

【トピックス】

老化促進モデルマウス (SAM) の促進老化・短寿命を規定する非同義置換の網羅的探索

谷澤 薫平<sup>1</sup>、田中 雅嗣<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 早稲田大学大学院 スポーツ科学研究科、<sup>2</sup> 東京都健康長寿医療センター 臨床検査科

1. はじめに

老化促進モデルマウス (SAM: Senescence-accelerated mouse) は京都大学胸部疾患研究所の竹田らによって確立された純系マウス系統群であり、促進老化・短寿命を特徴とする SAMP (Senescence prone) 系統と、正常老化を示す SAMR (Senescence resistant) 系統からなる [1]。SAMP 系統は促進老化・短寿命を示すのみならず、病理学的変化を基準とした選抜交配を経て、老化アミロイドーシス、骨粗鬆症、学習・記憶障害などの多様な老化病態を特徴とする亜系統が樹立されており (表1)、老化・寿命のメカニズムの解明あるいは、加齢に伴い発症する多様な病態の発症機序解明のために広く用いられてきた。

系統とは異なる多型を検出している [2]。また、Guo らは第5、6、19 染色体上に、SAMP1 と B10BR 系統の交雑仔において寿命と関連する領域を同定している [3]。しかし、SAMP の促進老化表現型に関連する遺伝子変異を同定するためには、マイクロサテライトマーカーを用いて特定した領域周辺数十 Mb から数百 Mb の塩基配列を詳細に決定する必要がある、いずれの研究においても原因遺伝子変異の同定には至っていない。また、系統特異的な老化病態を規定する遺伝子についても、候補遺伝子アプローチや連鎖解析による探索が行われてきたが、同定されたのは老化アミロイドーシスを規定する *Apoa2* と低骨量を規定する *Strp4* に限られているのが現状である [4, 5]。

表1 SAM 各系統の特徴的形質

SAMP1	老化アミロイドーシス、免疫機能不全、腎萎縮、聴覚障害、老年性肺過膨張
SAMP2	老化アミロイドーシス、免疫機能不全、腎萎縮
SAMP3	顎関節の変形性骨関節症、続発性アミロイドーシス
SAMP6	老年性骨粗鬆症、続発性アミロイドーシス、大腸炎
SAMP7	老化アミロイドーシス、胸腺腫
SAMP8	学習・記憶障害、免疫機能不全、概日リズムの異常
SAMP9	白内障、老化アミロイドーシス
SAMP10	脳萎縮を伴う学習・記憶障害、老化アミロイドーシス
SAMP11	老化アミロイドーシス、腎萎縮

SAM 研究協議会ホームページより引用 (<http://samrc.md.shinshu-u.ac.jp>)

SAM は AKR/J 系統と未知のマウス系統との不測の交雑が生じたマウスコロニーから、老化度評点・病理学的変化を基準とした選抜交配により確立された経緯より、未知系統に由来する遺伝子変異が促進老化・短寿命を規定すると推測されている。Xia らは、未知のマウス系統に由来し、促進老化と関連する染色体上の領域を明らかにするために、マイクロサテライトマーカーによる SAM 全系統のゲノムタイピングを行い、第14、16、17 染色体上において SAMP 全系統に共通であるが SAMR

このような状況を打開すべく、筆者らは疾患関連遺伝子の探索において近年大きな成果を挙げている解析手法である次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析に着目し、SAMP における促進老化・短寿命を規定する遺伝子変異群を探索した [6]。本稿では、エクソーム解析の方法論としての特徴を解説した後、エクソーム解析により検出された SAMP 特異的な遺伝子変異を紹介する。

2. 次世代シーケンサーの登場とエクソーム解析による疾患原因遺伝子の探索

次世代シーケンサーの登場は、ゲノム医学に革命をもたらした。従来のキャピラリーシーケンサーを用いて行われたヒトゲノム全塩基配列の決定には、10 年以上の歳月と 1000 億円以上の費用を要したが、次世代シーケンサーの性能向上により、2013 年末には解析時間

