ASYLIILONM  EYPAVSRQHA
881 TLLFNTALEQ  GKWDLCRHMI  RFLKAIGSGE  SETPSTPTA
921 QEPSSSGGFE  FFRNRSISLS  QSAENVPAEK  FSLQKTLSPF
961 SGPSGKRWSE  DSDCAENMYI  DMNLRHARR  LLEDVRLKDL
1001 GCFEAQLGFE  LISMLCKERT  BAARVDNFVI  ALKRLHKDFL
1041 NPLPIIPASS  ISSPFKNGKY  RTVGEQLLKS  QSADPFLNLE
1081 MDAGISNIQR  SQSWLSNIGP  THHEIDTASS  HGPQMQDAFL
1121 SPLSNKGDEC  SIGSATDLTE  SSSMVDGDMT  MVDENFSTLS
1161 LTQSELEHIS  MELASKGPHK  SQVQLRYLLH  IFMEAGCLOW
1201 CIVIGLILRE  SSIINQILVI  TQSSEVDGEM  LQNIKTGLHA
1241 VDRWASTDCP  GYKPFNLNIK  FQLQKLSEIT  EEQVQPDAPQ
1281 PITMGKTPEQ  TSPRAEESRG  SSSHGSIPQG  EVGSSNMVSR
1321 KEEDTAQARE  EEPFDGTYD  CSVS

```

#### 図 4 CIP150 のアミノ酸配列と抗原部位

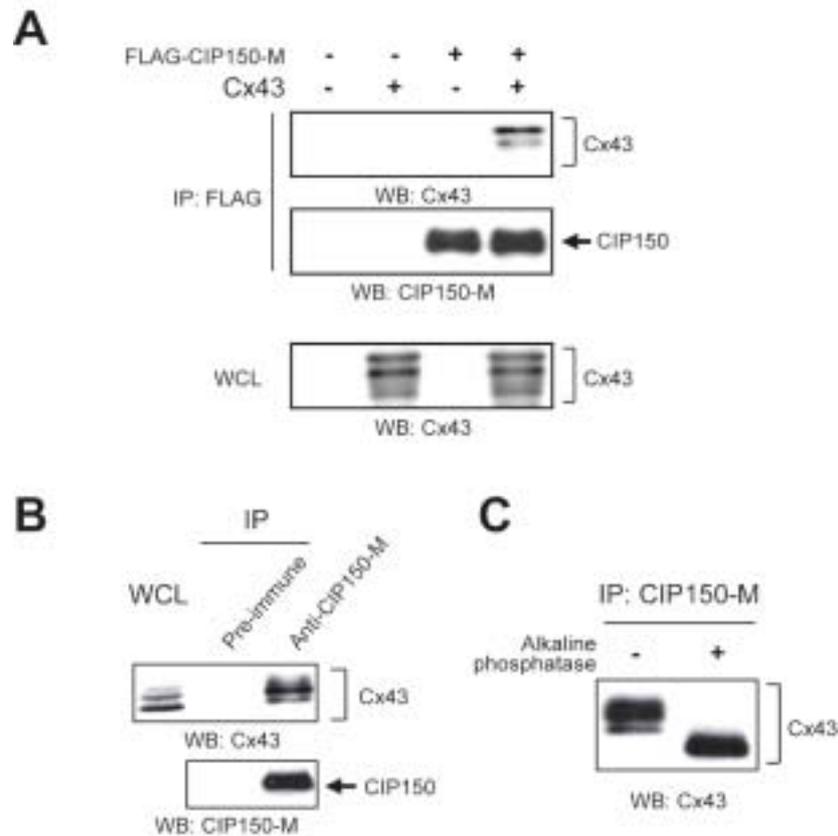
CIP150 の ORF 配列より予想されるアミノ酸配列と抗体作製に用いた 3 種類の抗原部位（下線）を図に示した。



### 図 5 CIP150 の細胞における発現の確認

A. 図 4 で示した抗原部位を認識する抗体を用い NRK(ラット腎臓)、HEK293 (ヒト胎児腎臓)、HeLa(ヒト子宮)、KGN(ヒト顆粒膜細胞)、T47D(ヒト乳腺)細胞における CIP150 の発現を確認した。CIP150-N は N 末端、-M は中央、-C は C 末端を認識する。

B. ラット顆粒膜細胞における CIP150 発現を RT-PCR により確認した。

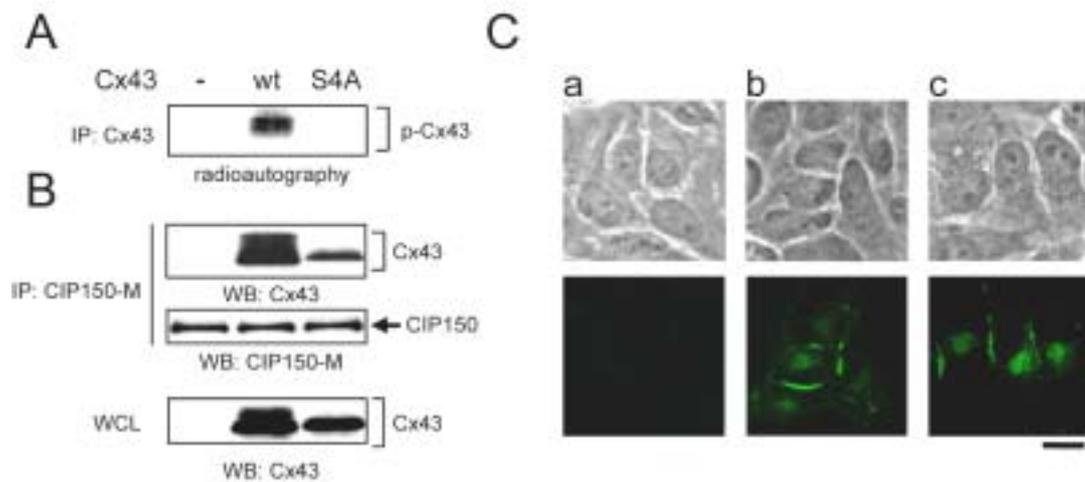


### 図 6 CIP150 はリン酸化レベルの高い Cx43 と会合する

A. HEK293 細胞において N 末端に FLAG タグを付加した CIP150 (FLAG-CIP150) と、Cx43 全長配列とを過剰発現し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降後、抗 Cx43 および CIP150-M 抗体それぞれでウエスタンブロットを行った。

B. NRK 細胞における、内在性 CIP150 と Cx43 との会合。抗 CIP150-M 抗体で免疫沈降後、抗 Cx43 および CIP150-M 抗体それぞれでウエスタンブロットを行なった。免疫沈降のネガティブコントロールとして、抗原を免疫する以前に採血した血清を用いた。

C. NRK 細胞より抗 CIP150-M 抗体で免疫沈降し、共沈した Cx43 をアルカリホスファターゼにより脱リン酸化を行なった。

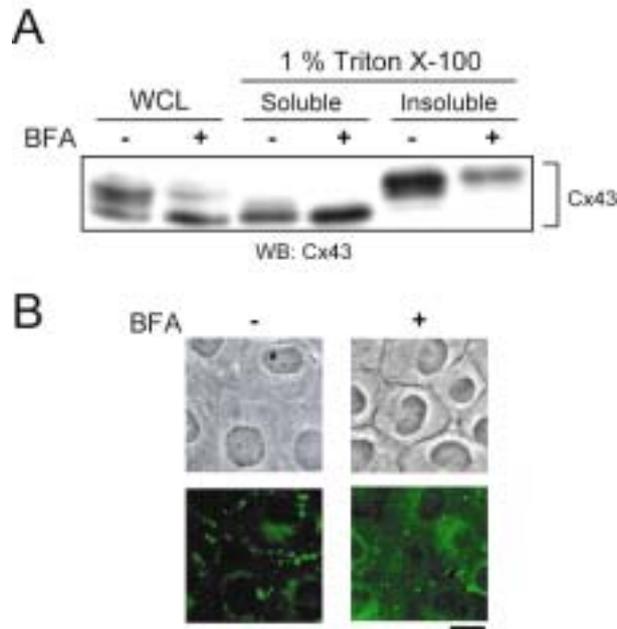


### 図 7 CIP150 と Cx43-S4A とは会合する

A. HeLa 細胞に野生型 Cx43 および Cx43-S4A を遺伝子導入し、<sup>32</sup>P 正リン酸により細胞をラベルすることで、そのリン酸化レベルを確認した。

B. A と同様に遺伝子導入を行い抗 CIP150-M 抗体で免疫沈降し、抗 Cx43 および CIP150-M 抗体それぞれでウエスタンブロットを行なった。

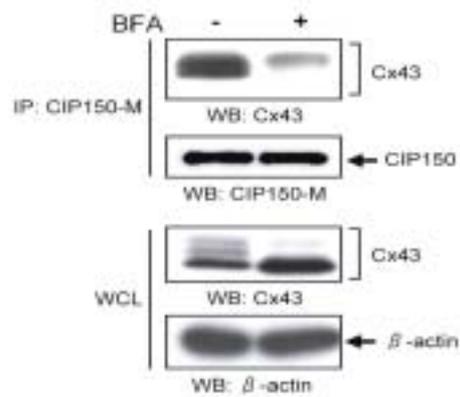
C. HeLa 細胞に野生型 Cx43 および Cx43-S4A を発現し、抗 Cx43 抗体を用いた免疫蛍光染色により Cx43 の局在を確認した。a: ベクターコントロール、b: 野生型 Cx43、c: Cx43-S4A。Bar: 15 μ m。



### 図 8 NRK 細胞における BFA 処理

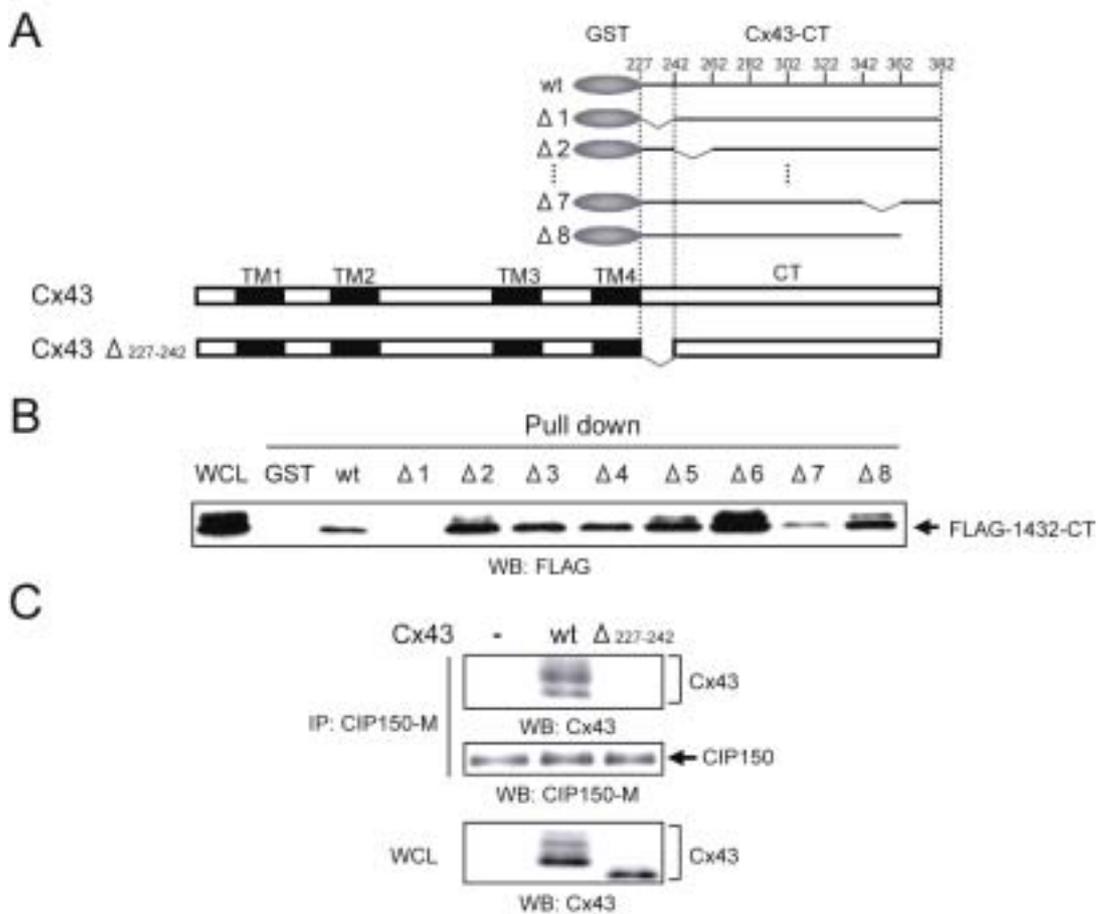
A. NRK 細胞を BFA (5  $\mu$ g/ml) で 6 時間処理し、ギャップ結合を構築している Cx43 は、非イオン性の界面活性剤に対し不溶性を示すことを利用した 1% Triton X-100 buffer による細胞分画を行った。

B. BFA で処理した NRK 細胞において抗 Cx43 抗体で免疫蛍光染色を行い、Cx43 の局在を確認した。Bar: 15  $\mu$ m。



**図 9 BFA 処理は Cx43 と CIP150 との会合を阻害する**

BFA 処理した NRK 細胞内での CIP150 と Cx43 との会合を、抗 CIP150-M 抗体で免疫沈降し確認した。タンパク質量の内部標準として、アクチンによるウエスタンブロットを行なった。

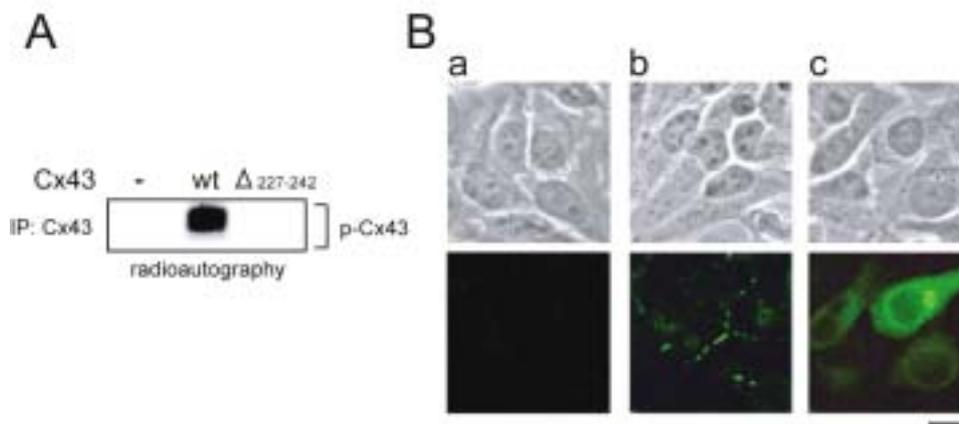


**図 10 Cx43 の 227-242 番目のアミノ酸は CIP150 との会合に重要である**

A. GST 融合型 Cx43-CT および、20 アミノ酸 ( Δ1 は 16 アミノ酸 ) の欠損を有する変異体の模式図 ( Δ1-8 )。

B. FLAG-1432-CT を過剰発現した COS7 細胞の細胞抽出液と GST 融合 Cx43-CT を用い、GST pull down を行なった。GST-Cx43-CT と会合してくる FLAG-1432-CT をウエスタンブロットにより検出した。

C. HEK293 細胞に野生型 Cx43 または CIP150 結合領域を欠損した Cx43<sup>Δ227-242</sup> を遺伝子導入し、細胞内で Cx43<sup>Δ227-242</sup> と CIP150 とが会合しないことを確認した。



**図 11 CIP150 結合領域は Cx43 のギャップ結合構築に重要である**

A. 野生型の Cx43 および Cx43<sub>227-242</sub> を HeLa 細胞に遺伝子導入し、<sup>32</sup>P 正リン酸ラベルによりそのリン酸化レベル確認した。

