

博士論文

単球・樹状細胞における結核菌ならびにその構成成分により発現変動される遺伝子群についての研究
ー新規リソソーム膜タンパク構成遺伝子の同定とその機能解析ー

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 大阪府立成人病センター

森脇 康博

目次

	頁
略語表	iii
序章	1
第1章 Differential display 法による BCG-CWS 発現変動遺伝子の解析	
1-1. 実験材料および試薬	4
1-2. 実験方法	6
1-3. 実験結果	12
1-3-1. Differentially expressed genes の同定	
1-3-2. DNA dot-blots 法による解析	
1-3-3. 発現変動遺伝子のパネル化	
1-3-4. GCAP2 の発現変動の確認および全長の推定	
1-3-5. GCAP2 と LITAF 遺伝子の同一性の検証	
1-3-6. 新規遺伝子産物、SIMPLE の同定	
1-3-7. SIMPLE、mRNA の組織分布と他刺激に対する応答の検証	
1-3-8. SIMPLE および TNF- α の転写における相関性の解析	
1-4. 考察	25
第2章 SIMPLE の生化学的解析および転写因子としての機能検討	
2-1. 実験材料および試薬	29
2-2. 実験方法	32
2-3. 実験結果	38
2-3-1. SIMPLE の motif 解析	
2-3-2. GFP による SIMPLE 細胞内局在の検討	
2-3-3. SIMPLE 抗体を用いた SIMPLE 細胞内局在の同定	
2-3-4. SIMPLE の膜統合および糖鎖修飾の検証	
2-3-5. SIMPLE のトポロジー解析	
2-3-6. SIMPLE の核および膜移行の確認	
2-3-7. EMSA 法による SIMPLE の転写因子としての解析	
2-4. 考察	51

第3章 DT40細胞を用いた SIMPLE 欠損細胞の作製、および表現系解析	
3-1. 実験材料および試薬	54
3-2. 実験方法	55
3-3. 実験結果	61
3-3-1. ニワトリ SIMPLE cDNA の単離	
3-3-2. cSIMPLE の組織分布および株化細胞における発現検討	
3-3-3. cSIMPLE genome 領域の cloning	
3-3-4. cSIMPLE 欠損 DT40 細胞の作製とその検証	
3-3-5. cSIMPLE 欠損における細胞周期および細胞増殖における影響	
3-3-6. ADR による cSIMPLE および p53 発現誘導の確認	
3-3-7. SIMPLE/PIG7 のアポトーシスへの関与	
3-4. 考察	71
終章	72
謝辞	73
参考文献	I

略語表

ADR	: adriamycin
APC	: antigen presenting cell
bp	: base pair
BPB	: bromophenol blue
BSA	: bovine serum albumin
BCG	: Bacillus Calmette-Guerin
CD	: cluster of differentiation
cDNA	: complementary DNA
cpm	: counts per minute
CTL	: cytotoxic T lymphocyte
CWS	: cell wall skelton
DC	: dendritic cell
DEPC	: diethylpyrocarbonate
DEX	: dexamethasone
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
D-PBS	: Dulbecco phosphate buffered saline
DTT	: 1,4-dithiothreitol
EDTA	: ethylenediaminetetraacetate
EET-1	: estrogen-enhanced transcript-1
EMSA	: electrophoretic mobility shift assay
ERE	: estrogen responsible element
EST	: expressed sequence tag
FACS	: fluorescence activated cell sorter
FCS	: fetal calf serum
FITC	: fluorescein isothiocyanate
GAPDH	: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GM-CSF	: granulocyte macrophage colony stimulating factor
HRP	: horseradish peroxidase
IAA	: iodoacetamide
Ig	: immunoglobulin
IL	: interleukin
LAMP	: lysosome associated membrane protein
LITAF	: LPS-induced TNF-alpha factor
LPS	: lipopolysaccharide
LRR	: leucine-rich repeat
mAb	: monoclonal antibody

MHC	: major histocompatibility complex
MOPS	: 3-(<i>N</i> -morpholino) propanesulfonic acid
mRNA	: messenger RNA
Ni-NTA	: nickel-nitrilotriacetic acid
NP-40	: Nonidet P-40
ORF	: open reading frame
pAb	: polyclonal antibody
PAMPs	: pathogen-associated molecular patterns
PAGE	: polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	: polymerase chain reaction
PIG7	: p53-induced gene-7
PGN	: peptidoglycan
PMA	: phorbol 12-myristate 13-acetate
PMSF	: phenylmethylsulfonyl fluoride
rpm	: rolling per minute
PRRs	: pattern recognition receptors
PVDF	: polyvinylidene difluoride
RACE	: rapid amplification of cDNA ends
ROS	: reactive oxygen species
RT	: reverse transcriptase
SDS	: sodium dodecyl sulfate
SIMPLE	: small integral membrane protein of lysosome/late endosome
SSC	: standard saline citrate
TIR	: Toll/IL-1 receptor
TNF- α	: tumor necrosis factor- α
TLR	: Toll-like receptor
Tris	: tris (hydroxymethyl) aminomethane
UV	: ultra violet
2-ME	: 2-Mercaptoethanol
3' UT	: 3' untranslated region

序章

ヒト免疫系における非自己の排除には、獲得免疫 (adoptive immunity) が最も重要な役割を果たしている。B 細胞や T 細胞に代表されるリンパ球を主とした獲得免疫は、抗原レセプターの遺伝子を体細胞レベルで再編成することにより、多種多様な異物由来のペプチド、抗原を認識する (1)。抗原を認識した CD8 陽性 T 細胞は、細胞傷害性 T 細胞 (Cytotoxic T lymphocyte :CTL) に成熟化し、パーフォリンやグランザイムといった細胞死誘導タンパクを分泌することで、B 細胞はプラズマ細胞に成熟化し、抗体を産生することで、抗原を有する異物の排除を行う。しかしながら、これら CTL やプラズマ細胞の誘導は抗原のみでは十分に発揮されない。

一方、実験動物を用いた抗体作製の際、抗原と共に結核菌の死菌を含む溶液、俗に言うアジュバントを同時に投与することで、効率良く抗体産生を誘導することは予てより知られていた。アジュバントは、リンパ球を直接活性化することができないにも関わらず、リンパ球の活性化を誘導する。この機構は長年の間、謎に包まれていたが、最近になり、アジュバントの標的細胞が抗原提示細胞 (Antigen presenting cell :APC) であることが明らかとなった。また、APC は、単球や樹状細胞 (Dendritic cell :DC) を代表とする基本免疫 (innate immunity) の主とした細胞であることから、獲得免疫の活性化は基本免疫の活性化により誘導されていると考えられた (1)。

基本免疫の活性化はアジュバントによって誘導されるが、近年、アジュバント様に基本免疫を活性化する、微生物に普遍的に存在する成分は PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) と位置付けられた (2)。PAMPs はその名の通り、微生物に特有の分子パターンで宿主には存在せず、また、微生物の生存に必須であることから変異することも稀である。代表的な PAMPs として、グラム陰性菌およびグラム陽性菌の細胞壁成分である Lipopolysaccharide (LPS) や Peptidoglycan (PGN)、RNA ウィルスの二本鎖 RNA、酵母細胞壁成分ザイモザンが挙げられる。基本免疫はこれら PAMPs を認識または貪食するレセプターとして germ line にコードされている PRRs (Pattern recognition receptors) を有する (2-3)。最近、貪食ではなく、シグナルに関与する PRRs として TLR (Toll like receptor) が同定され注目を集めている (3)。TLR は 1 型の膜タンパクで、細胞外領域に PAMPs の認識を行う LRR (Leucine-rich repeat domain、細胞内領域にシグナル伝達に必須の TIR (Toll/IL-1 receptor) domain を有する。これまでに、10 種類の TLR が単離されており、それぞれが LPS、PGN、2 本鎖 RNA といった PAMPs を認識することが報告されている (3)。TLR はこれら PAMPs を認識すると、主に転写因子である NF- κ B を活性化し、獲得免疫活性化に必要な、共刺激分子である CD80 および CD86、サイトカイン、抗原提示分子である MHC の発現を増強する。以上の知見をまとめると、これまで明らかでなかった、基本免疫による獲得免疫の活性化機構は、TLR を介した異物認識とそれに伴った基本免疫の活性化により説明できると考えられる。

癌細胞は、元は宿主由来の細胞であることから PAMPs を持たない。一方で、最近

の報告にあるように、腫瘍抗原は存在する (4)。従って、宿主が腫瘍免疫を成立することができないのは、獲得免疫が基本免疫による活性化誘導を受けない、つまり基本免疫が活性化されていないためであると考えられる (5)。この観点から、大阪府立成人病センターでは、アジュバントとして用いられている結核菌の、細胞壁骨格成分である BCG-CWS (Bacillus Calmette-Guerin Cell-wall skelton) を用いた癌切除患者に対する基本免疫療法を行っており、優位な予後経過が確認されている (6-7)。

BCG-CWS は Mycolic acid、Arabinogalactan、PGN を構成成分とし、これまでの解析により、その標的細胞は APC である単球や DC であることが明らかとなっている (8-9)。また、ノックアウトマウスの解析から、BCG-CWS は TLR-2 および-4 に認識されることが報告されている (9)。更に、BCG-CWS は未成熟型 DC (immature DC :iDC) を抗原提示能の高い成熟型 DC (mature DC :mDC) へと成熟化することも明らかとなっており、その成熟化は BCG-CWS により発現誘導されるサイトカイン、TNF- α のオートクライン作用に依存している (9)。以上の知見をまとめると、BCG-CWS による抗癌作用は、DC の TLR-2 および-4 を介した獲得免疫を活性化するための分子、共刺激分子である CD80 および CD86、抗原提示分子である MHC の発現誘導と、TNF- α の放出による自身の成熟化に伴った抗原提示能の増加で説明できる。しかし、BCG-CWS を用いた基本免疫療法には、腫瘍抗原は用いておらず、また PAMPs 全てに BCG-CWS に見られる抗腫瘍効果があるか不明である。つまり、BCG-CWS 特有の基本免疫活性化が、延いては獲得免疫活性化が誘起される分子が発現誘導されている可能性が考えられる。また、BCG-CWS は PGN 以外の成分により貪食されることが示唆されており (10)、そのレセプターを介した基本免疫活性化経路が存在する可能性も考えられる。これまでに、上述した可能性を検討すべく当研究室では、BCG-CWS によって発現変動する遺伝子群について、サブトラクション法および differential display 法により解析を行っており (5, 8)、幾つかの既知遺伝子および未知遺伝子の情報を得ることができている。しかし、それらの情報は BCG-CWS 刺激、24 時間後の変化を示すものであり、発現変動を受ける遺伝子は BCG-CWS により誘導される液性因子の影響、つまり BCG-CWS の二次的影響により発現変動を受けている可能性が考えられた。そこで、本研究では、BCG-CWS のプライマリーな影響を受ける遺伝子についての情報を得るべく解析を行ったので、以下に得られた知見について報告する。

