

TRPC チャネルのリン酸化による心血管機能制御

西田基宏,^{*,a} 斎木翔太,^a 北島直幸,^a 仲矢道雄,^a 佐藤陽治,^b 黒瀬 等^a

Regulation of Cardiovascular Functions by the Phosphorylation of TRPC Channels

Motohiro NISHIDA,^{*,a} Shota SAIKI,^a Naoyuki KITAJIMA,^a
Michio NAKAYA,^a Yoji SATO,^b and Hitoshi KUROSE^a^aDepartment of Pharmacology and Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan, and^bDivision of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health
Sciences, 1-18-1 Kami-yoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received June 15, 2010)

Calcium ions (Ca^{2+}) play an essential role in homeostasis and the activity of cardiovascular cells. Ca^{2+} influx across the plasma membrane induced by neurohumoral factors or mechanical stress elicits physiologically relevant timing and spatial patterns of Ca^{2+} signaling, which leads to the activation of various cardiovascular functions, such as muscle contraction, gene expression, and hypertrophic growth of myocytes. A canonical transient receptor potential protein subfamily member, TRPC6, which is activated by diacylglycerol and mechanical stretch, works as an upstream regulator of the Ca^{2+} signaling pathway required for pathological hypertrophy. We have recently found that the inhibition of cGMP-selective phosphodiesterase 5 (PDE5) suppresses agonist- and mechanical stretch-induced hypertrophy through inhibition of Ca^{2+} influx in rat cardiomyocytes. The inhibition of PDE5 suppressed the increase in frequency of Ca^{2+} spikes induced by receptor stimulation or mechanical stretch. Activation of protein kinase G by PDE5 inhibition phosphorylated TRPC6 proteins at Thr⁶⁹ and prevented TRPC6-mediated Ca^{2+} influx. Substitution of Ala for Thr⁶⁹ in TRPC6 abolished the antihypertrophic effects of PDE5 inhibition. These results suggest that phosphorylation and functional suppression of TRPC6 underlies the prevention of cardiac hypertrophy by PDE5 inhibition. As TRPC6 proteins are also expressed in vascular smooth muscle cells and reportedly participate in vascular remodeling, TRPC6 blockade may be an effective therapeutic strategy for preventing pathologic cardiovascular remodeling.

Key words—transient receptor potential; calcium signaling; hypertrophy; remodeling; phosphodiesterase

1. はじめに

心血管系における長期的な構造的改変（リモデリング）は、心不全や動脈硬化を引き起こす原因として注目されている。心血管リモデリングは、心筋細胞や血管平滑筋細胞の肥大、線維芽細胞の過形成や筋分化などによって引き起こされる。この過程には、細胞外からの持続した Ca^{2+} 流入によって誘発される Ca^{2+} シグナリングの活性化が深く関わっている。心血管系における Ca^{2+} 流入の主な役割は興奮収縮連関（excitation-contraction coupling, E-C

カップリング）への寄与であり、周期的な心筋細胞の興奮（活動電位）に伴う電位依存性 Ca^{2+} チャネルを介した Ca^{2+} 流入が筋小胞体に貯蔵された Ca^{2+} の放出を惹起し、トロポニン C の抑制解除を介してアクチン-ミオシンの相互作用による律動的な収縮を発生する（Fig. 1）。一方、心血管リモデリングに係わる Ca^{2+} シグナリングは活動電位に依存せず、細胞外の生理活性物質や機械的圧負荷によって誘発される Ca^{2+} 流入を介して活性化される。この電位以外の物理化学的な刺激で活性化される Ca^{2+} 透過型カチオンチャネルの分子実体として注目されているのが Transient Receptor Potential (TRP) である。われわれは最近、アンジオテンシン II (Ang II) やエンドセリン-1 (ET-1) などのアゴニスト刺激により誘発される活動電位の発火頻度の増加に、ジアシルグリセロール (diacylglycerol;

^a九州大学大学院薬学研究院薬効安全性学分野（〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1）、^b国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部（〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1）

*e-mail: nishida@phar.kyushu-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 130 年会シンポジウム S52 で発表したものを中心に記述したものである。