B. HeLa 細胞に野生型 Cx43 および Cx43<sub>227-242</sub> を発現し、抗 Cx43 抗体を用いた免疫蛍光染色により Cx43 の局在を確認した。a: ベクターコントロール、b: 野生型 Cx43、c: Cx43<sub>227-242</sub>。Bar: 15 μm。

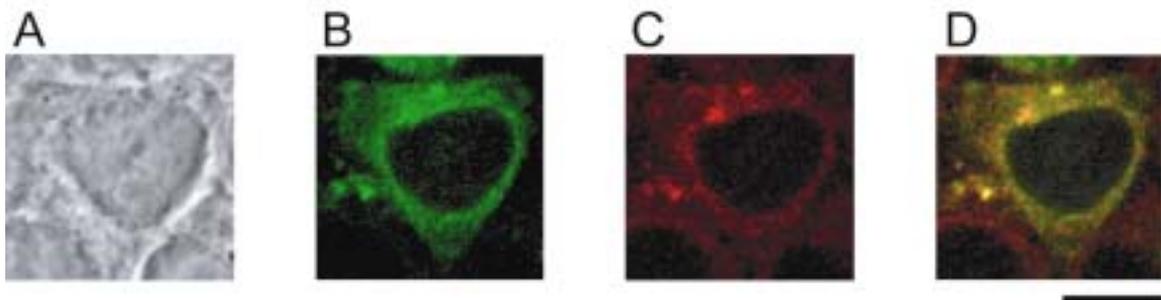
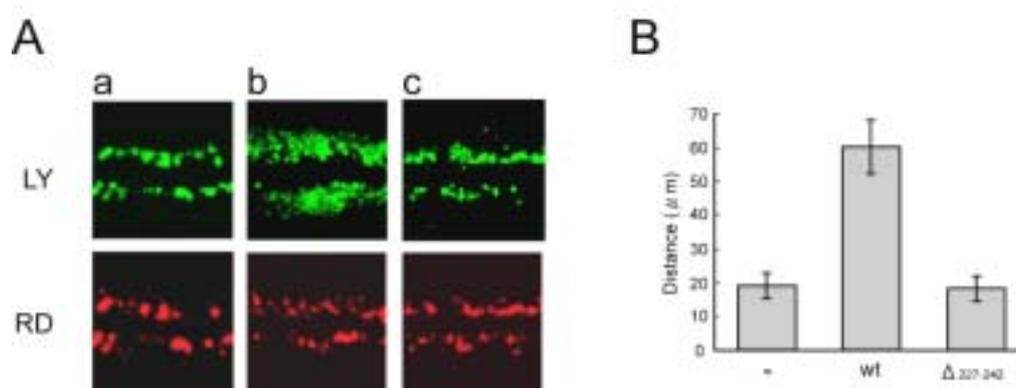


図 12 Cx43<sub>227-242</sub> 発現細胞における小胞体と Cx43 との 2 重染色

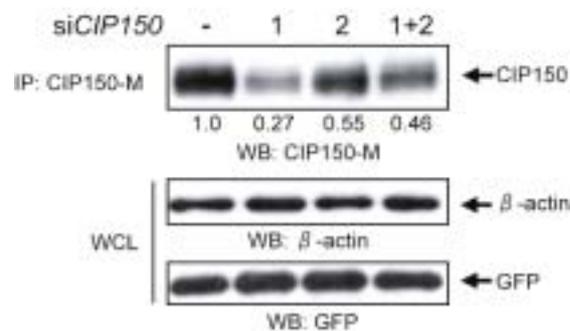
HeLa 細胞に Cx43<sub>227-242</sub> を遺伝子導入し、コンカナバリン A (ConA) と Cx43 との二重染色を行なった。A は位相差、B は抗 Cx43 抗体、C は ConA による染色像、D は B と C を重ねた像。Bar: 15  $\mu$ m。



**図 13 Cx43<sub>227-242</sub> は物質透過活性を持たない**

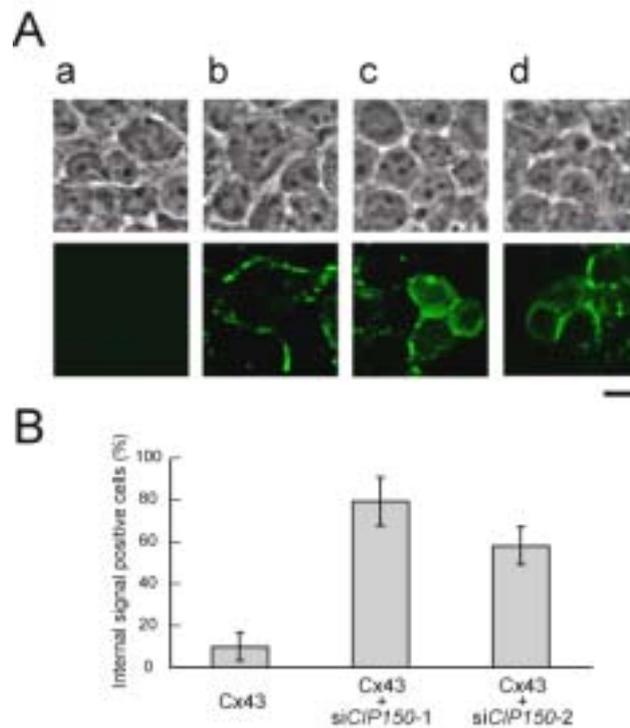
A. HEK293 細胞に空ベクター (a)、野生型 Cx43 (b)、Cx43<sub>227-242</sub> (c) をそれぞれピューロマイシン耐性遺伝と共に遺伝子導入し、ピューロマイシンで 1 日間選別を行った後、Scrape-loading 法による色素透過活性を解析した。0.25% Lucifer yellow (LY; 分子量 476Da)、0.75% Rhodamine dextran (RD; 分子量 10kDa) /PBS 溶液中で細胞を直線状に 27G の注射針で傷つけて色素を取り込ませ、室温で 10 分間インキュベートし、傷口から取込まれた色素の細胞間での移行を検鏡した。RD は、分子量が 1kDa 以上でありギャップ結合チャネルを通過できないことから、ネガティブコントロールとして用いている。

B. A を定量化したグラフ。



**図 14 CIP150 に対する siRNA 発現ベクターの作製**

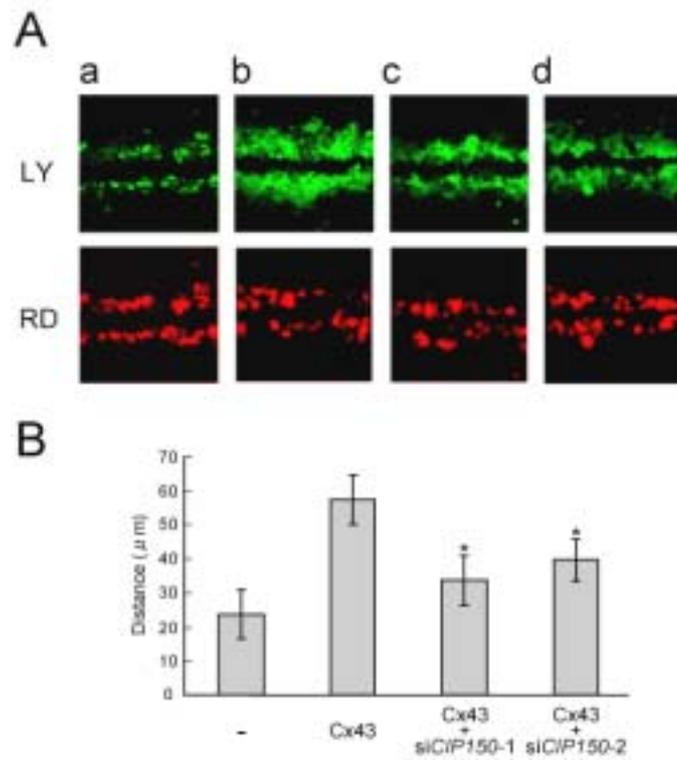
CIP150 を標的とした 2 種類の siRNA 発現ベクター ( *siCIP150-1*、*-2* ) を作製し、その発現抑制効果を HEK293 細胞において調べた。ピューロマイシン耐性遺伝と共に siRNA 発現ベクター、GFP 発現ベクターを遺伝子導入し、1 日選別を行い、CIP150 の発現量を免疫沈降後、ウエスタンブロットにより確認した。上のパネルの下に示してある数値は、CIP150 のシグナル強度をデンストメーターで定量し、コントロールに対する発現量の相対比を算出したものである。GFP とアクチンは、遺伝子導入効率とタンパク質量の内部標準として用いた。



**図 15 CIP150 発現抑制時において細胞質に局在する Cx43 は増加する**

A. HEK293 細胞において、CIP150 発現抑制時における Cx43 の細胞内局在を免疫蛍光染色により確認した。a: ベクターコントロール、b: Cx43、c: Cx43 + siCIP-150-1、d: Cx43 + siCIP-150-2。Bar: 15  $\mu$  m。

B. 細胞内のシグナルが見られる細胞の割合を、100 個の細胞を数えることで定量した。各実験区あたり独立した 2 回の実験を行い、平均した数値をグラフ化した。



**図 16 CIP150 発現抑制は Cx43 によるギャップ結合チャネル活性を阻害する**  
 A. HEK293 細胞に空ベクター (a)、野生型 Cx43 (b)、Cx43 + siCIP-150-1 (c)、Cx43 + siCIP-150-2 (d) をそれぞれピューロマイシン耐性遺伝子と共に遺伝子導入し、ピューロマイシンで 1 日間選別を行った後、図 13 A と同様に Scrape-loading 法による色素透過活性を解析した。  
 B. A を定量化したグラフ。

## 考察

本研究では、Cx43 会合タンパク質の探索を Yeast two-hybrid 法により行い、新規タンパク質 CIP150 を同定した。この会合には、CIP150 の C 末端の 164 アミノ酸と、Cx43-CT の膜貫通領域下流の 16 アミノ酸が重要であった。細胞内において CIP150 はリン酸化レベルの高い Cx43 と会合していることが示された。しかし、Cx43-S4A との会合が見られたことより、Cx43 のリン酸化は CIP150 との会合に必須ではなかった。また、BFA 処理により会合が阻害されたことより、この 2 つのタンパクの会合は細胞膜への輸送過程において、ゴルジ体以降に起こることが示された。さらに、Cx43<sup>227-242</sup> の細胞内での挙動を解析した結果や siRNA による CIP150 の発現抑制の実験より、CIP150 は Cx43 が細胞膜上においてギャップ結合を構築するのに重要ではないかと考えられた。

CIP150 は、本研究でその全長配列を明らかにした新規遺伝子であり、そのアミノ酸配列に対する他種の相同配列を NCBI-BLAST において探索したところ、ゲノム配列より予想されるアミノ酸配列を含めると、酵母、線虫、シロイヌナズナ、ミドリフグ、ニワトリ、チンパンジーに至るまで、多種にわたり相同性を有する配列が存在した。この内、ミドリフグでは 71% の相同性があったが、シロイヌナズナや線虫では約 25% であり、酵母ではそれ以下であった。ギャップ結合が存在しない植物や、酵母でこのような配列が存在していることから、CIP150 は Cx43 によるギャップ結合構築を制御する以外の機能を有しているのではないかと予想される。一方、線虫などの無脊椎動物では、脊椎動物のコネクシンとタンパク質配列の相同性は無いがタンパク質構造が似ておりギャップ結合を構築するイネクシンが存在することが報告されている (Phelan, 2005)。無脊椎動物における CIP150 がイネクシンと会合する可能性も考えられるが、これは予想の域に達しない。なお、哺乳類や鳥類 (ニワトリ) ではヒト CIP150 配列に対する相同性は高く、ニワトリと比較しても 85% の相同性があることから、各動物種の細胞内において CIP150 と Cx43 の相同配列は会合するのではないかと予想される。

