

られた。今後、FEMg が CSA の副作用をモニターする有用な指標となるか、さらに検討する必要がある。

#### **E. 結論**

病態が安定した場合、CSA の血中濃度・時間曲線は投与量が変更されても類似しており、AUC<sub>0-4</sub> 値の推測に C2 モニタリングが十分に機能すると思われる。腎機能障害が存在する場合に AUC<sub>0-4</sub> 値が高値を示す傾向があり、腎機能障害者に CSA を使用する場合には、一度は AUC<sub>0-4</sub> 値を測定することが推奨される。

#### **F. 健康危険情報**

なし

#### **G. 知的所有権の出願・登録状況**

なし

#### **H. 研究発表**

##### **1. 論文発表**

準備中

##### **2. 学会発表**

日本腎臓学会（平成 15 年）

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
各個研究報告書

「新しい WHO ループス系球体腎炎分類に基づいた臨床病理学的検討」

研究協力者 横山 仁  
共同研究者 和田隆志, 古市賢吾  
金沢大学医学部附属病院血液浄化療法部

研究要旨

ループス系球体腎炎(LGN)2003年改定基準を基に、後ろ向き調査により予後を検討した。腎機能予後の予測上、発症時あるいは経過中のIV-SもしくはIV-G型とネフローゼ症候群、抗リン脂質抗体症候群の合併は腎あるいは生命予後を判定する上で有用な指標と考えられる。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス(以下 SLE)では経過中早期に約 20~50%の症例において検尿異常を伴い、成人例の約 60%が腎機能障害に進展すると報告されている。さらに約 15%の症例では、ネフローゼ症候群を伴う(1-2)。この SLE に伴う腎病変(以下にループス腎炎)に関しては、一般に WHO 分類が用いられているが、予後評価を加味して、この基準を改訂する案が International Society of Nephrology/ Renal Pathology Society (ISN/RPS) 2003 classification として報告された(3)。今回、このループス系球体腎炎 ISN/RPS 2003 年改訂基準の意義を明らかにするため、初回および追跡腎生検により診断したループス系球体腎炎の長期予後を後ろ向き調査により検討した。

B. 研究方法

1976 年以降に金沢大学第 1 内科ならびに関連施設に入院し、経過観察されたループス系球体腎炎 56 例を対象とした。内訳は男性 6 例、女性 50 例、平均 33.1 歳であり、観察期間は 1 から 349 ヶ月、平均 139 ヶ月であった。56 例中 19 例 33.9%がネフローゼ症候群、2 例が急性腎炎症候群、2 例が急速進行性腎炎で発症した。治療に関しては免疫抑制治療が施行されなかった 2 例を除く 54 例にプレドニゾロン 1 日 20~40mg を投与し、さらにメチルプレドニゾロンパルス療法を 33 例に併用した。免疫抑制薬としてシクロフォスファミド、ミゾリビン、アザチオプリン、シクロスポリン A を経口投与したものが 17 例、シクロフォスファミドパルス療法を施行したものが 4 例あった。いずれ

もインフォームドコンセントを行ない施行した。

腎病理組織については2003年WHO分類(案)に従い、糸球体病変の分類、ならびにAustinらのNIHスコアにより activity(AI) および chronicity index(CI)を算定した(4)。糸球体病変に臨床所見を加え、Kaplan-Meier 法、Cox 比例ハザードおよびステップワイズ法により初回腎生検ならびに最終腎生検時の臨床病理学的因子を検討した。

### C. 結果と考察

組織型分類では、I型9例、II型9例、III型8例、IV-G型14例、IV-S型6例、V型10例であり、4例(7%)に組織型の移行が認められた。その内訳はIII型からIV-G型に移行したものが1例、IV-G型からIII型に1例、IV-S型からIV-G型に1例、そしてV型からIV-G型に1例移行した。56例中末期腎不全に至った症例は10例(18%)であり、そのうちIV-SもしくはIV-G群が9例を占めており、V型の1例はIV型合併例であった。初回腎生検組織所見がIV-SもしくはIV-G群は、Kaplan-Meier法において他の病型に比して腎死を高率に認め、50%腎生存は140カ月であった。IV-SもしくはIV-G群は表に示すようにCox比例ハザード法において有意であり、ステップワイズ法においてもハザード比24.39( $\chi^2$ 係数9.13,  $p=0.0025$ )で腎死に対する最も有意な因子であった。

表：末期腎不全の臨床病理学的因子

因子	ハザード比(95%CI)	P値
IV-S/-G型	13.41(1.27-14.19)	0.031
ネフローゼ	3.28(0.59-18.18)	0.176
AI	1.10(0.86-1.40)	0.438
CI	0.93(0.62-1.40)	0.734
年齢	0.95(0.88-1.03)	0.190
抗リン脂質抗体症候群	1.09(0.26-4.67)	0.907

腎機能予後に関してIV-SとIV-G群間にKaplan-Meier法における差はなかったが、初回腎生検のIV-S型で腎機能がより低下する傾向を示した。さらに末期腎不全と腎外死に対する臨床病理学的因子の検討では、ネフローゼ症候群の合併、IV型ループス糸球体腎炎、抗リン脂質抗体症候群の合併、年齢、慢性病変指標、activityおよびchronicity indexのうちactivity indexが有意因子であった。また、透析療法導入後を含めた生存に関して抗リン脂質抗体あるいはネフローゼ症候群の合併がKaplan-Meier法において有意差が認められ、ステップワイズ法においても有意因子として選択された。さらに末期腎不全と腎外死に対する臨床病理学的因子の検討では、ネフローゼ症候群の合併、IV型ループス糸球体腎炎、抗リン脂質抗体症候群の合併、年齢、慢性病変指標、activityおよびchronicity indexのうちactivity indexが有意因子であった。さらに透析療法導入後を含めた生存に関して抗リン脂質抗体あるいはネフローゼ症候群の合併が

Kaplan-Meier 法において有意差が認められ、ステップワイズ法においても有意因子として選択された。

#### D. 結論

腎機能予後の予測上、発症時あるいは経過中の IV-S もしくは IV-G 型とネフローゼ症候群、抗リン脂質抗体症候群の合併は腎あるいは生命予後を判定する上で有用な指標と考えられる。

#### 参考文献

- 1) Berden JH: Lupus nephritis. *Kidney Int* 52:538-558, 1997
- 2) Cameron JS: Clinical manifestations of lupus nephritis: Lupus nephritis. Edited by Lewis EJ Schwartz MM, Korbet SM. pp159-184, Oxford, New York, Oxford University Press, 1999
- 3) Weening JJ, D'Agati D, Schwartz M, *et al*: The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int* 65:521-530, 2004
- 4) Austin HA, 3rd, Muenz LR, Joyce KM, *et al*: Diffuse proliferative lupus nephritis: identification of specific pathologic features affecting renal outcome. *Kidney Int* 25:689-695, 1984

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yoshimoto K, Yokoyama H, Wada T *et al*. Pathologic findings of initial biopsies reflect the outcomes of membranous

nephropathy. *Kidney Int* 65: 148-153, 2004.

- 2) Furuichi K, Wada T, Iwata Y, *et al*. CCR2 signaling contributes to ischemia-reperfusion injury in kidney. *J Am Soc Nephrol* 13:2503-2515, 2003.

- 3) Wada T, Matsushima K, Yokoyama H *et al*. Chemokines as therapeutic targets for renal diseases. *Curr Med Chem-Anti-inflammatory & anti-allergy agents* 2:175-199, 2003.

