

電子線結晶構造解析から導かれたギャップ結合チャンネルの
プラグゲーティング機構

Plug Gating Mechanism of Gap Junction Channels Revealed by Electron Crystallography

大 嶋 篤 典

Atsunori Oshima

京都大学大学院理学研究科生物科学専攻生物物理学教室

要 旨 多細胞生物において細胞間の物質透過を担うギャップ結合は隣接細胞の細胞質を直接連絡するコミュニケーションチャンネルである。ギャップ結合のゲーティング機構に関しては以前から複数存在することが指摘されていたが、それらの構造学的知見は少なかった。本稿ではコネクシン 26 (Cx26) が作るギャップ結合の二次元結晶から電子線結晶学によって計算した三次元構造と投影像の構造解析を紹介する。Cx26M34A 変異体の三次元構造はチャンネルの孔の中に直径約 20 Å の密度が確認され、これがプラグとして通路を塞ぐことでチャンネルの閉じた状態を作り出すことを強く示唆するものであった。一方、N 末端を切断した Cx26M34Adel2-7 の投影像ではプラグに相当する密度の有意な低下を確認した。これらの構造解析からコネクシンの N 末端がチャンネルの孔の中で物理的に閉じることによってチャンネルを開閉するプラグゲーティング機構を提案する。

キーワード：ギャップ結合, 電子線結晶学, 極低温電子顕微鏡, 三次元構造解析, ゲーティング機構

1. はじめに

ギャップ結合は多細胞生物の広範囲な組織において確認され、隣接する細胞質を直接連絡して細胞間の物質透過を担っているチャンネルである。その構成タンパク質は 4 回膜貫通型のコネクシン (Cx) と呼ばれ、ラット、ヒト、マウスなどの脊椎動物からクローニングされた配列相同性のある複数のアイソフォームがコネクシンファミリーを形成している。6 個のコネクシンが一つの細胞膜上で会合してヘミチャンネル (コネクソン) を形成し、向かい合う細胞膜上に存在するヘミチャンネルと細胞外ドメインを介して結合することで隣接細胞間の透過を可能にするギャップ結合チャンネルとなる。このチャンネルは胚発生、受胎能力、免疫系、神経系における電気シナプスによるシグナル伝達などが正常に機能するために必要であり¹⁾、コネクシンの突然変異は難聴や白内障などの病気を引き起こすことが知られている²⁾。

ギャップ結合はラット生体内の肝臓においてチャンネルが二次元結晶状に集積して存在することから、電子顕微鏡を用いた研究に適しており古くから構造解析が進められてきた。特にゲーティング機構に関する研究は 1980 年代に英国 MRC 研究所の Nigel Unwin らによって行われ、一つの有名なモデルが提唱されている^{3,4)}。これはコネクシンのサブユニット

が Ca^{2+} の非存在下で傾いていたものが、 Ca^{2+} 存在下で各サブユニットが同時に回転してその傾きを変化させチャンネルの孔を閉じる、というものである (以下これをサブユニットローテーション機構と呼ぶ)⁴⁾。このモデルではヘミチャンネルに存在する 6 個のサブユニットが同時に回転するため、少なくとも 6 個のコネクシンは同じ構造変化を伴うことになる。またサブユニットの回転という現象は対を成すヘミチャンネルに少なからずアロステリックな構造変化を引き起こす可能性が高く、その意味では結合する一対のヘミチャンネル同士が連動して構造変化することを想定したモデルである。近年になって Cx43 が作るギャップ結合チャンネルの三次元構造が同じく電子線結晶学的手法により水平方向 7.5 Å および 5.6 Å の分解能で計算され、コネクシンの膜貫通ヘリックスが分離した構造が報告された^{5,6)}。しかしこれらの構造はチャンネルが開いた状態なのか閉じた状態なのかについては一切議論されていない。その理由は Cx43 のブロッカーとして知られる oleamide を結晶化透析外液に加えているにもかかわらずチャンネルの孔を閉じるものは存在せず、その開閉状態は不明な構造であったためである。

