カルデスモンのリン酸化と Cell Cycle

Rutgers University 松村文夫
山代茂子

One of the profound changes in cellular morphology which occur during mitosis is a massive alteration in the organization of the microfilament cytoskeleton. These changes, together with other mitotic events including nuclear membrane breakdown, chromosome condensation, and formation of mitotic spindles, are all induced by a single molecular complex called MPF, maturation promoting factor. We have demonstrated that cdc2 kinase, a catalytic subunit of MPF, phosphorylates nonmuscle caldesmon both *in vivo* and *in vitro*, which causes caldesmon to dissociate from microfilaments during mitosis. Our results suggest that cdc2 kinase directly controls microfilament re-organization during mitosis because caldesmon inhibits actomyosin ATPase.

Caldesmon/Microfilament/cdc2 kinase

分裂期の細胞は著しい形態変化を示す。培養細胞を例にとると、基質に接着しよく広がった間期の細胞が、分裂期には丸くなり、染色体形成、紡錘体形成、分裂溝形成などを示す。従来、研究の方向は、形態変化の観察に重点がおかれ、分裂時におこる現象の生化学的研究は、同調細胞を多量に集めることが難しいなどの理由で、ほとんど行われていなかった。ところが、1980年代後半に細胞周期を制御する蛋白質としてMPF (Maturation-Promoting Factor 又は, Mitosis-Promoting Factor), サイクリンと cdc 2 が同定されて、この方面の研究の糸口となった。この総説では、前半をマイクロフィラメント (以後 MF と略す) の構成成分であるカルデスモンの細胞周期に依存したリン酸化と、それに伴う細胞骨格の変化について、又後半に、P34^{cdc2} Kinase を中心として最近の話題について述べる。

分裂期の細胞の MF に

どのような生化学的变化が起こるか

培養細胞に於て、主にアクチン・ミオシン系からなる細胞骨格の構造を、間期と分裂期で形態的に比較すると、基質によく接着し、広がった間期の細胞では、ストレスファイバー (主に MF とミオシンを含む線維

の束) と呼ばれる構造が、蛍光抗体法で明確に観察できるのに対し、分裂時に、ストレスファイバーは消失し、細胞はまるくなり基質からはずれ易くなる (図 1)。MF が束になって基盤に接着している状態から、束がとけて MF がバラバラになった分裂時の状態への、はっきりした構造変化が如何にして生ずるかは、大変興味のある事である。この構造変化と対応して、どのような生化学的变化が起こるのか。この課題に取り組む第一歩として、我々は MF の構成成分をを比較した。

多量に集める事が大変な培養細胞、そのうちでも分裂細胞から物を取り出すことは易くない。筆者らは、トロポミオシンを含む MF を単離する方法をすでにみつづけていた¹⁾。この方法だと、短時間で少量の出発材料から MF の単離が可能である。間期、及び分裂期の細胞から単離した MF をゲル電気泳動で比較した結果

図 1. 蛍光抗体法で染めたラット胎児由来培養細胞。抗カルデスモン抗体で染色した A; 間期の細胞, B; 分裂期の細胞。

Phosphorylation of Caldesmon and Cell Cycle

Fumio MATSUMURA Shigeko YAMASHIRO

Department of Molecular Biology and Biochemistry, Rutgers University. (State University of New Jersey)

図2. 分裂期及び間期の細胞から単離したMF (A) と熱安定な蛋白質画分 (B) の電気泳動パターン。(A) 1, 分裂期の細胞のMF; 2, 分子量マーカー (上から200K, 117K, 94K, 68K, 43K, 30K, 21K, 14K); 3, 間期の細胞のMF。(B) 1, 分子量マーカー (Aと同じ); 2, 分裂期の細胞からの熱安定蛋白質; 3, 間期の細胞からの熱安定蛋白質。Cad カルデスモン; TM, トロポミオシン。細胞 (Ref 5 より転載)。REF-4 A, SV40-transformed ラット胎児由来培養細胞。