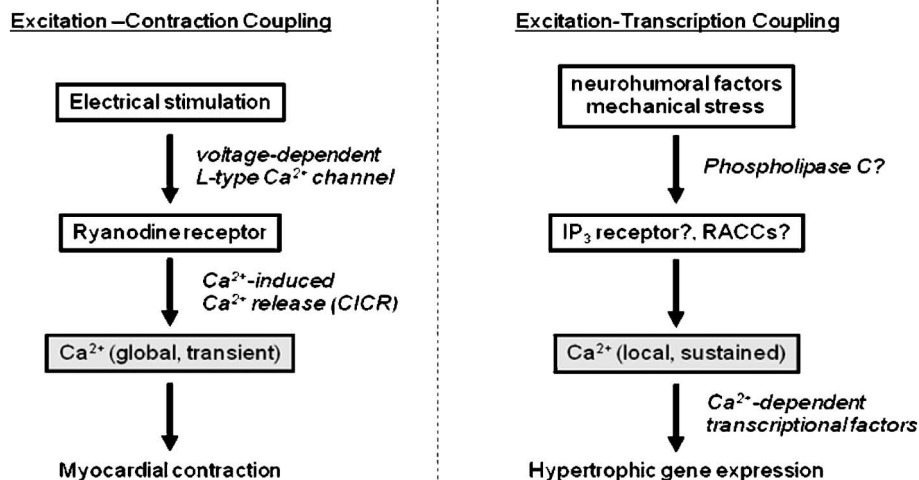


Fig. 1. Diagram of Excitation-contraction Coupling and Excitation-transcription Coupling in the Heart

DAG)で直接活性化される TRP チャンネル (TRPC3 と TRPC6) が係わっていることを見出した。¹⁾ また, TRPC3/TRPC6 チャンネルを選択的に阻害する化合物が個体レベルの心肥大を抑制することが明らかとなり, 心不全治療薬の新たな標的分子としての可能性がみえてきた。²⁾ さらにごく最近, ホスホジエステラーゼ 5 (PDE5) 阻害剤がプロテインキナーゼ G (PKG) 依存的に TRPC6 タンパクをリン酸化し TRPC6 チャンネル活性を減弱させることで, アゴニスト刺激やメカニカルストレスで誘発される心肥大応答を抑制することを明らかにした。³⁾ PDE5 阻害剤は性機能改善薬としてだけでなく, 肺動脈性高血圧や慢性心不全に対しても有効であることから, PDE5 阻害剤の標的分子として見出された DAG 活性化 TRPC チャンネルは様々な心血管疾患の新たな治療標的となることが期待される。

2. 興奮転写連関と心肥大

細胞外の神経伝達物質や液性因子などの化学的刺激あるいはメカニカルストレスや張り応力などの物理的刺激は, 持続的な Ca^{2+} 流入を誘発し, カルモデュリン (CaM) を介して nuclear factor of activated T cells (NFAT) や CaM-binding transcription factor (CAMTA), cAMP-responsive element binding protein (CREB) などの転写因子を活性化し, 心肥大関連遺伝子の発現を誘導する。⁴⁾ これを興奮転写連関 (excitation-transcription coupling, E-T カップリング) という。興奮転写連関を担う Ca^{2+} 流入は, 細胞質の CaM キナーゼや CaM 依存性ホスフ

ターゼ (カルシニューリン) によって感知されることで初めて転写が誘導される。しかし, E-C カップリングに必要なリズムカルな細胞内 Ca^{2+} 濃度変化が起こっている中で, CaM キナーゼやカルシニューリンが一体どうやって E-T カップリングに必要な Ca^{2+} 流入を感知するのかについてはよくわかっていない。最近, 活動電位に伴って生じる Ca^{2+} スパイクの頻度の増加そのものが心肥大関連遺伝子の発現誘導に必要であることが明らかにされ, 電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介する Ca^{2+} 流入の量的・時間的变化が興奮転写連関の誘導に関与する可能性が示された。⁵⁾ われわれはカルシニューリンの下流にある転写因子 NFAT の活性を指標に心肥大誘導を担う Ca^{2+} シグナリングの活性化機構の解析を行い, 受容体刺激による Ca^{2+} 流入を仲介する新たな因子として TRPC チャンネルを同定した (Fig. 2)。

