

〈短報〉

## 改良型膜透過ペプチドによるサイトゾルへの タンパク質導入に牛胎児血清が与える影響

奥田 明子<sup>1)</sup>、及川 晟<sup>1)</sup>

### Effect of fetal bovine serum on the cytosolic protein delivery using modified cell-penetrating peptide

Akiko Okuda<sup>1)</sup> and Akira Oikawa<sup>1)</sup>

**Summary** Cell-penetrating peptide (CPP) can deliver cargoes, which are macromolecules such as proteins, into cells. CPP-cargo complexes enter cells via endocytosis; as a result, many cargoes remain in the endosomes. We have developed a new CPP (Pas2r12) that can introduce enhanced green fluorescent protein (EGFP) and Immunoglobulin G into the cytosol to improve this problem. In this study, we focused on the concentration of fetal bovine serum (FBS) in the cell culture medium for effective delivery. After incubating the cells in FBS-free or low-FBS media for a short period, the cytosolic delivery of EGFP by Pas2r12 was detected in 5–7% of the cells. On the other hand, the cytosolic delivery of EGFP was observed in 30–40% of cells after a longer incubation period in FBS-free or low-FBS media. Therefore, it is important to culture cells under serum-free or low-serum medium before the delivery.

**Key words:** Cell penetrating peptide, Drug delivery system, Fetal bovine serum, Enhanced green fluorescent protein

#### I. 緒言

生命科学分野において、核酸やタンパク質などの高分子を細胞に届けることができる技術が必要とされている。核酸の細胞内導入に関しては、生体への効果的な核酸導入技術が開発され、さまざまな核酸ベースの薬が承認され始めている<sup>1)</sup>。しかし、タンパク質に関しては、培養細

胞レベルでさえ効果的な細胞内導入技術は確立されていない。これまで、タンパク質や抗体などの高分子薬は、細胞外液または細胞表面分子を標的とするものに限られてきた<sup>2)</sup>。タンパク質を細胞内へと導入する利点は、核酸と比較して迅速な機能発現が可能である点や、低分子薬ではアクセスできない細胞内のシグナル伝達経路やタンパク質間相互作用などの制御が可能で

<sup>1)</sup>新潟大学医学部保健学科  
〒951-8518 新潟県新潟市中央区旭町通2-746

<sup>1)</sup>School of Health Sciences, Faculty of Medicine,  
Niigata University, 2-746 Asahimachi-dori, Chuo-ku,  
Niigata, Niigata 951-8518, Japan

連絡先：奥田明子  
新潟大学医学部保健学科  
Tel : +81-25-227-2387

受付日：2020年11月4日  
採択日：2020年12月3日

E-mail: okudaa@clg.niigata-u.ac.jp

ある点などが挙げられる。

これまでに報告されてきたタンパク質の細胞内導入法として、膜透過ペプチド<sup>3)</sup> やナノ粒子<sup>4)</sup> などをを用いた方法がある。膜透過ペプチドは、ペプチドやタンパク質など様々な積荷 (cargo) を細胞へと運ぶことができる。膜透過ペプチドの例として、HIV転写活性化タンパク質 (Tat) に由来するTATペプチド<sup>5)</sup> や合成オリゴアルギニンペプチド<sup>6)</sup> などがある。ペプチドとcargoの結合は、遺伝的にcargoにペプチド配列を融合する方法<sup>7)</sup> や化学的に架橋する方法<sup>8)</sup> などがある。一方、膜透過ペプチドの細胞内導入の主経路はエンドサイトーシスであることが報告されており<sup>9-10)</sup>、このようなペプチドと共に細胞内に導入されたタンパク質が、エンドソームから脱出して細胞質基質に到達する効率は低いことが課題であった。しかし、2017年にはヒト・シンシチン1由来ペプチド (S19) が発見され、TATペプチドにS19を融合することでTATペプチド単独によるタンパク質送達効率を数十倍向上させることが報告されている<sup>11)</sup>。このように、従来の膜透過ペプチドに改良を加えることで、タンパク質をより効果的に細胞内へと送達できるようなツールの開発が進められている。