を図2Aに示す。分裂期から単離したMFでは、カルデスモンと呼ばれる蛋白質が、著しく減少していることがわかった。カルデスモンは、Kakiuchi, Sofue²⁾らによって初めて単離同定された蛋白質で、F-アクチンに結合し、その結合が Ca^{2+} 、カルモジュリンで制御される。そして平滑筋では高分子量タイプが、非筋細胞では低分子量タイプが主に発現されている。またこの蛋白質は、ミオシン、トロポミオシンともアフィニティーがあり、アクチンに結合するとトロポミオシンによって活性化されるアクチンミオシンATPaseを阻害する^{3), 4)}。話を分裂期のカルデスモンに戻そう。では分裂時に細胞内のカルデスモンの量が減少するのか、あるいは、カルデスモンの量は一定だがMFに結合していないのか、このことを確かめる実験を行った。幸いカルデスモンは熱に対し安定な蛋白質である。間期、分裂期の細胞を集めて、ホモジナイズした後、すぐ熱処理 (100℃, 10分間) を行った (図2B)。その結果カルデスモンは間期も分裂期も同じように存在し

ていた。従って分裂期には、MFから離れていると考えられる。その原因として、まず蛋白質が修飾された結果、はずれ易くなると予想して、最も可能性の高いリン酸化に的をしぼって実験を行った。

分裂期にカルデスモンはリン酸化されている

結論からいうと、カルデスモンは細胞周期に従って、主にP34^{cdc2} Kinaseによってリン酸化されて、MFからははずれ易くなっている⁵⁾。カルデスモンのリン酸化が間期及び分裂期の細胞のいずれの酵素画分で行われているかを調べると、両画分ともにカルデスモンをリン酸化はするが、活性は、分裂期の酵素画分が10倍以上高いことがわかった。そこでKinaseを同定するため、nocodazoleで14時間処理することにより、分裂期

図3. HeLa 分裂期細胞からカルデスモンキナーゼの分画。2種類のカルデスモンキナーゼがポリーレーリジンアガロースカラムクロマトグラフィーによって分離される。—□—□—□—, 蛋白の吸収; —○—○—○—, ヒストンH1を基質とした活性; —●—●—●—, カルデスモンを基質とした活性。

で止まった HeLa 細胞から, Kinase を部分精製した所, 図 3 に示すように 2 つのピークが, カルデスモンをリン酸化した. 後者のピークはカゼインを基質とし, ヘパリンでリン酸化が阻害されることからカゼイン II タイプ Kinase のようである. 一方ピーク I はヒストン H 1 を基質とし, 既に報告されている HeLa の P34^{cdc2} Kinase の溶出位置とよく一致する. ピーク II によるカルデスモンのリン酸化はアクチン結合能に影響しないが, ピーク I によるリン酸化でカルデスモンのアクチン結合能は著しく低下した. 上記の結果は, 細胞周期を制御する P34^{cdc2} Kinase が, MF の一構成成分であるカルデスモンを基質にしていることを示唆している.

一般にある蛋白質が生体内において P34^{cdc2} Kinase でリン酸化されたと結論するためには次の 3 点が重要である^{6),7)}. (1), 精製された Kinase 標本が, *in vitro* でその蛋白質をリン酸化すること. (2), *in vivo* のリン酸化 site が *in vitro* でリン酸化される事. (3), リン酸化によって何らかの生化学的性質の変化が検出できる事. (1)については, カエル卵から精製した P34^{cdc2} Kinase (Lohka 博士提供) でリン酸化された. 更に HeLa の P34^{cdc2} Kinase の C 末端ペプチドに対する抗体で Immunoprecipitation された酵素でもカルデスモンはリン酸化された. また HeLa の酵素画分を Immunoprecipitation させる時, 抗原に用いたペプチドを共存させたものでは, リン酸化が著しく低下した. 以上のことから, 我々は P34^{cdc2} Kinase がカルデスモンをリン酸化すると結論した⁸⁾. (2)については, 分裂期の細胞を³²P でラベルした後, 抗カルデスモン抗体を用いて単離精製したカルデスモンと, 前もって精製した間期のカルデスモンを P34^{cdc2} Kinase でリン酸化したものの 2 次元ペプチドマップを比較した (図 4). その結果, *in vitro* での site は *in vivo* の site と基本的にはよく一致していた. (3)については, 通常リン酸化は認められても, その生理的, 生化学的性質の変化をみつける事が困難な場合が多い. しかし, 我々の仕事の出発点が分裂時にカルデスモンが MF からはずれ易くなるということであった. それ故, リン酸化によってカルデスモンのアクチン結合能が落ちる事を *in vitro* で示せばよい. 間期の細胞のカルデスモンを *in vitro* で P34^{cdc2} Kinase によりリン酸化した場合, 図 5 a に示したように, 確かにリン酸化により, アクチン結合能は, リン酸化しなかったものに比べて低下している. カルデスモンは他の Kinase によってもリン酸化されるが, アクチン結合能には影響しない. またカルデス

図 4. リン酸化カルデスモンの 2 次元ペプチドマップ.