連絡先：(谷澤 薫平) 〒 173-0015  
 東京都板橋区栄町 35-2  
 TEL：03-3964-3241  
 FAX：03-3579-4776  
 E-mail：kunpei-tanisawa@fuji.waseda.jp

わずか1日、10万円の費用でヒトゲノム全塩基配列を決定することができると予測されている。エクソーム解析は、タンパク質をコードするエクソンのみをプローブで捕捉・増幅し、次世代シーケンサーにより迅速に塩基配列を決定する解析手法である。エクソンは全ゲノムの約1.5%を占めるに過ぎないが、疾患原因遺伝子変異の大多数はタンパク質のアミノ酸置換を伴う変異（非同義置換）であることが報告されている [7]。したがって、全ゲノム解析と比較して、エクソーム解析はコスト・労力の両面で未知の疾患関連遺伝子を探索するための効率的な手法であり、実際に、数多くの単一遺伝病の原因遺伝子がエクソーム解析により同定されている [8]。エクソーム解析は単一遺伝病の原因説明に対しては、最も効果的な解析手法であるが、①依然1サンプルあたりのコストが高い、②エラーが多くヘテロ接合の遺伝子変異の検出が難しい、という2つの弱点があるため、ヒトにおいて多因子遺伝性疾患の原因遺伝子を同定することは難しい。一方、SAMは純系マウスであるため、同系統のマウスを多数解析する必要がない上に、ホモ接合の遺伝子変異のみに焦点を絞ることができるため、エクソーム解析がSAMP系統における促進老化を規定する遺伝子変異群を同定するための有効な手段であると考えた。そこで、①全てのSAMP系統に共通する促進老化・短寿命は、全てのSAMP系統が共通に有し、SAMRおよびAKR/Jには存在しない新規非同義置換により規定される、②SAMPの各系統特異的な老化病態は、SAMPの各系統特異的な新規非同義置換により規定される、という仮説のもとSAMのエクソーム解析を行った。

### 3. 全てのSAMP系統は *Ogg1* と *Mbd4* に有害な非同義置換を有する

6系統のSAMP (SAMP1/SkuSlc, SAMP3/SlcIdr, SAMP6/TaSlc, SAMP8/TaSlc, SAMP10/TaSlc, SAMP11/SlcIdr)、3系統のSAMR (SAMR1/TaSlc, SAMR1/SlcIdr, SAMR3/SlcIdr)、およびAKR/J系統のDNAの全エクソン領域を増幅し、次世代シーケンサーにより塩基配列を決定した。得られた塩基配列とマウスゲノム参照配列 (C57BL/6J) を比較したところ、系統毎に約32000-38000個の塩基配列の相違 (Single nucleotide variation: SNV) が検出された。全てのSNVの内、過去に報告されていない新規非同義置換は230-491個検出された。この中から、SAMP系統に共通の促進老化・短寿命を規定し得る、SAMP全系統が有しSAMRとAKR/J系統には存在しない新規非同義置換を探索したが、驚くべきことにそのような新規非同義置換は一つも検出されなかった。そこで、SAMRとAKR/J系統には存在しないが、過去に他のマウス系統において確認されている非同義置換を含めて再度探索したところ、全てのSAMP系統に共通する非同義置換が7つ検出された (表2)。これらの非同義置換がタンパク質の機能に及ぼす影響を、非同義置換の機能予測プログラムであるSIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) とPolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) を用いて予測したところ、*Ogg1* p.R304W と *Mbd4* p.D129Nのみが機能に有害な影響を及ぼし得る変異であることが明らかとなった。

