

抗ラット肝 Gap Junction 抗体を用いた免疫組織化学的研究

園 田 智 子

札幌医科大学口腔外科学講座 (主任 小浜源郎 教授)

小 川 勝 洋

札幌医科大学病理学第2講座 (主任 森 道夫 教授)

Immunohistochemical Study on the Gap Junctional Protein in Tissues

Tomoko SONODA

Department of Oral Surgery, Sapporo Medical College

(Chief : Prof. G. Kohama)

Katsuhiko OGAWA

Department of pathology (Section 2), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. M. Mori)

Cells communicate with each other by gap junctions which are composed of channels that directly connect the interior of interacting cells. Such junctions are widely distributed in tissues of all animals and couple the cells both electrically and metabolically by allowing small molecules to pass from the cytoplasm of one cell into the cytoplasm of another. The presence of gap junctions can be demonstrated morphologically by electron microscopy and functionally by dye transfer, metabolic coupling and electric coupling methods. However, the observation of gap junctions in tissues has been limited to electron microscopy, because the above functional methods are applicable only to the cultured cells. In this study, we developed an immunohistochemical method for visualization of gap junctions in tissues. Gap junctions were successfully isolated from rat liver plasma membranes by a combination of NaOH treatment, sonication and sucrose gradient centrifugation. The isolated gap junctions were morphologically intact, and they were comprised of a 26,000 protein on SDS-PAGE.

Antibodies to gap junctional protein were raised in mice, and immunostaining was performed using the antibodies on various tissues including normal, preneoplastic and neoplastic tissues of rodents and humans. The antibodies reacted to the livers of all the species examined, and to rat kidney, stomach, pancreas and salivary glands. It was found that there was a significant difference in the number and size of gap junctions among the tissues. It was noteworthy that the number of gap junctions were markedly decreased in chemically-induced hyperplastic nodules and hepatocellular carcinomas in rats, indicating that cellular communication is reduced during carcinogenesis. The results of this study demonstrated that this immunohistochemical method is useful in quantitating gap junctions in tissues of various kinds of animals including humans.

(Received November 17, 1987 and accepted January 25, 1988)

Key word: Gap junction, Sucrose gradient centrifugation, Antibodies to gap junctional protein, Immunostaining

1 緒 言

Gap Junction (以下, GJ) は動物組織に広く分布する細胞間結合装置で, 低分子の細胞間連絡装置としての役割を果たしている。GJ は connexon と呼ばれる単位粒子が, 隣接する細胞膜の脂質二重層に対をなして規則正しく配列する形態をとっており, 各 GJ には数百から数千の connexon が存在する。さらに, ひとつの connexon は 6 個の connexin と呼ばれる蛋白からなり, 中心部に直径約 1.5 nm の channel を形成して配列する。この channel が細胞間の通路となっており, 無機イオン, アミノ酸, ヌクレオチドなどの分子量 1,500 以下の低分子が自由に隣接細胞に移行できると考えられている。¹⁻³⁾

GJ は部分肝切除後の再生肝⁴⁻⁷⁾や, 発癌プロモーターの作用を受けた細胞では一時的に減少すること⁸⁻¹²⁾が知られている。また, 肝癌などの腫瘍では GJ が著明に低下しているとの報告もある¹³⁻¹⁵⁾。細胞は, 集合して一つの細胞社会を形成する場合, GJ によって, 集団としての増殖や, その他の種々の細胞反応を, 細胞間で調節していると考えられ, 生体内では様々な病的・生理的变化に伴って GJ の数の変動が起こることが予想される。従来から, GJ を観察する方法としては, 超薄切法やフリーズ・フラクチャー法などを用いた電顕的観察法と, metabolic coupling, electric coupling や microinjection による dye transfer などの機能的な方法が行われてきた。しかし, 機能的な方法は培養細胞にのみ有効で, 生体組織の GJ を検索する場合は電顕的方法に限られるため, GJ を定量化するには次のような問題点があった。1) 超薄切片で観察する場合には, 固定の条件などにより GJ の見え方が異なるため, 同定が難しい。2) フリーズ・フラクチャー法では, 凍結断面に現れる細胞膜の割合が比較的少なく, 一つの試料中の GJ の出現頻度が低いため, 定量化するには多数の試料を作製する必要がある。従って, 現在まで生体組織での GJ を定量的に検索した報告は少ない。^{8,13,14)}

近年, 齧歯類の肝¹⁶⁻²³⁾, 心^{24,25)}, レンズ²⁶⁾, 子宮²⁷⁾などの臓器・組織から GJ を分離する方法が確立され, 肝^{27,28)}やレンズ¹⁾では GJ 構成蛋白のアミノ酸配列が明らかにされている。我々は, 生体組織中での GJ を調べるために, ラット肝より GJ を分離して抗 GJ 抗体を作成し, 免疫組織化学的方法を用いて, GJ の数を定量化する方法を開発したので報告する。