第1章 Differential display 法による BCG-CWS 発現変動遺伝子の解析

BCG-CWS は結核菌の細胞壁骨格成分であり、癌切除患者に投与することで癌再発を防ぐことが報告されている。BCG-CWS 投与によるこの現象は、基本免疫の活性化により説明されるが、その活性化に関与する遺伝子の情報は乏しい。本章では、BCG-CWS により発現変動する遺伝子について情報を得るべく、Differential display 法による解析を行ったので、以下に得られた知見について報告する。

1-1 実験材料および試薬

1-1-1 細胞

ヒト単球細胞株 THP-1、ヒト大腸ガン細胞株 DLD-1 は Japanese Cancer Research Resources Bank より購入した。それぞれの細胞は 10% FCS (Bio-WHITTAKER, Walkersville, MD)、100 U/ml penicillin G (GIBCO-BRL, Rockville, MD)、100 mg/ml streptomycin (GIBCO-BRL) を含む RPMI 1640 (GIBCO-BRL) 培養液を用いて、37°C の 5% CO₂ incubator で培養した。細胞の継代は、細胞が confluent になり次第行った。培地を吸引除去後、D-PBS で 1 回洗浄し、Trypsin 液で処理した。Trypsin 液により剥がれた細胞に培地を加え、回収細胞の 1/10 量を新しい plate に継代した。

1-1-2 オリゴヌクレオチドプライマー

Differential display 法に用いた anchor プライマーは、サワデー・テクノロジー株式会社 (Tokyo, Japan) に合成を依頼した。arbitrary プライマーは GenHunter 社製 (Nashville, TN) のものを購入した (表 1-1)。

表 1-1. differential display 法に用いたプライマーの配列情報

Anchor primers		Arbitrary primers	
T12AA	5'-TTTTTTTTTTTTTAA-3'	AP- 1	5'-AGCCAGCGAA-3'
T12AC	5'-TTTTTTTTTTTTTAC-3'	AP- 2	5'-GACCGCTTGT-3'
T12CA	5'-TTTTTTTTTTTTTCA-3'	AP- 3	5'-AGGTGACCGT-3'
T12CC	5'-TTTTTTTTTTTTTCC-3'	AP- 4	5'-GGTACTCCAC-3'
T12CG	5'-TTTTTTTTTTTTTCG-3'	AP- 5	5'-GTTGCGATCC-3'
T12GC	5'-TTTTTTTTTTTTTGC-3'	AP- 6	5'-GCAATCGATG-3'
		AP- 7	5'-CCGAAGGAAT-3'
		AP- 8	5'-GCATTGTGCG-3'
		AP- 9	5'-CGTGGCAATA-3'
		AP-10	5'-TAGCAAGTGC-3'

1-1-3 遠心分離器

15 ml、50 ml のチューブ容量の試薬は、3,000 rpm 以下の低速遠心分離では、日立社製の 05PR-22 遠心分離器とローターを用いた。3,000 rpm より高速遠心分離では、日立社製の CR22G 遠心分離器と R10A2 ローターを用いた。0.5 ml、1.5 ml のチューブ容量の試薬は、トミー精工社の MX-160 遠心分離器と付属のローターを用いた。

1-1-4 溶液および緩衝液の組成

本章で使用した主な緩衝液等の組成を項目ごとにまとめて示した。

細胞

D-PBS	137 mM NaCl, 8.10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2.68 mM KCl 1.47 mM KH ₂ PO ₄
Elutriation buffer	MEM, 1% FCS, 10% NaHCO ₃ for pH adjustment
Macs binding buffer	2 mM EDTA, 0.5% BSA, solved by D-PBS
Emulsion buffer	1% (v/v) Tween80, 1% (v/v) Drakeol 6VR, solved by saline
Trypsin 液	0.25% (w/v) trypsin, 10 mM EDTA, solved by D-PBS

Northern blot

SSC	16.5 mM NaCl, 16.5 mM Sodium citrate, pH 7.0
10×MOPS buffer	0.2 M MOPS, 50 mM Sodium acetate, 10mM EDTA, pH 7.0
5×RNA loading dye	16 µl saturated BPB, 2 ml Glycerol, 3.1 ml Formamide 720 µl 37% Formaldehyde, 80 µl 0.5 M EDTA (pH 8.0)
RNA Running buffer	50 ml 10×MOPS buffer, 10 ml 37% Formaldehyde in 440 ml DEPC water

1-2 実験方法

1-2-1 ヒト単球細胞の分離

ヒト単球細胞は大阪府赤十字血液センターより供与された buffy coat (40 ml : 400 ml 全血由来) を用いて調製した。まず、buffy coat を saline (0.15 M NaCl) で 180 ml に調整し、2%メチルセルロースを最終濃度 0.2%になるように加え、室温で 45 分間静置した。上層を 50 ml のチューブ 4 本に分取し、1,500 rpm で 5 分間遠心した。遠心後、それぞれのチューブを saline で wash し、1 本のチューブに回収した。再度、1,500 rpm で 5 分間遠心し、ペレットを得た。このペレットから以下に述べる方法でヒト単球細胞を分離した。

1) Elutriation system

1-2-1 で調製したペレットを 40 ml の elutriation buffer に懸濁し、サンプルとした。このサンプルより以下に記した方法で、monocytes fraction を回収した。以下に elutriation system のフローチャートを記す。

- | | |
|---|--------------|
| 1) 500~1,000 ml の滅菌 milli Q 水で洗い流す。 | flow rate 22 |
| 2) 100~150 ml の elutriation buffer で洗い流す。 | flow rate 22 |
| 3) 遠心 (3,000 rpm) を開始し、サンプルを流す。 | flow rate 22 |
| 4) 200~250 ml の lymphocytes fraction を採取。 | flow rate 31 |
| 5) 200 ml の monocytes fraction を採取。 | flow rate 36 |
| 6) 100 ml の elutriation buffer で洗い流す。 | flow rate 50 |
| 7) 回収が終了したら 70% エタノールで洗浄。 | |

回収した monocytes fraction を 1,500 rpm で 10 分間遠心した後、上清を捨て、ペレットを 2% AB serum (ICN Biomedicals, Inc, Aurora, OH)、100 U/ml penicillin G、100 mg/ml streptomycin を含む RPMI 1640 培養液で懸濁した。懸濁液を Corning (Corning, NY) の cell culture dish に適量撹き、37°Cで培養した。1 時間後、浮遊細胞を吸引除去し、培養液を 10 ml の 10% FCS、100 U/ml penicillin G、100 mg/ml streptomycin を含む RPMI 1640 に変え、終夜培養した。

2) Macs-beads 法

1-2-1 で調製したペレットを 40 ml の saline もしくは D-PBS で懸濁し、10 ml ずつ 7 ml の Ficol PaqueTM Plus (Amersham Pharmacia Biotech AB, Upsala, Sweden) が分注されている 50 ml のチューブに静かに重層した。2,000 rpm、30 分間の遠心後、中間層 (上層 : Ficol, 下層 : リンパ球、赤血球) を 2 本の 50 ml のチューブに回収した。回収液を saline で 50 ml に fill up し、1,500 rpm で 10 分間遠心しペレットを得た。ペレットを適量の saline で懸濁し、15 ml のチューブに移した。ペレットを数回 saline を用

いて wash した後、Macs binding buffer (MBB) 900 μ l に溶かし、CD14 maicro beads (Miltenyi-Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を 100 μ l 加え、4°C で 15 分間反応した。10 ml になるように MBB を加え、1,500 rpm で 10 分間遠心しペレットを得た。ペレットを 3 ml の MBB に懸濁したものをサンプルとして、以下に記した方法により、monocytes fraction を回収した。

- 1) フィルター (Miltenyi-Biotec)、LS+/VS+column (Miltenyi-Biotec) を 3 ml の MBB で wash。
- 2) サンプルを LS+/VS+ column にフィルター越しに apply。
- 3) 3 ml の MBB を計 3 回、フィルター越しに apply し非吸着細胞を wash。
- 4) 5 ml の MBB で flash out を 3 度繰り返す、15 ml のチューブに回収。
- 5) 1,500rpm、4°C で 5 分遠心し、ペレットを得る。

再度 2) から 5) の操作を繰り返す、回収したペレットを適当量の 10% FCS、100 U/ml penicillin G、100 mg/ml streptomycin を含んだ RPMI 1640 に懸濁し、細胞数測定後、 5×10^6 cells/10cm culture dish になるように撻き、37°C で終夜培養した。

1-2-2 ヒト単球細胞由来、未成熟樹状細胞の調整

5×10^6 cells のヒト単球細胞を 10 ml の 10% FCS、100 U/ml penicillin G、100 mg/ml streptomycin を含む RPMI 1640 培地で懸濁し、10cm culture dish に撻いた。この培養液に 500 IU/ml human rGM-CSF (Pepro Tech, Rocky Hill, NJ)、100 IU/ml human rIL-4 (Pepro Tech) を加え培養した。3 日後、培養液を変え再度、同濃度の GM-CSF および IL-4 を加え 3 日間培養した。

1-2-3 BCG-CWS、BCG 生菌および死菌、LPS、TNF- α による刺激

BCG-CWS は emulsion buffer (EB) で 1 mg/ml に調整し、15 μ l/ml になるように細胞に加え、8 時間刺激を行った。また、対象には EB のみを用いた。*Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 株は大阪市立公衆衛生研究所の鈴木定彦博士より供与された。BCG 死菌は、生菌を 60°C で 30 分間処理することで調整し、刺激には生菌および死菌共、1 bacillus/cell になるように細胞に加えた。また刺激時間は BCG-CWS 刺激時と同様の 8 時間で行った。TNF- α (Pepro Tech) は 100 ng/ml になるように細胞に加え 4 時間の刺激を行った。LPS (*E.coli* serotype 026:B6, SIGMA) は 990 μ l の培養液と 10 μ l の DMSO で 1 mg/ml に調整したものを 10 μ l/ml になるように細胞に加え刺激を行った。

1-2-4 TRIZOL を用いた total-RNA の回収

10cm culture dish で confluent になった細胞を D-PBS で wash した後、2 ml の TRIZOL (GIBCO-BRL) を用いて懸濁した。懸濁液をフェノール・クロロホルム抵抗性のチューブに移し、室温で 5 分間 incubate した。0.4 ml のクロロホルムを加え、激しく撻拌

した後、室温で3分間 incubate した。10,000 rpm、4°Cで15分間遠心し、無色の上層を別のフェノール・クロロホルム抵抗性のチューブに移した後、1 ml のイソプロパノールを加え、激しく攪拌した。室温で10分間 incubate し、再び、10,000 rpm、4°Cで10分間遠心した。上清を取り除き、2~3分乾燥させ、200 µl の RNase free water で懸濁した。懸濁液を1.5 ml のチューブに移し、20 µl の3 M 酢酸ナトリウム (pH 6.5) と600 µl の100% エタノールを加え、-80°Cで終夜放置した。15,000 rpm、4°Cで30分間遠心し、上清除去後、ペレットを300 µl の80% エタノールで wash した。再度、15,000 rpm、4°Cで5分間遠心した後、上清を除き、2~3分乾燥し、適当量の RNase free water で懸濁した。