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
各個研究報告書

「タンパク尿の出現とポドシンの発現」

研究協力者 吉村 吾志夫

昭和大学医学部藤が丘病院腎臓内科助教授

研究要旨

タンパク尿出現に果たすスリット膜構成分子ポドシンの役割を検討する目的で、Puromycin投与ラット(PAN-N)、5/6腎摘ラット(5/6-N)、巣状糸球体硬化症自然発症BUF/Mnaラット(BUF)を用い、半定量RT-PCRと免疫電顕でポドシン発現を経時的に観察した。PAN-Nでは3日目にポドシンmRNAがdown-regulateされ、タンパク尿はその後著明に増加した。5/6NとBUFではまずタンパク尿が出現・増悪し、その後にポドシンmRNAが著明にdown-regulateされた。どのモデルでもポドシンmRNAがdown regulateされた時点にて免疫電顕上金粒子の数が減少した。以上より、タンパク尿におけるポドシンの役割は急性ラットモデルと慢性ラットモデルとは異なることが示唆された。

A. 研究目的

ポドシンなどのスリット膜構成分子の変異はタンパク尿の原因となる。しかし、タンパク尿を呈する種々の病態でスリット膜構成分子の発現がどうなるかは十分に検討されていない。本研究は、タンパク尿を呈するが病態の異なるラットモデルを用い、タンパク尿とポドシン発現との関係を経時的に観察することをとうして、各々のモデルにおけるポドシンの果たす役割を解析することを目的とした。

B. 研究方法

ラットモデルとして、1) puromycin aminonucleoside 単回投与ラット(PAN-N)、2) 5/6腎摘ラット(5/6-N)、

3) タンパク尿自然発症 BUF/Mna ラットを用いた。1)、2)、3)、それぞれで以下の検討を経時的に施行した。A) 24時間蓄尿によるタンパク尿定量を行った。B) ポドシンの mRNA レベルでの発現は、GAPDH を house keeping gene とする semi-quantitative RT-PCR 法で解析した。C) ポドシンの細胞外部分に対するペプチド抗体を作製し、タンパクレベルでの発現を免疫電顕的に解析した。

(倫理面への配慮)

全身麻酔下にて RNA や病理組織標本を採取し、実験動物に余分なストレスがかからないように、倫理的配慮を施した。

### C. 結果

急性モデルの 1) PAN-N では、まずポドシン mRNA が 3 日目に 50% まで down regulate され、タンパク尿は 7 日より顕著に出現した。慢性モデルの 2) S/6-N では、腎摘後 60 日でタンパク尿の出現を認めたが、ポドシン mRNA は腎摘後 150 日になってはじめて 60% まで down regulate された。慢性モデルの 3) BUF では、生後 90 日でタンパク尿の出現を認めたが、ポドシン mRNA は生後 150 日になってはじめて 50% まで down regulate された。尚、1)、2)、3) のいずれにおいても、ポドシン mRNA が down regulate された時点にて免疫電顕上金粒子の数は減少した。即ち、今回の解析でラットポドシンの mRNA レベルとタンパクレベルにおける発現の解離は認められなかった。

### D. 考察

今回の解析にて、タンパク尿を呈する急性ラットモデルと慢性ラットモデルでは、ポドシンの果たす役割が質的に異なる点が示唆された。急性モデルではより積極的にポドシンがタンパク尿出現に関わっている可能性が考えられた。さらに、別のモデルではどうか？ポドシン以外のスリット膜構成分子はどうか？急性モデルと慢性モデルにおける発現パターンの違いはどの程度の普遍性をもつか？このような興味はつきないが、将来においても解析を続け、データを蓄積することによって、タンパ

ク尿発現におけるスリット膜の役割が明確になり、タンパク尿のより本質的な病態把握の一助になる可能性がある。

### E. 結論

ラットモデルでは、ポドシン発現の down regulation とタンパク尿出現との時間的關係が一定ではなかった。

### F. 健康危険情報

本研究に直接関係した特記事項はない。

### G. 知的所有権の出願・登録状況

特許等は出願していない。

### H. 研究発表

#### 1. 論文発表

現在投稿準備中。

#### 2. 学会発表

Rat podocin expression in experimental and congenital models showing proteinuria. H. Morita, A. Yoshimura, K. Inui, M. Matsuyama, S. Roselli, C. Antignac, T. Ideura. 3003 American Society of Nephrology Meeting held in San Diego, USA.

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

各個研究報告書

「ヒト培養メサンギウム細胞においてアンジオテンシン II は p38 MAPK  
と JNK を介してトロンボスポンディン-1 の産生を促進する」

研究協力者 頼岡 徳在

共同研究者 正木崇生、内藤隆之

広島大学大学院医歯薬学総合研究科展開医科学専攻病態制御医科学講座

研究要旨

ヒト培養メサンギウム細胞において、Ang II 刺激により TSP-1 の発現が誘導され、TGF- $\beta$  の活性化に関与しているかを検討した。100 nM の Ang II 刺激により TSP-1 mRNA は発現が亢進し、細胞溶解液中 TSP-1 蛋白および培養上清中 TSP-1 蛋白も同様であった。これらの反応は Ang II type 1 受容体拮抗薬を添加することにより完全に抑制された。100 nM の Ang II 刺激による 24 時間後の培養上清中活性型 TGF- $\beta$  は、TSP-1 の拮抗ペプチドを添加することにより低下し、TSP-1 が TGF- $\beta$  の活性化に関与していることが判明した。また、Ang II 刺激による TSP-1 蛋白の増加に MAPK が関与しているかを検討した。ERK1/2 は細胞溶解液中および培養上清中の TSP-1 蛋白の増加には関与せず、p38 MAPK および JNK が TSP-1 蛋白の増加に関与していることが判明した。

A. 研究目的

Angiotensin II (以下 Ang II) は糸球体腎炎を増悪させる代表的因子であり、ACE 阻害薬および Ang II 受容体拮抗薬の腎保護作用を証明する臨床研究が相次いでいる。Ang II は血管収縮因子として作用するのみならず、メサンギウム細胞において生理活性を有しない潜在型 Transforming growth factor- $\beta$  (以下 TGF- $\beta$ ) を産生させること、そして産生された潜在型 TGF- $\beta$  が活性化し、細胞外基質を増生させることが知られている。一方、Thrombospondin-1 (以下 TSP-1) は種々

の糸球体腎炎においてメサンギウム領域に沈着する細胞外基質として知られていたが、本蛋白が TGF- $\beta$  の活性化に関与していることが近年報告された。しかしながら、メサンギウム細胞において Ang II 刺激により TSP-1 が産生するか、あるいは Ang II 刺激により産生された潜在型 TGF- $\beta$  の活性化に TSP-1 が関与しているかは不明である。本研究ではヒト培養メサンギウム細胞において、Ang II 刺激により TSP-1 の発現が誘導され、TGF- $\beta$  の活性化に関与しているかを検討した。

## B. 研究方法

細胞培養は、第 5-7 継代のヒト培養メサンギウム細胞(以下 HMC)を使用した。TSP-1 mRNA の検出には、Light Cycler Quick system による定量的 real time RT-PCR を行った。TSP-1 蛋白の検出には Western blot を行った。上清中の TSP-1 蛋白の検出には、Enzyme immunoassay を行った。(詳細な実験条件は H.研究発表 1.論文発表の 8)を参照。)

### (倫理面への配慮)

本研究では BioWhittaker 社から発売されているヒトメサンギウム細胞を使用した。なお本細胞は、インフォームドコンセントを得て採取されたことが添付文章に明記されている。

## C. 結果

Real time RT-PCR 法にて、TSP-1 mRNA の発現を検討したところ、100 nM の Ang II 刺激により TSP-1 mRNA は 3 時間後から発現が亢進し、6 時間で最大となった(図 1)。6 時間における 1~100 nM の Ang II 刺激では、TSP-1 mRNA は容量依存性に発現が亢進した(図 2)。

Ang II 刺激 24 時間後の細胞溶解液中 TSP-1 を western blot(図 3)、培養上清中 TSP-1 を enzyme immunoassay で検出し、TSP-1 は蛋白レベルでも mRNA と同様に増加することを明らかにした(図 4、5)。