2 材料と方法

2.1 ラット肝細胞膜の分離

1 回の分離につき体重約 300 g のラット 15 匹の肝を用い, Hertzberg¹⁷⁾の方法を改良して細胞膜を分離した。Phosphate buffered saline (pH 7.2) を灌流して血液を洗い流した後, 肝を取り出し food mill にて細切した。これを, 4°C に冷却した 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride 添加 1 mM NaHCO₃ (pH 7.5) (以下緩衝液) 中で, クリアランスの大きな Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーを用いて破碎し, ガーゼで濾過した。これに緩衝液を加え 2 l とし, 上清に濁りがなくなるまで, 5,200 rpm (4,420 × g) ・ 10 分間遠心を繰り返した。沈殿物を 45% (w/w) ショ糖溶液に浮遊し, 45%/30% 不連続 ショ糖密度勾配遠心法にて 10,000 rpm (15,900 × g) ・ 12 時間遠心し, 粗膜分画を得た。さらに, 膜を精製するために 45% ショ糖溶液に浮遊して, 各チューブにつき, ショ糖溶液を 45% ・ 13 ml, 43% ・ 8 ml, 39% ・ 10 ml, 35% ・ 5 ml の順に重ね, 日立 RPS 27-2 型ローターを用いて, 22,000 rpm (90,000 × g) で 1 時間超遠心 (日立 65 P) した。39%/35% の界面の浮遊物を集め, 電顕的観察を行ったところ, ほぼ純粋な肝細胞膜が見られ, また, glucose-6-phosphatase 及び 5'-nucleotidase 活性を調べたところ, 前者の活性はほとんど見られなかったことから, これを精製膜分画として GJ の分離に用いた。

2.2 ラット肝細胞膜からの GJ の分離

GJ の分離は Herzberg¹⁷⁾の方法に従った。分離した 15 匹分のラット肝細胞膜浮遊液 5 ml に同量の 40 mM NaOH を加え, Sonifier Cell Disrupter Model W 185 (Heat System Ultrasonics) により, 10~15 秒間超音波処理を行った。これに 20 mM NaOH 25 ml を加え, RP-65 型ローターを使用して, 22,500 rpm (43,700 × g) で 10 分間超遠心した。沈殿物を緩衝液に浮遊して, 22,500 rpm (43,700 × g) で遠心を繰り返して沈殿物を洗った後, 38% (w/w) ショ糖溶液に浮遊して, 2本のチューブに分け, 45%/38%/30% のショ糖密度勾配にて RPS-40T 型ローターを使用して, 39,000 rpm (270,000 × g) ・ 1.5 時間超遠心した。38%/30% の界面の浮遊物を集め, 緩衝液に浮遊して 35,000 rpm (100,000 × g) ・ 10 分間遠心し, GJ 分画を得た。

2.3 電顕観察

分離した GJ の一部をグルタルアルデヒド及びオスミウム酸で重固定し, 脱水, プロピレンオキシド処理後, エポキシに包埋した。超薄切片は, 酢酸ウラニ-

ル・鉛二重染色を行ない観察した。さらに、GJの一部を1%酢酸ウラニールにてネガティブ染色し、50,000~100,000倍の高倍率で観察した。

2.4 蛋白の定量と Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE)

分離したGJの蛋白濃度は、BCA Protein Assay Reagent (Pierce Chemical)²⁸⁾ を使用し、分光光度計 (UV-260 島津製作所) で波長 562 nm の吸光度を測定して求めた。GJ 蛋白の分子量を解析するために、GJ を 0.1% SDS にて 12 時間室温で可溶化し、Laemmli²⁹⁾ の方法により、SDS-PAGE を行なった。ゲルの染色には銀染色 (Bio Rad) を用いた。

2.5 抗 GJ 抗体の作製

約 8 週齢の BALB/c マウス(雌)に、初回は約 20~30 μg の GJ を 0.1% SDS にて可溶化し、完全 Freund アジュバントと混合して腹腔内に投与した。その後 10 日間から 2 週間の間隔をおいて、同様に可溶化した GJ を、不完全 Freund アジュバントと混合し、数回追加免疫を行なった。抗体価の測定には ELISA 法を使用した。マイクロタイタープレートの各ウェルに可溶化した GJ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を 4°C 24 時間吸着させ、スキムミルクでブロッキングした後、段階的に希釈したマウス抗 GJ 血清を、室温で 1 時間反応させた。二次抗体には peroxidase 標識ウサギ免疫グロブリンを用い、peroxidase 基質には、2,2-azino-di-(3-ethyl-benziazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) を使用した。反応は Microplate Reader MR 600 (Dynatech) を用いて、波長 410 nm で測定した。最終免疫より 4 日後、血中抗体価が ELISA 法で 1,000 倍に上昇しているのを確認し、血清を採取した。

2.6 免疫組織化学

各種動物正常肝組織(ラット、マウス、ハムスター、ヒト)、ラット正常胃・腎・唾液腺・膵・心・レンズの各組織と肝発癌剤により誘発したラット肝癌及び過形成結節に対して、GJ の免疫染色を蛍光抗体間接法にて行なった。肝癌は 0.06% の diethylnitrosamine を含む飼料を 6 カ月間投与することによって、また、過形成結節は Solt and Farber 法³⁰⁾ によって誘発したものを用いた。いずれも厚さ 4 μm の凍結切片を用いて、4°C で 10 分間アセトン固定し、一次抗体にはマウス抗 GJ 血清を用い、二次抗体は FITC 標識ウサギ免疫グロブリンを使用した。

