

Streptococcus intermediusの感染に関する付着機構

著者	山口 泰平
雑誌名	鹿児島大学歯学部紀要
巻	28
ページ	27-37
発行年	2008
別言語のタイトル	Adherence mechanism in infection of Streptococcus intermedius
URL	http://hdl.handle.net/10232/4860

Streptococcus intermedius の感染に関する付着機構

山口 泰平

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 健康科学専攻
発生発達育成学講座 口腔保健推進学分野

Adherence mechanism in infection of *Streptococcus intermedius*

Taihei Yamaguchi

Department of Preventive Dentistry, Field of Developmental Medicine,
Health Research Course,
Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences,
8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8544, Japan

Abstract

The first step of bacterial infection is adherence to host tissue. *Streptococcus intermedius* is a significant component in the normal oral floor and one of the most common causes of oral and systemic pyogenic infections. This organism possessed particular-type fimbriae expanded from the cell surface. Molecular biological approach demonstrated that the appendages were associated with bacterial aggregation and adherence mediated by human saliva. Receptor molecule on the host was purified and identified with saliva agglutinin/DMBT1/gp-340 from whole saliva. However, bacterial aggregation titer was not directly associated with adherence titer nor clinical data concerning dental caries among five healthy male. Thereafter, the molecule that inhibited the bacterial adherence to immobilized saliva agglutinin was identified with human albumin in human saliva. In the high concentration conditions, albumin worked as inhibitor, but in the low concentration conditions, as enhancer. The functional domain was located within the area from third exon to sixth exon using a valiant albumin clone derived from human liver. The concentration of agglutinin and albumin in whole saliva was widely varied among individuals. These molecules could carefully control the composition of oral flora in individuals. I expect that further research could produce a novel and effective preventive approach for bacterial infection in systemic disease as well as oral disease.

Key words: *Streptococcus intermedius*, fimbriae, saliva agglutinin, adherence, albumin

はじめに

細菌による感染が成立するにあたって、最初に必要な段階が細菌表層の付着因子と宿主の表層に存在するレセプターとの付着である。口腔での歯垢形成については細菌の歯表面への付着になる。口腔レンサ球菌はいろいろな種類の付着因子を持っており、線毛、レク

チン、リポタイコ酸、未同定のタンパクなどがある。線毛として総称される、細菌表層から伸びている繊維状構造物はさまざまな細菌種で確認されており、感染因子のひとつと考えられている¹⁾。レンサ球菌では A group レンサ球菌、*Streptococcus faecalis*、*Streptococcus salivarius*、*Streptococcus sanguis*、*Streptococcus oralis*、

Streptococcus mutans, *Streptococcus parasanguis*, *Streptococcus crista*²⁾, *Streptococcus gordonii*³⁾などで報告がある。

anginosus group レンサ球菌はヒト口腔、消化管、泌尿器領域に常在している弱毒菌である。通常は外来病原菌に対抗しているが、状況により日和見感染を起こす⁴⁾。この菌種はデンタルカリエスのほか、歯性膿瘍、脳膿瘍、肝膿瘍、髄膜炎、心内膜炎、胸膜膿胸、腹膜炎、胆管炎、外傷性あるいは手術による感染、菌血症など口腔および全身性の化膿性病変に関与している⁵⁾。anginosus group レンサ球菌の1菌種である *Streptococcus intermedius* は宿主の免疫反応を低下させ、組織障害の修復を遅らせる。また、ヒト繊維芽細胞の増殖、リンパ球の形質転換を低下させる⁶⁾。anginosus group レンサ球菌でも他の物質との付着能がいくつか報告されており、放線菌との共凝集、ガラスへの付着、唾液でコートしたハイドロキシアパタイトへの付着、ヒトあるいは他の動物の赤血球との凝集などがある⁷⁾。本稿ではanginosus group レンサ球菌の中で *S. intermedius* を取り上げ、唾液を介した口腔組織への付着機構について概説する。前半では細菌側の付着因子を、そして後半では生体側因子としての唾液タンパクを取り上げている。

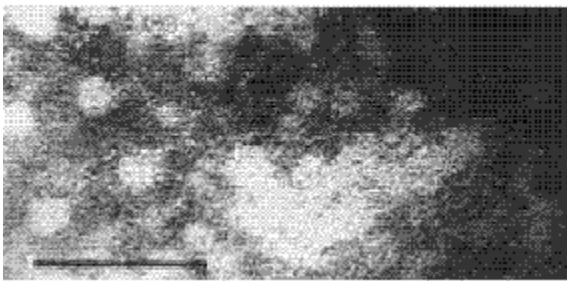
1. *S. intermedius* 菌体表層の付着因子

細菌表層の初期付着に関与する構造物として fimbriae あるいは pili と呼ばれる線毛様構造物が関与するとされている。口腔レンサ球菌の線毛様付着因子はよく研究されており、大きく分けて2種類に分ける