1-2-5 DNase 処理

STRATAGENE 社製 (La Jolla, CA) の DNase I または MessageClean Kit (GenHunter Corporation) を用いて DNase 処理を施した。RNA サンプル (5-20 µg)、5.7 µl の10× DNase digestion buffer、1 µl の RNase free DNase (10 U/µl) を混ぜ、DEPC water を用いて総量 57 µl に fill up し、37°Cで30分間反応させた。反応後、40 µl のフェノール：クロロホルム (3:1) 溶液を加え、攪拌した。氷上で10分間冷却し、15,000 rpm、4°Cで15分間遠心した。遠心後、ペレットを適当量の DEPC water に懸濁しエタノール沈澱を行い、適当量の DEPC water に懸濁した。

1-2-6 First-strand cDNA の合成

DNase 処理後の RNA を鋳型とし、first-strand cDNA の合成を行った。RNA サンプル (2 µg) 及び、表 1-1 に記した anchor プライマー (10 mM) を2 µl を混ぜ、DEPC water を用いて総量 12 µl に fill up した後、70°Cで10分間反応させた。反応後、氷上で2分間冷却し、4 µl の5×first strand buffer、2 µl の0.1 M DTT、1 µl の10 mM dNTPs を加え 42°Cで incubate した。5分後、1 µl の SuperScript II reverse transferase (GIBCO-BRL) を加え 42°Cで50分間 incubate した。70°Cで15分間反応し酵素を失活させた後、37°Cまで冷却し RNase H (GIBCO-BRL) を1 µl 加え20分間 incubate した。

1-2-7 cDNA の増幅およびアクリルアミドゲルへの泳動

2 µl の1st strand cDNA、2 µl の10×PCR buffer、1.2 µl の25 mM MgCl₂、1.6 µl の25 µM dNTPmix、2 µl の10 µM anchor プライマー、2 µl の2 µM arbitrary プライマー、9.2 µl の DEPC-water、0.2 µl の rTaq polymerase (TAKARA, Tokyo, Japan)、1 µl の[α-32P] dCTP (1 mci/ml) を混ぜ、反応液とした。反応液を DNA Thermal Cycler (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて、94°C 20 秒、40°C 20 秒、72°C 30 秒の条件で40 サイクル、さらに最終サイクルで72°C 5 分間の伸長を行った。反応終了後、3 µl の PCR 反応溶液に2 µl の GH loading dye (GenHunter) を加え、80°Cで2分間反応した。反応後、直ちに氷上に移し、3分間放置した。軽く遠心後、調製及び pre-run 済みの6% アクリルアミドゲルに apply した。60 watts で3時間泳動後、ゲルを3MM

紙に転写し、gel dryer を用いて乾燥した。乾燥したゲルを Kodak XAR5 フィルム (Kodak, Tokyo, Japan) を用いて露光した。

1-2-8 Differentially expressed gene の抽出

露光したフィルムを乾燥させたゲルの上に重ね、発現差を示したバンドを切り出した。切り出したゲル片を 200 μ l の滅菌水に 15 分間浸した。15 分煮沸した後、15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を別のチューブに集めた。5 μ l の glycogen (10 mg/ml)、20 μ l の 3 M 酢酸ナトリウム (pH6.5) 及び、900 μ l の 100% エタノールを加え-80°Cで 2 時間以上放置した。15,000 rpm、4°Cで 15 分間遠心後、上清を除き 200 μ l の 80% エタノールを加え再度、同条件で遠心した。上清を除き、ペレットを風乾した後、11 μ l の TE buffer で懸濁し、dry gel elute とした。5 μ l の dry gel elute を鋳型とし、4 μ l の 10 $\times$ PCR buffer、2.4 μ l の 25 mM MgCl₂、3.2 μ l の 250 mM dNTPmix、4 μ l の 10 μ M anchor プライマー、4 μ l の 2 μ M arbitrary プライマー、17 μ l の滅菌水、0.4 μ l の rTaq polymerase を混ぜ、反応液とした。反応液を 1-2-7 に記述した条件で再度 PCR を行い、増幅された DNA をアガロースゲルより QIAEX II Gel Extraction kit (QIAGEN, Valencia, CA) を用いて回収し、DNA dot-blots 用のサンプルとした。

1-2-9 DNA dot-blots

9 $\times$ 12cm の Hybond-N+ニトロセルロース膜 (Amersham Pharmacia) を滅菌水であらかじめ湿らせた後、6 $\times$ SSC に浸した。10 分後、適当な紙を用いて余分な SSC を取り除いた。次いで、Bio-dots apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を組み立て、ラバーの上に 6 $\times$ SSC で湿らせておいた 3MM 紙 2 枚を乗せ、その上に先程の膜を乗せた。Sample template を乗せ、ネジを、対角線を描くように閉めた後、Vacuum Set-I で吸引を開始した。吸引後、ネジを締め直し、吸引法を Vacuum Set-II に戻した。膜を水和させるために、500 μ l の滅菌水を用いて blot を行い、Vacuum Set-III で吸引した。溶液が全て抜けた後、調整しておいたサンプルを blot した。次いで、サンプルを固定させるため 500 μ l の 2 $\times$ SSC で blot し、XL-1000 UV Crosslinker (Spectronics corporation) を用い UV cross link を行った。膜を 2 $\times$ SSC で wash し、以下に述べる方法で調製したプローブを用いて hybridization を行った。hybridization には QIAGEN 社製の Expresshyb solution を用い、反応条件、wash の条件等は付属のマニュアルに準拠した。

1) サンプルの調整法

各 DNA サンプルに、NaOH と EDTA がそれぞれ最終濃度 0.4 M と 10 mM になるように加え、100°Cで 10 分間反応した。反応後、氷上で冷却し、等量の 2 M 酢酸アンモニウム (pH 7.0) を加えプロット用サンプルとした。

2) プローブの作成

プライマーには本実験で用いた anchor プライマーの混合液を、鋳型には 10 μ g の total RNA を用いて総反応量 50 μ l の系で RT を行った。反応液の 5 分の 1 量を、Megaprime labeling Kit (Amersham Pharmacia) 用いて標識し、dot-blots 用のプローブとした。

1-2-10 Northern blot analysis

1.2 g の Seakeam CTG アガロース (FMC, Rockland, Maine) を 100 ml の MOPS buffer で懸濁し、加熱溶解した。40 ml を分取し、720 μ l のホルムアルデヒドと 10 mg/ml の Et-Br 溶液 1 μ l を加え泳動用のゲルとした。泳動用のサンプルには様々な刺激を行ったヒト単球細胞および未成熟樹状細胞から回収した total RNA、10 μ g を用い、5 μ l の RNA loading dye を加えた後、総量が 25 μ l になるように DEPC water で調整した。マーカーには 0.24-9.5 Kb RNA Ladder (GIBCO-BRL) を使用した。泳動 30 分前に RNA Running buffer に浸しておいたゲルに 65°C で 5 分間の熱変性後、氷上で冷却したサンプルおよびマーカーをアプライし、50 V で 1 時間泳動を行った。泳動後、ゲルを 0.05 M NaOH で 20 分、2 回振とうし、次いで 0.5 M Tris-HCl (pH7.5) で 20 分振とうした。振とうしたゲル中の RNA をニトロセルロース膜に 24 時間掛け転写した後、UV cross link を施し膜に RNA を固定した。この作成した膜または、Human Multiple Tissue Northern Blot (CLONTECH Laboratories Inc, Paloalto, CA) に対して、dot-blots により発現差が確認されたサンプルあるいは、TNF- α の PCR による増幅断片をプローブとして用い、ExpressHyb solution により hybridization を行った。尚、条件は ExpressHyb solution に添付されているマニュアルに準拠した。

1-2-11 Data base 解析

DNA dot-blots で発現差が確認できた全てのサンプルを、TA-cloning kit (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) を用いてサブクローニングし、シーケンスの確認を行った。シーケンス反応には Big Dye Terminator kit sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) を用い、解析には PE Applied Biosystems 社製の ABI PRISM 310 Genetic Analyzer および ABI 373A DNA sequencer を用いた。確認したシーケンスの情報を基に既知遺伝子、Expressed sequence tag (EST) および genome 配列との相同性の比較、EST 遺伝子を基にした *in silico* cloning を National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)、The Institute for Genomic Research (TIGR, <http://www.tigr.org/tdb/index.shtml>) に収められているデータにより行った (11, 12)。

1-2-12 mRNA の分離

TRIZOL を用いて回収した total-RNA より mRNA purification kit (Amersham Pharmacia) を用いて mRNA を精製した。total-RNA を含む溶液に elution buffer を加え 1 ml にした後、65°C で 5 分間 incubate した。氷上に移し、0.2 ml の sample buffer

を加えた後、予め 1 ml の high-salt buffer で 2 度洗浄しておいたカラムに apply した。flow through を再度 apply し、流出後、1,400 rpm、4°C で 2 分間遠心した。0.25 ml の high-salt buffer で 2 度、0.25 ml の low-salt buffer で 3 度 wash した後、前もって 65°C に温めておいた elution buffer、0.25 ml で 4 度 elute した。約 1 ml の RNA elute に 100 µl の sample buffer、10 µl の glycogen、2.5 ml の 100% エタノールを加え、-20°C で 2 時間以上冷却した。15,000 rpm、4°C で 15 分間遠心し、上清除去後、ペレットを適当量の RNase-free water に懸濁した。

1-2-13 PCR confirmation of linkage between GCAP2 and LITAF

ヒト単球より回収した 1 µg の mRNA より作成した cDNA を鋳型として、以下に配列を記した GCAP2 断片特異的配列を有するプライマー、LITAF の open reading frame (ORF) 内にある配列を有するプライマーにより *Pfu* turbo polymerase (STRATAGENE) を用いて 94°C 30 秒、57°C 30 秒、72°C 2 分の 25 サイクルで RT-PCR を行った。

ORF-LITAF	: 5'-gggCCTTCCTCAgCACCATC-3'
GCAP2	: 5'-gAATCCTggCTTgCTgcTTg-3'

1-2-14 LITAF ORF および SIMPLE ORF の伸長

ヒト単球より回収した 1 µg の mRNA より作成した cDNA を鋳型として、以下に配列を記したプライマーにより *Pfu* turbo polymerase を用いて RT-PCR を行いそれぞれの ORF を単離した。LITAF ORF は 94°C 30 秒、58°C 30 秒、72°C 3 分の 25 サイクルの条件で行い、SIMPLE ORF は 94°C 30 秒、57°C 30 秒、72°C 2 分の 25 サイクルの条件で行った。

LITAF/SIMPLE ORF5'	: 5'-ATgTCggTTCCAaggACCTTA-3'
LITAF ORF3'	: 5'-CTATgCACgACTCCAAGCAg-3'
SIMPLE ORF3'	: 5'-CTACAAACgCTTgTAggTgC-3'

1-2-15 TNF- α の伸長

ヒト単球より回収した 1 µg の mRNA より作成した cDNA を鋳型として、以下に配列を記したプライマーにより *Pfu* turbo polymerase を用いて 94°C 30 秒、57°C 30 秒、72°C 2 分の 25 サイクルで RT-PCR を行った。