一方電気生理学者によってギャップ結合のチャンネルの特性が詳しく調べられている。それによるとギャップ結合チャンネルは少なくとも 2 種類の電位感受性ゲーティングと、pH や Ca^{2+} など化学物質に感受して開閉する化学ゲーティングという複数のゲーティング機構を有していることが示されている⁷⁾。1 つ目の電位感受性ゲーティングは膜電位 (V_m) を直接感受することから V_m -ゲーティングといわれ、 V_m の値に

¹⁾ 〒 606-8502 京都市左京区北白川追分町
TEL: 075-753-4216; FAX: 075-753-4218
E-mail: atsu@em.biophys.kyoto-u.ac.jp
2009 年 2 月 14 日受付

よってギャップ結合間を流れる定常電流が異なるというものである¹¹。この現象のファミリー内に共通する分子機構は詳しくはわかっていないが、Cx43 においてはその C 末端の配列が関与しているとされる⁸。もう一つの電位感受性ゲーティングはギャップ結合間の電位差 (Vj) を感受して開閉するもので、Vj-ゲーティングと呼ばれている⁹。Vj-ゲーティングと Vm-ゲーティングは基本的に異なる機構であり、それぞれに独自の電位センサーが存在すると考えられている¹¹。単一のコネクシンから成るギャップ結合の場合、Vj-ゲーティングは Vj が正負どちらに傾いてもその絶対値が大きくなるほど定常状態におけるチャンネルのコンダクタンスが低下することで説明される。これはコネクシンファミリーにおいて広く見られる現象で、向かい合うヘミチャンネルそれぞれが独自に電位センサーを持つためと解釈されている^{9,10}。Vj-ゲーティングはコネクシンファミリーにおいて一般的な性質である一方、化学ゲーティングに関してはアイソフォーム特異的な記述に留まっており、例えば pH-ゲーティングでは Cx43 の C 末端配列が particle を形成して細胞質ループと相互作用することで孔を閉じる particle-receptor model¹¹ や、カルモジュリンの Cx32 への結合¹² がそれぞれ示唆されているが、コネクシンファミリーにおいて一般性のあるモデルの提唱には至っていない。これらの電気生理学的手法で述べられてきたギャップ結合チャンネルの開閉特性をサブユニットローテーション機構のみで説明するのは難しく、ギャップ結合に関する新たな構造的知見が必要とされている状況であった。今回コネクシン 26 ギャップ結合チャンネルの二次元結晶を作製して電子線結晶学的手法で再構成された三次元構造から、これまでとは全く異なるゲーティング機構が示唆された¹³ ので紹介する。

2. 二次元結晶化と電子線結晶構造解析

天然に存在するギャップ結合には必ず複数のコネクシンが存在するため、リコンビナント発現系である Sf9 細胞を用いることで単一の Cx26 のみから成るギャップ結合チャンネルを大量発現した。過去の筆者らの研究により、Cx26M34A 変異体は野生型に比べ発現量が高くチャンネルの透過性を低下させることがわかっている¹⁴。チャンネルの閉じた構造を明らかにするという目的から Cx26M34A 変異体の C 末端に His タグを付加したコンストラクトを発現し、可溶化後 Ni アフィニティカラムで精製した。これに合成脂質 DOPC 溶液を混合して透析で界面活性剤を除去することでタンパク質が脂質二重膜に再構成され、温度や塩濃度等の結晶化条件の最適化によって二次元結晶が得られた (図 1A)。また超薄切片によって二次元結晶の膜に対して垂直な断面を観察すると、この二次元結晶は三層構造である可能性が強く示唆され (図 1B 矢印)、しばしばそれらは重なる傾向にあった (図 1B 矢じり)。試料をトレハロース包埋して急速凍結し、極低温電子顕微鏡で最大傾斜角 45 度までの実像を撮影して三次元データの収集を行った。