CIP150 は、HUGE Protein Database の KIAA1432 に関するデータとして、その発現量は低いヒトの様々な組織において RNA レベルでの発現が報告されている (<http://www.kazusa.or.jp/huge/gfpage/KIAA1432/>; 参考図 6)。このことは、本研究で用いた様々な組織由来の細胞全てにおいて CIP150 の発現

が見られたことと一致している。CIP150 は、卵巣の cDNA ライブラリーを用いたスクリーニングにより単利、同定されたが、卵巣特異的な機能を有するかは不明である。Cx43 は脳や心臓、卵巣において発現量が高いが、他のコネクシンに比べ広範な組織で発現していることが知られており (Bruzzone *et al.*, 1996a,b) KIAA1432 の発現パターンより卵巣以外の組織においても Cx43 の制御に関わる可能性は考えられる。このことは、NCBI の UniGene において、EST 配列データを基に各遺伝子の発現パターンを示した EST Profile Viewer で、KIAA1432 とヒト Cx43 との発現を比較しても推察される (参考図 7)。少なくとも、本実験で用いた腎臓由来の NRK や HEK293 細胞、子宮由来の HeLa 細胞で CIP150 は Cx43 と会合することは確認されている。また、卵巣における機能に関してもまだ不明であるが、ラット顆粒膜細胞を用いた RT-PCR の結果より、CIP150 は卵巣において Cx43 が重要な役割を担っている顆粒膜細胞で発現していることが確認されており、データとして示していないが、ヒト顆粒膜細胞由来の腫瘍細胞である KGN 細胞において Cx43 と会合するという結果も得られている。これらのことは顆粒膜細胞において CIP150 が Cx43 の制御機構に関わることを予想させるが、他の組織も含めて今後生体内での機能解析を行なう必要がある。

CIP150 と Cx43 との結合領域は、KIAA1432-CT および GST-Cx43-CT を用いた pull down 法により同定され、この領域は細胞内においても 2 つのタンパク質の会合に重要であったことから、KIAA1432-CT にあたる CIP150 の C 末端 164 アミノ酸と Cx43-CT の膜貫通領域下流 16 アミノ酸 (227-242) であると考えられる。一方、Cx43-CT の 228-263 番目のアミノ酸は チューブリンの結合に重要であり、特に 234-243 番目のアミノ酸はチューブリン結合モチーフであるということが報告されている (Giepmans *et al.*, 2001b)。これらのことから CIP150 と Cx43 との会合に、チューブリンに関わる可能性が考えられたが、細胞をチューブリン重合阻害剤である nocodazole で処理をしても CIP150 と Cx43 との会合に変化が無いことという結果が得られており (データ省略) またチューブリンの会合は Cx43 の制御に関わらないという報告があることから (Giepmans *et al.*, 2001a) おそらく CIP150 と Cx43 との会合には作用しないのではないかと考えられる。また、CIP150 と他のコネクシンとの会合について本実験では解析しなかったが、C 末端領域はファミリー間で相同性が低いことから、おそらく会合しないのではないかと予想される。しかし、Cx43 は Cx40 (He *et al.*, 1999)、Cx45 (Martinez *et al.*, 2002) など異なるコネクシンとコネクソンを形成することが報告されており、このような場

合に CIP150 は Cx43 と会合するかなどさらに解析する必要がある。

CIP150 は NRK 細胞においてリン酸化レベルの高い Cx43 と会合していることが示され、CIP150 はリン酸化依存的に Cx43 と会合している可能性が示唆された。しかし、この結果を理解する上で、Cx43 の細胞内局在とリン酸化レベルとの相互関係を考慮する必要がある。これまでに、NRK 細胞ではギャップ結合を構築している Cx43 はリン酸化レベルが高いということが報告されている (Musil and Goodenough, 1991)。本研究においても BFA で細胞を処理したときに、ギャップ結合を構築している Cx43 (Triton 不溶性画分) が減少すると伴に、Cx43 のリン酸化依存的なバンドのシフトも消失していくことが確認されている。また、Cx43 は発現しているがギャップ結合を構築していない細胞において、カドヘリンを遺伝子導入し、接着結合を形成させると、ギャップ結合が構築され (Matsuzaki *et al.*, 1990; Jongen *et al.*, 1991)、Cx43 のリン酸化レベルも上昇することが報告されている (Musil *et al.*, 1990)。すなわち、Cx43 がギャップ結合を構築することと、リン酸化されることは相関関係がある。このことより、CIP150 がリン酸化依存的に Cx43 と会合する可能性と、ギャップ結合を構築している Cx43 と会合した結果、リン酸化レベルの高い Cx43 が共沈してきたという 2 つの可能性が有るのではないかと考えられる。これに関して、4 つのセリン残基におけるリン酸化部位をアラニンに置換した S4A 変異体 (Yogo *et al.*, 2001) は細胞内でほとんどリン酸化を受けないが、ギャップ結合を構築しており、この変異体と CIP150 は会合した結果が得られている。このことより、CIP150 は Cx43 のリン酸化依存的に会合するのではなく、ギャップ結合を構築している Cx43 と会合しており、その結果リン酸化レベルの高い Cx43 が優先的に共沈するのではないかと予想された。

しかし、これまでに Cx43 のリン酸化は、参考図 5 に示したように S4A の 4 つのセリン残基以外にも多く報告されており、他のリン酸化との関係も考慮する必要がある。これまでに報告されている PKC、MAPK、Src などによるリン酸化部位は、細胞増殖因子による刺激など、ある特定の条件下において起こること、またそれらのリン酸化はギャップ結合を負に制御することなどから、今回行なった実験条件ではあまり関与しないのではないかと予想される。これに対し、CK1 によるリン酸化は、その阻害剤である IC261 で細胞を処理すると、Cx43 の細胞膜への輸送は起こるが、ギャップ結合の構築が阻害されることが示されており (Cooper and Lampe, 2002)、CK1 依存的なリン酸化と CIP150 の Cx43 との会合の関係は、否定できない。しかし、