3. TRPC チャンネルと心肥大

哺乳類 TRPC チャンネルには 7 つのアイソフォーム (TRPC1-TRPC7) が存在する。このうち, TRPC2, TRPC3, TRPC6, TRPC7 の 4 つが DAG により直接活性化されると報告されており, 心筋細胞には TRPC3, TRPC6, TRPC7 の 3 つが発現している。⁶⁾ われわれは, Ang II 刺激で誘発される Ca^{2+} シグナリングの活性化及び心筋細胞の肥大応答に, TRPC3 チャンネルと TRPC6 チャンネルが関与することを見出した。TRPC3 と TRPC6 は, 肥大心及び不全心において発現が増加しており, TRPC3 あるいは TRPC6 を心筋細胞に過剰発現させたマウス

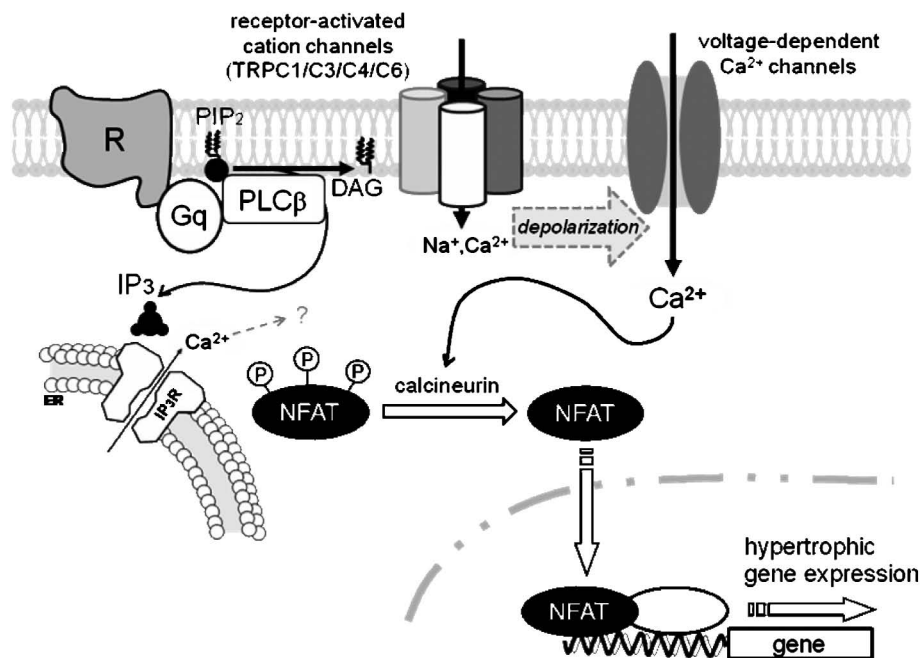


Fig. 2. Role of DAG-activated TRPC Channels in the Development of Cardiac Hypertrophy

では圧負荷に対する肥大感受性が增大する。^{7,8)} 一方、TRPC3 又は TRPC6 の恒常的不活性型変異体を心筋細胞に発現させたトランスジェニックマウスでは、圧負荷による心肥大が顕著に抑制されることも報告されている。⁹⁾ これに加えて、DAG 非感受性の TRPC1 チャンネルを欠損させたマウスや TRPC1 の恒常的不活性型変異体を心筋特異的に発現させたマウスでも圧負荷による心肥大が抑制されることが明らかにされている。^{9,10)} さらに、心筋の TRPC3 と TRPC4 が複合体を形成すること、及び TRPC4 の恒常的不活性型変異体を心筋特異的に発現させたマウスで圧負荷による心肥大が抑制されることがつい最近報告された。⁹⁾ イオンチャンネルは基本的に四量体を形成すると信じられており、これらの知見を考慮すると、心筋の DAG 活性化チャンネルは TRPC1/C3/C4/C6 のヘテロ四量体で構成されている可能性が考えられる。

4. リン酸化による TRPC チャンネル活性の制御

TRPC チャンネル活性は、リン酸化されることで増大又は抑制される。例えば Src チロシンキナーゼの Fyn が SH2 ドメインを介して TRPC6 タンパクの N 端領域と物理的に相互作用すること、及び Fyn による TRPC6 の Tyr リン酸化が TRPC6 のチャンネル活性を増大させることが報告されている。¹¹⁾ また、Src による TRPC3 チャンネルの Tyr リン酸化