100 nM の Ang II 刺激による、細胞溶解液中および培養上清中 TSP-1 蛋

白の増加は、1  $\mu$  M の Ang II type 1 受容体拮抗薬(Valsartan)を添加することにより完全に抑制された(図 6、7)。

100 nM の Ang II 刺激による 24 時間後の培養上清中 TGF- $\beta$  は、活性型 TGF- $\beta$  および活性型と潜在型を合わせた total TGF- $\beta$  とともに高値を示した(図 8、9)。TSP-1 の特異的拮抗ペプチドを添加することにより、活性型 TGF- $\beta$  がコントロールと同程度まで低下し、TSP-1 が TGF- $\beta$  の活性化に関与していることを明らかにした(図 8)。

さらに、Ang II 刺激による TSP-1 蛋白の増加に extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2、p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) および p46/p54 c-Jun N-terminal kinase (JNK) の 3 種の MAPK が関与しているかを検討した。100 nM の Ang II 刺激により、ERK 1/2、p38 MAPK、p46 JNK は 5 分を最大としてリン酸化を亢進した(図 10、11、12)。

ERK1/2 系の阻害薬である PD98059 を 5~50  $\mu$  M 添加することにより、100 nM の Ang II 刺激による ERK 1/2 のリン酸化は有意に抑制されたが(図 13)、細胞溶解液中および培養上清中の TSP-1 蛋白の増加は抑制されなかった(図 14、15)。

p38 MAPK の阻害薬である SB203580 を 0.2~20  $\mu$  M 添加することにより、100 nM の Ang II 刺激による p38 MAPK のリン酸化は有意に抑制され(図 16)、細胞溶解液中および



培養上清中の TSP-1 蛋白の増加は有意に抑制された(図 17、18)。

JNK の阻害薬である SP600125 を 20  $\mu$  M 添加することにより、100 nM の Ang II 刺激による p46 JNK のリン酸化は有意に抑制され(図 19)、細胞溶解液中および培養上清中の TSP-1 蛋白の増加は有意に抑制された(図 20、21)。

#### D. 考察

本研究では、ヒト培養メサンギウム細胞において Ang II は Ang II type 1 受容体を介して TSP-1 mRNA の発現亢進および TSP-1 蛋白の増加を来たし、産生された TSP-1 が TGF- $\beta$  の活性化に関与していること、そして Ang II 刺激による TSP-1 の産生には p38 MAPK と p46 JNK のシグナル伝達に関与していることを明らかにした。

TSP-1 は type1 repeat と呼ばれるドメインを有しておりこのドメインが潜在型 TGF- $\beta$  に結合することにより TGF- $\beta$  活性化を来すとされている。本研究ではこの type1 repeat に拮抗するペプチドを使用して、Ang II 刺激による TGF- $\beta$  の活性化には TSP-1 が関与していることが判明した。また、TSP-1 によらない TGF- $\beta$  の活性化機序も存在していることも判明した。これは図 8 に示すようにコントロールにおいても TGF- $\beta$  の活性化は生じていることから推定される。しかしながら、どのようにして生じているのかは今後の検討を要する。

本研究では Ang II がどのような細

胞内情報伝達経路を経て産生を促進するのも検討した。我々が検討した ERK 1/2、p38 MAPK、JNK は増殖因子やストレスを細胞膜表面から核内へ伝達するセリン/スレオニンキナーゼである。Ang II 刺激はメサンギウム細胞や血管平滑筋細胞において、これらのキナーゼを介して細胞増殖あるいは細胞肥大を生じることが報告されている。しかしながら、TSP-1 とこれらのキナーゼの関連は未だ報告が少ない。我々の検討で、Ang II 刺激による TSP-1 の産生には ERK 1/2 は関与せず、p38 MAPK と p46 JNK のシグナル伝達に関与していることが判明した。ただし p38 MAPK と p46 JNK が TSP-1 の転写促進を来しているのか、転写後の蛋白翻訳過程で機能しているのかは今後の検討を要する。

#### E. 結論

ヒト培養メサンギウム細胞において Ang II は Ang II type 1 受容体を介して TSP-1 mRNA の発現亢進および TSP-1 蛋白の増加を来たし、産生された TSP-1 が TGF- $\beta$  の活性化に関与していること、そして Ang II 刺激による TSP-1 の産生には p38 MAPK と p46 JNK のシグナル伝達に関与していることを明らかにした。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

## G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

## H. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Nakashima A, Yorioka N, Doi S, Ueda C, Usui K, Shigemoto K, Harada S: Radial bone mineral density in hemodialysis patients with adynamic bone disease. *The International Journal of Artificial Organs*, 26:200-204, 2003

2) Nakashima A, Yorioka N, Tanji C, Asakimori Y, Ago R, Usui K, Shigemoto K, Harada S: Bone mineral density may be related to atherosclerosis in hemodialysis patients. *Osteoporos Int*, 14:369-373, 2003

3) Ota K, Akiba T, Nakano T, Nakayama M, Maeba T, Park M.S, Trancoes A, Yorioka N, and the Icodextrin Study Group: Peritoneal ultrafiltration and serum icodextrin concentration during dialysis with 7.5% icodextrin solution in Japanese patients. *Peritoneal Dialysis International*, 23:356-361, 2003

4) Asakimori Y, Yorioka N, Tanaka J, Kohno N: Effect of polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase and apolipoprotein E genes on carotid atherosclerosis in hemodialysis patients. *American Journal of Kidney Diseases*, 41:822-832, 2003

5) Ogata S, Yorioka N, Kiribayashi K, Naito T, Kuratsune M, Nishida Y: Viability of, and basic fibroblast growth factor secretion by, human peritoneal

mesothelial cells cultured with various components of peritoneal dialysis fluid. *Advances in Peritoneal Dialysis*, 19:2-5, 2003

6) Doi S, Yorioka N, Usui K, Shigemoto K, Harada S: Effect of 22-oxacalcitriol on secondary hyperparathyroidism in hemodialysis patients. *Internal Medicine*, 42:955-959, 2003

7) Nakashima A, Yorioka N, Asakimori Y, Ito T, Masaki T, Shigemoto K, Harada S: Different risk factors for the maximum and the mean carotid intima-media thickness in hemodialysis patients. *Internal Medicine*, 42:1095-1099, 2003.

8) Naito T, Masaki T, Nikolic-Paterson D.J., Tanji C, Yorioka N, Kohno N: Angiotensin II induces Thrombospondin-1 production in human mesangial cells via p38 MAPK and JNK: a mechanism for activation of latent TGF- $\beta$  1. *Am J Physiol Renal Physiol*, 286: F278-287, 2004.