Cx43-S4A 発現細胞を  $^{32}\text{P}$  正リン酸でラベルし、リン酸化を確認した結果、そのシグナルがほとんど検出できないことから、CK1 のリン酸化は関与しないのではないかと推察される。

また、BFA 処理により Cx43 細胞内局在が細胞膜から細胞質へと変化すると会合が見られなくなることが示された。すなわち、CIP150 との会合には Cx43 が細胞膜へと輸送されることが重要であり、このことから、Cx43 と CIP150 とが細胞膜で会合している可能性が示唆される。しかし、BFA は小胞体-ゴルジ間輸送に関わる ARF-GEF の阻害剤であり、ゴルジ体構造を可逆的に破壊することから、両者の会合はタンパク質輸送時のゴルジ体以降に起こる可能性があることや、BFA が CIP150 に及ぼす影響は不明であり、CIP150 の細胞内局在を変化させた結果、会合が認められなくなった可能性もあり、さらに解析を行なう必要がある。

CIP150 の結合領域を欠損した Cx43<sub>227-242</sub> はリン酸化による修飾を受けず、ギャップ結合を構築しないことからチャネル活性を有さないことが示された。前述したようにギャップ結合を構築している Cx43 はリン酸化レベルが高いことをあわせて考えると、ギャップ結合を構築しない結果として Cx43<sub>227-242</sub> はリン酸化による修飾を受けないことが推察される。また、Cx43

<sub>227-242</sub> は細胞質に局在することが観察されたことより、CIP150 は Cx43 の細胞膜への輸送、細胞膜でのコネクソン同士の連結、ギャップ結合を構築した後の安定化に関わるのではないかと考えられた。しかし、このことはアミノ酸欠損によるこの変異体特有の表現型である可能性もある。これまでに、点変異により立体構造が異常となった Cx32 が、小胞体に局在し、細胞質のプロテアソームによって分解される小胞体関連分解を受けることが報告されている( VanSlyke *et al.*, 2000 )。この可能性に関して小胞体を染色する ConA と 2 重染色した結果より、Cx43<sub>227-242</sub> は小胞体においてその局在が見られるが、他の細胞質の領域にも存在していることが観察されており、立体構造の異常により小胞体関連分解を受けているのではないであろうと予想される。

また、siRNA により CIP150 を発現抑制した細胞では、Cx43 の細胞質における局在が増加していることが確認され、ギャップ結合チャネル活性も有意に低下したことから、CIP150 がギャップ結合構築制御に関わることを示唆していると考えられる。細胞膜においてギャップ結合を構築している Cx43 と会合していること、結合の阻害や CIP150 の発現抑制が Cx43 の局在を細胞質へと移行することなどの結果より、CIP150 は Cx43 がギャップ結合を安定

的に構築するのに関わるのではないかと思われるが、本実験ではその詳細なメカニズムを明らかにしておらず、更なる解析が必要である。

また CIP150 による制御機構を理解する上で、CIP150 自身の機能を理解することは重要である。しかし、CIP150 はこれまでに機能が知られているタンパク質ドメイン構造を全く有しておらず、唯一その C 末端にプレニル化モチーフ (CaaX) が存在する。プレニル化のなかでも、X がセリン残基であることから CIP150 はファルネシル化を受けると考えられ、この修飾により細胞膜に局在することが予想される。このことから、CIP150 は細胞膜においてギャップ結合を構築している Cx43 と会合しているのではないかと考えられるが、その詳細を解析するには CIP150 の細胞内局在を明らかにする必要がある。

本研究において CIP150 に対する抗体は 3 種類作製しており、これを用いた免疫蛍光染色を行ったが、CIP150 に得的な染色像は観察されなかった。また、CIP150 の N 末端に FLAG タグを付加し発現した細胞において、抗 FLAG 抗体による免疫蛍光染色も行ったが、そのシグナルを検出することができなかった。さらに、FLAG-CIP150 を細胞に過剰発現し、その細胞抽出液から抗 CIP150-M または FLAG 抗体を用いて免疫沈降し、ウエスタンブロットを行うとそのバンドが検出できたのに対し、全細胞抽出液では全くバンドを検出することができなかった。このようなことが起こる理由は不明であるが、CIP150 のタンパク質としての特殊な性質があるのかもしれない。

これまでに Cx43 の制御機構の解析は、Cx43-CT を中心に行なわれ、リン酸化部位や会合タンパク質の同定など、多くの知見が報告されている。例えば、Cx43 の裏打ちタンパク質として考えられている ZO-1 は、その 2 番目の PDZ ドメインを介して Cx43 の C 末端 20 アミノ酸と会合していることが知られている (Sorgen *et al.*, 2004)。しかし、Cx43-CT のほとんど (241 または 245 番目のアミノ酸以降) が欠損した変異体は、野生型と同様にギャップ結合を構築するということが示されており (Fishman *et al.*, 1991; Dunham *et al.*, 1992)、このことは ZO-1 や他の会合タンパク、リン酸化部位はギャップ結合の構築に必須ではない可能性を示唆する。これに対し、CIP150 は 227-242 番目の領域に会合することや、Cx43<sup>227-242</sup> はギャップ結合を構築しないことなどは、上記の報告に一致しており、CIP150 の重要性を示唆するのではないかと考えられる。一方、ZO-1 は心筋細胞において、介在板 (心筋細胞の長軸両端に見られる構造) 付近におけるギャップ結合構築に重要であるこ

とが示されており (Toyofuku *et al.*, 1998a) 細胞膜のギャップ結合を構築する領域を決定する役割を担っているのではないかと考えられる。すなわち、Cx43 は、ギャップ結合を適切な細胞膜領域に構築するのに ZO-1 との会合が、ギャップ結合を安定して構築するのに CIP150 との会合が重要であるのではないかと予想される。

### RT-PCR-ELISA



### 参考図 6 ヒト組織における KIAA1432 の発現パターン

HUGE Protein Database における報告で、KIAA1432 はその発現量は低いですがヒトの様々な組織において RNA レベルでの発現が確認されている。