TNF- α 5'	: 5'-gTTCCTCAgCCTCTTCTCCT-3'
TNF- α 3'	: 5'-ggCAATgATCCCAAAGTAGA-3'

1-3 実験結果

1-3-1 Differentially expressed genes の同定

実験材料に記述したプライマーの組み合わせによる Differential display 法による解析を行った結果、BCG-CWS により発現誘導される遺伝子断片、128 断片、抑制される遺伝子断片、107 断片、総数 235 断片を得ることができた。プライマーの組み合わせと、得られた遺伝子断片数の関係を表 1-2 に示す。

表 1-2. プライマーの組み合わせと得られた遺伝子断片数の関係

Anchor primer	BCG-CWS induction	BCG-CWS suppression
5'-T12AA-3'	16	28
5'-T12AC-3'	33	37
5'-T12CA-3'	22	17
5'-T12CC-3'	16	6
5'-T12CG-3'	15	12
5'-T12GC-3'	28	7
Total	128	107

1-3-2 DNA dot-blots 法による解析

Differential display 法による解析で発現変動が見られた断片に関して、発現変動の再現性確認を行った。総数 235 の全ての断片を PCR による再増幅後、2 枚それぞれ別のニトロセルロース膜に固定し、それぞれの膜を未刺激または BCG-CWS 刺激の単球から回収した RNA をソースに作製したプローブで hybridization を行い、シグナル強度の差異を比較した。その結果、誘導される断片では 36 断片で、抑制される断片では 38 断片で顕著な差を確認することができた (図 1-1A)。表 1-3 に得られた再現性の割合を示す。

表 1-3. DNA dot-blots 法による再現性の割合

No. of clones		235
Up-regulated genes	(%)	36/128 (28.1%)
Down-regulated genes	(%)	38/107 (35.5%)
BCG-CWS-regulated genes	(%)	74/235 (31.4%)

1-3-3 発現変動遺伝子のパネル化

DNA dot-blots 法により BCG-CWS に対する発現変動の再現性が得られた遺伝子断片が、如何なる遺伝子をコードしているか情報を得るため、相同性遺伝子について検索を行ったところ、本研究で得られた遺伝子断片の多くが EST でのみ確認されている未知遺伝子であることが明らかとなった。一方、既知遺伝子については、BCG-

CWS 刺激によりタンパクレベルでの発現誘導が確認されているサイトカイン、IL-1 β や IL-6、IL-8 および TNF- α において BCG-CWS 誘導断片との相同性を確認することができた (9)。他の BCG-CWS 誘導断片および BCG-CWS 抑制断片に関しては、これまでにタンパクレベルでの発現変動等の現象は報告されておらず、BCG-CWS 誘導遺伝子に関しては、phosphatase として機能することが報告されている CD45、機能未知の lysosome 膜タンパクである CD63、抗酸化酵素として知られる MnSOD および TRX ペルオキシダーゼ、Cu²⁺ 輸送に関与することが報告されている COX17、gp130 を介した転写に関与する転写因子 STAT1、カルシウム依存的に細胞分裂や分化に関与すると報告のある転写因子 MEF2A、細胞分裂やマイグレーション等のシグナルに関与する分子 EB1、樹状細胞のエンドサイトーシスに関与し、TLR2 と相互作用することが確認されている分子 Rac1 との相同性が確認された。また、BCG-CWS 抑制断片に関しては mannose receptor、NK enhancing factor (NKEF)、LAIg-R-1 との相同性が確認された。本研究により得られた結果を表 1-4 に示す。また、幾つかの既知遺伝子に関しては、Northern blot においても、その発現変動の確認を行ったので、図 1-1B に結果を示す。

表 1-4. DNA dot-blots 法による発現差が確認された断片の配列情報

Genes	Expression pattern	Function
CD45	Up	Surface molecule
CD63	Up	
Mannose receptor	Down	
LAIg-R-1	Down	
MnSOD	Up	Antioxidant
Trx Peroxidase	Up	
NKEF	Down	
STAT1	Up	Transcriptional factor
MEF2A	Up	
Rac1	Up	Adaptor molecule
EB1	Up	
CAAP10	Up	Novel : KIAA0470
GCAP2	Up	Novel
ACAP9	Down	Novel : KIAA0780
CGAP5	Down	Novel

1-3-4 GCAP2 の発現変動の確認および全長の推定

DNA dot-blots 法において顕著な発現変動が確認された未知遺伝子断片、数種をプローブとし、BCG-CWS で刺激したヒト単球および樹状細胞から調整した RNA をプロットした膜を用いて Northern blot による解析を行った。結果、T12GC プライマーおよび AP2 プライマーの組み合わせで増幅される、断片長 373-bp の未知遺伝子断片、GCAP2 (表 1-4, 図 1-2A) において強い発現誘導を確認することができた (図 1-1B, 1-3A)。また、同実験の結果より遺伝子断片 GCAP2 を含む遺伝子産物の全長は、およそ 2.4-kb であることが明らかとなった。

GCAP2 を 6 パターンのフレームで翻訳したところ、ORF を含む可能性がないと考

えられた。GCAP2 が、全長 2.4-kb の遺伝子であることから、GCAP2 配列より 5'側に ORF が存在すると考え、GCAP2 の全長を推定するため NCBI に登録されている EST 情報を基に、*in silico* クローニングを行った (11, 12)。結果、遺伝子断片 GCAP2 配列および既知遺伝子、LITAF (LPS inducible TNF-alpha factor)/PIG7 (p53-induced gene 7) の配列を有する EST クローン (AW022014) を確認した (図 1-2B) (13, 14)。また TIGR においても GCAP2 および LITAF の両配列を有する EST クローン (THC1116999, October, 2000) を確認することができた。以上の結果より、GCAP2 は LITAF の 3' Untranslated region (3' UT) をコードすると予測されたため、次に実験的にその事実についての検証することにした。

1-3-5 GCAP2、LITAF 遺伝子の同一性の検証

GCAP2 と LITAF が同一の遺伝子であるか否かを確認すべく、LITAF の ORF 内と GCAP2 断片内、それぞれに特異的なプライマーを作成し、ヒト単球より回収した mRNA を鋳型に RT-PCR を行った。結果、予測長の DNA 断片の増幅を確認することができた (図 1-2B)。また、この増幅断片が LITAF、AW022014、GCAP2 全ての配列情報を有している事を塩基配列解析により確認した。以上の結果より、GCAP2 断片が LITAF 遺伝子の未報告の 3' UT に存在することが明らかとなった (図 1-4)。

GCAP2 は配列中に poly (A) tail および polyadenylation signal を有する (図 1-4)。一方で LITAF 遺伝子にも poly (A) tail が存在し、LITAF 遺伝子の全長は 1773bp であると報告されている (13)。このことから、LITAF 配列を含む転写産物が 2 種類存在する可能性が考えられる。しかし、実際、GCAP2 をプローブに用いた Northern blot による解析では 2.4-kb のシグナルを確認するだけであり (図 1-3A,B, 1-6)、今回得られた増幅断片をプローブとして同様の実験を行った場合でも、やはり同シグナルを確認するだけであった (図 1-3A,B, 1-6)。LITAF、AW022014 および GCAP2 により構成される転写産物のサイズがおよそ 2.4-kb であること、今回の増幅断片中に LITAF で確認されている poly (A) tail に似た、2 つのグアニン塩基を途中に含む 19 のアデニン塩基からなる配列 (1754-1777 bp) が存在すること (図 1-4)、更に、LITAF 遺伝子が GCAP2 に見られる様な polyadenylation signal を持たないことを考えると、LITAF 遺伝子として報告されている 1773-bp からなる転写産物は存在しないものと考えられた。そこで、今回得られた増幅断片の遺伝子情報を基に、この配列情報を有する genome クローンについて検索を行い、その情報について考察することにした。検索の結果、第 16 番染色体の遺伝情報を有する genome クローン、RP11-547D14 (Acc no. AC007616.3) が LITAF、GCAP2 および AW022014 全ての配列情報を有することが明らかとなった (図 1-5C)。このクローン RP11-547D14 について詳細に解析を行ったところ、LITAF で poly (A) tail として報告されている配列がこのクローン上で確認された (図 1-4)。一方で GCAP2 断片に含まれる poly (A) tail をこのクローン上で確認することはできなかった。以上の結果より、GCAP2 は LITAF 遺伝子の未報告の 3' UT をコードしていること、LITAF 遺伝子は実際、およそ 2.4-kb の転写産物であること、

また、LITAF 遺伝子は BCG-CWS 刺激によって、ヒト単球および樹状細胞で発現誘導されることが明らかとなった (図 1-3A)。

1-3-6 新規遺伝子産物、SIMPLE の同定

先程の増幅断片の配列情報を詳細に解析したところ、LITAF/PIG7 の ORF に存在する連続した 5 つのグアニン塩基で構成される部位 (608-612 bp; Acc no. NM_004862 or U77396 / 454-458 bp; Acc no. AF010312) でグアニン、1 塩基を欠損していることが明らかとなった (図 1-4, 1-5A.B.C)。この 1 塩基の欠損により増幅断片に含まれる ORF では翻訳時にフレームシフトを起こし、LITAF/PIG7 が 228 アミノ酸からなるタンパクをコードするのに対し、その ORF では 126 番目のアミノ酸までは LITAF 同様のアミノ酸で構成され、161 アミノ酸からなるタンパクがコードされる (図 1-4, 1-5B)。LITAF 配列を含む転写産物は Northern blot の結果より 1 種類を確認するだけであり、どちらかの転写産物が実在しないものと考え、以下の 4 点を検証することで、どちらが本来の転写産物であるか確認を行った。まず始めに、今回の増幅断片および LITAF/PIG7 がそれぞれ、単球細胞、ヒト単球細胞株である THP-1 細胞、ヒト大腸癌細胞株である DLD-1 細胞で単離されていることから、それぞれの mRNA を回収、鋳型とし、LITAF ORF 部位を PCR により増幅後、塩基配列を確認することにした。それぞれの RNA に対し 5 種類別々の反応系を組み、PCR を行った後、得られた増幅産物全ての塩基配列を検証したところ、LITAF で報告されている、5 つのグアニン塩基の連続した配列を確認することはできなかった (図 1-5A)。次に、LITAF の ORF 配列を query として、相同性を示す EST クローンについて検索を行い、LITAF 配列との比較を行った。その結果、LITAF で確認されている 5 つのグアニン塩基の連続した配列を有する EST クローンを確認することはできなかった (図 1-5A)。3 番目に、LITAF の poly A tail の検証に用いた genome クローン、RP11-547D14 を基に、donor-accepter ルールにより、その配列から産生される転写産物の推定を行った。結果、LITAF で確認されている 5 つのグアニン塩基により構成されている部位は splice junction に位置することが、またその部位における接続の可能性に関しては donor-accepter ルールである GT/AG ルールより、その部位では 4 つのグアニン塩基の連続した配列が転写される可能性が高いことが明らかとなった (図 1-5B.C)。最後に LITAF によってコードされる 228 アミノ酸からなるタンパク配列、グアニン塩基、1 塩基の欠損によりコードされる 161 アミノ酸からなるタンパク配列それぞれを query として他種間における相同性を持つタンパクの存在について検証を行った。結果、マウス、ラットにおいて 161 アミノ酸からなるタンパクの homologue が存在することを、またニワトリ、線虫、アフリカツメガエルにおいて 161 アミノ酸から構成されるタンパクの C 末端領域に相同性を示す EST クローンが存在することが確認された。一方で、LITAF の C 末端領域と相同性を示すクローンを見いだすことはできなかった (data not shown)。以上の結果より、LITAF で報告されている遺伝子配列、ORF 部位での 5 つの連続したグアニン塩基の配列および、poly (A) tail の存在は全て artifact であると断定した。