### 2. 学会発表

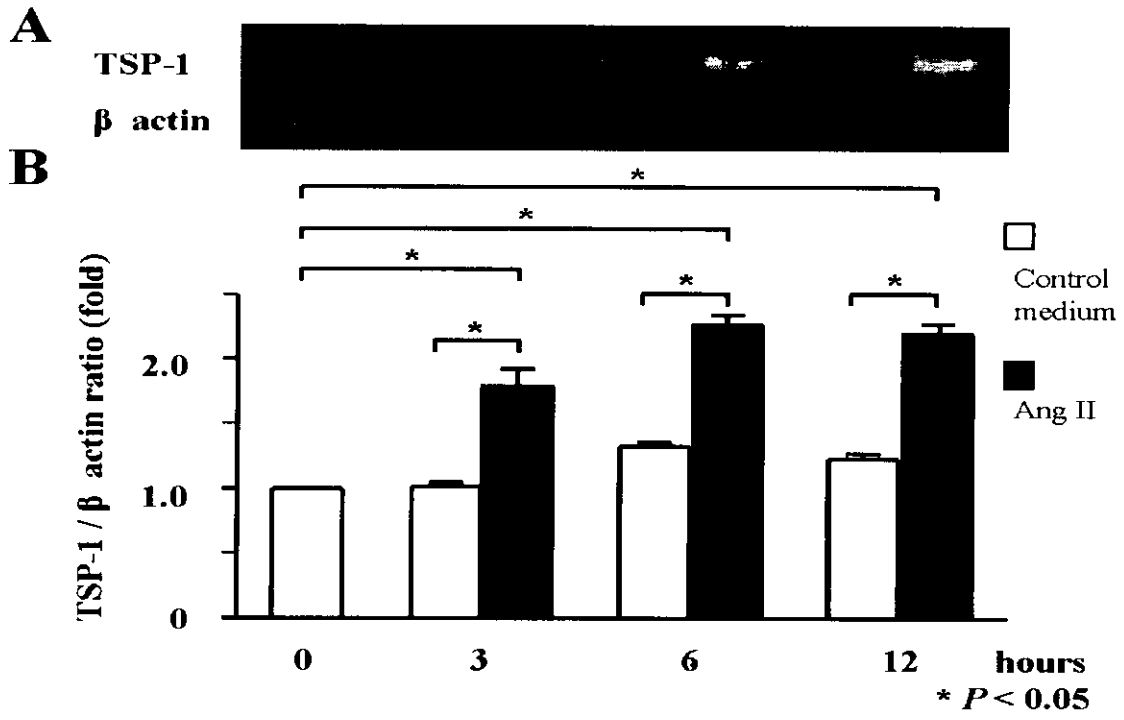
1) Ogata S, Yorioka N, Kohno N (2003-3): Viability and Basic Fibroblast Growth Factor Expression by Human Peritoneal Mesothelial Cells Cultured with Various Components of Peritoneal Dialysis Fluid. *The 23rd Annual Conference on Peritoneal Dialysis, Tronto.*

2) Naito T, Masaki T, Hirai T, Kuratsune M, Yorioka N, Kohno N (2003-5): Angiotensin II stimulates Thrombospondin-1 synthesis on cultured

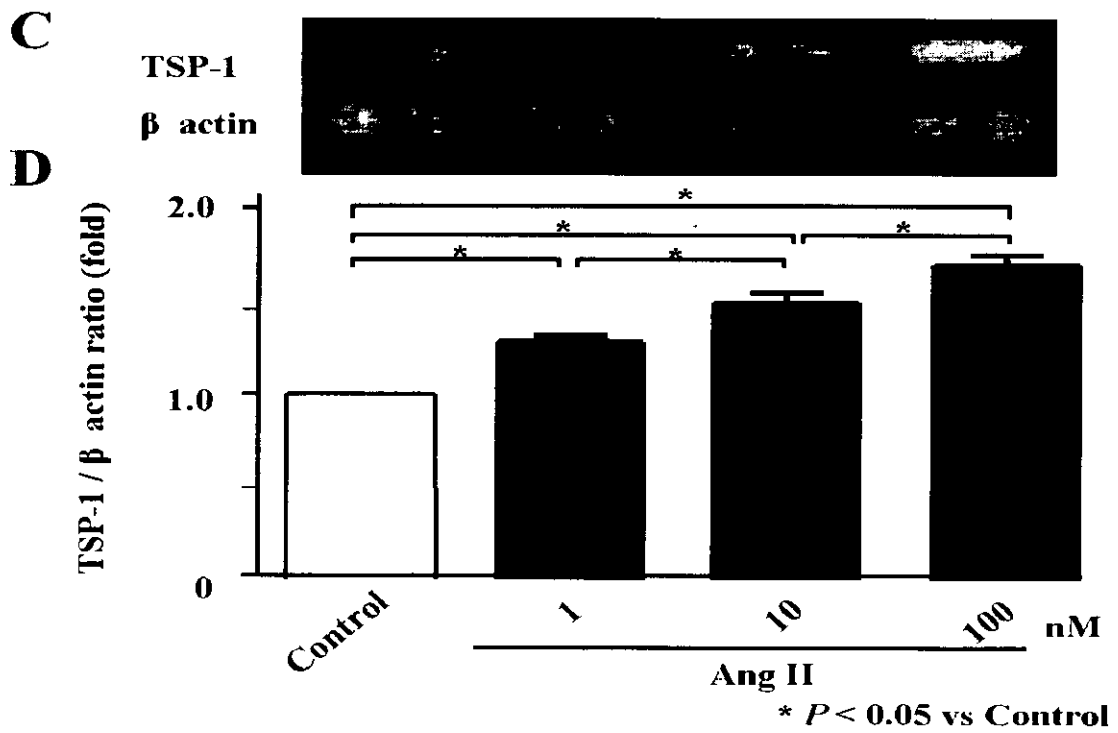
human mesangial cells. XXXXVI  
Congress of the Japanese Society of  
Nephrology, Tokyo.

3) Nakashima A, Yoriaki N, Doi S, Ueno  
T, Takasugi N(2003-11): Osteoprotegerin  
in hemodialysis patients with low-  
turnover bone disease. The ASN 36<sup>th</sup>  
Annual Meeting, San Diego.

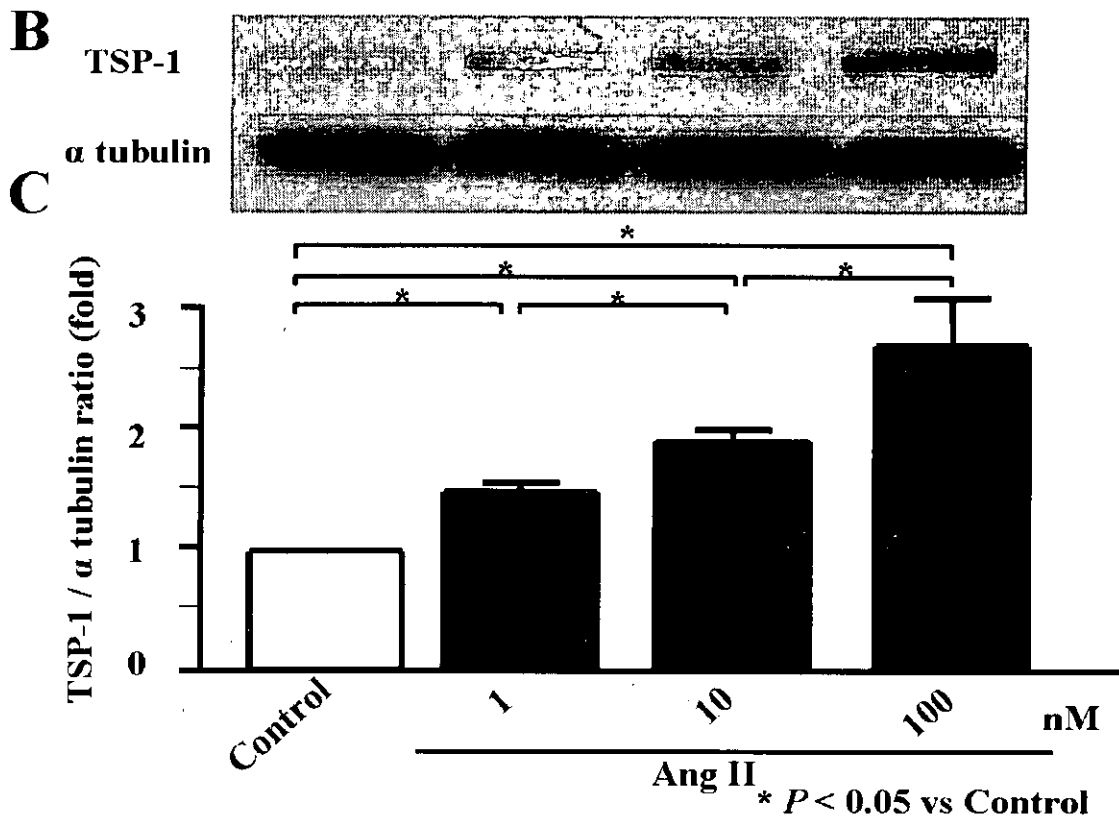
(图 1)