近年、膜透過ペプチド (オクタアルギニン: R8) に膜透過促進配列Penetration-accelerating sequence (Pas: FFLIPKG) を付加することで、cargoのサイトゾル到達量が増加することが報告された<sup>12-13)</sup>。しかし、PasによるR8の浸透促進能力は、5 kDaまでの比較的小さなカーゴ分子の細胞内送達に対してのみ有効であった。そこで、我々はPasによる膜透過促進効果を高める為に、Pas ΔPK (FFLIG) をタンデムに繰り返してPas2 (FFLIGFFLIG) とした。また、R8の効果を増強させる為にR12に延長し、さらにプロテアーゼからの分解を防ぐ為にL-アルギニンからプロテアーゼ耐性のD-アルギニンへと変換した。このような特徴を持つPas2r12 (FFLIGFFLIGrrrrrrrrrr: 大文字はL-アミノ酸、小文字はD-アミノ酸) を用いて、Enhanced green fluorescent protein (EGFP: 27 kDa) および免疫グロブリン (IgG: 150 kDa) を、培養細胞のサイトゾルへと送達することに成功した<sup>14)</sup>。Pas2r12は、塩基性アミノ酸に加えて疎水性アミノ酸を含有することで、疎水性相互作用によ

りタンパク質と結合することができる。よって、cargoと混合するのみで複合体を形成し、化学的な架橋や遺伝的な融合等の操作を必要としない。

本研究では、Pas2r12を用いたより効果的な導入条件を見出す為に、牛胎児血清 (Fetal bovine serum: FBS) 濃度がモデルcargoであるEGFPのサイトゾル導入に与える影響について検討を行った。動物血清は、タンパク質、電解質、脂質、炭水化物、ホルモン、酵素など多くの分子を含んでおり、培養細胞の維持の為に、数%から数十%程度のFBSなどの血清を加える。しかし、FBSを添加した培養細胞の培地に含まれるプロテアーゼによる膜透過ペプチドの分解や<sup>15)</sup>、タンパク質との相互作用<sup>16)</sup> などにより、ペプチドの導入率が抑制されることが報告されている。そこで、Pas2r12を用いたEGFPの導入において、導入実験を行う前の培地に含まれるFBS濃度を変化させて培養を行い、それぞれの条件におけるEGFPのサイトゾル導入率を求め、FBSが与える影響について考察を行った。

## II. 材料と方法

### 1. 使用細胞株

HEK293 (ヒト胎児腎臓由来細胞) は、JCRB細胞バンクから購入した。Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Thermo Fisher Scientific, USA) に、10% 牛胎児血清アルブミン (FBS) (Corning, USA) を加え、5% CO<sub>2</sub>濃度のもと37℃で培養を行い、5～7日ごとに継代して使用した。

### 2. ペプチドの調製

スクラム社 (日本) に、Pas2r12 (FFLIGFFLIGrrrrrrrrrr-amide、分子量 3046.7、大文字はL-アミノ酸、小文字はD-アミノ酸) の合成と精製を委託した。Pasr12は、超純水に溶解して使用した。

### 3. EGFPの調製

新潟大学遺伝子組換え実験安全管理規則の規定に基づき、第二種使用等拡散防止措置を行い、以下の遺伝子組換え実験を行った (承認番号: SD00799)。大腸菌BL21 (DE3) 株 (BioDynamics

Laboratory、日本) でヒスチジンタグを付加させたEGFPを過剰発現させ、大腸菌の溶解液からNi-NTA agarose (Qiagen, Netherlands) を用いてEGFPを精製した<sup>7)</sup>。精製されたEGFPは限外濾過膜 (Vivaspin 6-PES 30000 MWCO; Sartorius, Germany) を用いてリン酸緩衝液への置換と濃縮を行った。EGFPの精製度は、Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) により分離し、Coomassie brilliant blue R-250染色を行って確認した。