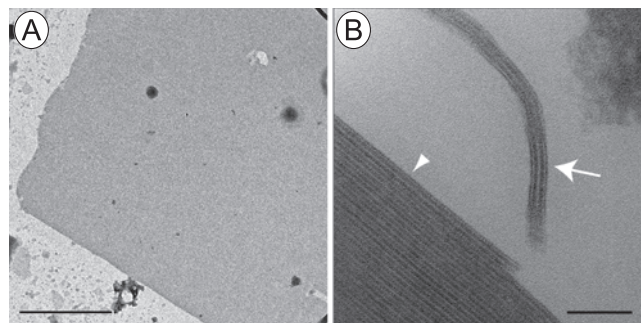


図 1 Cx26M34A の二次元結晶の電子顕微鏡写真
(A) 合成脂質 DOPC への再構成によって得られた Cx26M34A の二次元結晶。2%酢酸ウランで負染色した。スケールバーは 1 μm 。
(B) Cx26M34A 二次元結晶の超薄切片の電子顕微鏡写真。矢印は二次元結晶の単位となる三層構造を、矢じりはそれらが多層に重なった構造を示す。スケールバーは 100 nm。

3. Cx26M34A の三次元構造とチャンネル孔に存在するプラグ

合計 254 枚の像から水平分解能 10 \AA 、垂直分解能 14.1 \AA で三次元構造が計算され、結晶の対称性は $p22_12_1$ であった (図 2, accession no. EMD-1319, <http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/emsearch/index.html>)。この構造から予想通り二次元結晶が三層の脂質二重膜から構成されていることがわかり、その厚さは約 240 \AA であった。三層の脂質二重膜という環境は天然には存在しないが、再構成されたタンパク質はヘミチャンネルではなく完全なギャップ結合チャンネルを形成したものが互いに反対向きに配置することで三層となっている (図 2)。したがって立体構造という点においては天然の脂質二重膜に埋まったギャップ結合チャンネルに近い状況を再現しているものと考えられる。三層のうち両端の膜 (Membrane-1 と Membrane-3) に存在するヘミチャンネルの密度は中央の膜 (Membrane-2) に存在するヘミチャンネルに比べて弱い傾向にあった。その理由として、Membrane-2 にはヘミチャンネルが上下逆に密に詰まっているが Membrane-1 と Membrane-3 には分子間に隙間があり直接的な相互作用がないため分子が不安定である可能性、凍結試料作製時に使用するカーボン支持膜が両端の分子表面に直接接触するので分子の変形が起こっていると思われること、さらには凍結直前の試料液を吸い取る際に気液界面の表面張力がタンパク質分子を変形させている可能性、などが挙げられる。しかし逆に Membrane-2 に存在するヘミチャンネルは試料作製による物理的な接触が全く起こらないため、より確かな構造を保持していると思われる。以後構造に関する議論は断りのない限り Membrane-2 に存在するヘミチャンネルについて記述する。

水平分解能が 10 \AA と膜貫通ヘリックスの分離は十分ではないが細胞質ドメインの分離が良いため、膜貫通ヘリックス部位に Cx43 の α モデル⁶ を重ね合わせることが可能であった (図 3)。遺伝子配列を元にコネクシンファミリーにおいて進化系統樹を描くと、Cx43 は α サブグループに、Cx26 は