A; P34^{cdc2} Kinase により, *in vitro* でリン酸化したカルデスモン. B; 分離期の細胞を³²P で *in vivo* でラベルしたカルデスモン. C; *in vivo*, *in vitro* ラベルのリン酸化ペプチドを混合して同時に展開したもの. 各試料をトリプシン消化した後一次元で電気泳動, 二次元で薄層クロマトを行い, オーストラジオグラフィでリン酸化ペプチドを検出. *in vitro* リン酸化で 7 個の major (番号 1→7), 3 個の minor (X→Z) のスポットが検出され, そのうち 1 から 6 までの major と X→Z の minor のスポットはすべて *in vivo* のリン酸化ペプチドのスポットと対応した. *in vivo* のペプチドマップに検出される 3 つのスポット (a→b) は, *in vitro* で検出されないが, これらは他の Kinase によるリン酸化サイトかも知れない. (ref 8 より転載).

モンの, もう 1 つの重要な性質であるカルモジュリンとの結合能も又, リン酸化されることにより著しく低下していた. すでにカルデスモンの機能ドメインの研究は行われていて, アクチン結合 site そしてカルモジュリン結合 site は C-末端ペプチドの 25KD・(最近 11KD まで短縮された) にあることが知られている. リン酸化はこの C-末端におこっていることが NTCB (2-nitro-5-thiocyanatobenzoic acid) で切断する事

図5. リン酸化カルデスモンのNTCBによる切断(A)とアクチン結合性(B).

A; smCDM, 平滑筋カルデスモン. P34^{cdc2} Kinase によってリン酸化した smCDM のNTCB による切断. 1, 2, 切断前のカルデスモン; 3, 4, NTCB 切断後. nmCDM; 非筋細胞カルデスモン. P34^{cdc2} Kinase によるリン酸化 nmCDM のNTCB 切断. 5, 6; 切断前のカルデスモン; 7, 8, *in vitro* でリン酸化した後 NTCB 切断; 9, 10, 分裂期の細胞から精製したカルデスモンの NTCB 切断. 1, 3, 5, 7, 9, Coomassie blue 染色. 2, 4, 6, 8, 10, オートラジオグラフィー. +, -: NTCB による切断, 未処理を示す. 4, 8, 10のオートラジオグラフィーからC端を含むペプチド, C-term (C端側)と未分解 CDM (smCDM の場合, C+CTR (C端+center部)も含まれる)にリンが取りこまれている.

B, *in vitro* P34^{cdc2} Kinase により, リン酸化したカルデスモンのアクチン結合性. S; 上清, P; 沈殿. 1, 2, 5, 6, *in vitro* でリン酸化されたカルデスモン (+P) のアクチン結合. 3, 4, 7, 8, リン酸化されていないカルデスモン (-P) のアクチン結合. 1, 2, 3, 4, Coomassie blue 染色. 5, 6, 7, 8, 1~4 に対応したオートラジオグラフィー. P34^{cdc2} Kinase でリン酸化されたカルデスモンは, コントロールのリン酸化されていないカルデスモンに比べてアクチン結合性が低下している. (ref 8 より転載).

によって明らかになった(図5A). 分裂時のMFの構造を考える上で, カルデスモンのミオシンに対するアフィニティーはどう変るのか, これは今後に残された課題の1つである.