ことができる。1つは *Streptococcus pyogenes* の M タンパクやフィブロネクチン結合タンパクに代表される、単一の直線状巨大分子が菌体表層から伸びている構造⁸⁾、もうひとつは、多数の球状タンパクが直鎖状に繋がった数珠状構造をとるものである。このうちで、*S. intermedius* では後者のタイプを報告している²⁾。精製物を SDS-PAGE で解析すると、コアタンパクは約 60,000 の分子量をもち、ユニット間の結合は強固である。SDS 存在下で加熱するとわずかつつユニット間の結合が切れ、1ユニット、2ユニット、3ユニットといったラダー状の染色バンドが確認された。この点、グラム陰性細菌の線毛が加熱処理により容易に完全分解されるのと性質を大きく異にする。精製物の電子顕微鏡による観察像を図1に示す。構造的には小さな球状物質が連なって1本の鎖を形成し、長さは1 μ m を越え、波を打ったように見えた。同様な構造は *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus suis*, *S. parasanguis* でも確認されており、遺伝子構造もお互いによく類似している。精製物に対する抗体を作成して、免疫金染色を行うと菌体の表層から伸びている線毛に沿って金の粒子が観察できた。

anginosus group レンサ球菌で本線毛の保存状況を調べたのが図2である。保有している菌は全て *S. intermedius* で、血清型は g あるいは untypable に限局していた。血清型は表層の糖抗原に基づいて決めた分類法で⁴⁾、なんらかの関連がありそうであった。保有菌は遺伝子 (*fimI*) だけでなく、抗原タンパクや、唾液による凝集活性も保有していた。K16-1K 株は本線毛は有していなかったが、唾液凝集活性を示し、他のタ

A



B

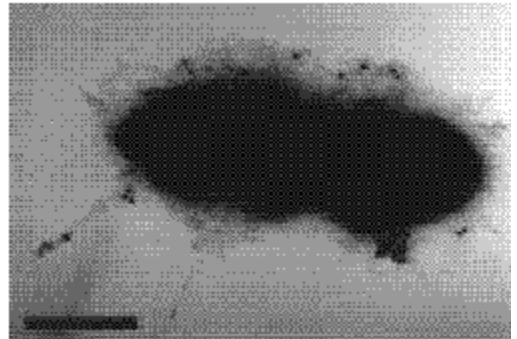


図1 線毛の微細構造と局在 A. 精製した線毛標品の電子顕微鏡像 X 200,000 バーは0.1 μ m を示す。

B. 精製線毛に対する抗血清を用いた免疫金染色像 X 50,000 バーは0.2 μ m を示す。

(Yamaguchi and Matsunoshita, 2004²⁾から)