#### 4. Pas2r12によるEGFPのサイトゾル導入率の解析

HEK293細胞 ( $4 \times 10^5$ 個) を直径35 mmのガラスベースディッシュ (AGCテクノグラス、日本) に播種し、10% FBSを含むDulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 中で5日間培養した。その後、前培養として0、2.5、5、7.5、10% FBSを含むDMEM培地にそれぞれ置換し、45分間あるいは24時間培養を行った。Pas2r12とEGFPの複合体形成は、マイクロチューブにOpti-MEM (Thermo Fisher Scientific, USA) とPas2r12 ( $40 \mu\text{mol/L}$ ) およびEGFP ( $30 \mu\text{mol/L}$ ) を加えて溶液量を $50 \mu\text{L}$ とし、室温で1時間静置した。これらの濃度は、細胞生存率およびEGFPのサイトゾル導入率の解析実験から、HEK293細胞に適した濃度であることが確かめられている<sup>14)</sup>。その後、複合体溶液にOpti-MEMを $50 \mu\text{L}$ 加えて2倍に希釈し、前培養を行ったガラスベースディッシュからDMEM培地を全て除き、中央の直径12 mmガラスベースウェル内の細胞に複合体溶液を加えた(細胞に対する終濃度： $20 \mu\text{mol/L}$  Pas2r12、 $15 \mu\text{mol/L}$  EGFP)。複合体を加えたHEK293細胞を $37^\circ\text{C}$ で45分間培養し、さらに10% FBSを含むDMEM 2 mLを加えて一晚培養した。生細胞内におけるEGFPの検出は、FluoView FV1200 (オリンパス、日本) 共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。対物レンズはUPlanSApo 60×O (オリンパス、日本) を使用し、可視光LDレーザー ( $473 \text{ nm}$ ) を照射してEGFPを励起して、3～5視野の細胞(全視野の合計が300-500個程度) についてイメージング画像を取得した。蛍光画像と明視野を重ね合わせ、「EGFPがサイトゾルへ拡散している細胞数」を目視で計測し、明視野画像から目

視で計測した「全細胞数」に対する割合を「サイトゾル導入率」とした。3回独立して実験を行い、平均値±標準偏差で表した。

#### 5. 細胞生存率の解析

HEK293細胞 ( $2 \times 10^4$ 個) を96ウェルマイクロプレート (AGCテクノグラス、日本) に播種し、10% FBSを含むDMEM中で5日間培養した。その後、0、2.5、5、7.5、10% FBSを含むDMEM培地に交換し、24時間培養を行った。Pas2r12とEGFPの複合体形成の為、マイクロチューブにOpti-MEMとPas2r12 ( $40 \mu\text{mol/L}$ ) およびEGFP ( $30 \mu\text{mol/L}$ ) を加えて $25 \mu\text{L}$ とし、室温で1時間静置した。Pas2r12のみ、あるいは細胞のみでインキュベートする場合も同様に、総溶液量が $25 \mu\text{L}$ となるようにOpti-MEMを加えて室温で1時間静置した。96ウェルマイクロプレートからDMEM培地を全て除き、静置後の溶液にOpti-MEMを $25 \mu\text{L}$ ずつ加えて2倍に希釈し、各ウェルの細胞へと加えた(細胞に対する終濃度： $20 \mu\text{mol/L}$  Pas2r12、 $15 \mu\text{mol/L}$  EGFP)。細胞を $37^\circ\text{C}$ で45分間培養した後、共焦点レーザー顕微鏡実験と複合体の希釈条件を合わせる為に、各ウェルから $40 \mu\text{L}$ を除き、残り $10 \mu\text{L}$ に10% FBSを含むDMEM  $200 \mu\text{L}$ を加えて一晚培養した。これらの細胞に対して、CellQuantum MTT cell-viability assay kit (Bioassay Systems, USA) によりMTT assayを行った。反応溶液 ( $95 \mu\text{L}$ ) を、それぞれのウェルに加え、 $37^\circ\text{C}$ で4時間静置した。その後、溶解液を $100 \mu\text{L}$ 加え、1時間振盪した。570 nmにおける吸光度をモデル550マイクロプレートリーダー (Bio-Rad, USA) を用いて測定した。測定値は、平均値±標準偏差で表した。統計学的有意差を判定する為に、10% FBSで培養した細胞の測定値に対して、それぞれStudentの*t*検定を行った。