( <http://www.kazusa.or.jp/huge/gfpage/KIAA1432/>より転載 )。

## KIAA1432

### Breakdown by Tissue

Tissue	Count	Spot Intensity	Gene EST / Total EST in pool
bladder	0	0	0 / 21754
blood	20	1	1 / 49988
bone	54	3	3 / 55055
bone marrow	0	0	0 / 36594
brain	36	17	17 / 469643
cervix	0	0	0 / 41294
colon	0	0	0 / 180153
eye	23	4	4 / 169020
heart	101	6	6 / 59062
kidney	71	10	10 / 139072
larynx	108	3	3 / 27598
liver	38	5	5 / 131343
lung	24	7	7 / 289012
lymph node	93	12	12 / 128237
mammary gland	49	7	7 / 140234
muscle	40	4	4 / 99982
ovary	62	6	6 / 95693
pancreas	30	6	6 / 197911
peripheral ...	39	1	1 / 25034
placenta	46	11	11 / 238006
prostate	29	4	4 / 133748
skin	18	3	3 / 165707
small intes...	70	1	1 / 14098
soft tissue	42	1	1 / 23774
spleen	0	0	0 / 19302
stomach	18	2	2 / 108315
tongue	0	0	0 / 28966
testis	43	6	6 / 136587
thymus	0	0	0 / 6844
uterus	55	10	10 / 181685
vascular	0	0	0 / 25893

### Breakdown by Developmental Stage

Stage	Count	Spot Intensity	Gene EST / Total EST in pool
embryo	71	40	40 / 557204
juvenile	83	5	5 / 59630
adult	36	36	36 / 975147

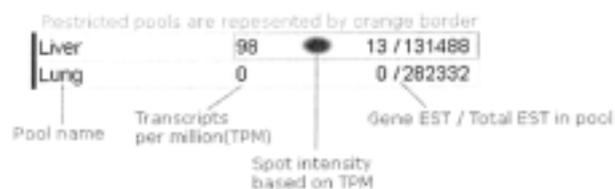
## Cx43

### Breakdown by Tissue

Tissue	Count	Spot Intensity	Gene EST / Total EST in pool
bladder	0	0	0 / 21754
blood	0	0	0 / 49988
bone	326	18	18 / 55055
bone marrow	191	7	7 / 36594
brain	117	55	55 / 469643
cervix	0	0	0 / 41294
colon	38	7	7 / 180153
eye	177	30	30 / 169020
heart	203	12	12 / 59062
kidney	14	2	2 / 139072
larynx	1413	39	39 / 27598
liver	22	3	3 / 131343
lung	114	33	33 / 289012
lymph node	7	1	1 / 128237
mammary gland	35	5	5 / 140234
muscle	40	4	4 / 99982
ovary	62	6	6 / 95693
pancreas	40	8	8 / 197911
peripheral ...	79	2	2 / 25034
placenta	134	32	32 / 238006
prostate	59	8	8 / 133748
skin	30	5	5 / 165707
small intes...	70	1	1 / 14098
soft tissue	378	9	9 / 23774
spleen	0	0	0 / 19302
stomach	92	10	10 / 108315
tongue	103	3	3 / 28966
testis	36	5	5 / 136587
thymus	0	0	0 / 6844
uterus	220	40	40 / 181685
vascular	772	20	20 / 25893

### Breakdown by Developmental Stage

Stage	Count	Spot Intensity	Gene EST / Total EST in pool
embryo	113	63	63 / 557204
juvenile	0	0	0 / 59630
adult	136	133	133 / 975147



参考図 7 EST 配列を基にした KIAA1432 と Cx43 の発現パターンの比較  
 EST Profile Viewer において、KIAA1432 とヒト Cx43 の発現を比較すると、  
 いくつかの組織で違いはあるが、どちらの遺伝子も比較的広範な組織で発現  
 していることが分かる。(NCBI UniGene EST Profile Viewer より転載)

## 謝辞

本研究を行うにあたり、修士課程より5年間、大変お世話になりました竹家達夫教授、研究を進めるにあたり、多くのアドバイスをいただきました、穴戸知行助教授、石田教弘、与語圭一郎助手、お互い励ましあい、一緒に苦楽をともにした同期の古賀慎太郎君に心から感謝します。

また、本大学院において研究する機会を与えて下さいました、バイオサイエンス研究科及び遺伝子教育センターの教授をはじめとする先生方、RI施設などの実験施設を管理して下さいました皆様、励ましの言葉を頂いた先輩、同期、後輩に深く御礼申し上げます。

## 参考文献

- Ackert, C.L., Gittens, J.E., O'Brien, M.J., Eppig, J.J., and Kidder, G.M. ( 2001 ) Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. *Dev. Biol.* 233:258-270.
- Anderson, E., and Albertini, D.F. ( 1976 ) Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J. Cell. Biol.* 71:680-686.