興味深いことに、*Ogg1* と *Mbd4* はいずれもDNAの

表2 全てのSAMP系統が有し、SAMRおよびAKR/J系統には存在しない非同義置換

Location	Gene symbol	Gene name	Nucleotide change	Amino acid change	SIFT score*	PolyPhen-2 score*	SNV carriers in 17 inbred strains of laboratory mice†
Chr6:113283636	<i>Ogg1</i>	8-oxoguanine DNA-glycosylase 1	c.1125C>T	p.R304W	0	0.999	NOD/ShiLJ
Chr6:115509985	<i>Tsen2</i>	tRNA splicing endonuclease 2 homolog (S. cerevisiae)	c.728C>T	p.P228L	0.32	0	129P2/OlaHsd, 129S1/SvImJ, 129S5SvEvBrd, DBA/2J, LP/J, NOD/ShiLJ, NZO/HILJ, WSB/Eij
Chr6:115799662	<i>Mbd4</i>	methyl-CpG binding domain protein 4	c.896C>T	p.D129N	0.12	0.996	129P2/OlaHsd, 129S1/SvImJ, 129S5SvEvBrd, DBA/2J, LP/J, NOD/ShiLJ, NZO/HILJ
Chr6:116186163	<i>D6Wsu116e (Fam21)</i>	DNA segment, Chr 6, Wayne State University 116, expressed (WASH complex subunit FAM21)	c.1737C>T	p.P556S	0.73	0.059	129P2/OlaHsd, 129S1/SvImJ, 129S5SvEvBrd, DBA/2J, LP/J, NOD/ShiLJ, NZO/HILJ
Chr6:116360826	<i>Alox5</i>	arachidonate 5-lipoxygenase	c.2040C>T	p.V646I	0.07	0	129P2/OlaHsd, 129S1/SvImJ, 129S5SvEvBrd, DBA/2J, LP/J, NOD/ShiLJ, NZO/HILJ
Chr10:24020000	<i>Moxd1</i>	monooxygenase, DBH-like 1	c.1634G>A	p.R516K	1	0	NOD/ShiLJ, WSB/Eij
Chr10:24021342	<i>Moxd1</i>	monooxygenase, DBH-like 1	c.1836A>C	p.K583N	0.39	0.006	NOD/ShiLJ, WSB/Eij

\*SIFT score: 非同義置換がタンパク質の機能に及ぼす影響が大きい程、スコアが0に近づく

\*PolyPhen-2 score: 非同義置換がタンパク質の機能に及ぼす影響が大きい程、スコアが1に近づく

†全ゲノムが解読されている純系マウス17系統の内、上記の非同義置換を有する系統を記載した

ミスマッチ修復に関与する遺伝子であった。Ogg1 (8-oxoguanine DNA glycosylase) は、グアニンの酸化損傷により生じ、突然点変異の原因となる 8-オキシグアニン (8-oxoG) を除去する酵素である [9]。Mbd4 (Methyl-CpG-binding domain protein 4) は、メチル CpG 結合領域を有し、5 メチルシトシンの変異により生じる G-T ミスマッチを修復する酵素である [10]。SAMP における *Ogg1* p.R304W は、2001 年に Mori らにより同定されている変異であった [11]。Mori らは、R304W 変異により *Ogg1* の活性が喪失し、核 DNA 中の 8-oxoG は増加することを明らかにしているが、SAMP1 と B10.BR 系統の交雑子において、この変異の有無は寿命に影響を及ぼさないことを報告している。また、*Ogg1* ノックアウトマウスの寿命は wild type と比較して変わらないことが報告されており [12]、*Ogg1* の機能が喪失するだけでは老化速度・寿命には影響が及ぼさないことが示唆されている。一方で、*Ogg1* に加え別の DNA 修復酵素をノックアウトしたマウスの寿命は短縮することが報告されている [13]。そこで、*Ogg1* p.R304W と *Mbd4* p.D129N の組み合わせにより SAMP の促進老化が規定されると仮定し、これら 2 つの変異を同時に有するマウス系統を探索したところ、SAMP 以外の系統では、NOD/ShiLtJ のみがこれら 2 つの変異を有していた。NOD/ShiLtJ 系統は一型糖尿病を自然発症し、通常飼育した場合の寿命は 8 ヶ月と短命であるが、NOD/ShiLtJ 系統における短寿命の原因は一型糖尿病であるため、*Ogg1* p.R304W と *Mbd4* p.D129N が促進老化・短寿命に関与するとは判断できない。しかしながら、*Ogg1* をはじめとする DNA 修復に関与する遺伝子の変異は、癌や 2 型糖尿病をはじめとする多様な疾患との関連が報告されている他、老化の体細

胞変異説も老化学説として広く受け入れられており、今後、SAMP における促進老化および各種老化病態の発症における *Ogg1* p.R304W と *Mbd4* p.D129N の役割の解明が期待される。