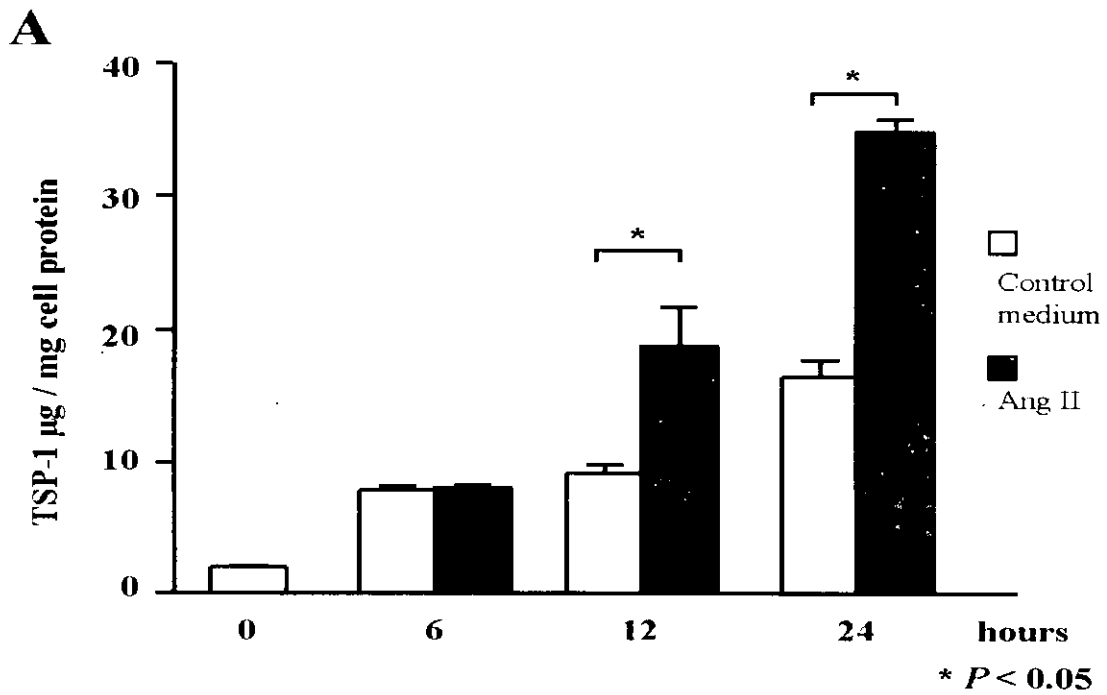
(图 2)



(图 3)

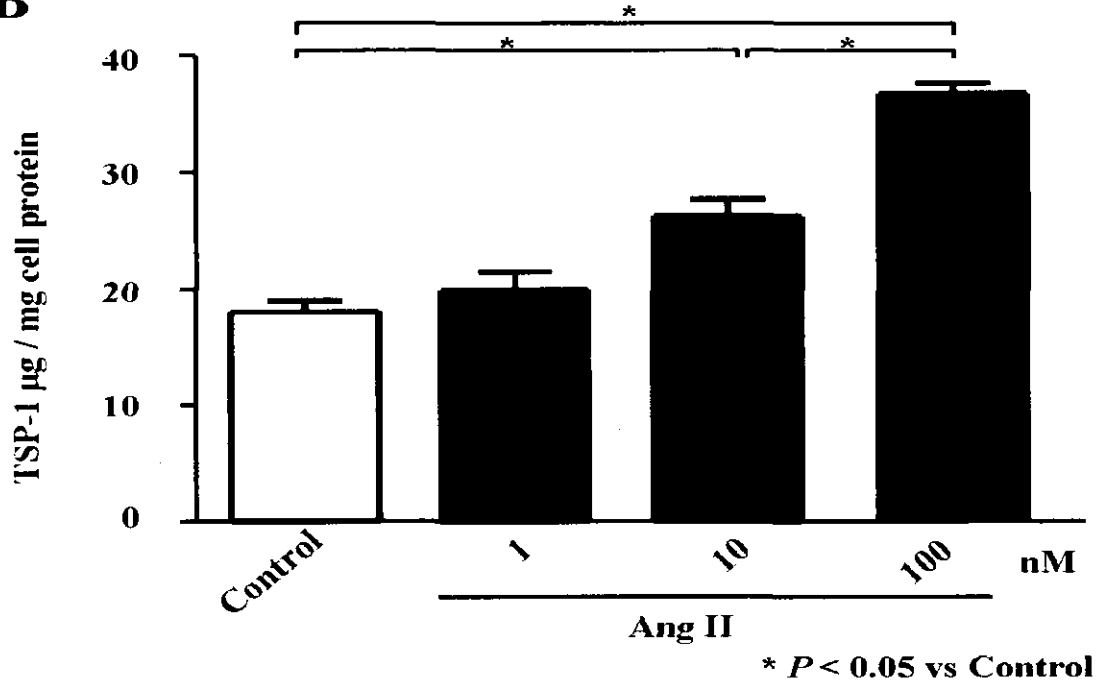


(图 4)



(图 5)

**B**

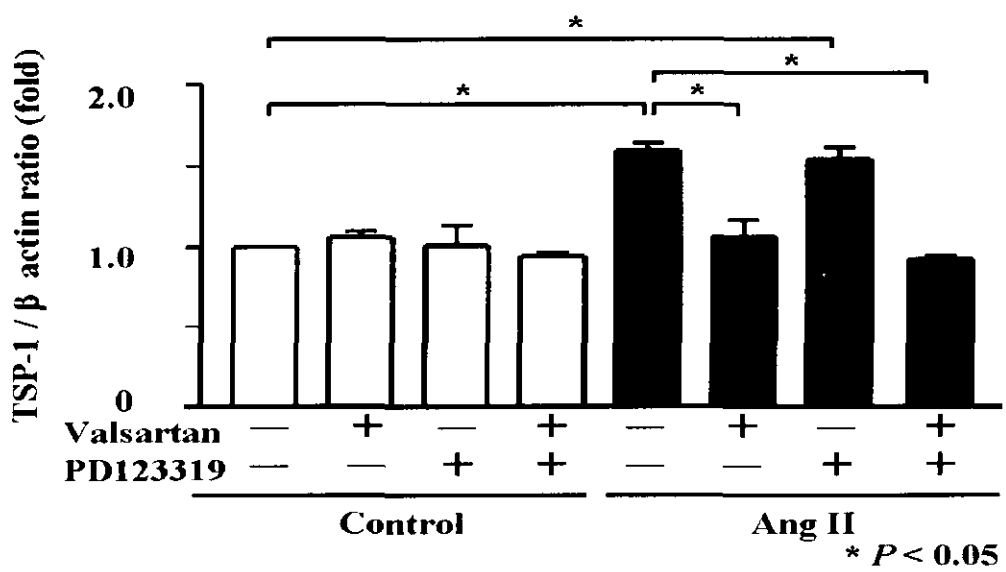


(图 6)