また、LITAF と比較し ORF 内で一塩基欠損し、161 アミノ酸からなるタンパクをコードしている断片長 2.4-Kb の遺伝子を、混乱を避ける目的と、以後の解析結果より SIMPLE (Small Integral Membrane Protein of Lysosome/late Endosome) と命名した。

1-3-7 SIMPLE、mRNA の組織分布と他刺激に対する応答の検証

SIMPLE の発現組織について Clontech 社製の Human Multiple Tissue Northern Blot を用いて Northern blot により検討したところ、Testis を除く全ての組織において明確な発現を確認することができた (図 1-6)。また、SIMPLE の配列を query として得た EST の由来組織について確認した結果、Testis 由来の EST が存在することが明らかとなった。以上の結果より、SIMPLE は全ての組織に発現していることが明らかとなった。また、この結果より、SIMPLE は単球やマクロファージといった細胞種に特化した役割ではなく、細胞において普遍的な機能を果たしていると考えられた。

SIMPLE のラット homologue である EET-1 (Estrogen enhanced transcript-1) は estrogen により発現誘導されることが報告されており、EET-1 の 3' UT には 2 つの estrogen responsible element (ERE) が存在する (15)。一方で、SIMPLE の配列中に ERE を見いだすことはできない。現段階で、SIMPLE が estrogen により発現誘導されるか否か明らかではないが、他の因子により誘導される可能性が考えられたため、SAGE-tag との相同性比較を行った。結果、SIMPLE の配列中に 5 α -dihydrotestosterone や estradiol により発現誘導が確認されている断片の配列が存在することが明らかとなった (図 1-4)。

SIMPLE は BCG-CWS により発現誘導されることから、BCG の生菌および死菌に対する発現誘導に関しても検討を行ったところ、BCG の生死を問わず、SIMPLE の発現誘導を確認することができた (図 1-3B)。今回、BCG の単球への感染時間は BCG-CWS 刺激同様、8 時間で行ったが、BCG の倍化時間がおおよそ 20 時間であることを考えると、SIMPLE の BCG による発現誘導は BCG と単球の接触あるいは、単球の BCG 食食時の刺激に拠るものと考えられた。

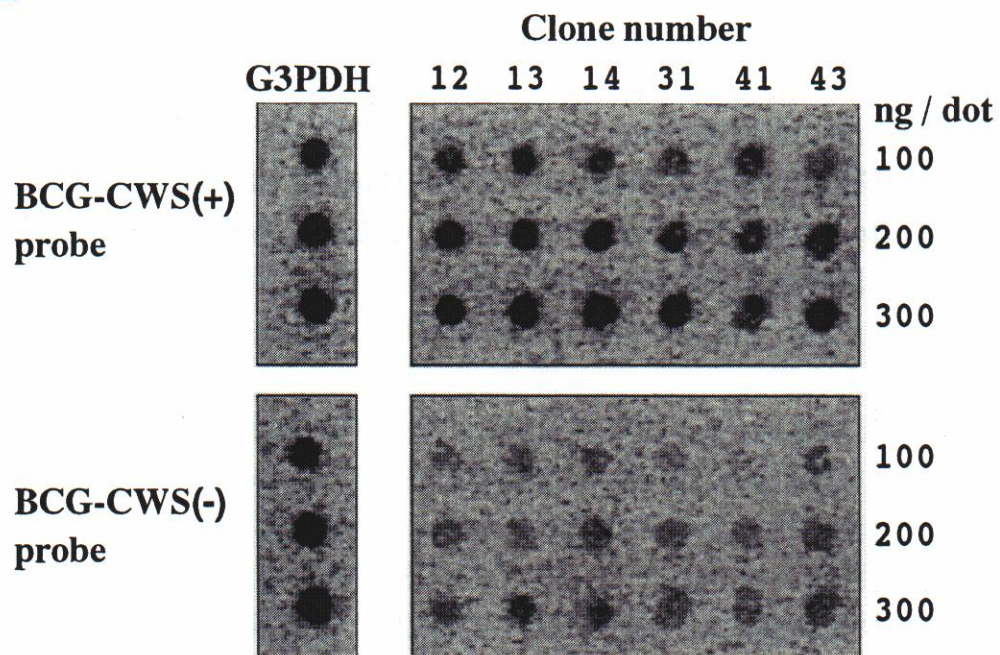
LITAF は THP-1 細胞を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で処理後、LPS 刺激することで発現誘導されると報告されていることから (13)、その可能性について検討を行ったところ、THP-1 細胞が未刺激状態で SIMPLE を発現していること、また、その発現が PMA 処理により低下することが明らかとなった (data not shown)。更に、PMA 処理後の THP-1 細胞を LPS で刺激しても、SIMPLE の発現が回復しないことが明らかとなった (data not shown)。

1-3-8 SIMPLE および TNF- α の転写における相関性の解析

LITAF は LPS によって誘導される TNF- α の転写誘導因子であることが報告されており (13, 16)、また単球を BCG-CWS で刺激することにより TNF- α が産生されることが確認されている (9)。そこで、単球を BCG-CWS で刺激した際の SIMPLE および TNF- α 転写産物の発現における相関性について検討することにした。また、LPS に

についても同様に検討を行った。継時変化を追って BCG-CWS または LPS で刺激を行った単球細胞から RNA を回収し、プロット作成後、SIMPLE または TNF- α の cDNA をプローブとして用い Northern blot により検討を行ったところ、BCG-CWS および LPS、両刺激に対して、SIMPLE は TNF- α の転写後に発現誘導されていることが明らかとなった (図 1-7A)。また、この結果より、SIMPLE が TNF- α 刺激により誘導される可能性が考えられた。この可能性について検討すべく、リコンビナント TNF- α で刺激を行った単球細胞より RNA を回収し、プロット作成後、SIMPLE の cDNA をプローブに用い Northern blot により検討を行ったところ、BCG-CWS や LPS より弱いながらも SIMPLE の発現誘導が確認された (図 1-7B)。

A.



B.

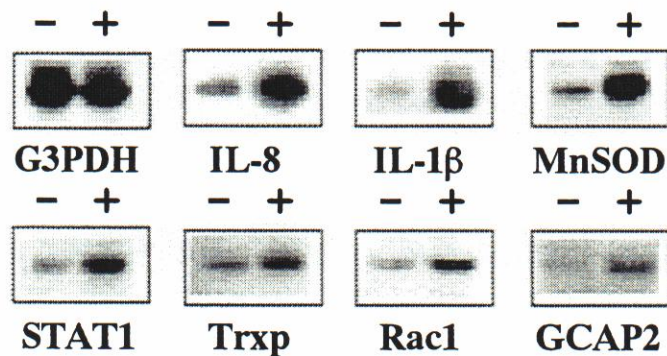
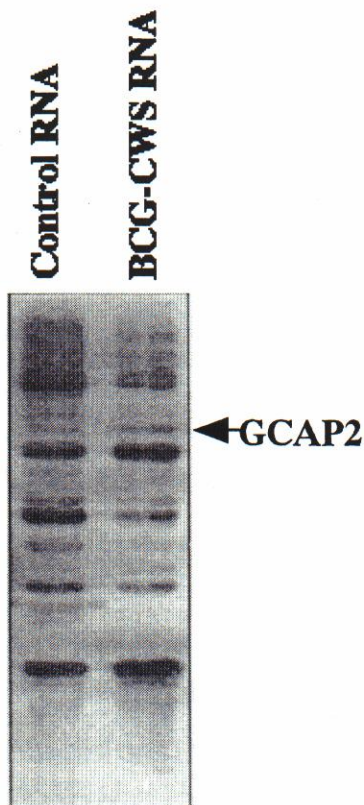


図1-1. DNA dot-blots法による発現変動の再確認

A. Differential display法による解析で発現変動が見られた遺伝子断片およびG3PDHを3段階の濃度に振って2枚それぞれ別のニトロセルロース膜に固定した。BCG-CWS存在下と非存在下において8時間培養した単球より回収したtotal-RNAを用いてprobeを作製しhybridizationを行い、シグナルの強度を比較した。図には発現変動が優位に確認された6クローンを示す。

B. 6つの既知遺伝子における発現誘導のNorthern blotによる確認。BCG-CWS存在下と非存在下で8時間培養した単球より回収したtotal-RNAを用いてNorthern blotによる解析を行った。probeにはDNA dot-blots法により発現変動の再現性が得られた遺伝子断片を用いた。

A.



B.

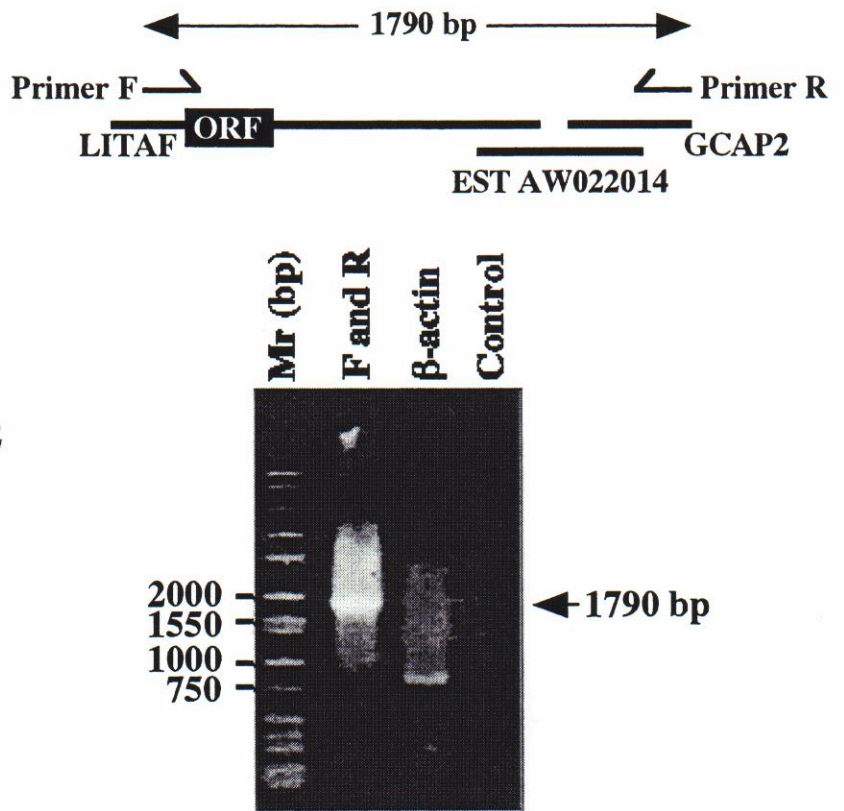
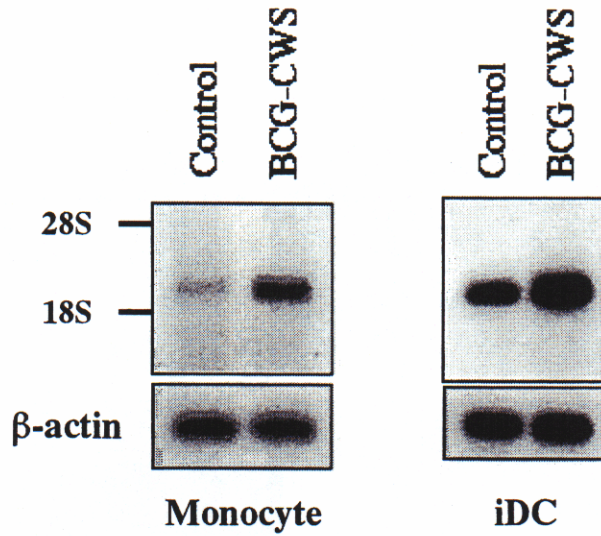