### Ⅲ. 結果

FBS濃度0-10%の条件下で45分間前培養したそれぞれの細胞に、Pas2r12とEGFPの複合体を加えて、サイトゾルへEGFPが導入された細胞の割合(サイトゾル導入率)を調べた。すべての条件下で細胞内に点状のEGFP由来の蛍光がみられたが、さらに5%、2.5%および0%におい

ては、EGFPが細胞全体に拡散している様子の細胞が観察された (Fig. 1A)。取得した画像の解析により、FBS濃度が10%、7.5%、5%、2.5%、0%のとき、EGFPのサイトゾル導入率は0%、

0%、5%、5%、7%であることが分かった (Fig. 1C)。そこで、さらに前培養の時間を24時間まで延長して導入率を調べた。45分間での前培養と同様、すべての条件下で細胞内に点状の

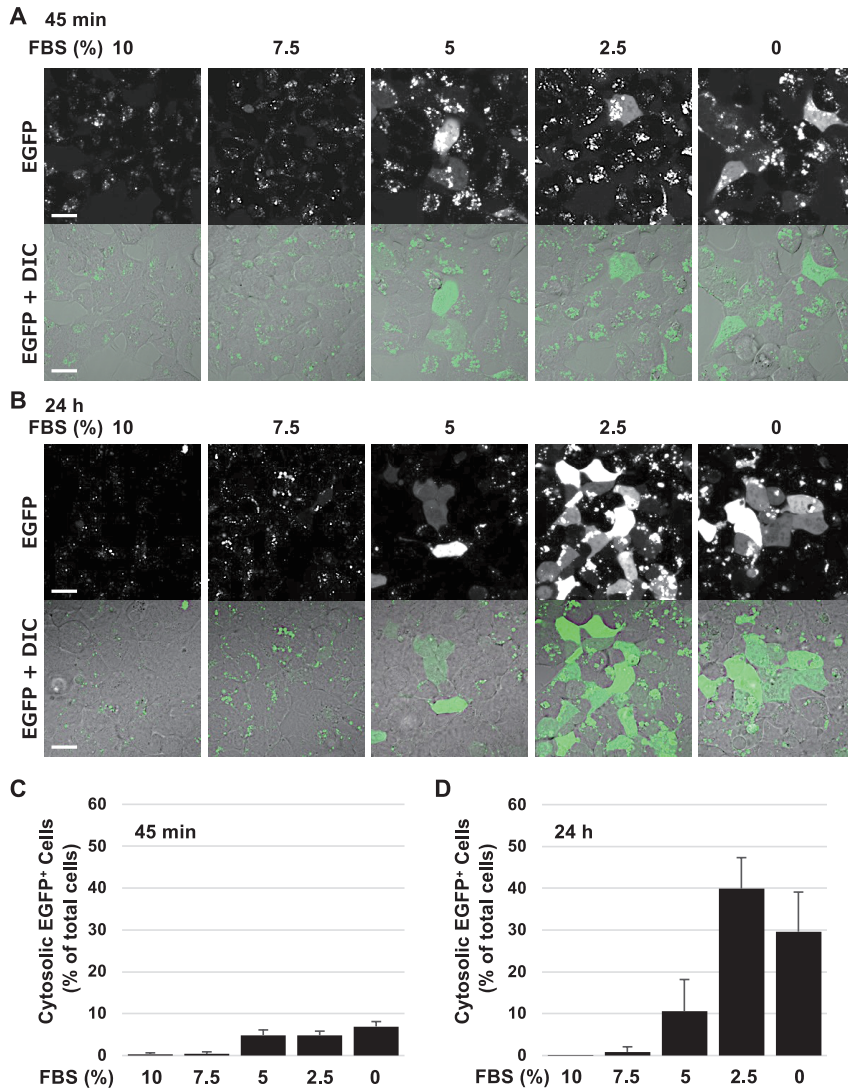


Fig. 1 Effect of fetal bovine serum concentration of the cytosolic introduction rate of enhanced green fluorescent protein by Pas2r12. Cells were precultured for 45 min (A and C) or 24 h (B and D) under different fetal bovine serum (FBS) concentrations and then were treated with enhanced green fluorescent protein (EGFP) and Pas2r12. Cells were observed by confocal laser scanning microscope. In A and B, the upper rows are EGFP fluorescence images of cells and lower rows are merged images of EGFP fluorescence (green layer) and differential interference contrast images of cells. Scale bars represent 20  $\mu$ m. In C and D, cytosolic introduction rate of EGFP by Pas2r12 are indicated.