- Bedell, M.A., Brannan, C.I., Evans, E.P., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Donovan, P.J. ( 1995 ) DNA rearrangements located over 100kb 5 ' of the Steel (Sl)-coding region in Steel-panda and Steel-contrasted mice deregulate Sl expression and cause female sterility by disrupting ovarian follicle development. *Genes. Dev.* 9:455-470.
- Bergoffen, J., Scherer, S.S., Wang, S., Scott, M.O., Bone, L.J., Paul, D.L., Chen, K., Lensch, M.W., Chance, P.F., and Fischbeck, K.H. ( 1993 ) Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 262:2039-2042
- Berthoud, V.M., Bassnett, S., and Beyer, E.C.( 1999 )Cultured chicken embryo lens cells resemble differentiating fiber cells in vivo and contain two kinetic pools of connexin56. *Exp. Eye. Res.* 68:475-484.
- Berthoud, V.M., Minogue, P.J., Laing, J.G., and Beyer, E.C. ( 2004 ) Pathways for degradation of connexins and gap junctions. *Cardiovasc Res.* 62:256-267.
- Beyer, E.C., Paul, D.L., and Goodenough, D.A. ( 1990 ) Connexin family of gap junction proteins. *J. Membr. Biol.* 116:187-194.
- Bornslaeger, E.A., and Schultz, R.M. ( 1985 ) Regulation of mouse oocyte maturation: effect of elevating cumulus cell cAMP on oocyte cAMP levels. *Biol. Reprod.* 33:698-704.
- Britz-Cunningham, S.H., Shah, M.M., Zuppan, C.W., and Fletcher, W.H. ( 1995 ) Mutations of the Connexin43 gap-junction gene in patients with heart

malformations and defects of laterality. *N. Engl. J. Med.* 332:1323-1329.

Brower, P.T., and Schultz, R.M. ( 1982 ) Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: existence and possible nutritional role during oocyte growth. *Dev. Biol.* 90:144-153.

Bruzzone, R., White, T.W., and Goodenough, D.A. ( 1996a ) The cellular Internet: on-line with connexins. *Bioessays* 18:709-718.

Bruzzone, R., White, T.W., and Paul, D.L. ( 1996b ) Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur. J. Biochem.* 238:1-27.

Butkevich, E., Hulsmann, S., Wenzel, D., Shirao, T., Duden, R., and Majoul, I. ( 2004 ) Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton. *Curr. Biol.* 14:650-658.

Cao, F., Eckert, R., Elfgang, C., Nitsche, J.M., Snyder, S.A., H-ulser, D.F., Willecke, K., and Nicholson, B.J. ( 1998 ) A quantitative analysis of connexin-specific permeability differences of gap junctions expressed in HeLa transfectants and *Xenopus* oocytes. *J. Cell. Sci.* 111:31-43.

Carabatsos, M.J., Sellitto, C., Goodenough, D.A., and Albertini, D.F. ( 2000 ) Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Dev. Biol.* 226:167-179.

Cooper, C.D., and Lampe, P.D. ( 2002 ) Casein kinase 1 regulates connexin-43 gap junction assembly. *J. Biol. Chem.* 277:44962-44968.

Cruciani, V., and Mikalsen, S.O. ( 2002 ) Connexins, gap junctional intercellular communication and kinases. *Biol. Cell.* 94:433-443.

DasSarma, J., Wang, F., and Koval, M. ( 2002 ) Targeted gap junction protein constructs reveal connexin-specific differences in oligomerization. *J. Biol. Chem.* 277:20911-20918.

Dekel, N., Lawrence, T.S., Gilula, N.B., and Beers, W.H. ( 1981 ) Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus-oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. *Dev. Biol.* 86:356-362.

Dong, J., Albertini, D.F., Nishimori, K., Kumar, T.R., Lu, N., and Matzuk, M.M. ( 1996 ) Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383:531-535.

Dunham, B., Liu, S., Taffet, S., Trabak-Janik, E., Delmar, M., Petryshyn, R., Zheng, S., Perzova, R., and Vallano, M. L. ( 1992 ) Immunolocalization and expression of functional and nonfunctional cell-to-cell channels from wild-type and mutant rat heart connexin43 cDNA. *Circ. Res.* 70:1233-1243.

Elvin, J.A., Clark, A.T., Wang, P., Wolfman, N.M., and Matzuk, M.M. ( 1999 ) Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol. Endocrinol.* 13:1035-1048.

Eppig, J.J. ( 1994 ) Oocyte-somatic cell communication in the ovarian follicles of mammals. *Semin. Dev. Biol.* 5:51-59.

Evans, W.H., Ahmad, S., Diez, J., George, C.H., Kendall, J.M., and Martin, P.E. ( 1999 ) Trafficking pathways leading to the formation of gap junctions. *Novartis Found. Symp.* 219:44-9.

Falk, M.M. ( 2000a ) Connexin-specific distribution within gap junctions revealed in living cells. *J. Cell. Sci.* 113:4109-4120.

Falk, M.M. ( 2000b ) Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels. *Eur. J. Cell. Biol.* 79:564-74.

Falk, M.M., and Gilula, N.B. ( 1998 ) Connexin membrane protein biosynthesis is influenced by polypeptide positioning within the translocon and signal peptidase access. *J. Biol. Chem.* 273:7856-7864.

Fishman, G. I., Moreno, A. P., Spray, D. C., and Levinwand, L. A. ( 1991 ) Functional

analysis of human cardiac gap junction channel mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3525-3529

Francis, P.J., Berry, V., Moore, A.T., and Bhattacharya, S. ( 1999 ) Lens biology: development and human cataractogenesis. *Trends. Genet.* 15:191-196.

Frenzel, E.M., and Johnson, R.G. ( 1996 ) Gap junction formation between cultured embryonic lens cells is inhibited by antibody to N-cadherin. *Dev. Biol.* 179:1-16.

Fu, C.T., Bechberger, J.F., Ozog, M.A., Perbal, B., and Naus, C.C. ( 2004 ) CCN3 (NOV) interacts with connexin43 in C6 glioma cells: possible mechanism of connexin-mediated growth suppression. *J. Biol. Chem.* 279:36943-36950.

Gabriel, H.D., Jung, D., Butzler, C., Temme, A., Traub, O., Winterhager, E., and Willecke K. ( 1998 ) Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. *J. Cell. Biol.* 140:1453-1461.

Gaietta, G., Deerinck, T.J., Adams, S.R., Bouwer, J., Tour, O., Laird, D.W., Sosinsky, G.E., Tsien, R.Y., and Ellisman, M.H. ( 2002 ) Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* 296:503-507.

Gellhaus, A., Dong, X., Propson, S., Maass, K., Klein-Hitpass, L., Kibschull, M., Traub, O., Willecke, K., Perbal, B., Lye, S.J., and Winterhager, E. ( 2004 ) Connexin43 interacts with NOV: a possible mechanism for negative regulation of cell growth in choriocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 279:36931-36942

Giepmans, B.N., and Moolenaar, W.H. ( 1998 ) The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. *Curr. Biol.* 8:931-934.

Giepmans, B.N., Hengeveld, T., Postma, F.R., and Moolenaar, W.H. ( 2001a ) Interaction of c-Src with gap junction protein connexin-43. Role in the regulation of cell-cell communication. *J. Biol. Chem.* 276:8544-8549.

Giepmans, B.N., Verlaan, I., Hengeveld, T., Janssen, H., Calafat, J., Falk, M. M.,

and Moolenaar, W. H. ( 2001b ) Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Curr. Biol.* 11:1364-1368

Giepmans, B.N., Verlaan, I., and Moolenaar, W.H. ( 2001c ) Connexin-43 interactions with ZO-1 and alpha- and beta-tubulin. *Cell Commun. Adhes.* 8:219-23.

Giepmans, B.N., Feiken, E., Gebbink, M.F., and Moolenaar, W.H. ( 2003 ) Association of connexin43 with a receptor protein tyrosine phosphatase. *Cell Commun. Adhes.* 10:201-205.

Gilula, N.B., Epstein, M.L., and Beers, W.H. ( 1978 ) Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *J. Cell. Biol.* 78:58-75.

Goldberg, G.S., Moreno, A.P., and Lampe, P.D. ( 2002 ) Gap junctions between cells expressing connexin 43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and ATP. *J. Biol. Chem.* 277:36725-36730.

Goldberg, G.S., Valiunas, V., and Brink, P.R. ( 2004 ) Selective permeability of gap junction channels. *Biochim. Biophys. Acta.* 1662:96-101.

Gong, X., Li, E., Klier, G., Huang, Q., Wu, Y., Lei, H., Kumar, N.M., Horwitz, J., and Gilula, N.B. ( 1997 ) Disruption of alpha3 connexin gene leads to proteolysis and cataractogenesis in mice. *Cell* 91:833-843.

Goodenough, D.A., Goliger, J.A., and Paul, D.L. ( 1996 ) Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu. Rev. Biochem.* 65:475-502.

Grifa, A., Wagner, C.A., D'Ambrosio, L., Melchionda, S., Bernardi, F., Lopez-Bigas, N., et al. ( 1999 ) Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. *Nat. Genet.* 23:16-18.