図1-2. GCAP2の全長の推定と同定

A. Differential display gelにおけるGCAP2の発現。BCG-CWS存在下と非存在下において8時間培養した単球から回収したRNAをoligo-dTプライマーで逆転写後、T12GCプライマーおよびAP2プライマーの組み合わせで増幅後、6%アクリルアミドに泳動した結果を示した。矢印で示したバンド、GCAP2においてBCG-CWS刺激による明確な発現誘導が確認された。

B. GCAP2はLITAF遺伝子の3' UTに位置する。GCAP2全長の推定を行った結果、既知遺伝子LITAF(NM_004862)およびGCAP2の両配列を有するEST断片(AW022014)の存在を確認した。上段にLITAFとGCAP2が同一遺伝子であることを確認したRT-PCR解析における概略図を、下段にBCG-CWS刺激を行った単球より回収したRNAを用いたRT-PCRにおける結果を示した。プライマーFおよびRの塩基配列はそれぞれLITAFおよびGCAP2特異的な配列を用いて作製した。コントロールは逆転写を行っていない、BCG-CWS刺激を行った単球より回収したtotal-RNAを鋳型としたRT-PCRの結果を示した。

A.



B.

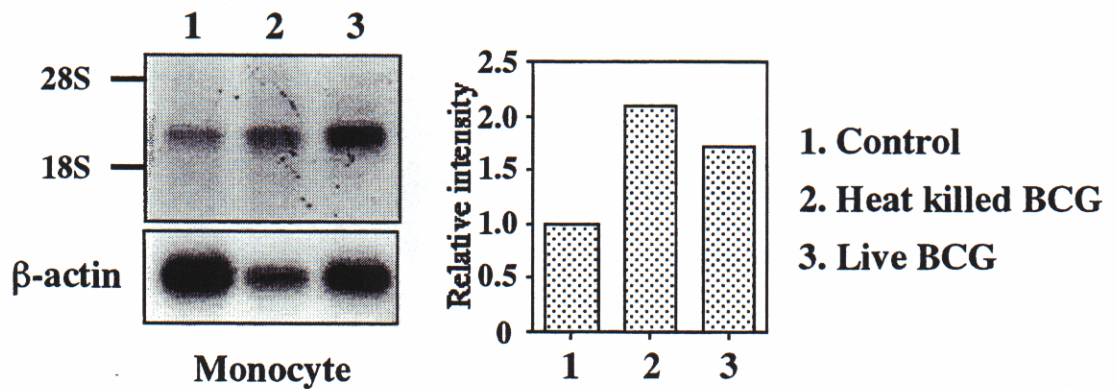


図1-3. SIMPLEの発現誘導

A. 単球および樹状細胞でのSIMPLEのBCG-CWS刺激による発現誘導。BCG-CWS存在下および非存在下で8時間培養を行った単球および樹状細胞、それぞれから回収したtotal-RNAを用いてNorthern blotによる解析を行った。probeにはGCAP2をPCRで増幅した断片を用いた。

B. SIMPLEのBCG生菌および死菌による発現誘導。単球とBCGを1:1の細胞比で共培養し、8時間後に回収したtotal-RNAを用いてNorthern blotによる解析を行った。probeにはGCAP2およびβ-actinをPCRで増幅した断片を用いた。グラフはNorthern blotで確認されたシグナルをNIH imageにより定量し、β-actinで補正したものである。

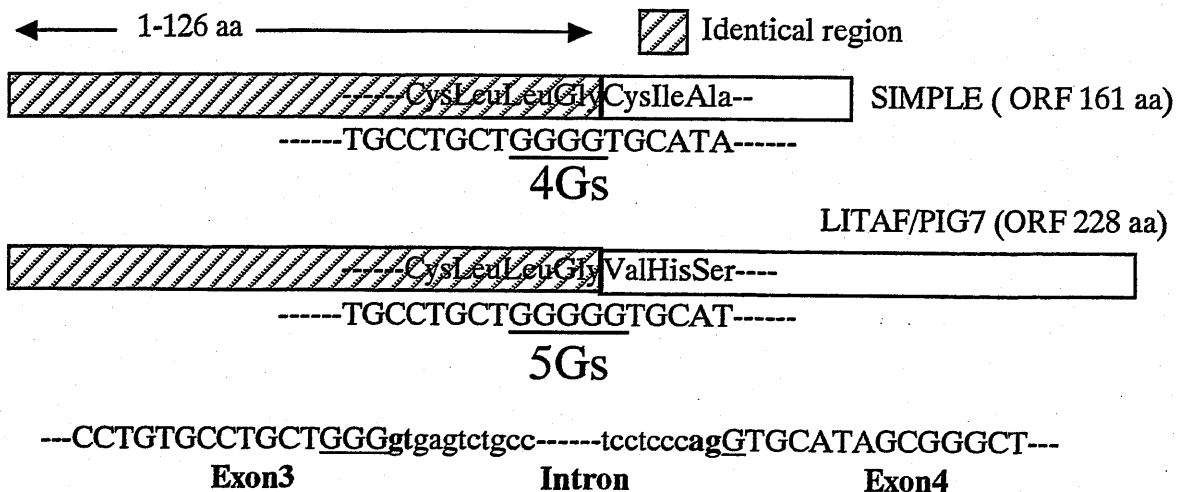
A.



SIMPLE nt seq (602-617bp) from Monocyte

BE538359, BE273368, BE619260
BE270530, BE397658, BE561338
BE298793, BE408700, BE543216
BE544483, BE274352, BE275905
BE303025

B.



C.

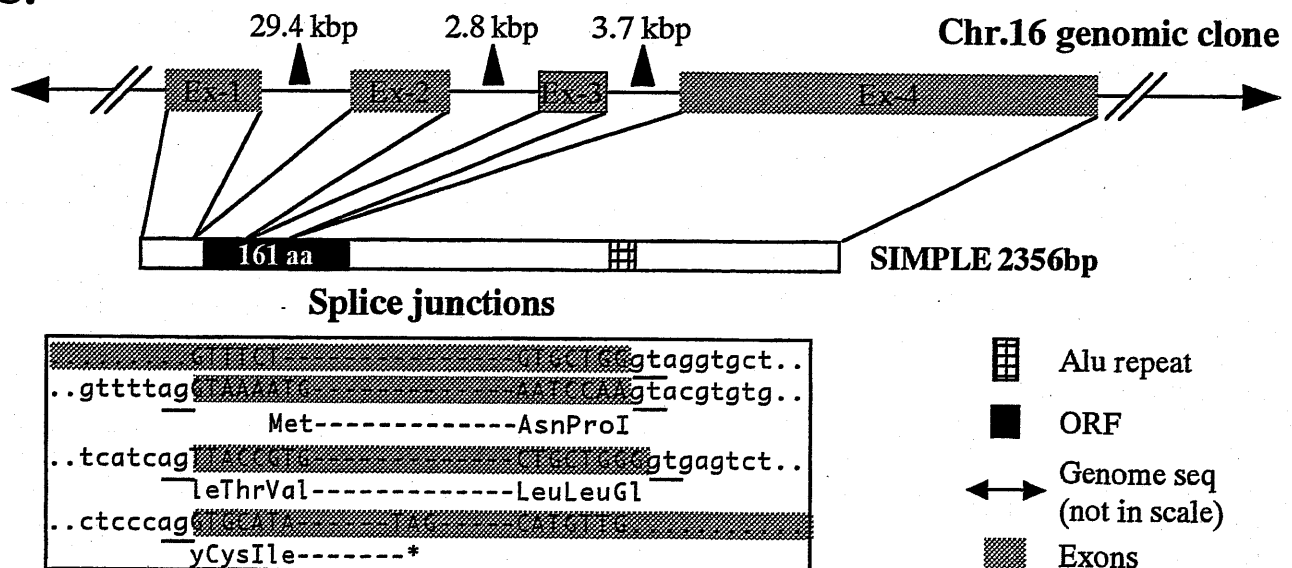


図1-5. SIMPLE遺伝子とLITAF遺伝子の相違およびその検証

A. SIMPLEはLITAFで報告されているORF内の連続した5つのグアニン塩基で構成されている部位において、一塩基の欠損を持つことが明らかとなった。SIMPLEがcloningされた単球および、LITAF、PIG7がcloningされたTHP-1細胞およびDLD-1細胞それぞれからRNAを抽出し、欠損が確認された部位を増幅後塩基配列を確認した結果、その部位は連続した4つのグアニン塩基から構成されていることが確認された。同様の配列を持つESTクローンを塩基配列解析の結果の右に列挙した。