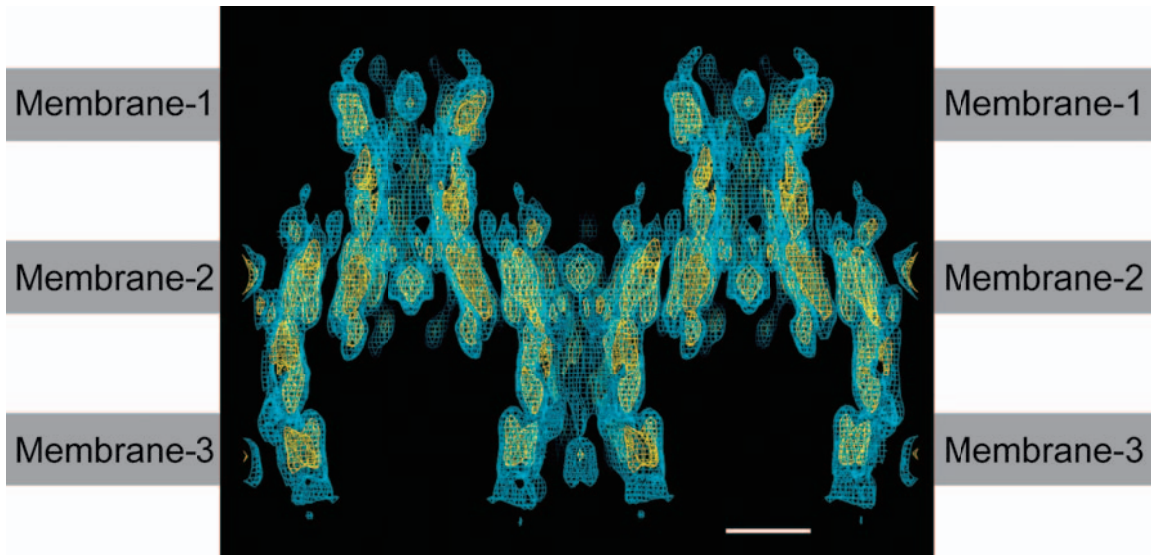


図2 Cx26M34Aの二次元結晶から10 Å分解能で計算された三次元構造。膜面に対して平行に見たCx26M34Aの電位図。三層の脂質二重膜に相当する部分は“Membrane-1, 2, 3”として示されている。水色のメッシュが1.0 σ 、黄色のメッシュが2.4 σ レベルの密度を示す。スケールバーは40 Å。

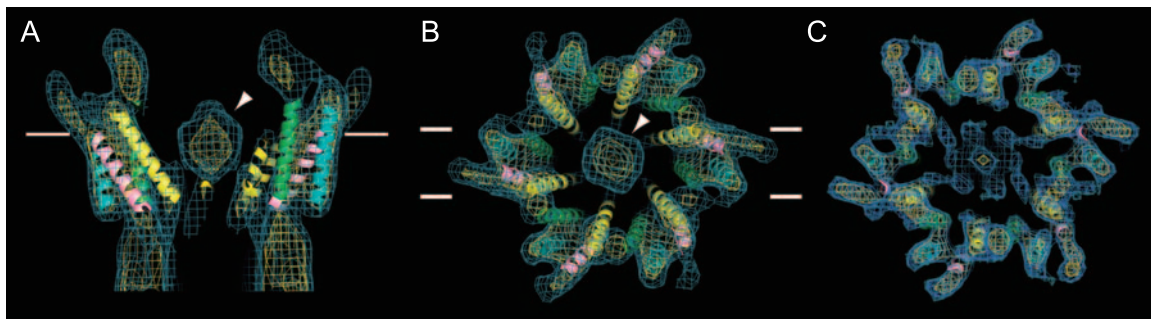


図3 Cx26M34Aヘミチャネルの拡大図
4本の膜貫通ヘリックスはCx43の構造⁶⁾を元にそれぞれシアン、緑、黄、ピンクで色分けされている。メッシュの配色は図2に準ずる。
(A) Membrane-2に位置するヘミチャネルを膜面に対して平行に見た厚さ20 Åの電位図。これは(B)に白線で示された領域に相当する。プラグに相当する密度が矢じりで示されている。
(B) (A)における白線を中心とした厚さ20 Åを膜面に垂直方向から見た電位図。
(C) 温度因子 $B = -700$ を用いて振幅を補正したCx26M34Aの電位図。プラグの密度が6個の α ヘリックス様の構造に分離しはじめ、プラグにつながる4本のループ部分の構造の一部が見られる。

β サブグループにそれぞれ分類される¹⁵⁾。したがって異なるグループのコネクションであってもその膜貫通部位の編成はほぼ同じであると考えられる。この構造で最も特筆すべきはチャンネルの孔の中に直径約20 Åの新たな密度が現れたことである(図3矢じり)。この密度はチャンネルの孔を物理的にブロックしており、これがチャンネルのプラグとして機能していることを強く示唆する構造であった。そしてこのプラグの密度はMembrane-2に存在するヘミチャネルの孔のみならずMembrane-1とMembrane-3に配置するヘミチャネルの孔にもその存在が確認された(図2)。この向かい合う二つのヘミチャネルは構造計算において平均化されておらず、独立な密度である。したがってそれぞれのヘミチャネルが自分自身のプラグを保持するという構造は、向かい合うヘミチャネルが独立にその開閉を制御しうることを意味している。