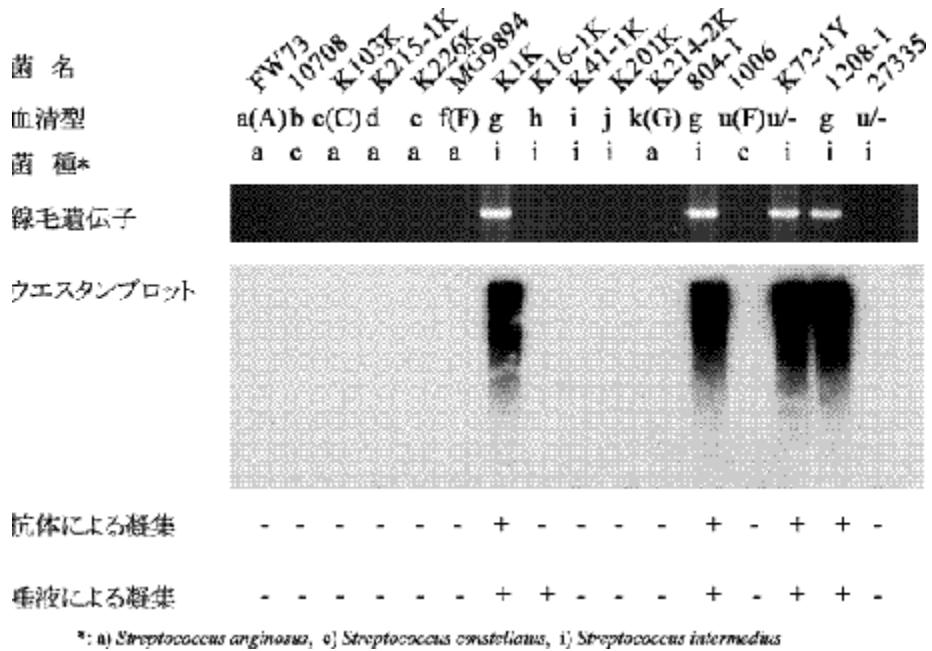


図2 *anginosus* group レンサ球菌における線毛の遺伝子(*fimI*), 抗原および唾液による凝集活性の分布

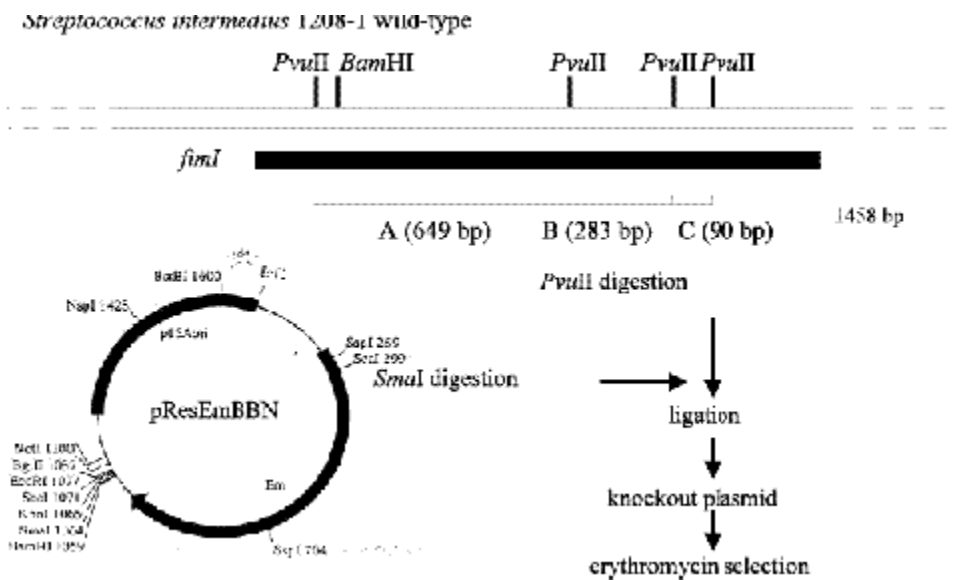


図3 線毛遺伝子の構造とノックアウト変異体作成手順

イブの凝集因子を有していることが示唆された。

唾液を介した凝集，附着活性への関与をより明確に調べるために，図3で示すデザインでロックアウト変異体を作成して影響を確認した。その結果を図4に示す。凝集活性は変異体ではほとんど確認できなかったが，精製唾液凝集素に対する附着は変異体では親株の約65%の活性を示した。しかし唾液標品で前処理した

ハイドロキシアパタイトに対しては明らかな効果を示さなかった。

このタイプの線毛の生合成はいくつかのタンパクの協調によるものであり，これらの遺伝子はクラスターを構成している。最初の報告は B group レンサ球菌で⁹⁾，われわれが研究してきた *S. intermedius* 1208-1 株でも類似の構造が見られ，単離した遺伝子 *fimI* は

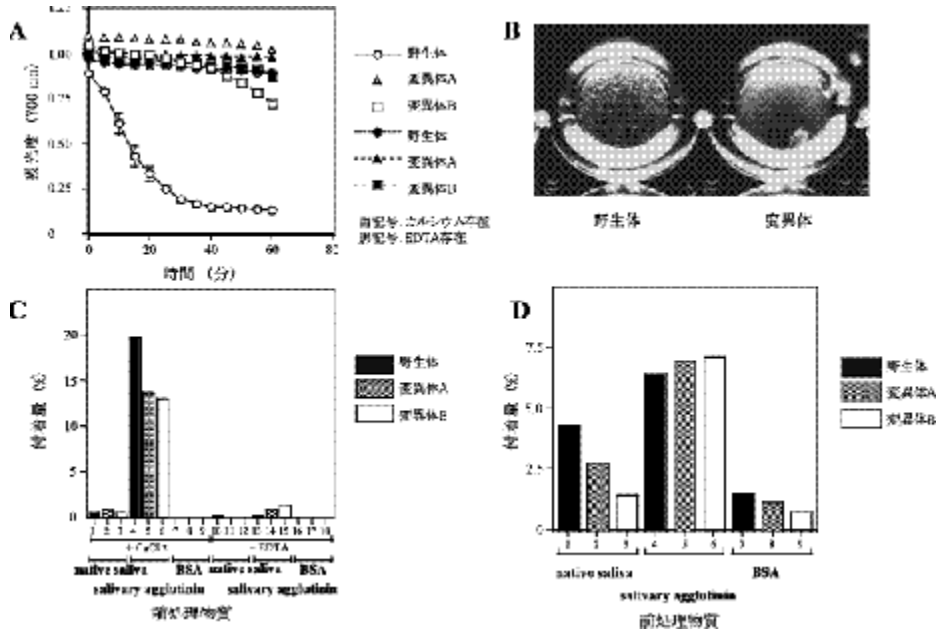


図4 線毛欠損株の解析 A. 唾液による細菌の凝集活性を示す。B. 野生体(左)と変異体(右)の唾液による凝集活性を示す。C. 唾液サンプル，ウシアルブミンにより前処理したプラスチックウェルに対する細菌の附着量を示す。D. 唾液サンプル，ウシアルブミンにより前処理したハイドロキシアパタイトに対する細菌の附着量を示す。