B. 一塩基の欠損によりSIMPLEは161 aaからなるタンパクをコードする。欠損の確認された部位はexon-intronの繋ぎ目に存在し、GT/AGルールを適用した場合、4つの連続したグアニン塩基が転写される可能性が考えられる。

C. SIMPLEは第16番染色体にコードされる。SIMPLEは4つのexonから構成され、全てのexonがGT/AGルールにより転写されている可能性が考えられた。

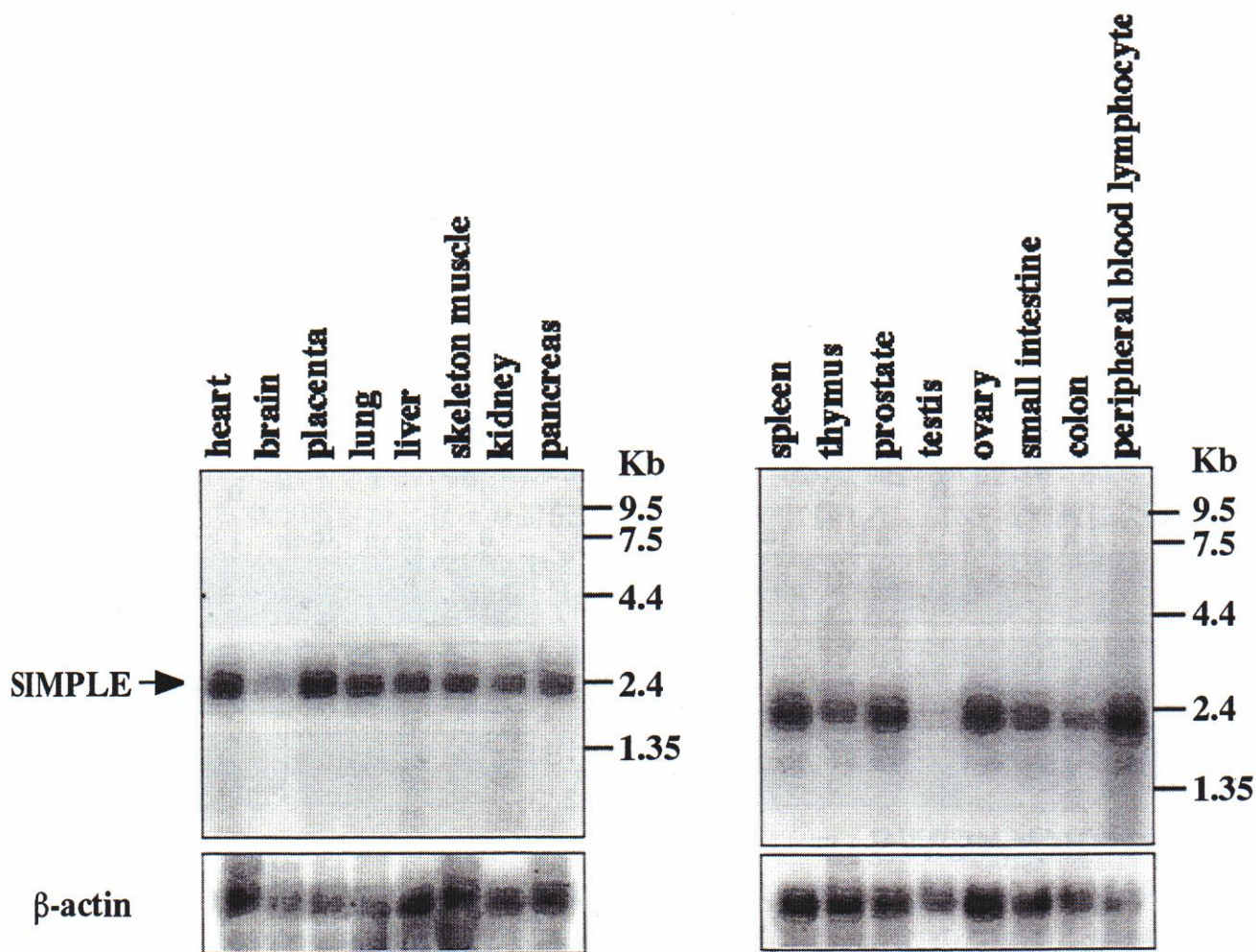
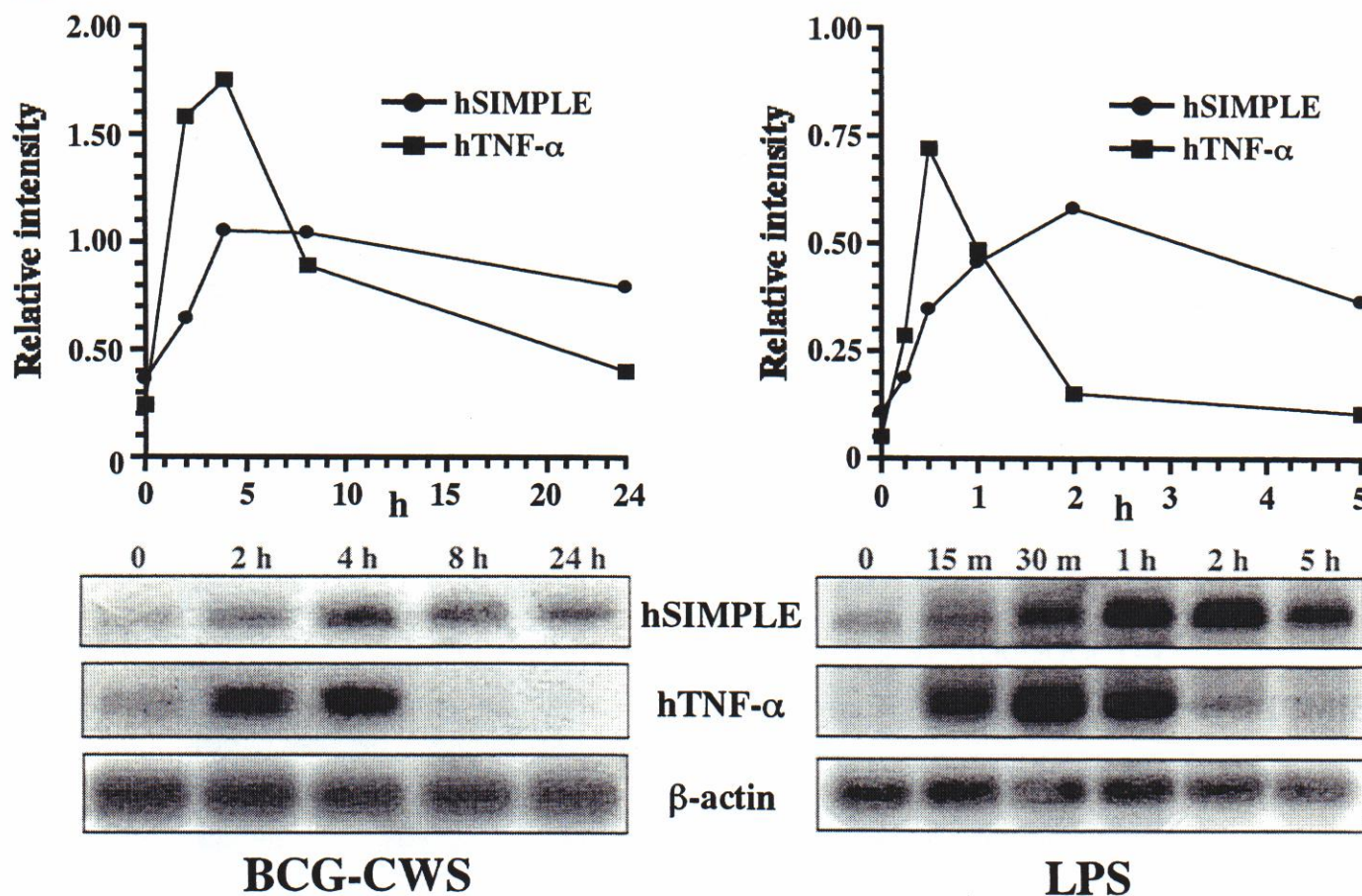


図1-6. SIMPLEの組織分布

SIMPLEの組織分布についてNorthern blotにより検討した。コントロールには β -actinを使用した。SIMPLEは2.4-kbの単一の転写産物として存在し、精巣を除く全ての臓器において明確な発現を確認することができた。また、SIMPLEの配列をqueryとして得たESTの由来組織について確認した結果、精巣由来のESTの存在が確認された。このことから、SIMPLEは全ての臓器に発現していると考えられた。

A.



B.

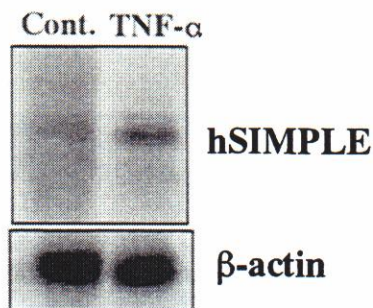


図1-7. SIMPLEおよびTNF-αの転写における相関性

A. BCG-CWSおよびLPSで刺激した単球より、継時的に回収したtotal-RNAを用いたNorthern blotによる解析を行った。probeにはSIMPLE ORF、TNF-αおよびβ-actinをPCRで増幅した断片を用いた。グラフはNorthern blotで確認されたシグナルをNIH imageにより定量し、β-actinで補正したものである。

B. SIMPLEはTNF-αにより発現誘導される。リコンビナントTNF-αにより4時間刺激した単球より回収したtotal-RNAを用いたNorthern blotによる解析結果を示す。probeにはSIMPLE ORFおよびβ-actinをPCRで増幅した断片を用いた。

1-4 考察

BCG-CWS 認識レセプター

BCG-CWS により発現変動される遺伝子についての情報を得るため、8 時間 BCG-CWS に感作させた単球より調整した RNA を使用した Differential display 法による解析を行った。感作時間は、先の報告にある、MD-1 の BCG-CWS による発現変化を継続的に測定した結果から決定し、その報告にある MD-1 は BCG-CWS 刺激後、8 時間で明確な発現抑制が確認されている (8)。この感作時間を選択した目的は、BCG-CWS により誘導される液性因子のオートクライン作用を妨げる事にあったが、実際、液性因子の一つである、TNF- α の転写は BCG-CWS 感作後、2 時間で顕著に誘導されている事が、また、TNF- α の誘導に伴って SIMPLE の発現誘導が起こっている事が明らかとなった (図 1-7A)。この結果より、SIMPLE および他の BCG-CWS により発現誘導される事が明らかとなった遺伝子、BIGM103 に関して、TNF- α 刺激による発現誘導の有無について確認を行ったところ、両遺伝子において発現誘導が確認された (17) (図 1-7B)。以上の結果は、本研究により単離された遺伝子が BCG-CWS のみの作用でなく、BCG-CWS により誘導された液性因子による二次的な作用により発現変動されている事を示す。

BCG-CWS および LPS 刺激における、SIMPLE 発現誘導の継時変化について解析を行ったところ、両刺激に対して SIMPLE の発現パターンが異なる結果を得た (図 1-7A)。BCG-CWS は TLR-2 および-4 に (9)、LPS は TLR-4 に認識される事が報告されている (3)。これまでに、TLR-4 は LPS 刺激により NF- κ B だけでなく、MAP kinase である ERK の活性化も誘起する事が明らかとなっており、このシグナルが DC の生存に必須である事も報告されている (18)。また、TLR-2 は他の TLR と異種二量体を形成することで、MAP kinase を活性化することも報告されている (19)。更に興味深いことに、SIMPLE のプロモーター領域を genome data base より推定し、その配列中に含まれる転写因子結合配列について確認を行ったところ、p53 および AP-1 の結合配列を見出す事はできたものの、NF- κ B の結合配列を見出す事はできなかった (図 1-8)。これらの知見を伴わせると、BCG-CWS の認識は TLR だけでなく、他のレセプターを介している可能性、更に、BCG-CWS による TLR-2 および-4 からのシグナルが NF- κ B だけでなく、他の転写因子を MAP kinase を介して活性化している可能性が考えられる。最近、明らかとなった事に、BCG-CWS の DC による貪食が糖鎖を介して行われているという事実も、上述の仮説を支持すると考えられる (10)。本研究により得られた BCG-CWS により発現変動が確認された遺伝子の発現誘導機構を検討する事で、BCG-CWS による基本免疫の活性化機構の詳細が明らかになる事を期待する。