4. プラグを構成するコネクションの部位

本研究における構造計算には二次元結晶の電子顕微鏡像のみを使用しているため、高分解能側の振幅データが弱い。温度因子として $B = -700$ の値を適用して計算した三次元構造ではプラグの密度が6個のヘリックスに似た密度に分離し始め、弱いながらそのうち4つからループと思われる突起が確認された(図3C)。このことはプラグがチャンネル孔に入り込んだCx26のN末端あるいはC末端から形成されている可能性が高いことを示している。

Vjの電位センサーはN末端に存在することが知られている。これはコネクションのN末端10残基までのアミノ酸側鎖を異なる電荷のものに変異させるとVj-ゲーティングの開閉特性が逆転することによる^{9,16,17)}。Vj-ゲーティングはその電

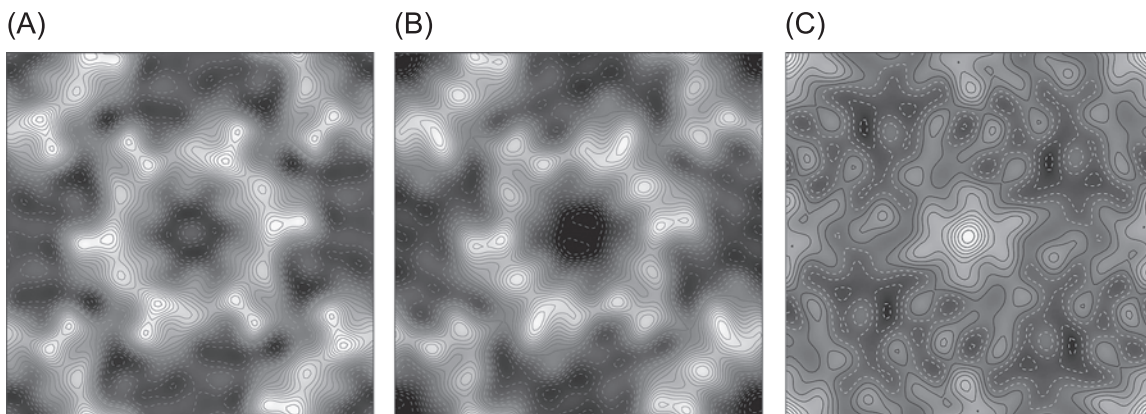


図4 Cx26M34A と Cx26M34Adel2-7 の投影図

Cx26M34A (A), Cx26M34Adel2-7 (B) の投影図とそれらの差フーリエマップ (C) がグレースケールと等高線で示されている。差フーリエマップは Cx26M34A から Cx26M34Adel2-7 の密度を差し引いたものである。表示エリアは単位格子に相当し、横方向が a 軸、縦方向が b 軸に相当する。実線と破線は (A), (B) では 0.2σ 刻み、(C) では 0.5σ 刻みで描かれている。

位センサー部分のアミノ酸側鎖の電荷が電場の中を移動することで閉じた状態になると考えられている^{9,18)}。そしてギャップ結合チャンネルの構造において Vj を感受できる場所はチャンネルの孔の中しかないため、Vj センサーは必ずチャンネル孔の中に存在するはずであるという考え方から、電位変化を感受するアミノ酸残基を含むコネキソンの N 末端がチャンネル孔の中に存在する可能性が示唆されている^{9,16,17,19)}。NMR による Cx26 の N 末端 15 残基ペプチドの溶液中における構造研究では最初の 1-10 残基がヘリックス構造をとり、それ以降は非常にランダムな構造であった²⁰⁾。これらの知見はいずれもプラグが Cx26 の N 末端の集合から構成されている可能性を支持している。