#### 4. いくつかの SAMP 系統は変性疾患に関与する遺伝子に有害な変異を有する

次に、いずれかの SAMP 系統が特異的に有し、SAMR と AKR/J 系統にはない新規非同義置換は探索したところ、130 個の新規非同義置換が検出された。その中でも機能的に有害な変異が SAMP の表現型を規定すると仮定し、非同義置換がタンパク質の機能に及ぼす影響を SIFT と PolyPhen-2 を用いて解析したところ、130 個のうち 31 個が有害な変異であると判定された (表 3)。興味深いことに、複数の SAMP 系統が、変性疾患との関連が報告されている遺伝子 (*Prx*, *Ldb3*, *Gja3*) に有害変異を有することが明らかとなった。SAMP3/SlcIdr, SAMP10/TaSlc および SAMP11/SlcIdr において *Prx* p.R167C 変異が検出された。*Prx* (periaxin) は、神経線維のミエリン (髄鞘) 形成に必須のタンパク質であり、ヒトにおいて *Prx* 遺伝子の欠損は遺伝性ニューロパチーの原因である [14]。また、SAMP8/TaSlc 以外の 5 系統で *Ldb3* p.R473W 変異が検出された。*Ldb3* (LIM domain-binding protein 3) は筋線維の Z 膜に存在するタンパク質であり、*Ldb3* 遺伝子の変異は遠位型ミオパチーの原因である [15]。SAMP の各系統において、これまでミオパチーやニューロパチーなどの遺伝性変性疾患は報告されていないが、加齢に伴う筋萎縮および筋力低下は SAMR 系統に比べて SAMP 系統で顕著に生じることから、*Prx* p.R167 と *Ldb3* p.R473W が SAMP にお