が DAG 刺激による TRPC3 チャンネル活性化に必須であることも報告されている。¹²⁾ これに対し、PKC や PKG による TRPC チャンネルの Ser/Thr 残基のリン酸化は TRPC チャンネル活性を低下させる。¹³⁾ PKC は TRPC6 の細胞質 C 端領域にある 768 番目の Ser (Ser⁷⁶⁸) 残基をリン酸化し、PKG は TRPC3 の Thr¹¹ 残基及び Ser²⁶³ 残基又は TRPC6 の Thr⁶⁹ 残基をリン酸化することでチャンネル活性を抑制する (Fig. 3)。特に TRPC6 の Thr⁶⁹ 残基 (ヒト TRPC6 では Thr⁷⁰ 残基) や TRPC3 の Thr¹¹ 残基はリン脂質との親和性が高い pleckstrin homology (PH) 様ドメインに位置しており、C 端側の PH 様ドメインとリン脂質の結合はチャンネル活性の増強に係わることが報告されている。¹⁴⁾ TRPC のリン酸化が TRPC タンパクの膜局在を変化させないことから、Ser/Thr 残基のリン酸化は TRPC チャンネルの四量体構造を不安定化させている可能性が考えられる。

5. PDE5 阻害による TRPC6 チャンネルのリン酸化

シルデナフィル (商品名: バイアグラ) は、PDE5 阻害により PKG 依存的に末梢血管拡張を引き起こすことで性機能改善作用を発揮する。シルデナフィルは、米国では肺動脈性高血圧症にも適応されており、最近では心肥大や心不全にも効くという知見が出てきている。^{15,16)} PDE5 阻害剤は PKG 依

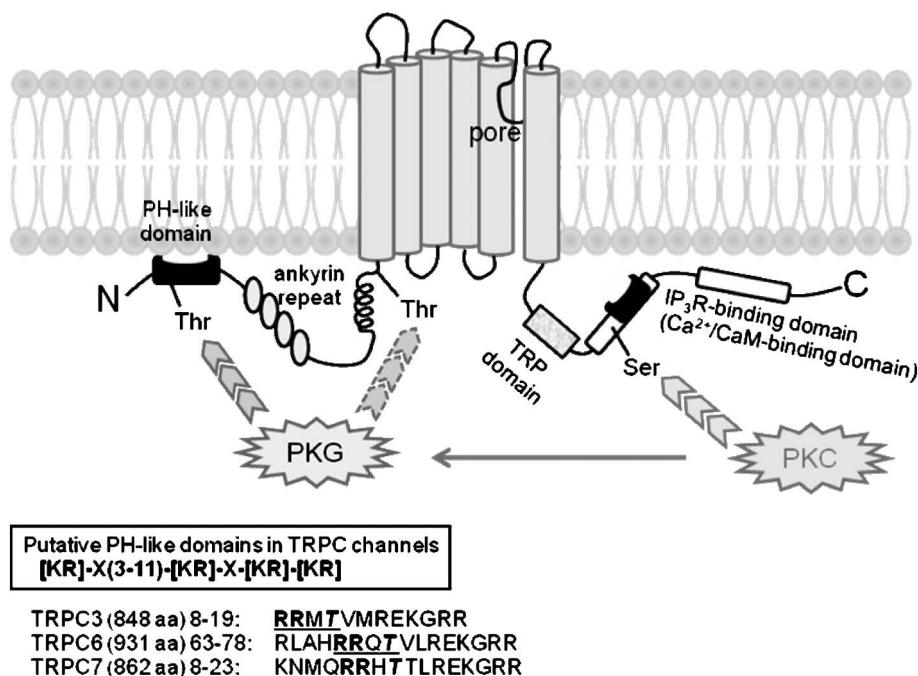


Fig. 3. Conserved Pleckstrin Homology (PH)-like Domains Including PKG Phosphorylation Sites in Human DAG-activated TRPC Channels