2.7 定量的形態計測

免疫染色したラット正常肝組織・過形成結節・肝癌及びラット正常胃・腎・唾液腺・膵の各組織の切片か

ら適当な部位を 400 倍の倍率で無作為に 5 枚ずつ撮影した。これらの写真に含まれる細胞数と GJ の数を数え、細胞 1 個当たりの GJ の数を計測した。

3 結 果

3.1 GJ の形態

薄切法による電顕観察では、GJ は環状またはひも状を呈し (Fig. 1a)、強拡大では約 20 Å の間隔を有する平行な高電子密度層と、その間のやや電子密度の低い層からなっていた。また、低電子密度層の中央部分には二層の点状の高電子密度層が認められた (Fig. 1b)。GJ のほかに、電子密度の高い、ライソゾームの内容物と思われるコンタミネーションが認められたが、GJ 以外の膜成分はほとんど見られなかった。ネガティブ染色では、GJ は直径約 1,000~8,000 Å の不整円盤形を呈し (Fig. 2a)、中心部に channel を有する直径 70~80 Å の connexon が、密に配列するのが認められた (Fig. 2b)。なお、一個の GJ は 500~15,000 個の connexon からなっていた。また GJ の端に相対する二枚の細胞膜がはり合わさった像が認められた (Fig. 2a)。

3.2 蛋白量と分子量の解析

ラット 15 匹当たりの GJ 蛋白の収量は約 150 μg で、肝湿重量 1 g 当たり約 1.0 μg であった。SDS-PAGE による分子量の測定では、可溶化を室温 12 時間で行うと、GJ 蛋白は分子量 26,000 の単一のバンドとなった (Fig. 3) が可溶化の条件を 100°C 2 分間に変えると、47,000 のダイマーや、さらに高分子のバンドも認められた。

3.3 GJ の免疫組織化学的解析

ラット正常肝組織の蛍光抗体法による免疫染色では、隣接する肝細胞の細胞膜に沿って点状に散在する GJ の蛍光が認められた (Fig. 4a)。本抗体はマウス、ハムスター、ヒトの正常肝組織に対し cross reactivity が認められ、GJ の分布はラットの肝の場合とほぼ同様であった。ラット正常膵 (導管及び腺房) (Fig. 4b)・腎 (尿細管)・唾液腺 (導管及び腺房)・胃 (被蓋上皮及び胃腺) 組織でも、細胞膜に沿って、肝と同様に点状に散在する GJ が認められたが、腎・唾液腺・胃では、肝や膵に比較してその数は少なく、1 個の GJ の大きさが小さかった。またレンズでは、GJ の蛍光は全く認められなかった。肝過形成結節では、GJ の著明な減少が見られ、周囲の圧排された正常組織とは明らかな差が見られた (Fig. 5a)。肝癌でも過形成結節と同様に GJ の著明な減少が見られ、GJ はほとんど認められなかった (Fig. 5b)。なお各組織では、いずれも間質結合織に非特異的の反応が見られ、心筋や平滑筋では細胞の全周に非特異