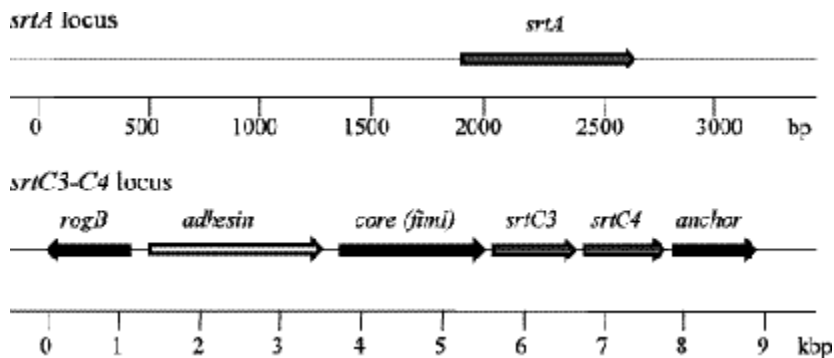


図5 *srtA* および *srtC3-C4* をコードしている染色体領域の構造

コアタンパクであった。図5でRogBタンパクは全体の発現量の調節に関与し、次に付着タンパク、コアタンパク、プロセシングを担っているsrtC3, srtC4, 最後に菌体表層のアンカータンパクの順でなっている。さらにこのオペロンの発現を調節している、別の遺伝子座に存在するsrtAが存在している。srtはsortase酵素を示しており、グラム陽性菌の表層タンパクのプロセシングに関与している。Actinomyces naeslundii, Corynebacterium diphtheriae, S. parasanguisでもいくつかのsortase酵素が菌体表層の線毛形成に関与するタンパクの重合化に関与していることが報告されている¹⁰⁾。線毛は生体側の付着対象物としての唾液による凝集、付着だけでなく宿主細胞への侵入にも関与している。S. agalactiaeでは付着タンパク、コアタンパクをそれぞれ潰した変異体は血管内皮細胞への侵入能はなくなった。一方で、S. agalactiaeのコアタンパクを発現させたLactococcusは付着・侵入能を獲得した。また、付着タンパクを発現させた株では付着能は獲得したが侵入しなかった¹¹⁾。

2. 宿主側因子の解析

1) レセプターとしての唾液凝集素の解析

ヒトの唾液は潤滑剤、消化、半透過性のバリアであるペリクルの形成など、いくつかの重要な機能を持っている¹²⁾。成分としてはアミラーゼ、シスタチン、プロリンリッチプロテイン、プロリンリッチグリコプロテイン、カルボニックアンヒドラーゼ、ペルオキシダーゼ、スタセリン、ヒスタチン、ラクトフェリン、リゾ

チーム、sIgA、ムチン、唾液凝集素などがあり、これらはいずれも1次構造が明らかになっている¹³⁾。また、唾液は抗菌活性を持ち、選択的な細菌の除去、付着を行っている¹⁴⁾。

唾液凝集素による口腔レンサ球菌の付着反応は多くの菌種で報告されており、初期付着とそれに続く増殖、蓄積に関与する¹⁵⁾。一方で細菌の付着部位をブロックしたり、凝集させることにより付着を阻害し、生体から排除する機能を有している¹⁶⁾。そこでS. intermediusの口腔内への付着を考えるにあたって、まず唾液による凝集反応を検討した。健康な男性から全唾液を採取し、ろ過した標品を用いてゲルろ過クロマトグラフィーにて凝集活性を有する物質を単離、精製した¹⁷⁾。活性を有する分画をSDS-PAGEで分析した結果を図6に示す。分子量が300,000を超える分子が単一バンドとして確認できた。他の報告では、SDS-PAGEによる分析により、この分子は他にsIgAとわずかな未同定物質を含んでいる複合体である¹⁸⁾とあるが、今回用いた唾液標品では複合体を示す結果は得られなかった。このことは唾液凝集素に個人差があることを示しており興味深い。

最初、この唾液凝集素はS. mutansの凝集や口腔内への付着に関与する物質として報告され、解析が進んでいる。唾液凝集素は、内的には、う蝕誘発能があるS. mutansへの付着や凝集により、う蝕への抵抗に対して重要な役割をしていると考えられている¹⁹⁾。凝集素に対するモノクローナル抗体はS. mutansの耳下腺唾液中で凝集や、人工的に作ったペリクルへの付着