EGFP由来の蛍光がみられた。しかし、5%、2.5%および0%において、より多くの細胞でEGFPが細胞全体に拡散している様子が観察された (Fig. 1B)。EGFPのサイトゾル導入率は、FBS濃度が10%、7.5%、5%、2.5%、0%のとき、それぞれ0%、1%、11%、40%、30%であった (Fig. 1D)。以上より、Pas2r12によるEGFPのサイトゾル導入率を45分間と24時間との前培養で比べると、10%および7.5% FBSでの導入率はほぼ0%で変化はみられなかったが、より低血清条件下である5% FBSでは2.2倍 (5% vs 11%)、2.5% FBSでは8倍 (5% vs 40%)、0% FBSでは約4.3倍 (7% vs 30%) にいずれも上昇していることが分かった。次に、24時間前培養を行った細胞に、Pas2r12によるEGFP複合体を加えることによる細胞へのダメージの有無を調べる為に、MTT assayを行った。複合体を加えた細胞では、FBS濃度が0-10%いずれの条件下で前培養を行っても、10% FBSで培養した細胞 (-) と比べて有意な変化は認められなかった (Fig. 2)。ただし、細胞のみ (-) とペプチドのみ (Pas2r12) では、2.5-7.5% FBSで前培養を行った場合に、10% FBSで培養した細胞 (-) と比べて細胞生存率の有意な上昇がみられた。以上の結果から、0% FBSあるいは2.5% FBSで24時間前培養することで、細胞生存率に影響を与えずにEGFPを30-40%の細胞のサイトゾルへと導入できることが分かった。

#### IV. 考察

膜透過ペプチドと培地に含まれる血清との関係については、FBSを添加した培養細胞の培地に含まれるプロテアーゼによる膜透過ペプチドの分解<sup>15)</sup> や、タンパク質とペプチドとの相互作用による細胞内導入の抑制<sup>16)</sup> などが報告されている。本研究においても、10% FBSで培養した細胞ではPas2r12によるEGFPのサイトゾル導入は検出されなかったが、無血清あるいは低血清条件下 (0-2.5% FBS) で短時間あるいは長時間前培養することによって、サイトゾル導入がみられるようになった。これらの結果から、FBSに含まれるタンパク質等の成分が、Pasr12によるEGFPのサイトゾル導入を抑制している可能性が示唆された。そこで、Pas2r12に対するFBSの作用について、①「プロテアーゼによる分解」と②「血清に含まれるタンパク質との相互作用」の可能性について考察を行った。

まず、①の血清に含まれるプロテアーゼによる分解の可能性についてである。膜透過ペプチドのTATペプチドやオリゴアルギニン、L-アミノ酸からD-アミノ酸に変換されることで、血清に含まれるプロテアーゼによる分解が抑制される<sup>15)</sup>。本研究で使用したPas2r12は、分解されやすいオリゴアルギニン領域が全てD-アルギニン (r12) であり、実際にトリプシンなどのプロテアーゼに耐性であることが示されている<sup>14)</sup>。よって、プロテアーゼによる分解が主な原因である可能性は低い。

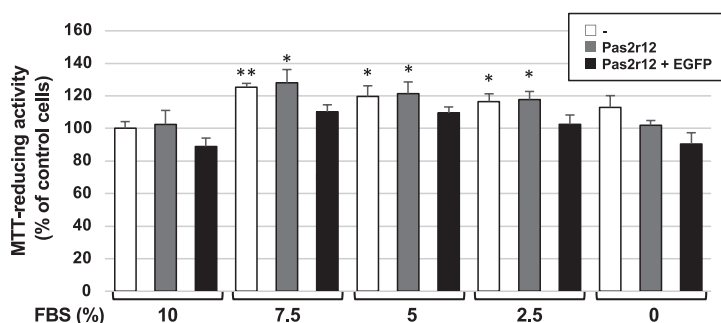


Fig. 2 Cell viability assay. Cells were pretreated under different FBS concentrations for 24 h as in Fig. 1B and D and then were incubated with Pas2r12 and EGFP. Differences from 10% FBS (-) (control) were determined by Student's *t* test (\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ ).