**A**

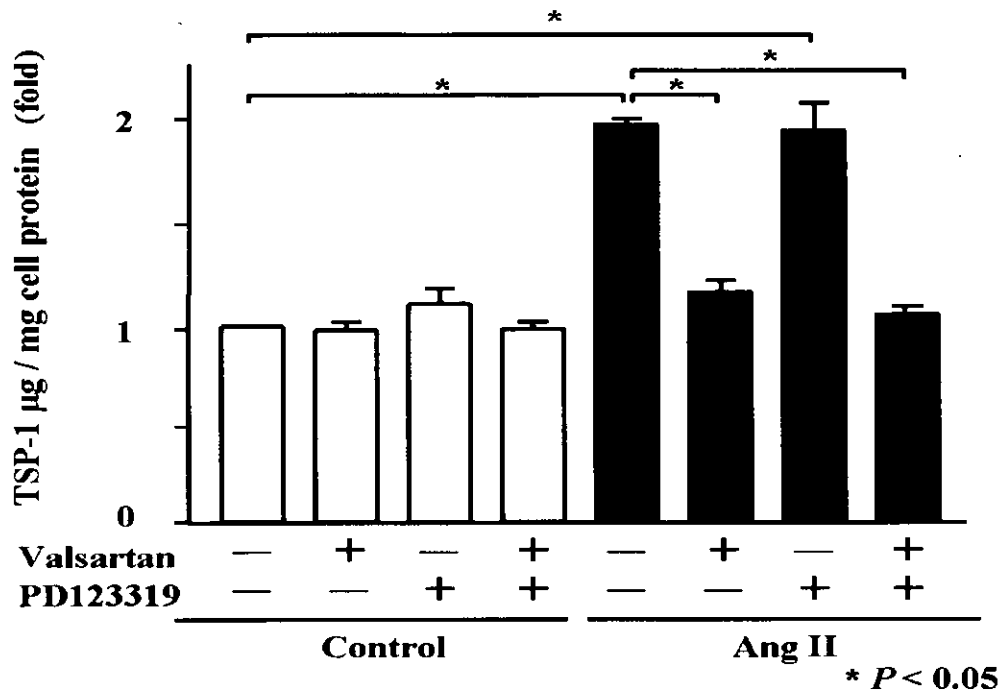


**B**



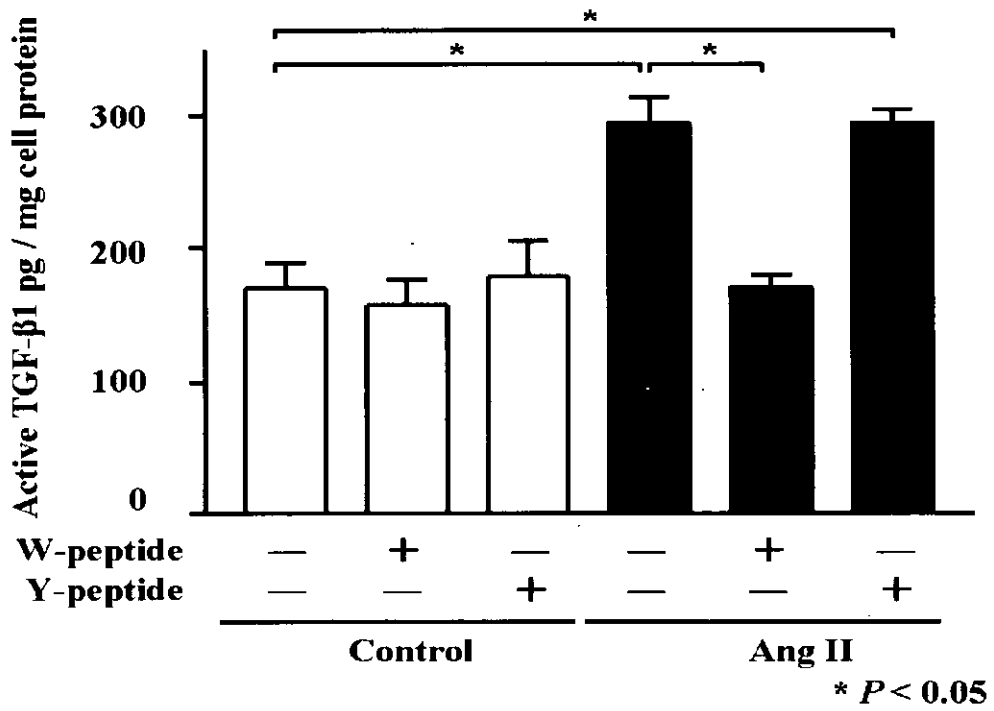
(图 7)

**E**



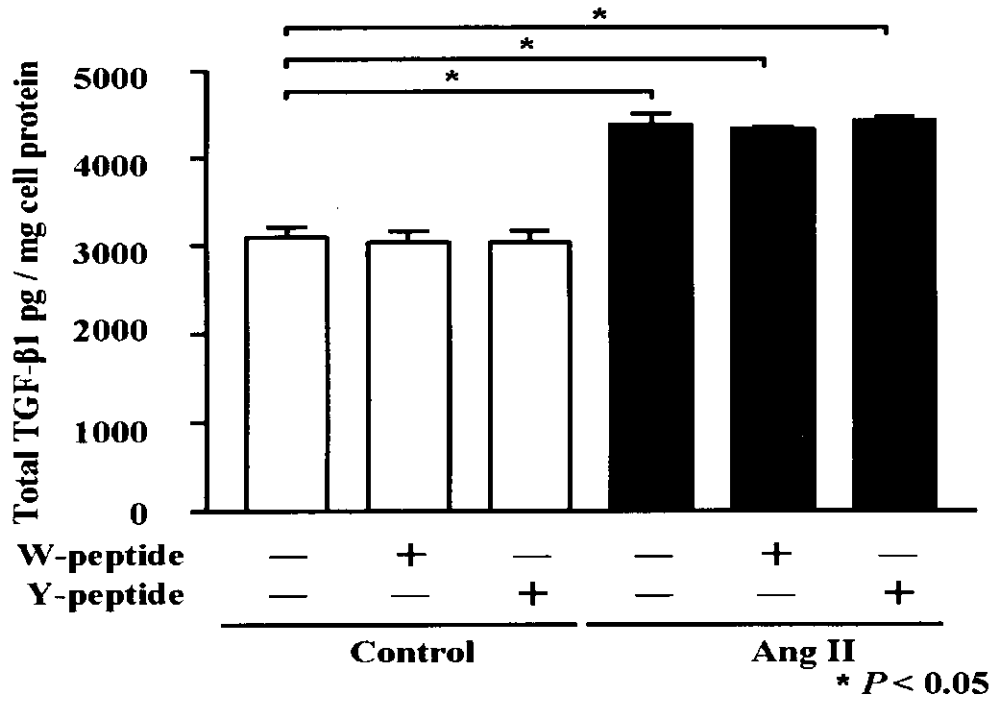
(图 8)

**B**



(图 9)

**A**

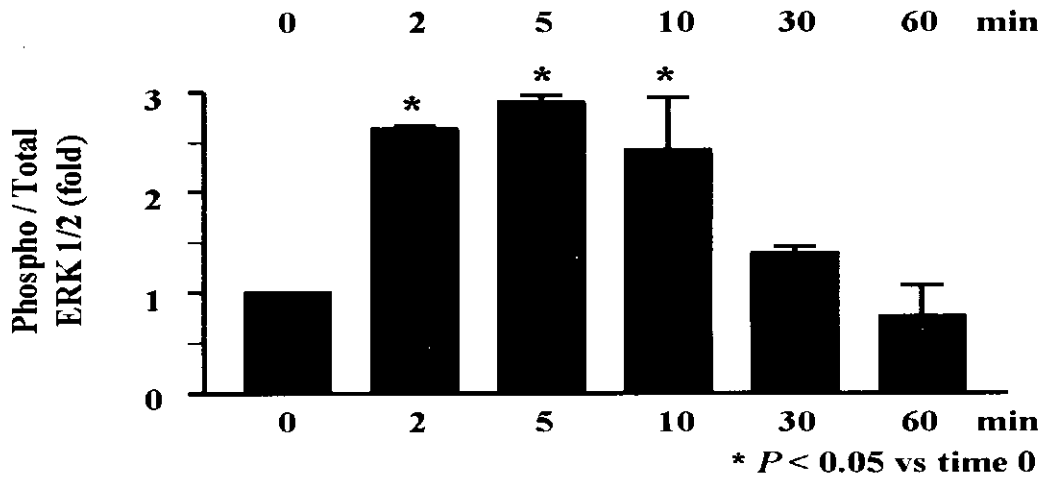


(图 10)