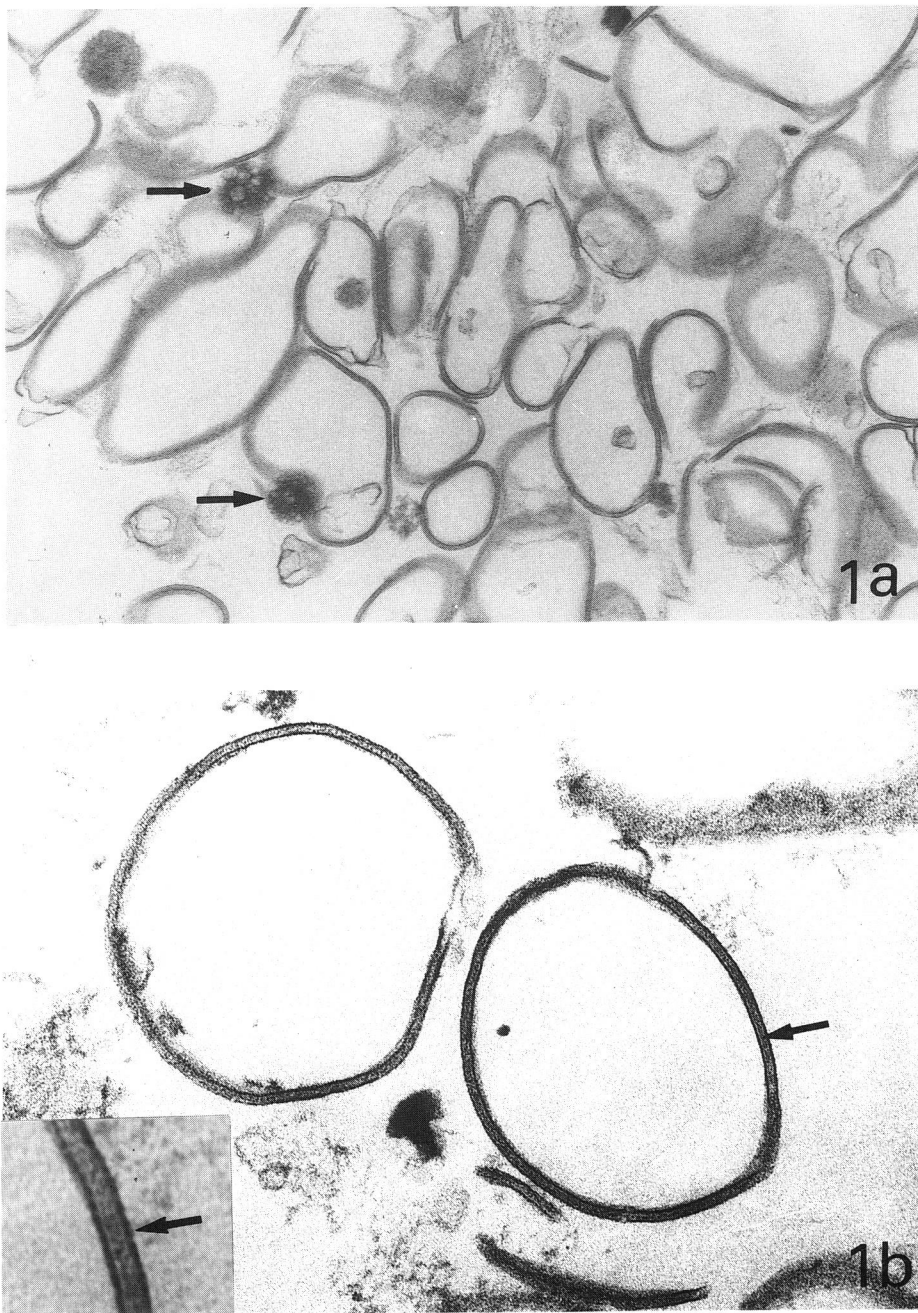


Fig. 1 Electron micrographs of thin sections of isolated gap junctions. (a) Gap junctions appear as rings or strands. Arrows are lysosomal contamination. ($\times 26000$) (b) Between two parallel outer layers, two low electron dense and two high electron dense layers are seen (arrow). Inset is higher magnification of a portion of arrow. ($\times 50000$)

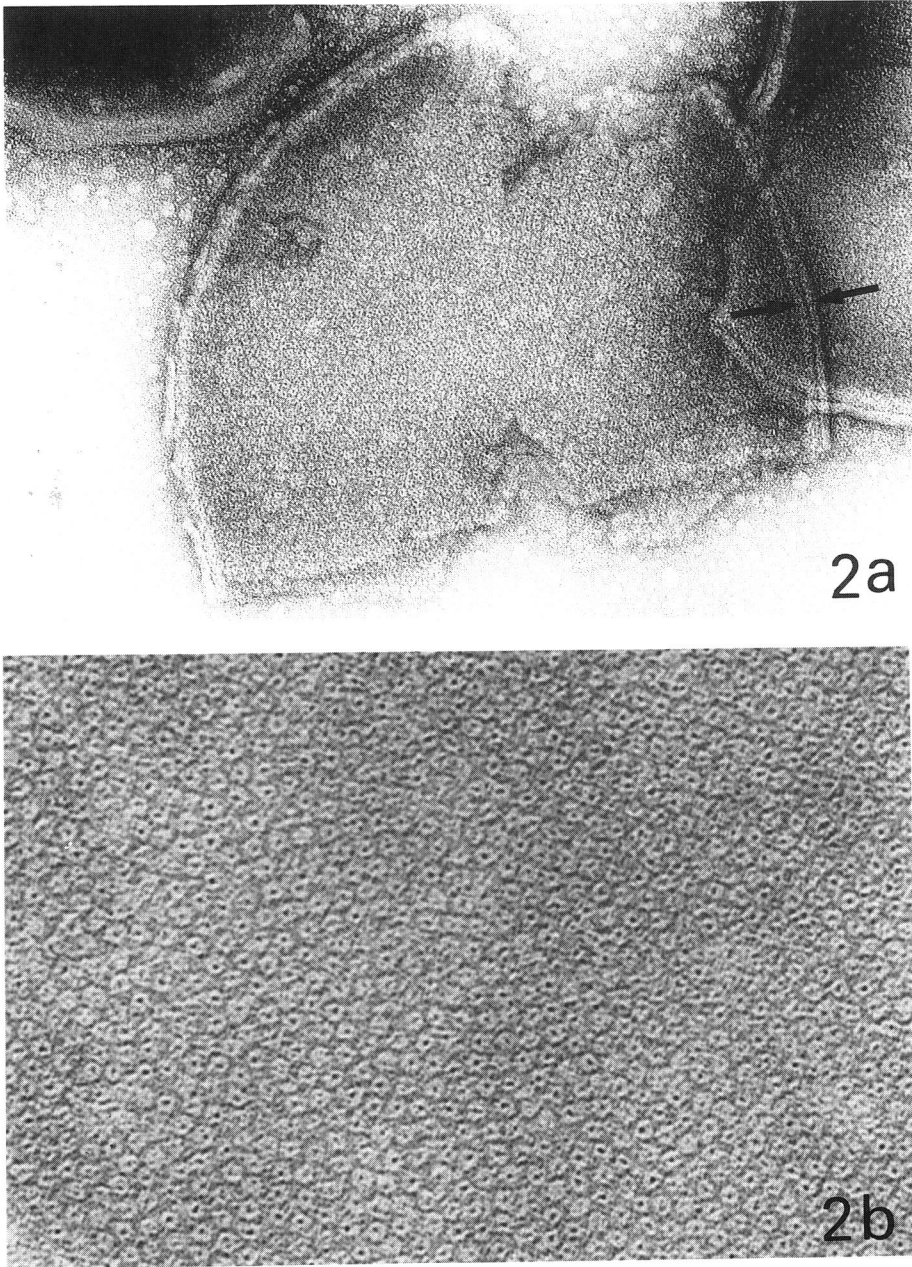


Fig. 2 Electron micrographs of negative stain of isolated gap junctions. (a) Arrows show double gap junctional membranes of interacting cells. ($\times 100000$) (b) High magnification of connexons. A channel is seen in the center of each connexon. ($\times 200000$)