次に、②血清含有タンパク質とPas2r12との相互作用についてである。FBSに含まれるアルブミンをはじめとした血清タンパク質が、膜透過ペプチドであるオリゴアルギニン (Rn) と相互作用し、細胞内へ移行するオリゴアルギニン量を著しく低下させることが報告されている<sup>16)</sup>。Pas2r12とEGFPの複合体形成時には無血清培地のOpti-MEMを使用しており、これらの複合体溶液を培養細胞へと添加する際には、前培養で使用した培地を除いている。また、無血清よりも2.5%FBSの方がより高いサイトゾル導入を示したことから、Pas2r12に対する血清タンパク質の「相互作用」も①のプロテアーゼによる分解と同様、主な原因である可能性は低い。以上より、Pasr12によるEGFPのサイトゾル導入とFBSとの関係は、これまでに報告されている「分解」や「相互作用」とは異なる可能性が高い。

本研究においては、無血清あるいは低血清培地で長時間 (24時間) 前培養することで、EGFPのサイトゾル導入の割合が劇的に上昇した。これまでに、Pas2r12によるcargoのサイトゾル導入は、エンドサイトーシスの一種であるカベオラ依存性エンドサイトーシスが関与していることが分かっている<sup>14)</sup>。カベオラとは、細胞表面に存在する50-80 nmのフラスコ状の窪みであり、Caveolin-1が主要な構成タンパク質である<sup>17)</sup>。このCaveolin-1の過剰発現により、カベオラ依存性エンドサイトーシスが活性化されることが報告されている<sup>18)</sup>。また、Caveolin-1の発現は、血清飢餓条件下で増加することが報告されており<sup>19-20)</sup>、実際に我々の研究室でも血清濃度を低下させることによってCaveolin-1の発現量が増加することを確認している (未発表)。よって、無血清あるいは低血清培地で長時間 (24時間) 前培養することで、EGFPのサイトゾル導入の割合が劇的な上昇がみられたのは、Caveolin-1の発現量が増加することによってカベオラ依存性エンドサイトーシスが活性化されたからかもしれない。現在、異なるFBS濃度条件下で培養した細胞についてRNA-Seq解析を行い、発現変動遺伝子を網羅的に検索している。これによって、異なるFBS濃度で培養することにより生じる細胞の変化について、全体像を掴むことができるはずである。

タンパク質デリバリー法の確立は、生命科学分野研究に革新と創造の幅を広げるブースターとなり得る。これまで低分子にしか実現できなかった“機能発現スイッチの瞬間的なOn・Off”や、予め修飾を施したKeyタンパク質の導入による“細胞内シグナル経路の活性化”など、新たな実験モデル構築への応用が期待される。その為に、Pas2r12による導入メカニズムを明らかにし、特徴を活かしたデリバリーの実践が望まれる。

## 謝辞

本研究の一部は、JSPS科研費JP25860400、17K08947および20K05744の助成を受けたものです。

本論文内容に関連する著者らの利益相反：なし

## 文献

- 1) Rüger J, Ioannou S, Castanotto D and Stein CA: Oligonucleotides to the (Gene) rescue: FDA approvals 2017-2019. *Trends Pharmacol Sci*, 41: 27-41, 2020.
- 2) Kim K and Khang D: Past, present, and future of anti-cancer nanomedicine. *Int J Nanomedicine*, 15: 5719-5743, 2020.
- 3) Liu J and Afshar S: In vitro assays: Friends or foes of cell-penetrating peptides. *Int J Mol Sci*, 21: 4719, 2020.
- 4) Zielińska A, Carreiró F, Oliveira AM, Neves A, Pires B, Venkatesh N, Durazzo A, Lucarini M, Eder P, Silva A, Santini A and Souto EB: Polymeric nanoparticles: production, characterization, toxicology and ecotoxicology. *Molecules*, 25: 3731, 2020.
- 5) Rizzuti M, Nizzardo M, Zanetta C, Ramirez A and Corti S: Therapeutic applications of the cell-penetrating HIV-1 Tat peptide. *Drug Discov Today*, 20: 76-85, 2015.
- 6) Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, Yagami T, Tanaka S, Ueda K and Sugiura Y: Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem*, 276: 5836-5840, 2001.
- 7) Futaki S, Niwa M, Nakase I, Tadokoro A, Zhang Y, Nagaoka M, Wakako N and Sugiura Y: Arginine carrier peptide bearing Ni(II) chelator to promote cellular uptake of histidine-tagged proteins. *Bioconjug Chem*,