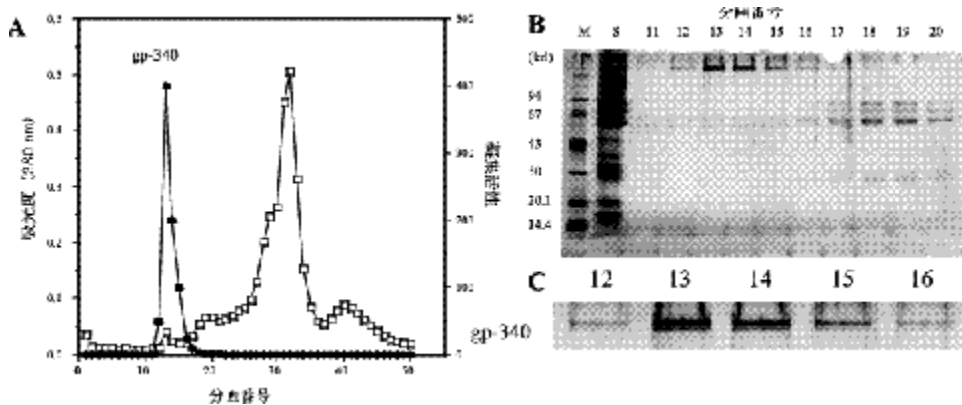


図6 唾液凝集素の精製 A. ろ過唾液をゲルろ過クロマトグラフィーで分画した時のタンパク溶出パターン(白四角)と各分画における細菌の凝集活性(黒丸)を示す。B. 示した分画のSDS-PAGE分析像を示す。S:ろ過唾液 M:マーカータンパク C. Bの拡大像を示す。(Yamaguchi, 2004¹⁷⁾から)

付着，凝集に部分的に関与していることが示された³⁰⁾。さらに，SRCR と SID ドメインを含む断片が *S. mutans* への付着に関与していたので，SRCR と SID のコンセンサス配列をカバーするようなペプチドを合成し，*S. mutans* への結合を検討した結果，図 7 B, C に示す SRCR ドメイン内の 16 残基ペプチド SRCRP2 (QGRVEVLRYSWGTVTC) だけが *S. mutans* と結合し，凝集を媒介した³¹⁾。

2) 凝集素への付着阻害因子の解析

宿主側のレセプターとして唾液凝集素が同定されたので，健康なひと 5 人を対象に細菌凝集活性，付着活性とう蝕に関する所見との関係を調べた結果を表 1 に示す。ここでは残念ながら凝集活性，付着活性，臨床所見とも相互にあまり関係がないように見えた。そこで，凝集活性が強く，付着活性の弱いヒト (M-1) の唾液標品を詳細に分析した。その結果，*S. intermedius* 菌の臨床分離株は精製した唾液凝集素に対しては非常

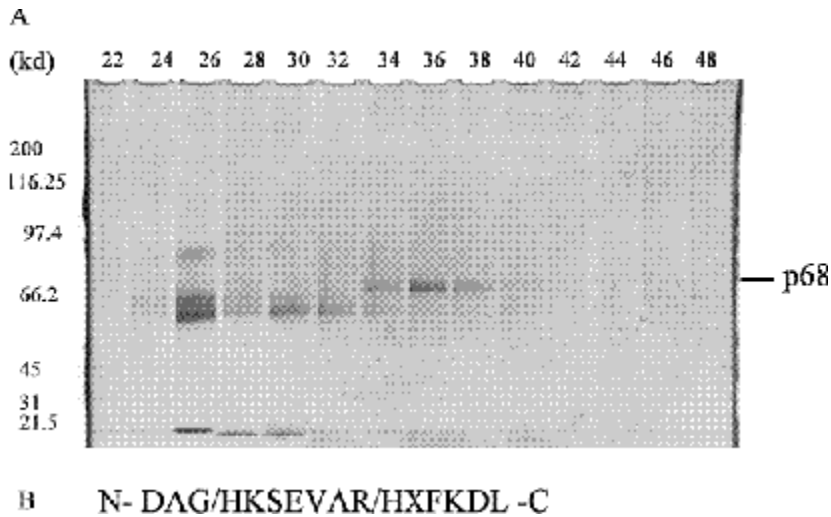


図 8 付着阻害物質の同定 A. ろ過唾液を陰イオン交換クロマトグラフィーで分画した時の各分画の SDS-PAGE 分析像を示す。 B. p68 タンパクのアミノ末端のアミノ酸配列分析の結果を示す。