存的に様々なシグナル分子をリン酸化することで心血管保護作用を示すと考えられており、PDE5 阻害による心肥大抑制は Regulator of G protein Signaling (RGS) のリン酸化を介した三量体 G_q タンパク質シグナリングの抑制によるものだと考えられていた。¹⁷⁾ しかし、われわれは G_q タンパク質の下流で生成される DAG の誘導体で刺激した際に生じる Ca^{2+} シグナル応答もまた PDE5 阻害剤によって抑制されることに気がついた。この結果は、PDE5 阻害剤が DAG の下流のシグナル分子を抑制している可能性を示している。そこでわれわれは TRPC6 チャンネルに注目し、Thr⁶⁹ 残基がリン酸化されている TRPC6 タンパク (pTRPC6) を特異的に認識する抗体を作製した。HEK293 細胞に TRPC3, TRPC6, TRPC7 をそれぞれ過剰発現させ、膜透過型 cGMP アナログ (8-Br-cGMP) 刺激を行い、ウェスタンブロットを行った。TRPC チャンネルは糖鎖修飾を受けることが知られている。TRPC6 には細胞外ループに糖鎖修飾部位が 2 ヲ所存在するため、糖鎖修飾の有無により 100–120 kDa に 3 種類のバンドが検出される。TRPC6 を過剰発現させ、8-Br-cGMP で刺激したもののみ、スミアーバンドが検出された (Fig. 4)。一方、TRPC3 及び TRPC7 を過剰発現させた細胞では、pTRPC6 抗体で 8-Br-

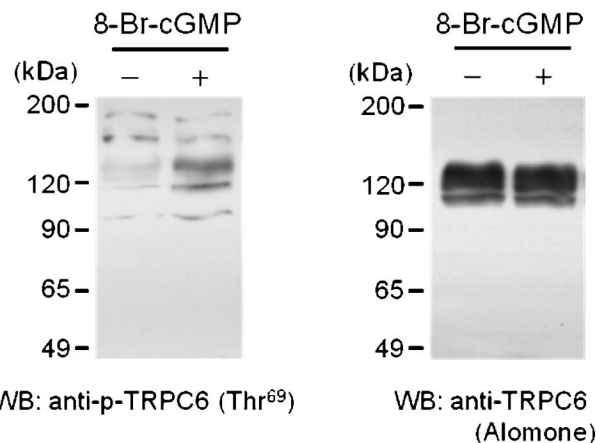


Fig. 4. Specific Recognition of TRPC6 Phosphorylation at Thr⁶⁹ by a Phospho-specific Antibody

Phosphorylation of TRPC6 at Thr⁶⁹ induced by PKG activation in vector-, TRPC3-, TRPC6- and TRPC7-expressing HEK293 cells. HEK293 cells were treated with 8-Br-cGMP (100 μ M) for 2 h. WB; western blotting.

cGMP 刺激によるリン酸化のバンドは検出されなかった。このリン酸化特異的なバンドは pTRPC6 抗原ペプチドをリン酸化抗体と一緒に反応させることで完全に消失し、非リン酸化 TRPC6 ペプチドと一緒に反応させてもバンドは消失しなかったことから、作製した pTRPC6 抗体が、TRPC6 の Thr⁶⁹ のリン酸化を特異的に認識していることが確認された。

次に、PDE5 阻害が心筋細胞に発現している

TRPC6 をリン酸化するかどうかを検討した。ラット新生児心筋細胞に心肥大応答を完全に抑制する濃度の PDE5 阻害剤を 1 時間処置すると、微弱ではあるが 8-Br-cGMP 刺激と同様に TRPC6 (Thr⁶⁹) のリン酸化バンドが観察された。PDE5 阻害剤処置による TRPC6 のリン酸化もまた KT5823 の処置によって完全に抑制された。Kass らのグループは以前、シルデナフィル (100 mg/kg/d) をマウスに 1 週間経口投与することで、圧負荷による心肥大が抑制されることを報告している。¹⁸⁾ 彼らと全く同じ条件で、マウスにシルデナフィル (100 mg/kg/d) を 1 週間投与したところ、心臓での TRPC6 (Thr⁶⁹) のリン酸化レベルが有意に増加していることがわかった。この結果より、*in vitro* で心肥大抑制効果を示す濃度の PDE5 阻害剤が TRPC6 チャンネルをリン酸化し得るように、*in vivo* においても心肥大抑制効果を示す用量の PDE5 阻害剤が、確かに TRPC6 (Thr⁶⁹) をリン酸化していることが明らかとなった。

6. PDE5 阻害による心肥大抑制作用における TRPC6 の Thr⁶⁹ 残基の関与

ラット新生児心筋細胞に野生型 TRPC6 (TRPC6) 又は TRPC6 の Thr⁶⁹ 残基をアラニンに置換した変異体 (TRPC6-T69A) を発現させ、エンドセリン (ET-1) 刺激を行い、心肥大応答 (細胞面積の増加とアクチン再構築) を測定した。TRPC6-WT 又は TRPC6-T69A を発現させておくと、発現させない場合と比較してより強い肥大応答が観察された。TRPC6-WT 発現による肥大増強効果は PDE5 阻害剤処置により完全に抑制されたものの、TRPC6-T69A 発現による肥大増強効果は PDE5 阻害により抑制されなかった (Fig. 5)。これらの結果より、PDE5-I 処置による肥大応答抑制には、TRPC6 の Thr⁶⁹ のリン酸化が必要であることが示された。