そこで構造からその可能性を特定するため Cx26M34A の N 末端アミノ酸 6 残基を欠失した変異体 (Cx26M34Adel2-7) を二次元結晶化し、 10 \AA 分解能で投影像を計算して Cx26M34A の投影像と比較した²¹⁾ (図 4A, B)。Cx26M34Adel2-7 の構造ではプラグに相当する密度が有意に低く、差フーリエマップ (図 4C) においてはプラグに相当する位置に 4.5σ のピークが現れた。これにより Cx26 の N 末端がプラグの形成に大きく寄与していることが明らかとなった。そして最近の研究では野生型 Cx26 ギャップ結合チャンネルの原子モデルが X 線結晶構造解析により報告されている²²⁾。この構造はヘミチャンネルを構成する 6 サブユニットの N 末端がヘリックスを形成してチャンネル孔の内壁に接触しており、それらは分離した配置をとっていたことからチャンネルが開いた状態であると考えられる。この研究は電子線結晶構造解析で確認された Cx26M34A のチャンネル孔に存在するプラグは N 末端が集合することで成り立っている可能性を非常に強く支持するものであった。

5. プラグゲーティング機構

Cx26M34A は本来ヒトにおいて難聴を引き起こす原因となる Cx26M34T を元に導入した変異であり¹⁴⁾、チャンネル孔を

ふさいだプラグの構造は生理的に閉じたチャンネルの構造を示していない可能性がある。逆に言えば Cx26M34A の変異によってプラグが孔をふさいぐ位置に固定されており、Cx26M34T の変異体においても程度の差こそあれ同じような状況が起きているとすれば、それがチャンネル透過活性の低下につながり難聴という疾患の原因になっている可能性は十分にある。Cx26 の原子モデルによればメチオニン M34 の側鎖が N 末端と相互作用しており²²⁾、このことはメチオニン M34 が変異すれば N 末端の配置が大きく変わりうることからよく説明される。

一方二次元結晶の結晶化透析外液には Ca^{2+} , Mg^{2+} , MES バッファー (pH=5.8), carbenoxolone (ブロッカー) など、ギャップ結合チャンネルを閉じることで知られる要素が多く含まれている^{1,23)}。また Cx26M34A の変異が導入されたことでその構造が生理的に閉じた状態を模倣している可能性がある。この場合プラグが孔をふさいだ状態を閉状態、X 線で解かれた Cx26 の原子モデルを開状態としたときの開閉モデルをプラグゲーティング機構として図 5 に示す。このモデル

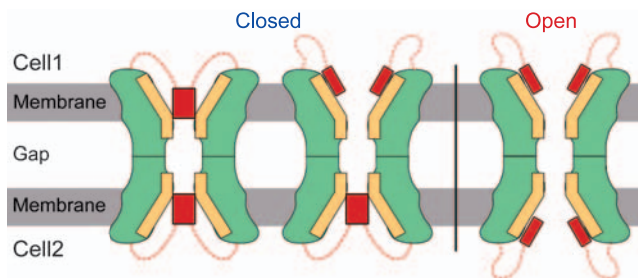


図5 プラグゲーティング機構のモデル (文献 13, 22 を元に改変)

このモデルでは向かい合うヘミチャンネル (緑色) が独立して開閉を制御する。ギャップ結合チャンネルは二つのヘミチャンネルが同時に N 末端で構成されるプラグ (赤色) を開いて初めて透過活性を示す。チャンネル孔を取り囲む膜貫通ヘリックスは黄色で、プラグにつながるループは赤色破線で示されている。

において重要な点は向かい合う二つのヘミチャンネルがチャンネル孔に入ったN末端の編成を変化させることでそれぞれ独自に開閉を制御でき、両方のヘミチャンネルが開いた状態になって初めてギャップ結合の透過が実現することである。ギャップ結合はイオンや代謝産物などのほか、分子量が1000Daを越えるペプチドまで通すことが知られている²⁴⁾。物理的なブロックでチャンネル孔を開閉するというモデルはその開閉サイクルにおいて孔の径をサブユニットローテーション機構のように変化させる必要がなく、これら幅広い範囲にわたる大きさの分子の透過を瞬時かつ厳密に制御することを可能にすると思われる。