反応が強いために GJ の特異蛍光を確認することができなかった。

各組織における GJ の定量結果は、肝で最も多く、細胞 1 個当たり 2.40 であった。ついで脾が 1.76、腎・胃・唾液腺は前二者に比べて少なく、それぞれ 1.37、1.40、1.13 であった。肝過形成結節では 0.68 と、正常肝組織の 28% に減少し、肝癌では、さらに 0.11 と正常肝の 4.5% にまで減少していた (Table 1)。

4 考 察

4.1 GJ の分離方法

GJ の分離は 1963 年に Benedetti and Emmelot²¹⁾ が、ラット肝より分離したことに始まる。その後、他の動物の肝及び他の臓器についても、GJ の分離が報告されてきた。GJ の分離には、まず膜分画を detergent などで処理して破壊し、これに抵抗性のある GJ をよく洗った後、ショ糖密度勾配遠心法などにより精製する方法がとられる。この際、GJ をなるべく完全な形で他の膜部分から分離する必要がある、そのために様々な膜の破壊方法が用いられてきた。これらには、deoxycholate^{21,22)}、Sarkosyl NL-97¹⁵⁾、Triton X-100¹⁹⁾ などの detergent による処理、アルカリ¹⁵⁾ による処理などがある。しかしこれらのいずれの方法でも、

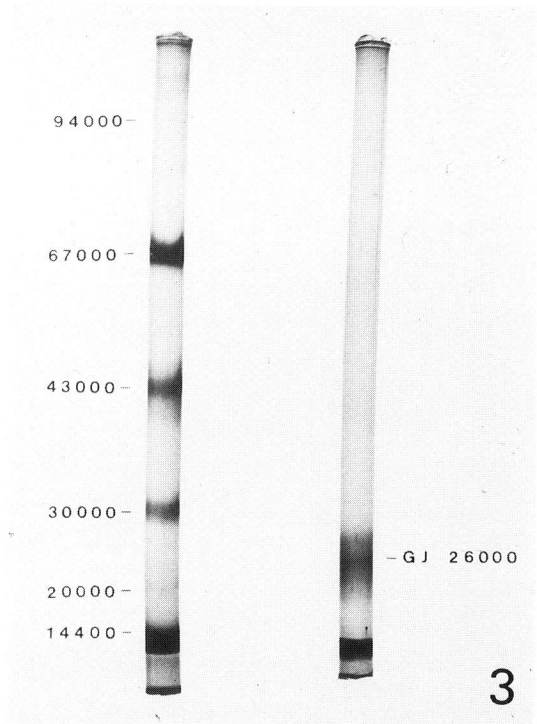


Fig. 3 SDS-PAGE of the gap junctional protein (right). Molecular weight standards (left).

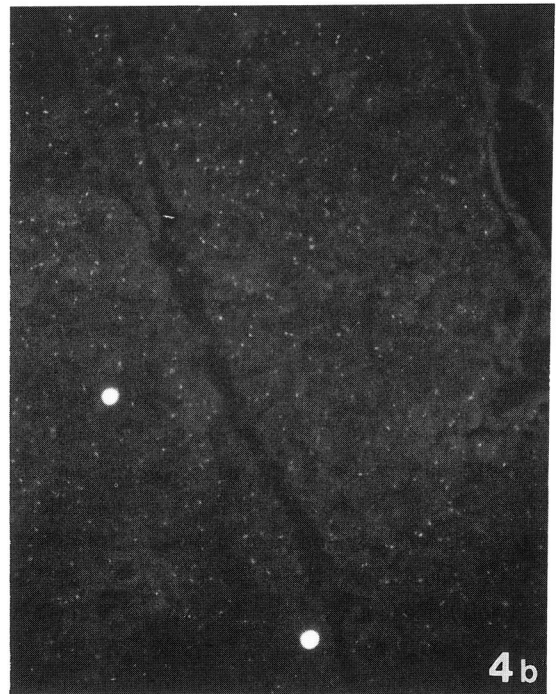


Fig. 4 Immunofluorescences of gap junctions in normal rat liver (a) and pancreas (b). Gap junctions are seen as fluorescent spots on cellular margin. Nonspecific staining is seen in the stroma.