カルデスモンの P34^{cdc2} Kinase によるリン酸化の生理的意味

分裂期のカルデスモンのリン酸化がMF系に及ぼす影響を考えてみると, 1つはアクトミオシンの収縮に対する効果である. カルデスモンは *in vitro* の実験からアクトミオシンのATPaseを阻害する事が知られている. Ca²⁺-カルモジュリンはカルデスモンをアクチ

ンフィラメントから離す事により, この阻害効果を除く. これと同じ作用機作でリン酸化によるカルデスモンのアクチンフィラメントからの解離も, 「ATPase 阻害効果をなくす」と考えられる. もしそうだとすれば, カルデスモンの分裂細胞におけるリン酸化は, アクトミオシンの収縮を引き起こすことになり, この事は細胞が分裂期に丸くなる事や, また時間的なずれはあるものの, 分裂溝が収縮するメカニズムを理解するたすけになりそうである. (分裂溝の性質については, 引用(9)参照).

もう一つの考え方は, アクチンフィラメントの切断によるストレスファイバーの消失である. 我々は以前, カルデスモンが, トロポミオシンのアクチンフィラメントへの結合を強め, ゲルゾリンによる, アクチンフィラメント切断作用を阻害すると報告した⁽¹⁰⁾. カルデスモンがフィラメント上にないと, トロポミオシンのみでは, この阻害効果は著しく低下して, ゲルゾリンが働き易くなる. 従って, リン酸化によるカルデスモンのアクチンフィラメントからの解離は, ゲルゾリンによるMFの切断を引き起こすだろう. このような切断は, ストレスファイバーの消失を引き起こし, 細胞が丸くなることにつながると考えられる. また分裂溝は収縮と同時に少しずつ解離消滅する訳だが, この解離消滅過程にもゲルゾリン様蛋白質が関与している可能性は, 充分考えられる.

今後の研究

上記の生理的意味についての仮説を調べる手段として次のような実験を進めている. 我々は, すでに単離したカルデスモンの cDNA を利用して, site-directed mutagenesis でリン酸化 site を block したミュータント cDNA を細胞へトランスフェクションする. このミュータントカルデスモンは, 分裂期の細胞でも, リン酸化されずにMFに結合したままではある. この時の細胞に対する影響はどうか, 大変興味深く, 結果が待たれるところである.

細胞周期を支配する蛋白質郡

今まで述べた我々の研究は, 細胞周期を制御するMPEが直接, MFの形態変化に関与しているという事を, 強く示唆している. ここで細胞周期を支配する蛋白質郡について簡単に述べる.

P34^{cdc2} Kinase について

カエル卵とヒトデ卵を用いて1980年以前から, 卵成熟誘起ホルモンの作用を媒介する重要な物質として,

研究されてきた MPF (Maturation-Promoting factor)¹¹⁾ は、その後、それが真核細胞一般の分裂を促進する Mitosis promoting factor でもあることが明らかになった¹²⁾。また卵成熟とは独立に、分裂酵母を材料とした、遺伝学的手法によって、細胞周期を制御する遺伝子として、cdc 2 (Cell division cycle) 遺伝子産物が同定された¹³⁾。そしてこの cdc 2 遺伝子産物と MPF とは、細胞周期を制御する真核生物一般に共通な蛋白質である事が、抗体を用いた研究から判明した。細胞周期の研究に大きく貢献した酵母を用いた研究について少し述べる。進化上離れた所に位置する 2 種類の酵母、パン酵母 (budding Yeast) と *S. Pombe* を材料として、細胞周期のある時期の温度感受性株が単離された。Permissive Temp では正常に分裂するが、non-Permissive Temp では細胞周期のある時点で cycle を止めてしまう変異株である。そして分裂期で止まった温度感受性株から、分裂期を支配する分子量 34KD の蛋白質を code する遺伝子として、分裂酵母では cdc 2 と、またパン酵母では、cdc28 と命名された^{14), 15)}。両者とも蛋白質は、P34^{cdc2} と呼ばれていて、これは G 2 期→M 期の変換には、もちろん必須だが、その他にも、栄養飢餓状態におくと P34^{cdc2} Kinase 活性が減少し、細胞は DNA 合成期に入る前で止まってしまうことから、G 1 期→S 期の変換にも関与するといわれている。