**A**



**B**





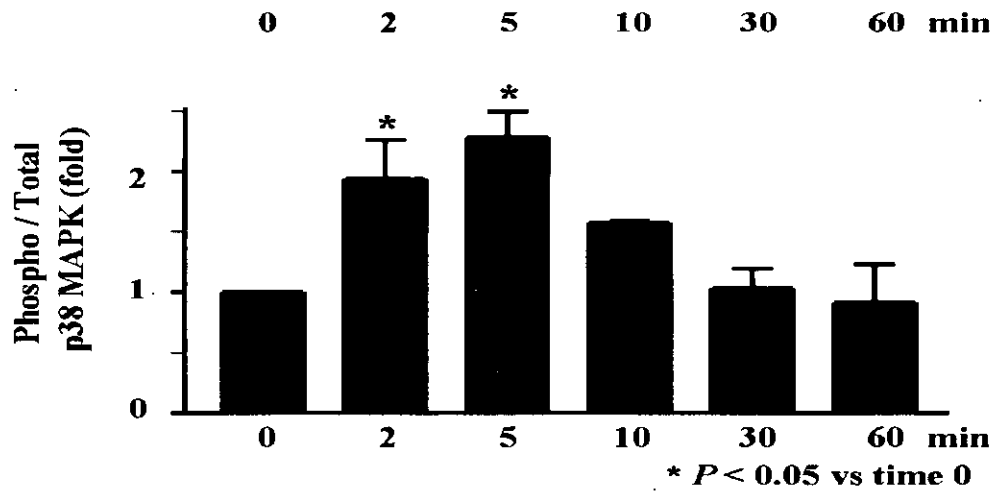
(图 11)

**C**

Phospho-p38 MAPK  
Total p38 MAPK



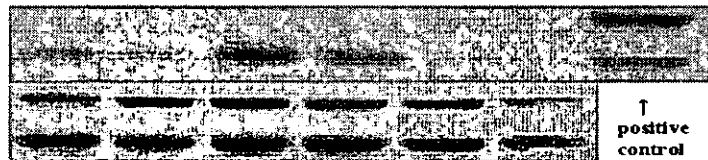
**D**



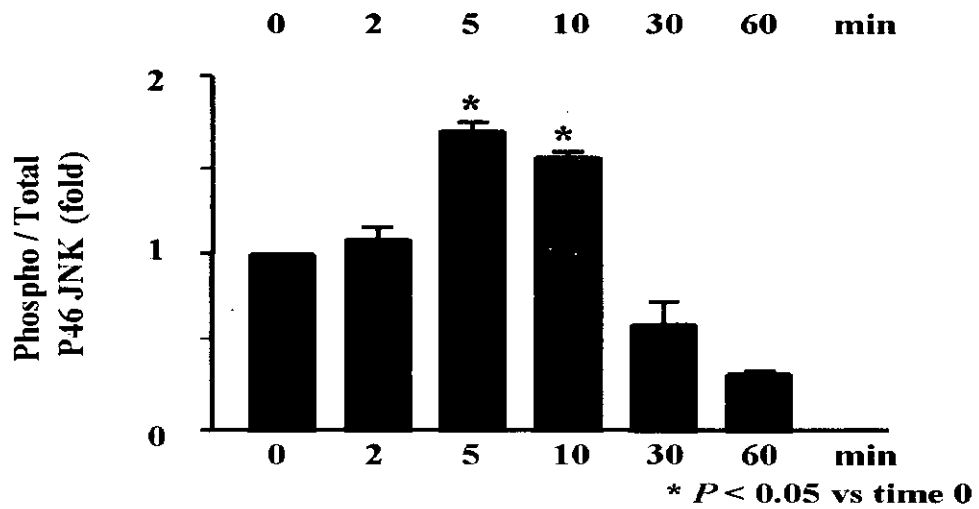
(图 12)

**E**

Phospho- p54 JNK  
Phospho- p46 JNK  
Total p54 JNK  
Total p46 JNK



**F**

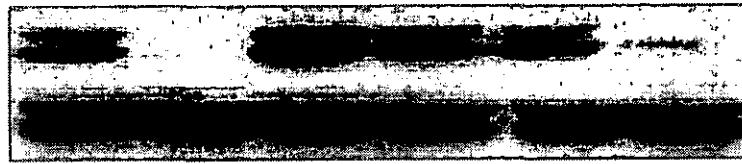


(☒ 13)

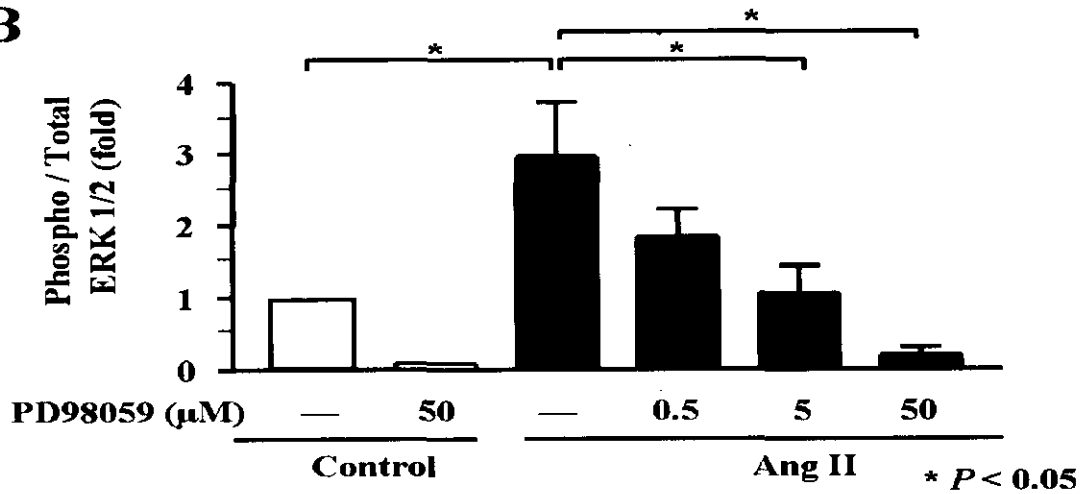
**A**

Phospho-ERK 1/2

Total ERK 1/2



**B**

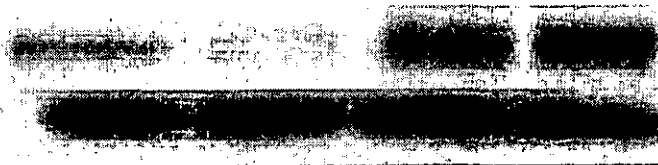


(☒ 14)