6. ギャップ結合チャンネルに存在するゲーティング機構とプラグ

本研究で示されたプラグゲーティング機構はこれまでに知られているサブユニットローテーション機構とはその動きが全く異なる。複数のゲーティング機構がギャップ結合チャンネルに存在することを示唆する機能解析の研究を考慮すれば、プラグによる開閉とサブユニットの回転がどちらもギャップ結合チャンネルのゲーティング機構として存在する可能性は十分にある。ヘミチャンネルが単独で開閉を行う能力を持つというその独立性については、先述したVj-ゲーティングの開閉特性だけでなく、ヘミチャンネル自体が透過活性を示すCx46, Cx56, Cx32*Cx43E1 (Cx32の第一細胞外ループをCx43の第一細胞外ループの配列で置換したキメラ)などの研究でも示されている^{25~27)}。またヘミチャンネルに含まれる6個のサブユニットのうち一つだけでもチャンネルを閉じるのに十分であるというindividual subunit model¹⁶⁾など、向かい合うヘミチャンネル同士のみならずヘミチャンネルを構成するサブユニットも独立に動きうることを示唆されており、プラグゲーティング機構はそれらの見解に沿った構造変化が可能である。プラグによる開閉がギャップ結合チャンネルに存在するゲーティング機構の中でどれに相当するのかを断定することはできないが、N末端のプラグへの寄与を考えればVj-ゲーティングを説明するものである可能性が高い。これについての詳しい解説はCx26の原子モデルの論文²²⁾に記述されているので参照されたい。プラグの密度はこれまでいずれのギャップ結合チャンネルの三次元構造研究においても確認されていない^{3~6,28)}。したがってプラグがコネクシンファミリーの中で共有される機構かどうかは今後の研究が待たれる。pH-ゲーティングに関してはコネクシンのC末端と細胞質ループの関与が示唆されているが¹¹⁾、この二つの細胞質ドメインは本稿で述べた電子顕微鏡によるCx26の三次元構造¹³⁾、及びX線で解かれたCx26の原子モデル²²⁾いずれにおいても不完全であることから、その具体的な機構については不明である。Ca²⁺の存在下と非存在下での構造研究から導かれたサブユニットローテーション機構⁴⁾はCa²⁺-ゲーティングに相当する可能性がある。Ca²⁺が引き起こす構造変化はAFMを用いた研究でも示されているが、それはサブユニットの回転とは

異なる動きを示唆するものであった²⁹⁾。したがってサブユニットの回転が一般性のあるモデルかどうかについても更なる今後の研究が必要であろう。

7. おわりに

ギャップ結合チャンネルのゲーティング機構に関する研究は長い間サブユニットローテーション機構という唯一の構造モデルと電気生理学的手法によるヘミチャンネルやサブユニットの独立な構造変化を示唆する結果という相容れない状態が続いていた。本稿で紹介したCx26の三次元構造に見られたプラグの存在はギャップ結合チャンネルがサブユニットの回転とは異なったゲーティング機構を有している可能性を示すものであり、最近解かれたCx26のX線結晶構造と合わせて考えるとギャップ結合チャンネルの持つVj-ゲーティングに関してその理解を大きく進めるものであると思われる。今後異なる分子のパッキングから成るギャップ結合チャンネルの結晶から三次元構造や原子モデルが得られていけばVm-ゲーティングや化学ゲーティングの分子機構の解明にもつながるであろう。

謝 辞

本稿で紹介したCx26ギャップ結合チャンネルの電子線結晶構造解析は京都大学の谷一寿助教、廣明洋子博士、藤吉好則教授、カリフォルニア大学サンディエゴのProf. Gina E. Sosinskyの方々との共同研究により行われたものです。ここに感謝の意を表します。