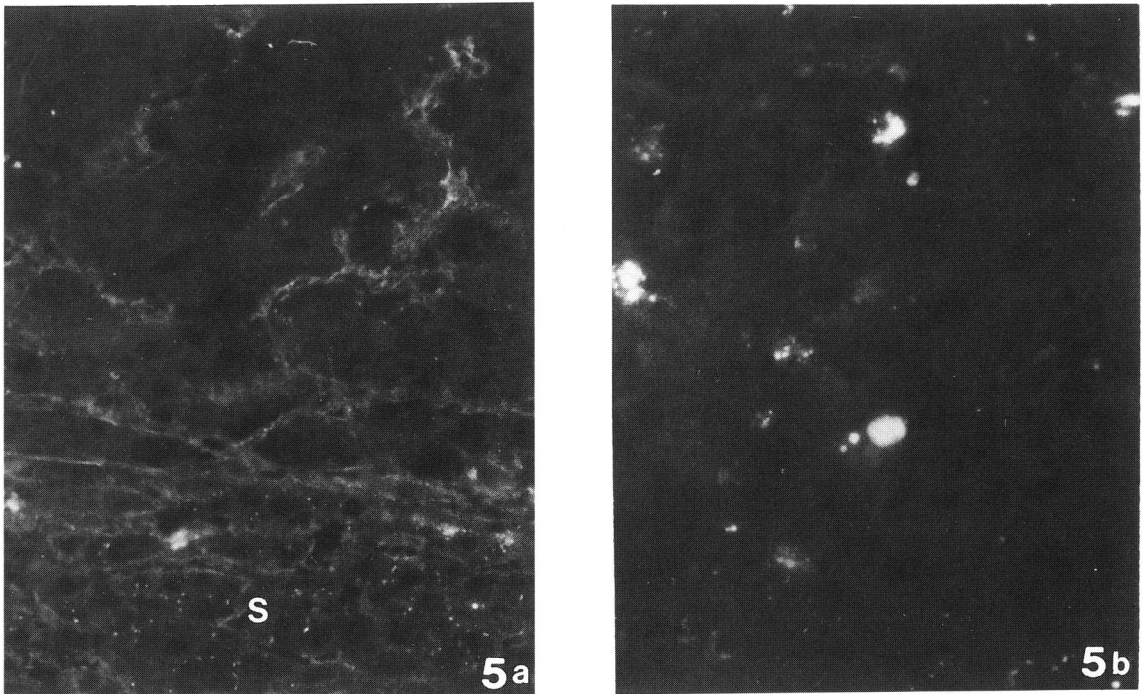


Fig. 5 Immunofluorescences of gap junctions in a hyperplastic nodule (a) and hepatocellular carcinoma (b) of rats. The number of gap junctions is markedly decreased in the nodule and hepatocellular carcinoma as compared to the surrounding hepatic tissue (S).

Table 1 The number of GJ per one cell in normal tissues, hyperplastic nodules and hepatocellular carcinoma in rat.

	Normal Tissues					Hyperplastic nodules	Hepatocellular carcinoma
	Liver	Pancreas	Kidney	Stomach	Salivary gland		
The number of GJ per one cell	2.40	1.76	1.37	1.40	1.13	0.68	0.11

GJの収量は、肝湿重量1g当たり0.1~1.0 μ g程度で少なかった。その後 Hertzberg は、アルカリと超音波で膜を処理することによってGJの収量を約10倍に上げる方法を報告した¹⁷⁾。

最初我々は、Hertzbergの方法によりGJの分離を行ったが、記載通りの方法では、ライゾゾームのコンタミネーションが多いという欠点があった。そこでこの点を解決するために、肝細胞から膜を分離する際、ショ糖密度勾配遠心を二段階で行い、膜の純度を高め、この段階でのコンタミネーションをできるだけ少なくした。その結果、GJの収量は彼の報告よりも低下したが、従来の方法に比べると良い結果が得られ、またコンタミネーションの少ないGJ分画を得ることができた。

4.2 GJ 蛋白

今回の我々の結果では、SDSによる可溶化の条件を室温12時間とした場合、26,000の単一バンドが得られたが、条件を変えて100°C2分間とすると、47,000のバンドや、もっと高分子のバンドも出現した。GJ蛋白の分子量は、報告により多少異なり、ラット及びマウスの肝では26,000~28,000^{14,16-20,22,23,31)}と21,000³²⁾、ラット心では28,000~30,000^{24,25)}ラットレンズでは26,000^{26,31,33)}と報告されている。もっと低分子の報告¹⁹⁾もあるが、それらは、コンタミネーションした他の蛋白か、あるいは、GJ蛋白が一部分解したものと考えられている。このように分離法や泳動の条件により、分子量の変化が起こることが予想される。しかし、Zervos

*et al.*²⁷⁾は、ラットの子宮・肝・心から GJ を同じ条件で分離し、これらの分子量を調べたところ、ともに 28,000 であり、また Hertzberg は、ラット心及び肝の GJ 蛋白は 27,000 と報告している。¹⁷⁾ 一方、Nicholson *et al.*³¹⁾ はラットのレンズの GJ と肝の GJ を比較したところ、前者では 26,000、後者では 28,000 と明らかな差があったとしている。したがって現在では、GJ 蛋白の分子量に関して、各臓器ではほぼ同じであるが、レンズのみ異なると考えられている。今回、我々の作成した抗 GJ 抗体は、ラットの臓器では、レンズを除き、膵・腎・胃・唾液腺が肝と同様に反応した。このように共通のエピトープが存在することは、これらの臓器間での、蛋白の一次構造の共通性がうかがわれる。GJ 蛋白のアミノ酸配列は、最初 Nicholson *et al.*³¹⁾ により、肝 GJ の N 末端側の 56 個が明らかにされた。また、peptide mapping による各臓器の GJ 蛋白の比較では、肝・心・レンズの間で違いが見られることから、これらの一次構造は、それぞれ異なると考えられていた。その後 Paul³⁴⁾ は、抗ラット肝 GJ 抗体を利用して、ラット肝 GJ cDNA のクローニングを行い、その塩基配列を調べたところ、分子量 32,000 の polypeptide を code する open reading frame が含まれ、その N 末端側は、Nicholson らが報告した配列とまったく一致することを明らかにした。さらに彼は、この cDNA をプローブにして、Northern blotting により各臓器の GJ mRNA を調べたところ、脳・肝・胃・腎ではともに 1.6 Kb の単一のバンドと反応したが、心・レンズではともに反応が弱く、それぞれ分子量の異なる mRNA と反応した。したがって現在では、肝・心・レンズの GJ 蛋白の一次構造はそれぞれ異なり、少なくとも 3 種類の GJ 蛋白が存在すると考えられている。我々の今回の免疫組織化学的検索の結果は、これらの分子的解析の結果と一致したが、今回我々が作製した抗体は、間質成分と非特異的の反応が強く、心の GJ については cross reactivity は確認できなかった。この点は、現在モノクローナル抗体を作製中であり、これにより今後の解析が可能になることが期待できる。なお、最近 Nicholson *et al.*³²⁾ は、ラット及びマウス肝の分子量 28,000 と 21,000 の GJ 蛋白を比較し、両者は別の蛋白であることを報告している。したがって、同じ臓器でもさらに 2 種類以上の GJ 蛋白が存在する可能性が考えられる。