Guerrero, P.A., Schuessler, R.B., Davis, L.M., Beyer, E.C., Johnson, C.M., Yamada, K.A., and Saffitz, J.E. ( 1997 ) Slow ventricular conduction in mice heterozygous for a connexin43 null mutation. *J. Clin. Invest.* 99:1991-1998.

He, D.S., Jiang, J.X., Taffet, S.M., and Burt, J.M.( 1999 )Formation of heteromeric gap junction channels by connexins 40 and 43 in vascular smooth muscle cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:6495-6500.

Heller, D.T., and Schultz, R.M. ( 1980 ) Ribonucleoside metabolism by mouse oocytes: metabolic cooperativity between the fully grown oocyte and cumulus cells. J. Exp. Zool. 214:355-364.

Hernandez-Blazquez, F.J., Joazeiro, P.P., Omori, Y., and Yamasaki, H. ( 2001 ) Control of intracellular movement of connexins by E-cadherin in murine skin papilloma cells. Exp. Cell. Res. 270:235-247.

Holm, I., Mikhailov, A., Jillson, T., and Rose, B.( 1999 )Dynamics of gap junctions observed in living cells with connexin43-GFP chimeric protein. Eur. J. Cell. Biol. 78:856-866.

Huang, E.J., Manova, K., Packer, A.I., Sanchez, S., Bachvarova, R.F., and Besmer, P.( 1993 )The murine steel panda mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. Dev. Biol. 157:100-109.

Itahana, K., Morikazu, Y., and Takeya, T. ( 1996 ) Differential expression of four connexin genes, Cx-26, Cx-30.3, Cx-32, and Cx-43, in the porcine ovarian follicle. Endocrinology 137:5036-5044.

Itahana, K., Tanaka, T., Morikazu, Y., Komatu, S., Ishida, N., and Takeya, T. ( 1998 )Isolation and characterization of a novel connexin gene, Cx-60, in porcine ovarian follicles. Endocrinology 139:320-329.

Jongen, W.M., Fitzgerald, D.J., Asamoto, M., Piccoli, C., Slaga, T.J., Gros, D., Takeichi, M., and Yamasaki, H. ( 1991 ) Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca<sup>2+</sup> in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. J. Cell. Biol. 114:545-555.

Jordan, K., Chodock, R., Hand, A.R., and Laird, D.W( 2001 )The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization. J. Cell. Sci. 114: 763-773

Juneja, S.C., Barr, K.J., Enders, G.C., and Kidder, G.M. ( 1999 ) Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biol. Reprod.* 60:1263-1270.

Kanemitsu, M.Y., Jiang, W., and Eckhart, W. ( 1998 ) Cdc2-mediated phosphorylation of the gap junction protein, connexin43, during mitosis. *Cell Growth Differ.* 9:13-21.

Kanno, Y. and Loewenstein, W.R. ( 1964a ) INTERCELLULAR DIFFUSION. *Science* 143:959-960.

Kanno, Y. and Loewenstein, W.R. ( 1964b ) LOW-RESISTANCE COUPLING BETWEEN GLAND CELLS. SOME OBSERVATIONS ON INTERCELLULAR CONTACT MEMBRANES AND INTERCELLULAR SPACE. *Nature* 201:194-195.

Kelsell, D.P., Dunlop, J., and Hodgins, M.B. ( 2001 ) Human diseases: clues to cracking the connexin code? *Trends. Cell. Biol.* 11:2-6.

Kelsell, D.P., Dunlop, J., Stevens, H.P., Lench, N.J., Liang, J.N., Parry, G., Mueller, R.F., and Leigh, I.M. ( 1997 ) Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 387:80-83.

Kelsell, D.P., Wilgoss, A.L., Richard, G., Stevens, H.P., Munro, C.S., and Leigh, I.M. ( 2000 ) Connexin mutations associated with palmoplantar keratoderma and profound deafness in a single family. *Eur. J. Hum. Genet.* 8:469-472.

Kirchhoff, S., Nelles, E., Hagedorff, A., Kruger, O., Traub, O., and Willecke, K. ( 1998 ) Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. *Curr. Biol.* 8:299-302.

Kissel, H., Timokhina, I., Rothschild, G., Tajima, Y., Soares, V., Angeles, M., Whitlow, S.R., Manova, K., and Besmer, P. ( 2000 ) Point mutation in kit receptor tyrosine kinase reveals essential role for kit signaling in spermatogenesis and oogenesis without affecting other kit responses. *ENBO J.* 49:1312-1326.

Kruger, O., Plum, A., Kim, J.S., Winterhager, E., Maxeiner, S., Hallas, G.,

Kirchhoff, S., Traub, O., Lamers, W.H., and Willecke, K. ( 2000 ) Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development* 127:4179-4193.

Kumai, M., Nishii, K., Nakamura, K., Takeda, N., Suzuki, M., and Shibata, Y. ( 2000 ) Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Development* 2000 127:3501-3512.

Kumar, N.M., and Gilula, N.B. ( 1996 ) The gap junction communication channel. *Cell*. 84:381-388.

Kuroda, H., Terada, N., Nakamura, H., Matsumoto, K., and Kitamura, Y. ( 1988 ) Infertility due to growth arrest of ovarian follicles in Sl/Slt mice. *Dev.biol.* 126:71-79.

Laing, J.G., and Beyer, E.C. ( 1995 ) The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 270:26399-26403.

Laird, D.W., Castillo, M., and Kasprzak, L. ( 1995 ) Gap junction turnover, intracellular trafficking, and phosphorylation of connexin43 in brefeldin A-treated rat mammary tumor cells. *J. Cell. Biol.* 131:1193-1203.

Lampe, P.D., and Lau, A.F.( 2000 )Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch. Biochem. Biophys.* 384:205-215.

Lampe, P.D., and Lau, A.F.( 2004 )The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36:1171-1186.

Lampe, P.D., Nguyen, B.P., Gil, S., Usui, M., Olerud, J., Takada, Y., and Carter, W.G. ( 1998 ) Cellular interaction of integrin alpha3beta1 with laminin 5 promotes gap junctional communication. *J. Cell. Biol.* 143:1735-1747.

Lampe, P.D., TenBroek, E.M., Burt, J.M., Kurata, W.E., Johnson, R.G., and Lau, A.F. ( 2000 ) Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J. Cell. Biol.* 149:1503-1512.

Lan, Z., Kurata, W.E., Martyn, K.D., Jin, C., and Lau, A.F. ( 2005 ) Novel rab GAP-like protein, CIP85, interacts with connexin43 and induces its degradation. *Biochemistry*. 44:2385-2396.

Lin, R., Warn-Cramer, B.J., Kurata, W.E., and Lau, A.F. ( 2001 ) v-Src phosphorylation of connexin 43 on Tyr247 and Tyr265 disrupts gap junctional communication. *J. Cell. Biol.* 154:815-827.

Liu, X.Z., Xia, X.J., Xu, L.R., Pandya, A., Liang, C.Y., Blanton, S.H., Brown, S.D., Steel, K.P., and Nance, W.E.( 2000 )Mutations in connexin31 underlie recessive as well as dominant non-syndromic hearing loss. *Hum. Mol. Genet.* 9:63-67.

Lo, C.W. ( 2000 ) Role of gap junctions in cardiac conduction and development: insights from the connexin knockout mice. *Circ. Res.* 87:346-8.

Macari, F., Landau, M., Cousin, P., Mevorah, B., Brenner, S., Panizzon, R., Schorderet, D.F., Hohl, D., and Huber, M. ( 2000 ) Mutation in the gene for connexin 30.3 in a family with erythrokeratoderma variabilis. *Am. J. Hum. Genet.* 2000 67:1296-1301.

Maestrini, E., Korge, B.P., Ocana-Sierra, J., Calzolari, E., Cambiaghi, S., Scudder, P.M., Hovnanian, A., Monaco, A.P., and Munro, C.S. ( 1999 ) A missense mutation in connexin26, D66H, causes mutilating keratoderma with sensorineural deafness (Vohwinkel's syndrome) in three unrelated families. *Hum. Mol. Genet.* 8:1237-1243.

Martinez, A.D., Hayrapetyan, V., Moreno, A.P., and Beyer, E.C. ( 2002 ) Connexin43 and connexin45 form heteromeric gap junction channels in which individual components determine permeability and regulation. *Circ. Res.* 90:1100-1107.

Matsuzaki, F., Mege, R.M., Jaffe, S.H., Friedlander, D.R., Gallin, W.J., Goldberg, J.I., Cunningham, B.A., and Edelman, G.M. ( 1990 ) cDNAs of cell adhesion molecules of different specificity induce changes in cell shape and border formation in cultured S180 cells. *J. Cell. Biol.* 110:1239-1252.

Maza, J., DasSarma, J., and Koval, M. ( 2005 ) Defining a minimal motif required to prevent connexin oligomerization in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 280:21115-21121.