文 献

- 1) Harris, A.L.: *Q. Rev. Biophys.*, **34**, 325-472 (2001)
- 2) Kelsell, D.P., Di, W.L. and Houseman, M.J.: *Am. J. Hum. Genet.*, **68**, 559-568 (2001)
- 3) Unwin, P.N.T. and Zampighi, G.: *Nature*, **283**, 545-549 (1980)
- 4) Unwin, P.N.T. and Ennis, P.D.: *Nature*, **307**, 609-613 (1984)
- 5) Unger, V.M., Kumar, N.M., Gilula, N.B. and Yeager, M.: *Science*, **283**, 1176-1180 (1999)
- 6) Fleishman, S.J., Unger, V.M., Yeager, M. and Ben-Tal, N.: *Mol. Cell*, **15**, 879-888 (2004)
- 7) Bukauskas, F.F. and Verselis, V.K.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **1662**, 42-60 (2004)
- 8) Revilla, A., Bennett, M.V.L. and Barrio, L.C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 14760-14765 (2000)
- 9) Verselis, V.K., Ginter, C.S. and Bargiello, T.A.: *Nature*, **368**, 348-351 (1994)
- 10) Harris, A.L., Spray, D.C. and Bennett, M.V.: *J. Gen. Physiol.*, **77**, 95-117 (1981)
- 11) Delmar, M., Coombs, W., Sorgen, P., Duffy, H.S. and Taffet, S.M.: *Cardiovasc. Res.*, **62**, 268-275 (2004)
- 12) Peracchia, C.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **1662**, 61-80 (2004)
- 13) Oshima, A., Tani, K., Hiroaki, Y., Fujiyoshi, Y. and Sosinsky, G.E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 10034-10039 (2007)
- 14) Oshima, A., Doi, T., Mitsuoaka, K., Maeda, S. and Fujiyoshi, Y.: *J. Biol. Chem.*, **278**, 1807-1816 (2003)

- 15) Beahm, D.L., Oshima, A., Gaietta, G.M., Hand, G.M., Smock, A.E., Zucker, S.N., Toloue, M.M., Chandrasekhar, A., Nicholson, B.J. and Sosinsky, G.E.: *J. Biol. Chem.*, **281**, 7994–8009 (2006)
- 16) Oh, S., Abrams, C.K., Verselis, V.K. and Bargiello, T.A.: *J. Gen. Physiol.*, **116**, 13–31 (2000)
- 17) Purnick, P.E., Oh, S., Abrams, C.K., Verselis, V.K. and Bargiello, T.A.: *Biophys. J.*, **79**, 2403–2415 (2000)
- 18) Oh, S., Rivkin, S., Tang, Q., Verselis, V.K. and Bargiello, T.A.: *Biophys. J.*, **87**, 912–928 (2004)
- 19) Oh, S., Rubin, J.B., Bennett, M.V.L., Verselis, V.K. and Bargiello, T.A.: *J. Gen. Physiol.*, **114**, 339–364 (1999)
- 20) Purnick, P.E., Benjamin, D.C., Verselis, V.K., Bargiello, T.A. and Dowd, T.L.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **381**, 181–190 (2000)
- 21) Oshima, A., Tani, K., Hiroaki, Y., Fujiyoshi, Y. and Sosinsky, G.E.: *Cell Commun. Adhes.*, **15**, 85–93 (2008)
- 22) Maeda, S., Nakagawa, S., Suga, M., Yamashita, E., Oshima, A., Fujiyoshi, Y. and Tsukihara, T.: *Nature*, **458**, 597–602 (2009)
- 23) Ebihara, L., Liu, X. and Pal, J.D.: *Biophys. J.*, **84**, 277–286 (2003)
- 24) Neijssen, J., Herberts, C., Drijfhout, J.W., Reits, E., Janssen, L. and Neefjes, J.: *Nature*, **434**, 83–88 (2005)
- 25) Paul, D.L., Ebihara, L., Takemoto, L.J., Swenson, K.I. and Goodenough, D.A.: *J. Cell Biol.*, **115**, 1077–1089 (1991)
- 26) Ebihara, L., Berthoud, V.M. and Beyer, E.C.: *Biophys. J.*, **68**, 1796–1803 (1995)
- 27) Pfahnl, A., Zhou, X.W., Werner, R. and Dahl, G.: *Pflügers Arch.*, **433**, 773–779 (1997)
- 28) Perkins, G.A., Goodenough, D.A. and Sosinsky, G.E.: *J. Mol. Biol.*, **277**, 171–177 (1998)
- 29) Müller, D.J., Hand, G.M., Engel, A. and Sosinsky, G.E.: *EMBO J.*, **21**, 3598–3607 (2002)