表3 いずれかの SAMP 系統が特異的に有し、SAMR および AKR/J 系統には存在しない有害な新規非同義置換

Location	Gene symbol	Gene name	Nucleotide change	Amino acid change	Strains	SIFT score	Polyphen-2 score
Chr14:35357289	<i>Ldb3</i>	LIM domain binding 3	c.1555G>A	p.R473W	SAMP1/SkuSlc, SAMP3/SlcIdr, SAMP6/TaSlc, SAMP10/TaSlc, SAMP11/SlcIdr	0.02	0.968
Chr14:57654538	<i>Gja3</i>	gap junction protein, alpha 3	c.1427A>G	p.S405P	SAMP3/SlcIdr, SAMP6/TaSlc, SAMP10/TaSlc, SAMP11/SlcIdr	0.09	0.917
Chr7:28301176	<i>Prx</i>	periaxin	c.784C>T	p.R167C	SAMP3/SlcIdr, SAMP10/TaSlc, SAMP11/SlcIdr	0.01	0.998
Chr11:89958661	<i>The1a9h</i>	TBC1 domain family, member 9B	c.560T>C	p.S161P	SAMP3/SlcIdr, SAMP10/TaSlc	0	0.867
Chr11:70277672	<i>Zmynd15</i>	zinc finger, MYND-type containing 15	c.1859C>T	p.T461M	SAMP3/SlcIdr, SAMP10/TaSlc	0.05	N.A.
Chr18:37455608	<i>Pcdhb2</i>	protocadherin beta 2	c.1115G>A	p.G327R	SAMP10/TaSlc, SAMP11/SlcIdr	0	N.A.
Chr18:37495244	<i>Pcdhb6</i>	protocadherin beta 6	c.1563G>T	p.E521D	SAMP10/TaSlc, SAMP11/SlcIdr	0	N.A.
Chr16:85899510	<i>Adam5</i>	α disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif 5	c.1861C>T	p.A335T	SAMP1/SkuSlc	0	0.81
Chr1:156319580	<i>Cacna1e</i>	calcium channel, voltage-dependent, R type, alpha 1E subunit	c.2565C>T	p.G855D	SAMP3/SlcIdr	0	0.225
Chr3:135729385	<i>Bonk1</i>	B cell scaffold protein with ankyrin repeats 1	c.2157C>T	p.E684K	SAMP3/SlcIdr	0.13	0.946
Chr18:4181926	<i>Lysf1</i>	lysine-like 1	c.542A>G	p.E134G	SAMP3/SlcIdr	0.01	0.173
Chr2:29947531	<i>Zdhhc12</i>	zinc finger, DHHC domain containing 12	c.381G>A	p.R112C	SAMP6/TaSlc	0	0.999
Chr2:31793494	<i>Lame3</i>	laminin gamma 3	c.4202A>G	p.D1310G	SAMP6/TaSlc	0.05	0.399
Chr7:132719753	<i>Il4ra</i>	interleukin 4 receptor, alpha	c.1860delC	p.S540fs	SAMP6/TaSlc	N.A.	N.A.
Chr10:79474903	<i>Abca7</i>	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 7	c.5477G>A	p.R1826H	SAMP6/TaSlc	0.01	0.108
Chr15:99998371	<i>Dip2b</i>	DIP2 disco-interacting protein 2 homolog B	c.1708G>A	p.A544T	SAMP6/TaSlc	0.05	0.17
Chr17:25257897	<i>Pex4</i>	pentraxin 4	c.176A>T	p.R34S	SAMP6/TaSlc	0	0.999
Chr19:4153338	<i>Coro1b</i>	coronin, actin-binding protein 1B	c.1253C>T	p.R393W	SAMP6/TaSlc	0	0.996
Chr2:60190230	<i>Lys75</i>	lymphocyte antigen 75	c.1657G>A	p.R553W	SAMP8/TaSlc	0.02	0.997
Chr5:75023400	<i>Lnx1</i>	ligand of numb-protein X 1	c.685T>A	p.N154Y	SAMP8/TaSlc	0	0.318
Chr15:34358663	<i>Mam2</i>	matrilin 2	c.2668C>T	p.A806Y	SAMP8/TaSlc	0.01	0.717
Chr16:14195230	<i>Myl11</i>	myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle	c.5938C>T	p.R1945H	SAMP8/TaSlc	0.17	0.99
Chr16:17506416	<i>Aifm3</i>	apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 3	c.1966G>T	p.K582N	SAMP8/TaSlc	0.01	0.879
Chr3:90262277	<i>Npr1</i>	natriuretic peptide receptor 1	c.2253C>T	p.M630I	SAMP10/TaSlc	0.03	0.939
Chr5:144785328	<i>Ocm</i>	oncomodulin	c.292G>A	p.Q55X	SAMP10/TaSlc	N.A.	N.A.
Chr8:71328857	<i>Ints10</i>	integrator complex subunit 10	c.875G>T	p.C270F	SAMP10/TaSlc	0.07	0.997
Chr11:51407434	<i>Aget2</i>	alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 2	c.782G>A	p.G240R	SAMP10/TaSlc	0	1
Chr7:10567464	<i>Usp1715</i>	Ubiquitin-specific peptidase 17-like 5	c.1473G>A	p.R484I	SAMP11/SlcIdr	0.08	1
Chr10:56108313	<i>Gja1</i>	gap junction protein, alpha 1	c.1044G>C	p.G321R	SAMP11/SlcIdr	0.2	1
Chr11:120650978	<i>Dna11</i>	dihydropyridine synthase 1-like	c.1742A>C	p.D427E	SAMP11/SlcIdr	0.02	0.999
Chr13:67393777	<i>Zfp457</i>	Zinc-finger protein 457	c.1726A>G	p.Y557H	SAMP11/SlcIdr	0.02	N.A.