P34^{cdc2} Kinase はどういう基質をリン酸化するか

はやくから基質として注目されたヒストン H 1 に加えて¹⁶⁾、今や 10 種以上の基質が報告されている。まず分裂時の核膜崩壊に重要なラミンである^{17)~19)}。ただし、ラミンのリン酸化は P34^{cdc2} Kinase によらず、S 6 Kinase によるという主張もある¹⁷⁾。またラミンのリン酸化により、ラミン抗体で核膜が染色されなくなる事からラミンが核膜からはずれている事は確かであるが、隔膜そのものは、残っている写真もある¹⁹⁾。従ってラミンリン酸化と核膜崩壊の話は、「まだ終らず、続くよ」というのが、実際に物を扱っている人の意見である。その他細胞骨格関係の基質としては、中間径線維のビメンチン²⁰⁾、MF 成分ではカルデスモンとミオシン軽鎖 (ミオシン軽鎖は、我々の条件ではリン酸化されなかった)、マイクロチューブル関係では、Map-2 が報告されている²¹⁾。他には PP60^{c-src}、Cyclin B、EF-1 β 、SV40 large T 抗原等が基質として報告されているが、その影響については、分かっていないものも多い^{6), 7)}。また G 1 期→S 期に重要と思われる基質として、RNA ポリメラーゼ II が上げられる^{6), 7)}

他に MPF の作用機作を考える上で気になる報告として、ヒトデの卵母細胞に P34^{cdc2} の conserved peptide (共通ペプチド) 16 残基を顕微注入すると、細胞内 Ca²⁺ の一過性の増加がみられたという²²⁾。これは Ca²⁺ 代謝のどこかに MPF がきいている可能性を示唆し、Ca²⁺-カルモジュリン依存性 Kinase が核膜消失に関与しているという最近の報告²³⁾とも関連しているようにみえるが詳しい事は、わからない。

一種の P34^{cdc2} Kinase はどうやって細胞の

S 期と M 期への導入を制御しているか

結論からいうと、答えは、わかっていない。これは P34^{cdc2} がどういう作用機構で細胞周期を制御するかという疑問でもあり、最も重要かつおもしろい所である。ところで今まで MPF と書いているが、これは実際 *in vivo* では catalytic Subunit の P34^{cdc2} Kinase と、regulatory Subunit として知られるサイクリンから成る MPF 複合体を意味している。

サイクリンは最初貝の卵、ウニ卵などで発見された。³⁵S-メチオニンのとり込みでその蛋白合成を調べると、S 期に合成が始まり、M 期に入る所で、その量が最高になり、M 期終了に際して消失してしまうという各分裂周期毎に合成、分解をくり返す蛋白として見出された。そして貝卵を材料とした場合 SDS・電気泳動でサイクリンは 57KD・56KD の 2 本のバンドに分かれ、サイクリン A、B と同定された。サイクリンの研究は、最初 P34^{cdc2} の研究とは全く独立に始まったが、この蛋白質が細胞周期に依存して P34^{cdc2} と複合体を形成する事から、一層強い関心呼び起こした。G 1 期では、P34^{cdc2} はリン酸化されておらず、分裂期に増加するタイプのサイクリンとは結合していない。またこの状態では、ヒストン H 1 を基質として調べる限り、Kinase 活性を P34^{cdc2} はもたない。G 1 期→S 期へと進むにつれて、P34^{cdc2} はセリン、スレオニン、チロシン残基がリン酸化され、サイクリンと結合した状態になる。このうち、チロシン残基が G 2 期において脱リン酸化される。この脱リン酸化は P34^{cdc2} の MPF 複合体形成、そしてまた Kinase 活性の発現を調節しているらしい。蛋白量が周期に依存して変るサイクリンに対し、一方の P34^{cdc2} の蛋白量は抗体で定量する限り、周期による変動はないといわれている。サイクリンも P34^{cdc2} も細胞周期により、リン酸化脱リン酸化を受け、細胞周期の各段階で互いの結合状態を変えていると思われる。ただ今の所では、結果が、数カ月で変わったりして混乱しているので詳細にふれなくて、最近非公式に言われている所では、8 種類ぐらいまで

のサイクリンがありそうで、細胞周期の各段階で異なるサイクリンが P34^{cdc2} と複合体を形成するらしい。そして結合するサイクリンにより、複合体は細胞内局在を変えたり、リン酸化する基質の特異性を変えたりしているのではないかという。これは、どのように P34^{cdc2} が細胞周期を制御するか考えた時の単なるモデルであり、サイクリンの研究は、周期の制御という点で重要であるにもかかわらず、その不安定さのために精製も成功していない。サイクリンの cDNA は単離され、構造決定も行われているので、将来は遺伝子工学的手法で、発現させた蛋白質を用いて、生化学的研究が進むものと期待される。