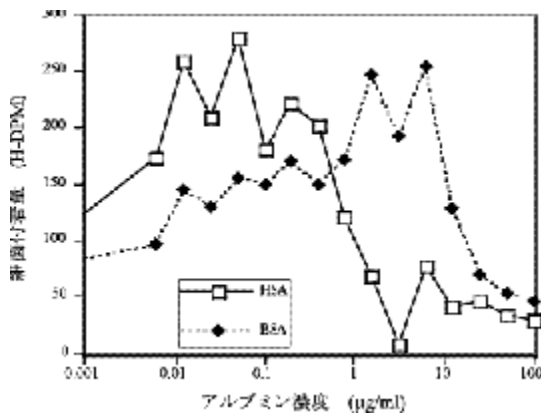


図 9 アルブミンの唾液凝集素に対する細菌付着への効果 ヒトアルブミン (白四角) とウシアルブミン (黒四角) の各濃度での効果を示す。

に強い付着を示すのに対し、ろ過しただけの標品を使った場合には、同程度の凝集素を含んでいるにも関わらず、極端に低い活性しか示さなかった。このことは唾液中に凝集素への付着を阻害する分子が含まれていることを示していた。そこでろ過唾液から付着阻害因子をカラム操作により精製した。SDS-PAGEで調べたところ図8で示すように68,000の分子量を持つ分子(p68)が単一バンドとして得られたので、アミノ末端の配列を調べたところ、16残基が決定できた。これをデータベースで検索した結果、アルブミンと一致した。濃度を変えて付着への効果を調べたところ、図9に示すように高濃度領域では確かに付着阻害効果を示したが、低濃度領域では逆に昂進活性を示した。対照に用いたウシ血清アルブミンでも同様の効果が得られたが、同程度の活性を得るのに約2桁高い濃度が必要であった。

図10Aに示すように、アルブミン遺伝子は第4染色体上の上のっており、15個のエクソンからなる比較的大きなタンパクである。アルブミンの活性部位を検討するために、ヒトアルブミンのcDNAを肝臓の全RNAサンプルから合成し、バリエーションを用いて検討した。第3, 4, 5, 6エクソンを欠失したクローン(△HSA)が得られたので、大腸菌で発現、精製し、やはり濃度を変えて付着に対する効果を検討した。結果を図10B

に示すが、欠失タンパクでは明らかな効果は認められなかった。第3から第6エクソンの領域はヒトとウシの間で相違が比較的大きな部分に一致しており、ここが活性に重要な役割を果たしていると思われる。

おわりに

根尖膿瘍をはじめ、全身的に膿瘍を形成する口腔レンサ球菌について口腔への感染に関する付着機構の解析を、菌体側、宿主側の両方について進めてきた研究の概要について概説した。菌側では表層に存在する線毛が関与していたが、この分子だけでは、説明はつきそうにない。また、生体側では細菌の主な標的は唾液凝集素であるが、この分子は標的因子としての働きと、付着前に菌体側の付着因子をブロックし、凝集させて生体との付着を阻害する、という2面性を持っている。アルブミンはそれらをコントロールする因子として働いていた。唾液凝集素、唾液アルブミンともに唾液中の含有量は個人差が大きく、臨床所見との関連が興味のあるところである。さらに、これまでのほとんどの研究では、菌液は緩衝液中に浮遊させて付着量を検討したが、実際の口腔内では細菌は唾液中に浮遊している。このことが問題解決を一層困難なものにしている。これらの関係を図11に示す。付着に関するこ

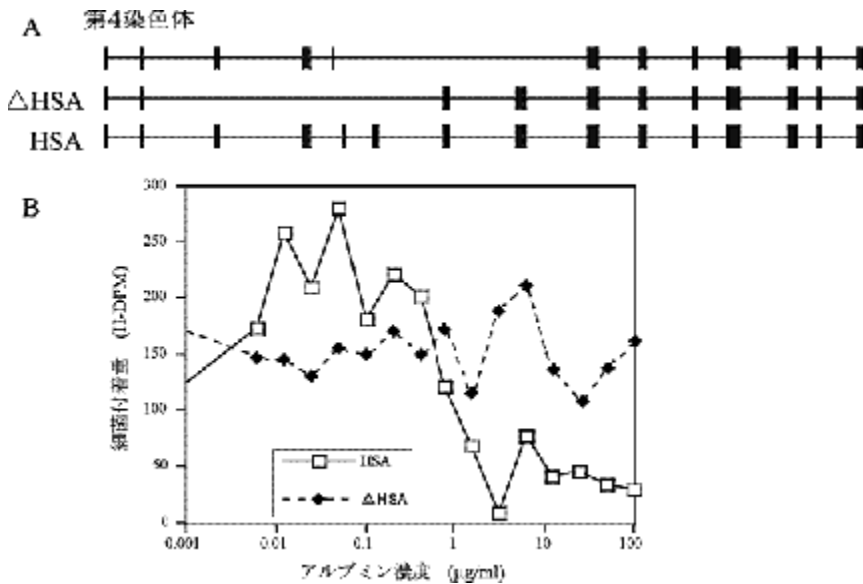


図10 変異アルブミンの唾液凝集素に対する細菌付着への効果 A. ヒトアルブミン遺伝子の染色体上での構造を示す。2段目の変異体(△HSA)を実験に供した。 B. ヒトアルブミン(白四角)と変異ヒトアルブミン(黒四角)の各濃度での効果を示す。