る骨格筋の加齢変化に及ぼす影響の解明が期待される。また、骨粗鬆症を特徴とする SAMP6/TaSlc において、*Il4ra* (interleukin 4 receptor alpha) のフレームシフト変異が検出された。*Il4ra* のリガンドである IL-4 (interleukin 4) は免疫調節に関わるのみならず、破骨細胞の分化を抑制することにより骨量減少を抑制する作用を持つことが報告されている [16]。*Il4ra* の機能欠損により、IL-4 の骨吸収抑制作用が得られず、SAMP6 において骨量減少が生じる可能性がある。以上、SAMP 系統の表現型に影響を及ぼし得る遺伝子変異をピックアップし紹介したが、今後、機能解析やコンジェニック系統の作成により、それぞれの変異が SAMP の促進老化・各種老化状態に及ぼす影響が解明されることが望まれる。

## 5. おわりに

筆者らは、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析により、SAM の全エクソン塩基配列を明らかにした。SAMP 系統における各種老化病態を規定し得る新たな候補遺伝子変異をリストアップすることに成功したが、一方で、全ての SAMP 系統に共通し、他の系統に存在しない新規非同義置換は検出されなかった。筆者らは、エクソーム解析のみならず、CGH (Comparative Genomic Hybridization) アレイによる、SAMP 系統のゲノム構造変異の探索を開始している。さらに詳細に SAM の遺伝背景の全貌を明らかにし、全ての SAMP 系統に共通する促進老化の原因遺伝子を同定したいと考えている。筆者らの研究が、SAM における促進老化・短寿命の遺伝メカニズムの解明、および老化の本質的なメカニズムの理解の一助となることを期待し、本稿の結びとしたい。

## 引用文献

1. Takeda T, Hosokawa M and Higuchi K. Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of senescence. *Exp Gerontol* 32(1-2):105-109, 1997.
2. Xia C, Higuchi K, Shimizu M et al. Genetic typing of the senescence-accelerated mouse (SAM) strains with microsatellite markers. *Mamm Genome* 10(3):235-238, 1999.
3. Guo Z, Toichi E, Hosono M et al. Genetic analysis of lifespan in hybrid progeny derived from the SAMPI mouse strain with accelerated senescence. *Mech Ageing Dev* 118(1-2):35-44, 2000.
4. Higuchi K, Kitagawa K, Naiki H et al. Polymorphism of apolipoprotein A-II (apoA-II) among inbred strains of mice. Relationship between the molecular type of apoA-II and mouse senile amyloidosis. *Biochem J* 279 ( Pt 2):427-433, 1991.
5. Nakanishi R, Shimizu M, Mori M et al. Secreted frizzled-related protein 4 is a negative regulator of peak BMD in SAMP6 mice. *J Bone Miner Res* 21(11):1713-1721, 2006
6. Tanisawa K, Mikami E, Fuku N et al. Exome sequencing of senescence-accelerated mice (SAM) reveals deleterious mutations in degenerative disease-causing genes. *BMC Genomics* 14(1):248, 2013.
7. Stenson PD, Mort M, Ball EV et al. The Human Gene Mutation Database: 2008 update. *Genome Medicine* 1(1):13, 2009.
8. Ng SB, Buckingham KJ, Lee C et al. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet* 42(1):30-35, 2010.
9. Nash HM, Bruner SD, Scharer OD et al. Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. *Curr Biol* 6(8):968-980, 1996.
10. Hendrich B, Hardeland U, Ng HH et al. The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature* 401(6750):301-304, 1999.
11. Mori M, Toyokuni S, Kondo S et al. Spontaneous loss-of-function mutations of the 8-oxoguanine DNA glycosylase gene in mice and exploration of the possible implication of the gene in senescence. *Free Radic Biol Med* 30(10):1130-1136, 2001.
12. Klungland A, Rosewell I, Hollenbach S et al. Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(23):13300-13305, 1999.
13. Xie Y, Yang H, Cunanan C et al. Deficiencies in mouse *Myh* and *Ogg1* result in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the *K-ras* oncogene in lung tumors. *Cancer Res* 64(9):3096-3102, 2004.
14. Guilbot A, Williams A, Ravise N et al. A mutation in *periaxin* is responsible for CMT4F, an autosomal recessive form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Mol Genet* 10(4):415-421, 2001.
15. Selcen D and Engel AG. Mutations in *ZASP* define a novel form of muscular dystrophy in humans. *Ann Neurol* 57(2):269-276, 2005.
16. Mangashetti LS, Khapli SM and Wani MR. IL-4 inhibits bone-resorbing activity of mature osteoclasts by affecting NF-kappa B and Ca<sup>2+</sup> signaling. *J Immunol* 175(2):917-925, 2005.