7. メカニカルストレス刺激による Ca²⁺ 応答に対する PDE5 阻害剤の効果

心臓は圧負荷によって肥大する。機械的伸展刺激は、*in vitro* の圧負荷のモデルとして一般的に用いられている。TRPC6 は受容体刺激以外にも、メカニカルストレスによって活性化することが報告されている。そこで、PDE5 阻害剤が機械的伸展刺激によって誘発される肥大応答を抑制するかどうかを検討するため、Fig. 6(A) に示すような伸展装置を顕微鏡上に設置した。ラット新生児心筋細胞に一過的

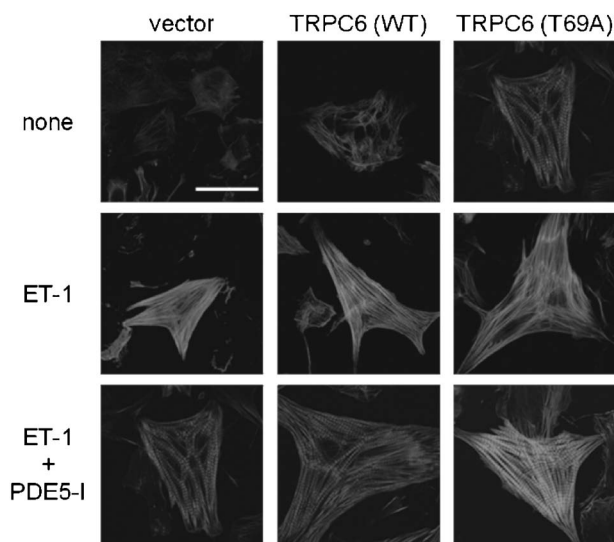


Fig. 5. Phosphorylation of Thr⁶⁹ Is Essential for the Anti-hypertrophic Effects of PDE5 Inhibition

Effects of PDE5-I on the ET-1-induced actin reorganization in vector, TRPC6 (WT), TRPC6 (T69A)-overexpressing cardiomyocytes. Cardiomyocytes were treated with PDE5-I (10 μ M) for 20 min before the addition of ET-1 (100 nM). Scale bar=50 μ m.

な機械的伸展刺激を加え、刺激後の細胞内 Ca²⁺ 濃度の変化を測定したところ、Ca²⁺ オシレーションが観察された (Fig. 6)。この Ca²⁺ オシレーションは PDE5 阻害剤を処置することで完全に抑制された。PDE5 阻害剤による Ca²⁺ オシレーションの抑制は、KT5823 (1 μ M) を処置することで解除された。機械的伸展刺激で生じる Ca²⁺ オシレーションは、TRPC チャンネル選択的阻害剤 (BTP2) や TRPC6 の恒常的不活性型変異体を発現させることによっても抑制されたことから、機械的伸展刺激により TRPC6 チャンネルを介したカチオン流入が誘発されることで、膜電位変化 (脱分極) が生じている可能性が示された。さらに、心筋細胞に持続的な機械的伸展刺激を行ったところ、NFAT の転写活性、心肥大マーカー [脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP)] の発現、タンパク合成は顕著に増大した。これらの増大は、PDE5 阻害剤により有意に抑制された。以上の結果から、PDE5 阻害剤は、機械的伸展刺激によって生じる心筋細胞内への Ca²⁺ 流入を抑制することで、肥大応答を抑制することが示唆された。