- 15: 475-481, 2004.
- 8) Takayama K, Tadokoro A, Pujals S, Nakase I, Giralt E and Futaki S: Novel system to achieve one-pot modification of cargo molecules with oligo arginine vectors for intracellular delivery. *Bioconjug Chem*, 20: 249-257, 2009.
  - 9) Nakase I, Niwa M, Takeuchi T, Sonomura K, Kawabata N, Koike Y, Takehashi M, Tanaka S, Simpson JC, Hones AT, Sugiura Y and Futaki S: Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol Ther*, 10: 1011-1022, 2004.
  - 10) Duchardt F, Fotin-Mleczek M, Schwarz H, Fischer R and Brock R: A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic*, 8: 848-866, 2007.
  - 11) Sudo K, Niikura K, Iwaki K, Kohyama S, Fujiwara K and Doi N: Human-derived fusogenic peptides for the intracellular delivery of proteins. *J Control Release*, 255: 1-11, 2017.
  - 12) Takayama K, Nakase I, Michiue H, Takeuchi T, Tomizawa K, Matsui H and Futaki S: Enhanced intracellular delivery using arginine-rich peptides by the addition of penetration accelerating sequences (Pas). *J Control Release*, 138: 128-133, 2009.
  - 13) Takayama K, Hirose H, Tanaka G, Pujals S, Katayama S, Nakase I and Futaki S: Effect of the attachment of a penetration accelerating sequence and the influence of hydrophobicity on octaarginine-mediated intracellular delivery. *Mol Pharm*, 9: 1222-1230, 2012.
  - 14) Okuda A, Tahara S, Hirose H, Hirose H, Takeuchi T, Nakase I, Ono A, Takehashi M, Tanaka S and Futaki S: Oligoarginine-bearing tandem repeat penetration-accelerating sequence delivers protein to cytosol via caveolae-mediated endocytosis. *Biomacromolecules*, 20: 1849-1859, 2019.
  - 15) Gammon ST, Villalobos VM, Prior JL, Sharma V and Piwnicka-Worms D: Quantitative analysis of permeation peptide complex labeled with technetium-99m: chiral and sequence-specific effects on net cell uptake. *Bioconjug Chem*, 14: 368-376, 2003.
  - 16) Kosuge M, Takeuchi T, Nakase I, Jones AT and Futaki S: Cellular internalization and distribution of arginine-rich peptides as a function of extracellular peptide concentration, serum, and plasma membrane associated proteoglycans. *Bioconjug Chem*, 19: 656-64, 2008.
  - 17) Dudău M, Codrici E, Tanase C, Gherghiceanu M, Enciu AM and Hinescu ME: Caveolae as potential hijackable gates in cell communication. *Front Cell Dev Biol*, 8: 581732, 2020.
  - 18) Singh RD, Puri V, Valiyaveetil JT, Marks DL, Bittman R and Pagano RE: Selective caveolin-1-dependent endocytosis of glycosphingolipids. *Mol Biol Cell*, 14: 3254-3265, 2003.
  - 19) van den Heuvel AP, Schulze A and Burgering BM: Direct control of caveolin-1 expression by FOXO transcription factors. *Biochem J*, 385: 795-802, 2005.
  - 20) Nohe A, Keating E, Underhill TM, Knaus P and Petersen NO: Dynamics and interaction of caveolin-1 isoforms with BMP-receptors. *J Cell Sci*, 118: 643-650, 2005.