一方、種特異性については、抗ラット肝 GJ 抗体は肝では、マウス・ハムスター・ヒトの肝 GJ と、ほぼ同じ程度に反応した。このことは種の違いによる GJ 蛋白の差は乏しいことを示している。ヒトとラットの肝の GJ

cDNA の塩基配列を比較した Kumar and Gilula の結果³⁵⁾ では両者はほぼ同じであり、レンズの GJ についても、Revel *et al.*¹⁾ はラットとウシで N 末端側の 39 個のアミノ酸を比較したところ、わずか 3 個の違いしか見られなかったと報告している。したがって、今回我々の作製した抗 GJ 抗体は、ラット以外の種々の臓器の GJ ととも反応すると考えられ、ヒトへの応用が期待できる。

4・3 GJ の定量

我々は、ラット正常組織、発癌剤投与により誘発した肝過形成結節及び肝癌について、GJ の数の変化を免疫組織化学的に定量化したが、その結果、正常肝組織に比較して、両者に著明な GJ の減少が認められた。これは、小川ら¹⁵⁾ がすでに電顕的に報告している結果と、ほぼ同様であった。またラットの正常組織では、他に比べて肝細胞で GJ がよく発達しており、従来の電顕観察の結果とよく一致した。Revel *et al.*⁴⁾ は、ラット再生肝における GJ の変化をフリーズ・フラクチャー法を用いて観測し、細胞膜単位面積当たりの GJ の面積を、部分肝切除後 24~44 時間にわたって検索した。その結果、GJ は部分肝切除後 28 時間前後で一時的に減少し、その後再び増加して 44 時間後には切除前に近い値まで回復するという結果を報告している。Trube *et al.*⁷⁾ は、26,000 の GJ 蛋白に対する抗体を用いて、部分肝切除後の肝細胞膜 GJ 蛋白の経時的変化をイムノプロットにより調べているが、ほぼ Revel *et al.* と同様の結果を報告している。

このように、抗 GJ 抗体を用いた今回の観察結果は、従来の電顕観察の結果と良好な対応を示した。この方法は、電顕観察よりも簡便で、より広範囲を調べることが可能であり、しかも、抗 GJ 抗体による免疫染色で GJ は点状に染まるため、その数を測定することが容易であり、細胞 1 個当たりの GJ 数を定量的に表現することができる。また、連続切片を作製することにより、組織化学的所見との対比が可能であり、細胞の病的・生理的变化と GJ の変化を、容易に対比させることができるという利点もある。

5 結 論

1) ラット肝細胞膜から GJ 蛋白を分離した。アルカリと超音波処理にシヨ糖密度勾配遠心を繰返し行うことにより、ライソゾームのコンタミネーションを少なくし、ほぼ完全な形の GJ が分離できた。

2) SDS-PAGE による GJ 蛋白の分子量の測定を行い、従来の報告と一致する分子量 26,000 の単一バンド

を得た。

3) 分離したGJをマウスに免疫し抗GJ抗体を作製した。

4) 抗GJ抗体を用いて、各種動物の正常肝組織及びラット各正常組織について免疫染色を行ない、肝ではラット、マウス、ハムスター、ヒトのGJにいずれも陽性で、ラットでは肝・腎・胃・脾・唾液腺のGJに対して陽性の結果を得た。

5) 免疫組織化学的に、ラット正常肝、肝過形成結節、肝癌についてGJの定量を行ない、肝過形成結節・肝癌では、正常肝に比べ著明なGJの減少を認めた。

謝 辞

御指導・御校閲いただきました小浜源郁教授並びに森道夫教授に深く感謝いたします。また、御協力いただいた病理学第二講座の諸先生、抗体の作製に際して御指導をいただいた病理学第一講座の諸先生、そして電顕写真の作製にたずさわった鈴木恵美子氏、田中和子氏に感謝致します。