8. おわりに

初代培養ラット心筋細胞を用いた解析で、われわれは、PDE5 阻害剤による心肥大抑制効果のメカニ

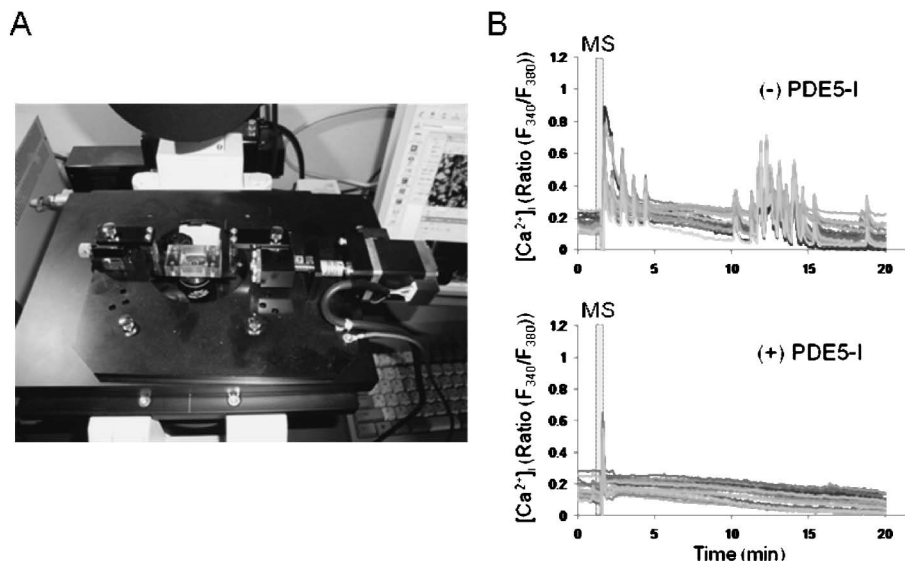


Fig. 6. Inhibition of PDE5 Suppresses Ca^{2+} Responses Induced by Mechanical Stretch

(A) Images of mechanical stretch machine (Strex Co. Ltd.). Twenty % of mechanical stretch at the speed of 90 mm/sec was performed for 3 sec. (B) Traces of Ca^{2+} responses induced by mechanical stretch (MS) in the absence or presence of PDE5-I ($10 \mu\text{M}$). More than 20 cardiomyocytes were monitored in each experiment.

ズムに TRPC6 の Thr⁶⁹ 残基のリン酸化が必要であることを見出した。われわれのグループはつい最近、PDE5 阻害剤のみならず心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) もまた TRPC6 チャンルの Thr⁶⁹ 残基のリン酸化を介して心肥大を抑制し得ることを報告した。¹⁹⁾ この知見より、NO 供与剤や ANP 製剤、PDE5 阻害剤など細胞内 cGMP 濃度を上昇させるすべての薬剤が、Thr⁶⁹ 残基のリン酸化による TRPC チャンル活性の抑制という共通のメカニズムを介して心肥大を抑制する可能性が示された。また、PKG でリン酸化される部位はプロテインキナーゼ A によってもリン酸化されることから、細胞内 cAMP 濃度を上昇させる薬もまた心肥大抑制作用を示す可能性が期待できる。さらに、TRPC6 は血管平滑筋細胞にも多く発現しており、心筋での役割と同様に細胞肥大に関与する可能性が考えられる。今後、DAG 活性化 TRPC チャンルを直接あるいは間接的に抑制する化合物を同定することで、新しいタイプの心血管疾患治療薬のシードが見つかるかもしれない。

現在、イオンチャンネルの一塩基多型 (SNP) 解析が精力的に進められている。ポジショナルクローニング解析から、腎糸球体硬化症の家系で TRPC6 チャンルの活性化型変異体が同定されている。例えば、P112Q 変異体では TRPC6 チャンルを介する

Ca^{2+} 流入が増大し、R895C, E897K 変異体では TRPC6 電流量が増大することが明らかにされている。^{20,21)} 遺伝病の SNP 中に TRPC6 の Thr⁷⁰ 残基の変異体はみつかっていない。しかし、Thr⁷⁰ 残基の変異は硝酸薬や PDE5 阻害薬の薬剤耐性にも関与する可能性があるため、今後は SNP 解析を含めて DAG 活性化 TRPC チャンルの生理機能をより詳細に解析していく必要があるだろう。

本研究は九州大学の動物実験委員会及び遺伝子組換え委員会にて承認されており、九州大学及び文部科学省の定める動物実験ガイドラインに従って実施されたものである。

REFERENCES

- 1) Onohara N., Nishida M., Inoue R., Kobayashi H., Sumimoto H., Sato Y., Mori Y., Nagao T., Kurose H., *EMBO J.*, **25**, 5305–5316 (2006).
- 2) Kiyonaka S., Kato K., Nishida M., Mio K., Numaga T., Sawaguchi Y., Yoshida T., Wakamori M., Mori E., Numata T., Ishii M., Takemoto H., Ojida A., Watanabe K., Uemura A., Kurose H., Morii T., Kobayashi T., Sato Y., Sato C., Hamachi I., Mori Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 5400–5405 (2009).
- 3) Nishida M., Watanabe K., Sato Y., Nakaya