今後、細胞周期の研究発展の方向として、1つはサイクリン-P34^{cdc2} 複合体が周期を制御するメカニズム解明があげられる。次に、細胞の増殖分裂に欠くことのできない growth factor の作用とは、必ず signal transduction のどこかの過程で連結するはずであるから、この作用機作の解明も重要な問題である。また MPF によってひき起こされる細胞機能或は形態変化に関わる蛋白質と、その調節機構の解明も急速に進むと考えられる。

文 献

- 1) Matsumura, F., Yamashiro-Matsumura, S., Lin, J. J. C. (1983) *J. Biol. chem.*, **258**, 6636-6644
- 2) Sobue, K., Muramoto, M., Fujita, and Kakiuchi, S. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5652-5655
- 3) Hemric, M. E., Chalovich, J. M. (1988) *J. Biol. chem.*, **263**, 1878-1885
- 4) Lim, M. S., Walsh, M. P. (1986) *Biochem. J.*, **238**, 523-

530

- 5) Yamashiro, S., Yamakita, Y., Ishikawa, R., Matsumura, F. (1990) *Nature*, **344**, 675-678
- 6) Moreno, S., Nurse, P. (1990) *cell*, **61**, 549-551
- 7) Lewin, B. (1990) *cell*, **61**, 743-752
- 8) Yamashiro, S., Yamakita, Y., Hosoya, H., Matsumura, F. (1991) *Nature*, in press.
- 9) 馬淵一誠, 米村重信 (1989) 蛋白質, 核酸, 酵素, **34**, 1672-1679
- 10) Ishikawa, R., Yamashiro, S., Matsumura, F., (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 16764-16770
- 11) Kishimoto, T., Kuriyama, R., Kondo, H., Kanatani, H. (1982) *Exp. Cell Res.*, **137**, 121-126
- 12) Lohka, M., Hayes, M. K., Maller, J. L. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3009-3013
- 13) Hayles, J., Nurse, P. (1986) *J. Cell Sci.*, **Suppl.**, **4**, 155-170
- 14) Nurse, P., Bissett, Y. (1981) *Nature*, **292**, 558-560
- 15) Reed, S. (1980) *Genetics*, **95**, 561-577
- 16) Arion, D., Meijer, L., Brizuela, L., Beach, D. (1988) *Cell*, **55**, 371-378
- 17) Ward, G., Kirschner, M. W. (1990) *Cell*, **61**, 561-577
- 18) Heald, R., McKeon, F. (1990) *Cell*, **61**, 579-589
- 19) Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J. C., Nigg, E. A. (1990) *Cell*, **61**, 591-602
- 20) Chou, Y. -H., Bischott, J. R., Beach, D., Goldman, R. D. (1990) *Cell*, **62**, 1063-1071.
- 21) Erikson, E., Maller, J. L. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 19577-19582.
- 22) Picard, A., Cavadore, J. C., Lory, P., Bernengo, J. C., Ojeda, C., Doree, M. (1990) *Science*, **247**, 327-331
- 23) Baitinger, C., Alderson, J., Poenie, M., Schulman, H., Steinhardt, R. A. (1990) *J. Cell Biol.*, **111**, 1763-1773.

まつむら ふみお

現在: Associate Professor (Rutgers University)
以前: Cold Spring Harbor Laboratory. 基生研.
名古屋大学. 東京大学.

やましろう しげこ

現在: Research Assistant Professor (Rutgers University)
以前: Cold Spring Harbor Laboratory. 名古屋大学.
お茶の水女子大. 日立製作所中央研究所. 立教大学.

日本を離れて10年以上になりますが、今上記のような仕事が軌道に乗っています。USA で働いてみようと思う人、テーマを変えたい人がいましたら連絡して下さい。今は、Culture cell 中心ですが、他の系に移そうと思っています。蛋白から一応 DNA まで扱いますが、必要な技術は少し我慢すれば誰にでも身につきます。現在の専門や技術の有無は問いませんが意欲のある方を望みます。

連絡先: USA. 908-932-2838