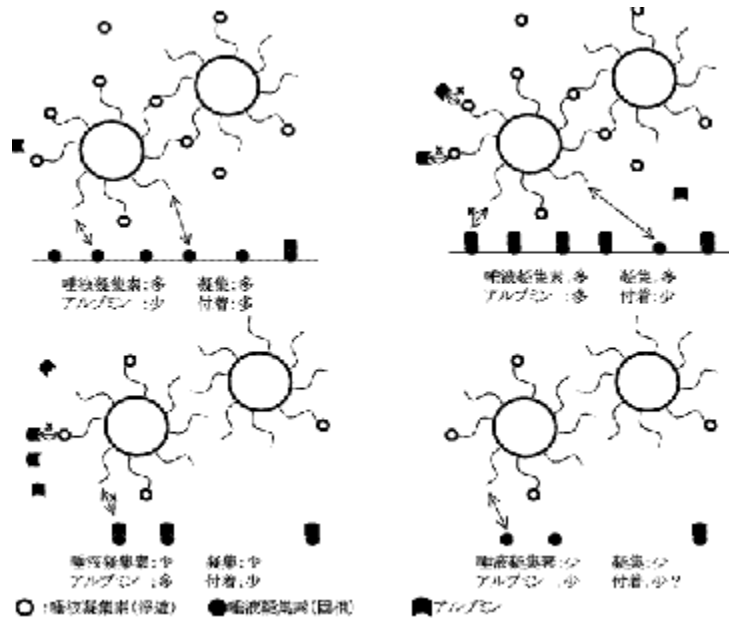


図11 細菌の凝集，付着に対する唾液凝集素，アルブミン濃度の影響

これらの因子の個人差が，すなわち各個人の細菌叢の構成を決定しているのではないかと，という仮説を持っており，これらの因子を外側からコントロールすることによって細菌叢の改善を図り，口腔のみならず，全身性の感染症の予防に寄与できないかと期待して研究を続けているところである。

文 献

- 1) Klemm, P.: Fimbriae: adhesion, genetics, biogenesis, and vaccines. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994
- 2) Yamaguchi, T. and Matsunoshita, N.: Isolation and some properties of fimbriae of oral *Streptococcus intermedius*. *Curr. Microbiol.*, 49, 59-65, 2004
- 3) Giomarelli, B., Visai, L., Hijazi, K., Rindi, S., Ponzio, M., Iannelli, F., Speziale, P. and Pozzi, G.: Binding of *Streptococcus gordonii* to extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiol. Lett.*, 265, 172-177, 2006
- 4) Yakushiji, T., Katsuki, M., Yoshimitsu-Narita, A., Sato, S. and Inoue, M.: Cariogenicity of oral *Streptococcus milleri* in rats. *J. Dent. Health.*, 40, 66-73, 1990
- 5) Russell, R. R. B.: Pathogenesis of oral streptococci. In: Fischetti, V. A., Novick, R. P., Ferretti, J. J., Portnoy, D. A. and Rood, J. I. (eds) Gram-positive pathogens. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp 272-279, 2000
- 6) Higerd, T. B., Vesole, D. H. and Goust, J.: Inhibitory effects of extracellular products from oral bacteria on human fibroblasts and stimulated lymphocytes. *Infect. Immun.*, 21, 567-574, 1978
- 7) Yamaguchi, T., Taketoshi, M., Eifuku-Koreeda, H., Yakushiji, T. and Inoue, M.: Haemagglutinating activities of oral strains of *Streptococcus milleri* group. *Microbios.*, 75, 249-59, 1993
- 8) Schwarz-Linek, U., Hook, M. and Potts, J. R.: Fibronectin-binding proteins of Gram-positive cocci. *Microbes. Infect.*, 8, 2291-2298, 2006
- 9) Dramsi, S., Caliot, E., Bonne, I., Guadagnini, S., Prévost, M. C., Kojadinovic, M., Lalioui, L., Poyart, C. and Trieu-Cuot, P.: Assembly and role of pili in group B streptococci. *Mol. Microbiol.*, 60, 1401-1413, 2006
- 10) Ton-That, H. and Schneewind, O.: Assembly of pili in Gram-positive bacteria. *Trends Microbiol.*, 12, 228-234, 2004
- 11) Maisy, H. C., Hensler, M., Nizet, V. and Doran, K,