- M., Kitajima K., Ide T., Inoue R., Kurose H., *J. Biol. Chem.*, **285**, 13244–13253 (2010).
- 4) Santana L. F., *Circ. Res.*, **103**, 681–683 (2008).
 - 5) Colella M., Grisan F., Robert V., Turner J. D., Thomas A. P., Pozzan T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 2859–2864 (2008).
 - 6) Lucas P., Ukhanov K., Leinders-Zufall T., Zufall F., *Neuron*, **40**, 551–561 (2003).
 - 7) Nakayama H., Wilkin B. J., Bodi I., Molken- tin J. D., *FASEB J.*, **20**, 1660–1670 (2006).
 - 8) Kuwahara K., Wang Y., McAnally J., Richardson J. A., Bassel-Duby R., Hill J. A., Olson E.N., *J. Clin. Invest.*, **116**, 3114–3126 (2006).
 - 9) Wu X., Eder P., Chang B., Molken- tin J. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 7000–7005 (2010).
 - 10) Seth M., Zhang Z.-S., Mao L., Graham V., Burch J., Stiber J., Tsiokas L., Winn M., Abramowitz J., Rockman H. A., Birnbaumer L., Rosenberg P., *Circ. Res.*, **105**, 1023–1030 (2009).
 - 11) Hisatsune C., Kuroda Y., Nakamura K., Inoue T., Nakamura T., Michikawa T., Mizutani A., Mikoshiba K., *J. Biol. Chem.*, **279**, 18887–18894 (2004).
 - 12) Vazquez G., Wedel B. J., Kawasaki B. T., Bird G. S., Putney J. W. Jr., *J. Biol. Chem.*, **279**, 40521–40528 (2004).
 - 13) Yao X., *Handb. Exp. Pharmacol.*, **179**, 527–540 (2007).
 - 14) Nilius B., Owsianik G., Voets T., *EMBO J.*, **27**, 2809–2816 (2008).
 - 15) Galiè N., Rubin L. J., Simonneau G., *N. Engl. J. Med.*, **362**, 559–60 (2010).
 - 16) Lewis G. D., Lachmann J., Camuso J., Lepore J. J., Shin J., Martinovic M. E., Systrom D. M., Bloch K. D., Semigran M. J., *Circulation*, **115**, 59–66 (2007).
 - 17) Takimoto E., Koitabashi N., Hsu S., Ketner E. A., Zhang M., Nagayama T., Bedja D., Gabrielson K. L., Blanton R., Siderovski D. P., Mendelsohn M. E., Kass D. A., *J. Clin. Invest.*, **119**, 408–420 (2009).
 - 18) Takimoto E., Champion H. C., Li M., Belardi D., Ren S., Rodriguez E. R., Bejia D., Gabrielson K. L., Wang Y., Kass D. A., *Nat. Med.*, **11**, 214–222 (2005).
 - 19) Kinoshita H., Kuwahara K., Nishida M., Jiang Z., Rong X., Kiyonaka S., Kuwabara Y., Kurose H., Inoue R., Mori Y., Li Y., Nakagawa Y., Usami S., Fujiwara M., Yamada Y., Minami T., Ueshima K., Nakao K., *Circ. Res.*, **106**, 1849–1860 (2010).
 - 20) Winn M. P., Conlon P. J., Lynn K. L., Far- rington M. K., Creazzo T., Hawkins A. F., Daskalakis N., Kwan S. Y., Ebersviller S., Burchette J. L., Pericak-Vance M. A., Howell D. N., Vance J. M., Rosenberg P. B., *Science*, **308**, 1801–1804 (2005).
 - 21) Reiser J., Polu K. R., Möller C. C., Kenlan P., Altintas M. M., Wei C., Faul C., Herbert S., Villegas I., Avila-Casado C., McGee M., Sugimoto H., Brown D., Kalluri R., Mundel P., Smith P. L., Clapham D. E., Pollak M. R., *Nat. Genet.*, **37**, 739–744 (2005).