文 献

- Bock, G. and Clark, S.: Junctional complexes of epithelial cells. In: Ciba Foundation Symposium 125, 78-167, John Wiley & Sons, Chichester (1987).
- Stachelin, L. A. and Hull, B. E.: Junctions between living cells. *Sci. Am.* **238** 140-153 (1978).
- Bennett, M. V. L., Spray, D. C., Harris, A. L., Gingberg, R. D., De Carvalho, A. C. and White, R. L.: Control of intercellular communication by way of gap junctions. *Harvey Lect.* **78** 23-57 (1982).
- Yee, A. G. and Revel, J. P.: Loss and reappearance of gap junctions in regenerating liver. *J. Cell Biol.* **78**, 554-564 (1978).
- Yancey, S. B., Easter, D. and Revel, J. P.: Cytological changes in gap junction during liver regeneration. *J. Ultrastruct. Res.* **67**, 229-242 (1979).
- Metz, J. and Bressler, D.: Reformation of gap and tight junctions in regenerating liver after cholestasis. *Cell Tissue Res.* **199**, 257-270 (1979).
- Traub, O., Druge, P. M. and Willecke, K.: Degradation and resynthesis of gap junction protein in plasma membranes of regenerating liver after partial hepatectomy or cholestasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 755-759 (1983).
- Tachikawa, T., Yamamura, T. and Yoshiki, S.: Changes occurring in plasma membranes and intercellular junctions during the process of carcinogenesis and in squamous cell carcinoma. *Virchows Arch. [B]* **47**, 1-15 (1984).
- Enomoto, T. and Yamasaki, H.: Lack of intercellular communication between chemically transformed and surrounding nontransformed BALB/c 3T3 Cells. *Cancer Res.* **44**, 5200-5203 (1984).
- Yancey, S. B., Edens, J. E., Transko, J. E., Chang, C. C. and Revel, J. P.: Decreased incidence of gap junctions between Chinese hamster V-79 cells upon exposure to the tumor promoter 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Exp. Cell Res.* **139**, 329-340 (1982).
- Mesnil, M., Montesano, R. and Yamasaki, H.: Intercellular communication of transformed and non-transformed rat liver epithelial cells. *Exp. Cell Res.* **165**, 391-402 (1986).
- Williams, G. M., Telang, S. and Tong, C.: Inhibition of intercellular communication between liver cells by the liver tumor promoter 1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis (p-chlorophenyl) ethane. *Cancer Lett.* **11**, 339-344 (1981).
- Sugie, S., Mori, H. and Takahashi, M.: Effect of in vivo exposure to the liver tumor promoters phenobarbital or DDT on the gap junctions of rat hepatocytes: a quantitative freeze-fracture analysis. *Carcinogenesis* **8**, 45-51 (1987).
- Janssen-Trimmen, U., Traub, O., Dermietzel, R., Rabes, H. M. and Willecke, K.: Reduced number of gap junctions in rat hepatocarcinomas detected by monoclonal antibody. *Carcinogenesis* **7**, 1475-1582 (1986).
- 小川勝洋, 横川金弥, 友寄高士, 森道夫, 小野江為則: ラット肝増生結節並びに肝癌の組織構築と細胞間結合. *日病会誌* **69**, 197 (1980).
- Hertzberg, E. L. and Gilula, N. B.: Isolation and characterization of gap junctions from rat liver. *J. Biol. Chem.* **254**, 2138-2147 (1978).
- Hertzberg, E. L.: A detergent-independent procedure for the isolation of gap junctions from rat liver. *J. Biol. Chem.* **259**, 9936-9943 (1984).
- Traub, P., Trimmen, U. J., Druge, O. M., Dermietzel, R. and Willecke, K.: Immunological properties of gap junction protein from mouse liver. *J. Cell. Biochem.* **19**, 27-44, (1982).
- Henderson, D., Eibl, H. and Weber, K.: Structure and biochemistry of mouse hepatic gap junctions. *J. Mol. Biol.* **132**, 193-218 (1979).

- 20) Sikerwar, S. S. and Malhotra, S. K.: A structural characterization of gap junctions isolated from mouse liver. *Cell Biol. Int. Rep.* **7**, 897-903 (1983).
- 21) Benedetti, E. L. and Emmelot, P.: Hexagonal array of subunits in tight junctions separated from isolated rat liver plasma membranes. *J. Cell Biol.* **38**, 15-24 (1963).
- 22) Ehrhart, J. C.: Further purification of mouse liver gap junctions with deoxycholate and protein composition. *Cell Biol. Int. Rep.* **5**, 1055-1061 (1981).
- 23) Trimmen, U. J., Dermietzel, R., Frixen, U., Leibstein, A., Traub, O. and Willecke, K.: Immunocytochemical localization of the gap junction 26k protein in mouse liver plasma membranes. *EMBO J.* **2**, 295-302 (1983).
- 24) Manjunath, C. K., Goings, G. E. and Page, P.: Cytoplasmic surface and intramembrane components of rat heart gap junctional proteins. *Am. J. Physiol.* **246**, 865-875 (1984).
- 25) Manjunath, C. K., Goings, G. E. and Page, E.: Isolation and protein composition of gap junctions from rabbit hearts. *Biochem. J.* **205**, 189-194 (1982).
- 26) Paul, D. L. and Goodenough, D. A.: Preparation characterization and localization of antisera against bovine MP26, an integral membrane protein of the lens fiber plasma membrane. *J. Cell Biol.* **96**, 624-632 (1983).
- 27) Zervos, A. S., Hope, J. and Evans, W. H.: Preparation of a gap junction fraction from uteri of pregnant rats: The 28-KD polypeptides of uterus, liver, and heart gap junctions are homologous. *J. Cell Biol.* **101**, 1363-1370 (1985).
- 28) Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, N. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85 (1985).
- 29) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
- 30) Solt, D. and Farber, E.: New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature* **263**, 701-703 (1976).
- 31) Nicholson, B. J., Takemoto, L. J., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E. and Revel, J. P.: Differences between liver gap junction protein and lens MIP 26 from rat: implication for tissue specificity of gap junctions. *Cell* **32**, 967-978 (1983).
- 32) Nicholson, B., Dermietzel, R., Teplow, D., Traub, K., Willecke, K. and Revel, J. P.: Two homologous protein components of hepatic gap junctions. *Nature* **329**, 732-734 (1987).
- 33) Obrink, B.: Review article: epithelial cell adhesion molecules. *Exp. Cell Res.* **163**, 1-21 (1986).
- 34) Paul, D. L.: Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J. Cell Biol.* **103**, 123-134 (1986).
- 35) Kumar, N. M. and Gilula, N. B.: Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein. *J. Cell Biol.* **103**, 767-776 (1986).