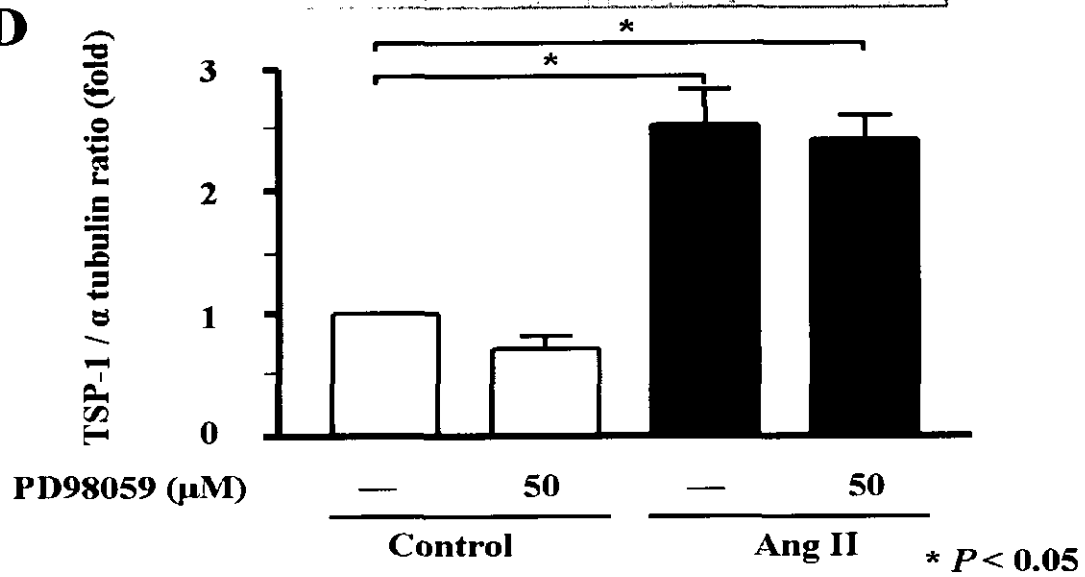
**C**

TSP-1

α tubulin

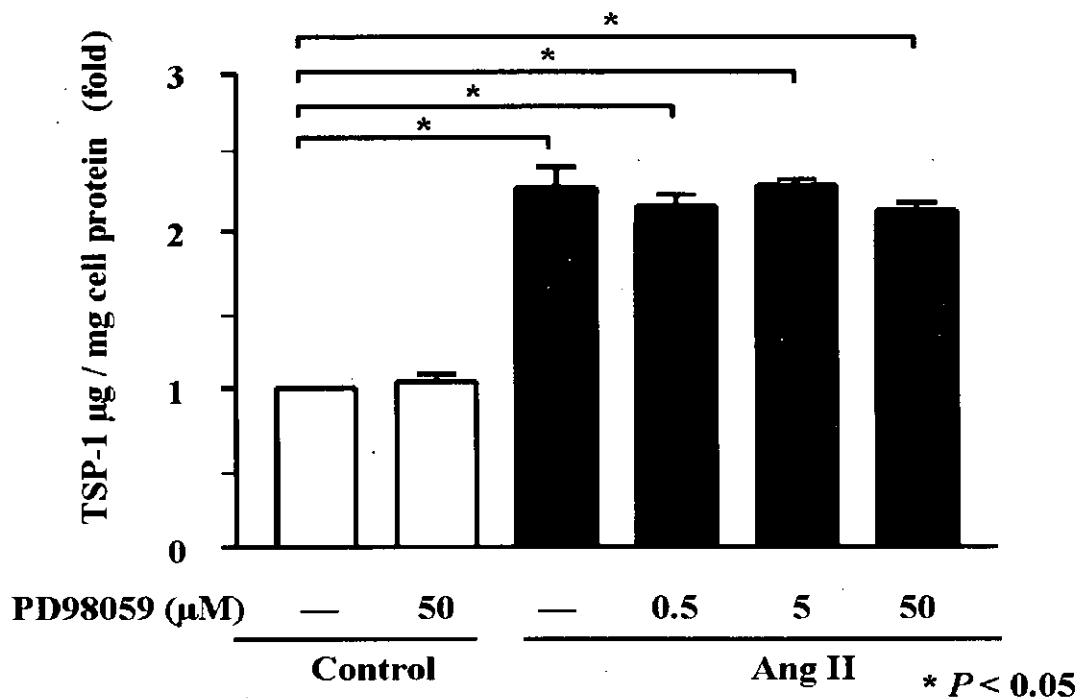


**D**



(图 15)

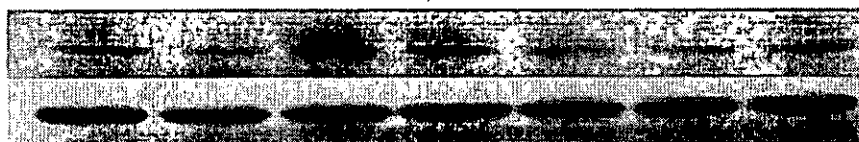
**E**



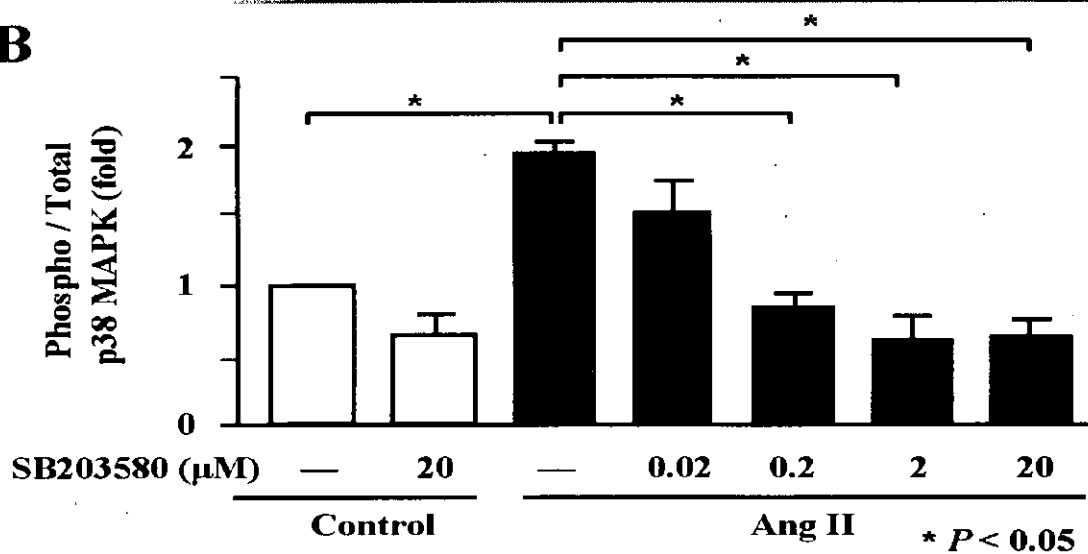
(图 16)

**A**

Phospho-p38  
MAPK  
Total p38  
MAPK



**B**



(☒ 17)

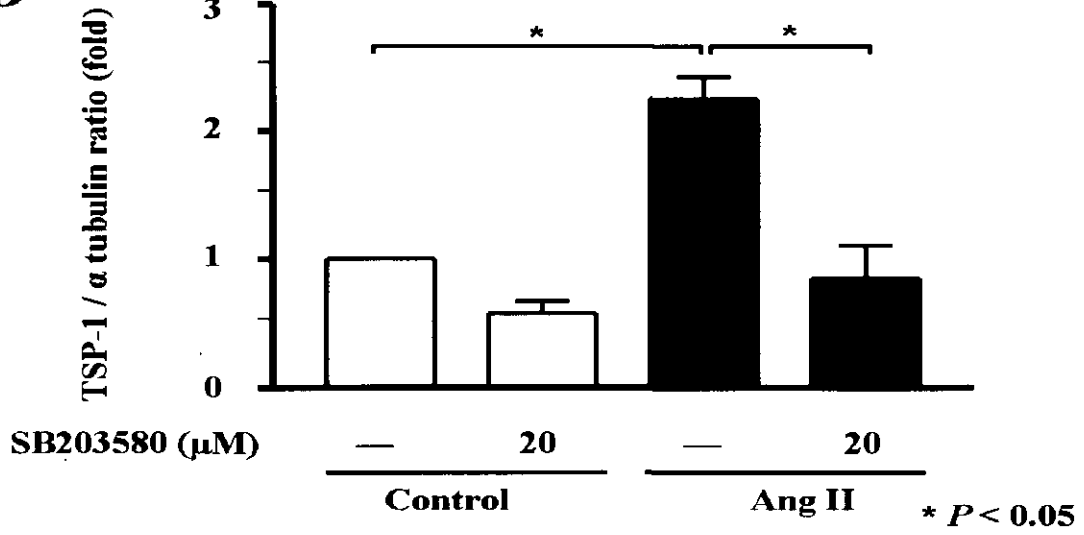
**C**

TSP-1

$\alpha$  tubulin



**D**



(☒ 18)

**E**