Meyer, R.A., Laird, D.W., Revel, J.P., and Johnson, R.G. ( 1992 ) Inhibition of gap junction and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies. *J. Cell. Biol.* 119:179-189.

Murray, S.A., Williams, S.Y., Dillard, C.Y., Narayanan, S.K., and McCauley, J. ( 1997 ) Relationship of cytoskeletal filaments to annular gap junction expression in human adrenal cortical tumor cells in culture. *Exp. Cell Res.* 234:398-404.

Musil, L.S., and Goodenough, D.A. ( 1991 ) Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J. Cell. Biol.* 115:1357-74.

Musil, L.S., and Goodenough, D.A. ( 1993 ) Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell* 74:1065-1077.

Musil, L.S., Cunningham, B.A., Edelman, G.M., and Goodenough, D.A. ( 1990 ) Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J. Cell. Biol.* 111:2077-2088.

Musil, L.S., Le, A.C., VanSlyke, J.K., and Roberts, L.M. ( 2000 ) Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. *J. Biol. Chem.* 275:25207-25215.

Nelles, E., Butzler, C., Jung, D., Temme, A., Gabriel, H.D., Dahl, U., Traub, O., Stumpel, F., Jungermann, K., Zielasek, J., Toyka, K.V., Dermietzel, R., and Willecke, K. ( 1996 ) Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:9565-9570.

Niessen, H., Harz, H., Bedner, P., Kramer, K., and Willecke, K. ( 2000 ) Selective

permeability of different connexin channels to the second messenger inositol 1,4,5-trisphosphate. *J. Cell. Sci.* 113:1365-1372.

Okuma A, Kuraoka A, Iida H, Inai T, Wasano K, Shibata Y. ( 1996 ) Colocalization of connexin 43 and connexin 45 but absence of connexin 40 in granulosa cell gap junctions of rat ovary. *J. Reprod. Fertil.* 107:255-264.

Paul, D.L. ( 1986 ) Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J. Cell. Biol.* 103:123-134.

Paulson, A.F., Lampe, P.D., Meyer, R.A., TenBroek, E., Atkinson, M.M., Walseth, T.F., and Johnson, R.G. ( 2000 ) Cyclic AMP and LDL trigger a rapid enhancement in gap junction assembly through a stimulation of connexin trafficking. *J. Cell. Sci.* 113:3037-3049.

Phelan, P. ( 2005 ) Innexins: members of an evolutionarily conserved family of gap-junction proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1711:225-245.

Plum, A., Hallas, G., Magin, T., Dombrowski, F., Hagendorff, A., Schumacher, B., Wolpert, C., Kim, J., Lamers, W.H., Evert, M., Meda, P., Traub, O., and Willecke, K. ( 2000 ) Unique and shared functions of different connexins in mice. *Curr. Biol.* 10:1083-1091.

Postma, F.R., Hengeveld, T., Alblas, J., Giepmans, B.N., Zondag, G.C., Jalink, K., and Moolenaar, W.H. ( 1998 ) Acute loss of cell-cell communication caused by G protein-coupled receptors: a critical role for c-Src. *J. Cell. Biol.* 140:1199-1209.

Reaume, A.G., de Sousa, P.A., Kulkarni, S., Langille, B.L., Zhu, D., Davies, T.C., Juneja, S.C., Kidder, G.M., and Rossant, J. ( 1995 ) Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267:1831-1834.

Rivedal, E., and Opsahl, H. ( 2001 ) Role of PKC and MAP kinase in EGF- and TPA-induced connexin43 phosphorylation and inhibition of gap junction intercellular communication in rat liver epithelial cells. *Carcinogenesis*

22:1543-1550.

Sandberg, K., Ji, H., Iida, T., and Catt, K.J. ( 1992 ) Intercellular communication between follicular angiotensin receptors and *Xenopus laevis* oocytes: medication by an inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent mechanism. *J. Cell. Biol.* 117:157-167.

Sherizly, I., Galiani, D., and Dekel, N. ( 1988 ) Regulation of oocyte maturation: communication in the rat cumulus-oocyte complex. *Hum. Reprod.* 3:761-766.

Simon, A.M., Goodenough, D.A., Li, E., and Paul, D.L. ( 1997 ) Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 385:525-529.

Simon, A.M., and Goodenough, D.A. ( 1998 ) Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends. Cell. Biol.* 8:477-483.

Singh, D., and Lampe, P.D. ( 2003 ) Identification of connexin-43 interacting proteins. *Cell Commun. Adhes.* 10:215-220.

Sorgen, P.L., Duffy, H.S., Sahoo, P., Coombs, W., Delmar, M. and Spray, D.C. ( 2004 ) Structural changes in the carboxyl terminus of the gap junction protein connexin43 indicates signaling between binding domains for c-Src and zonula occludens-1. *J. Biol. Chem.* 279:54695-54701.

Temme, A., Buchmann, A., Gabriel, H.D., Nelles, E., Schwarz, M., and Willecke, K. ( 1997 ) High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Curr. Biol.* 7:713-716.

Teubner, B., Michel, V., Pesch, J., Lautermann, J., Cohen-Salmon, M., Sohl, G., Jahnke, K., Winterhager, E., Herberhold, C., Hardelin, J.P., Petit, C., and Willecke, K. ( 2003 ) Connexin30 (Gjb6)-deficiency causes severe hearing impairment and lack of endocochlear potential. *Hum. Mol. Genet.* 12:13-21.

Thomas, T., Jordan, K., and Laird, D.W. ( 2001 ) Role of cytoskeletal elements in the recruitment of Cx43-GFP and Cx26-YFP into gap junctions. *Cell Commun.*

Adhes. 8:231-236.

Toyofuku, T., Yabuki, M., Otsu, K., Kuzuya, T., Hori, M., Tada, M. ( 1998a ) Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 273:12725-12731.

Toyofuku, T., Yabuki, M., Otsu, K., Kuzuya, T., Hori, M., Tada, M. ( 1998b ) Intercellular calcium signaling via gap junction in connexin-43-transfected cells. *J. Biol. Chem.* 273:1519-1528.

Unger, V.M., Kumar, N.M., Gilula, N.B., and Yeager, M. ( 1999 ) Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science* 283:1176-1180.

VanSlyke, J.K., Deschenes, S.M., and Musil, L.S. ( 2000 ) Intracellular transport, assembly, and degradation of wild-type and disease-linked mutant gap junction proteins. *Mol. Biol. Cell.* 11:1933-1946.

Wang, Y., and Rose, B. ( 1995 ) Clustering of Cx43 cell-to-cell channels into gap junction plaques: regulation by cAMP and microfilaments. *J. Cell. Sci.* 108:3501-3508.

Warn-Cramer, B.J., Cottrell, G.T., Burt, J.M., and Lau, A.F. ( 1998 ) Regulation of connexin-43 gap junctional intercellular communication by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 273:9188-9196.

Wei, C.J., Xu, X., and Lo, C.W. ( 2004 ) Connexins and cell signaling in development and disease. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 20:811-838.

White, T.W., Bruzzone, R., Wolfram, S., Paul, D.L., and Goodenough, D.A. ( 1994 ) Selective interactions among the multiple connexin proteins expressed in the vertebrate lens: the second extracellular domain is a determinant of compatibility between connexins. *J. Cell. Biol.* 125:879-892.

White, T.W., Goodenough, D.A., and Paul, D.L. ( 1998 ) Targeted ablation of

connexin50 in mice results in microphthalmia and zonular pulverulent cataracts. *J. Cell. Biol.* 143:815-825

Wiesen, J.F., and Midgley, A.R. Jr. ( 1994 ) Expression of connexin 43 gap junction messenger ribonucleic acid and protein during follicular atresia. *Biol. Reprod.* 50:336-348.

Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Guldenagel, M., Deutsch, U., and Sohl, G. ( 2002 ) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol. Chem.* 383:725-737.

Xia, J.H., Liu, C.Y., Tang, B.S., Pan, Q., Huang, L., Dai, H.P., Zhang, B.R., Xie, W., et al. ( 1998 ) Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. *Nat. Genet.* 20:370-373.

Xu, X., Li, W.E., Huang, G.Y., Meyer, R., Chen, T., Luo, Y., Thomas, M.P., Radice, G.L., and Lo, C.W. ( 2001 ) Modulation of mouse neural crest cell motility by N-cadherin and connexin 43 gap junctions. *J. Cell. Biol.* 154:217-230.

Yamaguchi, D.T., and Ma, D. ( 2003 ) Mechanism of pH regulation of connexin 43 expression in MC3T3-E1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304:736-9.

Yeager, M., Unger, V.M., and Falk, M.M. ( 1998 ) Synthesis, assembly and structure of gap junction intercellular channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:517-24.

Yogo, K., Ogawa, T., Akiyama, M., Ishida, N., and Takeya, T. ( 2002 ) Identification and functional analysis of novel phosphorylation sites in Cx43 in rat primary granulose cells. *FEBS Lett.* 531:132-136.