- S.: Group B streptococcal pilus proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells. *J. Bacteriol.*, 189, 1464-1467, 2007
- 12) Gans, R. F., Watson, G. E. and Tabak, L. A.: A new assessment in vitro of human salivary lubrication using a compliant substrate. *Arch. Oral Biol.*, 35, 487-492, 1990
- 13) Prakobphol, A., Xu, F., Hoang, V. M., Larsson, T., Bergstrom, J., Johansson, I., Frängsmyr, L., Holmskov, U., Leffler, H., Nilsson, C., Borén, T., Wright, J.R., Strömberg, N. and Fisher, S. J.: Salivary agglutinin, which binds *Streptococcus mutans* and *Helicobacter pylori*, is the lung scavenger receptor cysteine-rich protein gp-340. *J. Biol. Chem.*, 275, 39860-39866, 2000
- 14) Scannapieco, F. A., Torres, G. I. and Levine, M. J.: Salivary amylase promotes adhesion of oral streptococci to hydroxyapatite. *J. Dent. Res.*, 74, 1360-1366, 1995
- 15) Jenkinson, H. F. and Lamont, R. J.: Streptococcal adhesion and colonization. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 8, 175-200, 1997
- 16) Scannapieco, F. A.: Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 5, 203-248, 1994
- 17) Yamaguchi, T.: Purification of saliva agglutinin of *Streptococcus intermedius* and its association with bacterial aggregation and adherence. *Arch. Microbiol.*, 181, 106-111, 2004
- 18) Oho, T., Yu, H., Yamashita, Y. and Koga, T.: Binding of salivary glycoprotein-secretory immunoglobulin A complex to the surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.*, 66, 115-121, 1998
- 19) Stenudd, C., Nordlund, A., Ryberg, M., Johansson, I., Källestål, C. and Strömberg, N.: The association of bacterial adhesion with dental caries. *J. Dent. Res.*, 80, 2005-2010, 2001
- 20) Carlén, A., Bratt, P., Stenudd, C., Olsson, J. and Strömberg, N.: Agglutinin and acidic proline-rich protein receptor patterns may modulate bacterial adherence and colonization on tooth surfaces. *J. Dent. Res.*, 77, 81-90, 1998
- 21) Carlén, A., Olsson, J. and Ramberg, P.: Saliva mediated adherence, aggregation and prevalence in dental plaque of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces* spp. in young and elderly humans. *Arch. Oral Biol.*, 41, 1133-1140, 1996
- 22) Lenander-Lumikari, M., Tenovuuo, J., Emilson, C. G. and Vilja, P.: Viability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in whole saliva with varying concentrations of indigenous antimicrobial agents. *Caries Res.*, 26, 371-378, 1992
- 23) Bikker, F. J., Ligtenberg, A. J., Nazmi, K., Veerman, E. C., van't Hof, W., Bolscher, J. G., Poustka, A., Nieuw Amerongen, A. V. and Mollenhauer, J.: Identification of the bacteria-binding peptide domain on salivary agglutinin (gp-340/DMBT1), a member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily. *J. Biol. Chem.*, 277, 32109-32115, 2002
- 24) Mollenhauer, J., Wiemann, S., Scheurlen, W., Korn, B., Hayashi, Y., Wilgenbus, K. K., von Deimling, A. and Poustka, A.: DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumours. *Nat. Genet.*, 17, 32-39, 1997
- 25) Hohenester, E., Sasaki, T. and Timpl, R.: Crystal structure of a scavenger receptor cysteine-rich domain sheds light on an ancient superfamily. *Nat. Struct. Biol.*, 6, 228-232, 1999
- 26) Romero, A., Romão, M. J., Varela, P. F., Kölln, I., Dias, J. M., Carvalho, A. L., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E. and Calvete, J. J.: The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. *Nat. Struct. Biol.*, 4, 783-788, 1997
- 27) Sinowatz, F., Kölle, S. and Töpfer-Petersen, E.: Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. *Cells Tissues Organs*, 168, 24-35, 2001
- 28) Mollenhauer, J., Herberich, S., Helmke, B., Kollender, G., Krebs, I., Madsen, J., Holmskov, U., Sorger, K., Schmitt, L., Wiemann, S., Otto, H. F., Gröne, H. J. and Poustka, A.: Deleted in Malignant Brain Tumors 1 is a versatile mucin-like molecule likely to play a differential role in digestive tract cancer. *Cancer Res.*, 61, 8880-8886, 2001
- 29) Ligtenberg, T. J., Bikker, F. J., Groenink, J., Tornøe, I., Leth-Larsen, R., Veerman, E. C., Nieuw Amerongen, A. V. and Holmskov, U.: Human salivary agglutinin binds to lung surfactant protein-D and is identical with scavenger receptor protein gp-340. *Biochem. J.*, 359,

243-248, 2001

- 30) Ligtenberg, A. J., Veerman, E. C., and Nieuw Amerongen, A. V.: A role for Lewis a antigens on salivary agglutinin in binding to *Streptococcus mutans*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 77, 21-30, 2000
- 31) Bikker, F. J., Ligtenberg, A. J., End, C., Renner, M., Blaich, S., Lyer, S., Wittig, R., van't Hof, W., Veerman, E. C., Nazmi, K., de Blicke-Hogervorst, J. M., Kioschis, P., Nieuw Amerongen, A. V., Poustka, A. and Mollenhauer, J.: Bacteria binding by DMBT1/SAG/gp-340 is confined to the VEVLXXXXW motif in its scavenger receptor cysteine-rich domains. *J. Biol. Chem.*, 279, 47699-47703, 2004