SIMPLE の転写因子としての可能性

TNF- α プロモーター内の既知の転写因子結合 motif が存在しない 64-bp からなる領

域 (-550 to -487) が TNF- α の転写誘導に関与することが報告された (16)。また、この配列を用いた affinity カラムによる結合タンパクの精製において、LITAF 遺伝子が同定された (13)。本研究では、LITAF 遺伝子が ORF 内で一塩基欠損していることを明らかとし、その遺伝子を SIMPLE と命名した。SIMPLE の ORF にコードされるタンパクは RING finger domain を有している可能性が考えられており (第2章参照)、幾つかの RING finger domain を有するタンパクにおいて転写因子として機能することが報告されている (20-21)。そこで、TNF- α と SIMPLE の発現誘導に関する相関性について Northern blot により検討したところ、SIMPLE は TNF- α の転写後に発現誘導されていることが明らかとなった (図 1-7)。また、SIMPLE は BCG-CWS や LPS より弱いながらも TNF- α 刺激により発現誘導が確認された (図 1-7B)。以上の結果および、ヒト TNF- α の転写レベルでの発現誘導が主に、転写因子 NF- κ B によって制御されているといった報告から考えると (22)、SIMPLE が TNF- α の転写誘導因子として機能している可能性は極めて低いと考えられる。一方で、SIMPLE と TNF- α の転写における相関性から SIMPLE が TNF- α の転写抑制に関与している可能性が考えられる。

SIMPLE のアポトーシスへの関与

TLR は細菌を認識し、排除するための免疫応答を誘起すると同時に、アポトーシス誘導シグナルも誘起する (23-24)。一方、後者のシグナルによる宿主細胞のアポトーシスは、TLR によって活性化される主な転写因子、NF- κ B により誘導される遺伝子群の働きにより抑制される (25)。この現象を利用し、細菌は感染時に NF- κ B の活性化を阻害するタンパクを産生する事で、宿主の生体防御機構を回避する (26)。SIMPLE が TLR シグナルにより発現誘導されているか否か現段階で明らかではないもの、SIMPLE と p53 によって誘導されるアポトーシス関連遺伝子である、PIG7 が同一の遺伝子である事 (14, 27)、また、SIMPLE の推定プロモーター領域において、NF- κ B の結合配列ではなく、p53 および AP-1 の結合配列が確認された事から、SIMPLE がアポトーシス誘導に関与している可能性は高いと考えられる。更に、SIMPLE はアポトーシス刺激として知られる TNF- α によって発現誘導されるという現象も非常に興味深い。

結核菌の宿主細胞である、単球や DC は結核菌感染に対し生体防御の一環として自身のアポトーシスを誘導する (28)。一方、結核菌は単球や DC のアポトーシスをアポトーシス誘導遺伝子の発現を抑制することで、感染を成立させる (29)。更に、別の報告では、結核菌はアポトーシス抑制遺伝子である、A1 を発現誘導させることで単球の生存率を高めている (30)。これらの知見の、一方は先の可能性を支持するが、他方は SIMPLE のアポトーシス抑制への関与を示唆する。SIMPLE が如何なる機構によってアポトーシスに関与するか、またそれは正負どちらに機能しているか不明であるが、以上の知見より、SIMPLE のアポトーシスへの関与を検討する価値は十分にあると考えられる。

540 tcggaagctccctgtccaaatggcgtttgtttgtggatggccacatcatggttctgcccattctcctgact

AP-1

470 ctgtgtactctgaaagccaggcatgcttcttaattccctctatgatttcccagagagcctgctggatcc

p53

400 aggctgctgctgttatcactgcagccggccgatggggctccaagcagacgggcagatggcaccatttag

330 gggcggtatgtgaaatggggctactgatttccagagcttgctttcagtgatggctgagaaaggcctacctg

260 gcggcacggaccaccctgggggcacaaagcggacaggcagctgataagccttacctaatacctatcctgt

190 gctaaaaactttaccatcttcccagttcactcccagtcggtcttaggagacaggaccgctattgtgccc

120 ttttgcagacaggaagccgagctcagagaggatgggtaacatgcccgaaggcacagagagtgtcttggtc

050 tgtccggacgcgtctgtagagttacaggaagagaagggccgcccctccagagggccgggagcgcgccagcg

980 cgggtccgggggtcgaggttggtggtcccgccgcctggaagtggaggcggcgcggggaggggggaaagt

910 ggggagagccgcgagcggcaaatcaggagggagggccaggctgtcggggcgagcgggtggggctggcac

840 cgagaggcaggggcaggataggagagtgggggagacaccagggtccgcgccaggcgtctcgggggtaagcc

770 tgggaagctctgggggtggcgagcgagccgggtgtgggatggagcctgggggagatcagagtgaggcgggg

700 aaccggcggtggtctcgcctggggcccagggtgcggggccgcgggggagagcgggaagcccaagccg

630 gccgcgtccgccccggcggggtccagcccccgccccggtccccgcgcggcccttttctcggggcgc

560 cgagaggccagctcagacctcccggtcgcagaggcggcgcgggcgggcggtgagtgcggcgcggggacgcc

490 ggggcgcggggaccagcgggagacagcggggggccgggtggcgccagcacctgctgggggccccgggact

420 gagcccttggttggggcctcctgggatgccagggggcgcggggtcggtcgcgggcatcgaggcgcggcgg

350 agggcgtgggggccccggccggggcggggtccggcctcccagcgtggtcccggccgcgtctccggttggg

280 ttcagctcctgctcccagagtggcccgatcgcgcgtggcggggtcgtccggccccccaccgaacgagcg

210 cccttcgcggccccgcgcgtccccctccccggagaggacggcccctgggcttttttagaaaaaggcgcgat

↓

140 tctctctagtgactcaggttgagatttccagaaatatccccgggggttcagaaacaaaacaaaacaaa

AP-1

70 caaaaaaaccccaacgaattcccaaagtctatttgccaaacatttgacttctaggggcgcgggtacccgc

-1 GTTTCTCTCCCTGCCCCGCGACTTCGCGCAAGATCCGGGAAGGACACCCGAGGCCCTGGGAGACCTG

図1-8. genomeより推定したSIMPLE promoter配列

SIMPLEの配列を有するgenome領域よりSIMPLEのpromoter領域を推定した。本研究において同定したcDNAの5'末端を-1とした。転写開始点の推定はNeural Network Promoter Prediction (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)により行い縦線で示した(score : 0.97)。転写因子の結合配列はMOTIF(<http://motif.genome.ad.jp/>)およびTNSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCHJ.html>)により推定した。また、Promoterの推定についても WWW Promoter Scan(<http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/proscan/>)により行いboxで囲った(score : 79.33)。

第2章 SIMPLE の生化学的解析および転写因子としての機能検討

SIMPLE は LITAF/PIG7 で報告されている ORF 内で一塩基欠損した配列を有する。これまでに、LITAF は単球を LPS 刺激した際に誘導される TNF- α の転写因子として報告されており、PIG7 は p53 によって発現誘導されることが明らかとなっている。また、PIG7 についてはアポトーシスへの関与が推測されている。一方、LITAF/PIG7 が artificial な遺伝子であることを1章で明らかにした。LITAF および PIG7 が実存しないタンパクであることから、両タンパクで報告されている機能が SIMPLE によって行われている可能性は高い。また、SIMPLE が TNF- α の転写因子として機能しているのであれば、免疫系における SIMPLE の重要性は高く、更に、結核菌感染により単球のアポトーシスが抑制されることから、SIMPLE のアポトーシス関与の可能性も高いと考えられる。以上のことから、SIMPLE の転写因子およびアポトーシス関与の可能性について検討することにした。本章では、SIMPLE の基本性質を明らかにすべく生化学的解析および、転写因子としての機能に焦点を当て解析を行ったので、以下に得られた知見について報告する。

2-1 実験材料および試薬

2-1-1 抗体

抗ヒト SIMPLE 抗体 (rabbit pAb) は、筆者が免疫精製したものを用いた。抗 Penta-His 抗体 (mouse IgG1 mAb) は QIAGEN 社より、抗 GFP 抗体 (rabbit pAb) は Clontech より、抗 Flag 抗体 (M2, mouse IgG mAb) は SIGMA 社より、抗 ubiquitin 抗体 (P4D1, rabbit pAb) は Santa Cruz 社 (Temecula, CA) より、抗 Nedd4 抗体 (rabbit pAb)、抗ヒト LAMP-1 抗体 (H4A3, mouse IgG1 mAb)、抗ヒト LITAF 抗体 (mouse IgG1 mAb) は PharMingen 社 (San Diego, CA) より、HRP-conjugated goat anti-mouse IgG 抗体、HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG 抗体、rhodamine B-conjugated goat anti-mouse IgG 抗体は BioSOURCE 社 (Camarillo, CA) より、FITC-conjugated goat anti-mouse IgG 抗体、FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG 抗体は American Qualex Manufactures 社 (San Clemente, CA) よりそれぞれ購入した。

2-1-2 細胞

ウサギ腎由来繊維芽細胞株 RK13、サル腎由来繊維芽細胞株 COS-7、ヒト子宮頸ガン由来上皮細胞株 HeLa、マウス単球細胞株 RAW264.1 およびヒト繊維芽細胞株 NIH3T3 は Japanese Cancer Research Resources Bank より購入した。それぞれの細胞は 10% FCS、100 U/ml penicillin G、100 mg/ml streptomycin を含む DMEM (GIBCO)を用いて、37°Cの 5% CO₂ incubator で培養した。細胞の継代は、1-1-1 に記載した方法により行った。

2-1-3 data base 解析

motif、糖鎖付加等の推定は分子生物学研究用ツール集 (<http://www.yk.rim.or.jp/~aisoai/molbio-j.html>) および ExPASy Proteomics tools (<http://us.expasy.org/tools/>) に収められているサイトにより行った。特に、本研究において用いたサイトを以下に記す。

Motif Scan	http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN?
ScanProsite	http://us.expasy.org/tools/scanprosite/
PROSITEScan	http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsaautomat.pl?page=npsa_prosite.html
PSORT	http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/
SOSUI	http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html
SMART	http://smart.embl-heidelberg.de/
NetOGlyc	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/

2-1-4 溶液および緩衝液の組成

本章で使用した主な緩衝液等の組成を項目ごとにまとめて示した。また、その他の

溶液に関しては第1章に記述したものと同様のものを用いた。

GST カラムを用いたタンパク質精製

STE buffer	1 mM EDTA, 10 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 8.0
Elution buffer	75 mM Hepes (pH 7.4), 0.15 M NaCl, 5 mM DTT 10 mM reduced glutathione, 0.1% (v/v) Triton X-100

SDS-PAGE

Lysis buffer	1% (v/v) NP-40, 0.15 M NaCl, 10 mM EDTA, 1 mg/ml IAA 1 mM PMSF, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)
Running buffer	25 mM Tris, 0.19 M glycine, 0.1% SDS
Sample buffer (4X)	0.2 M Tris-HCl (pH 6.8), 40% (v/v) glycerol 8% (w/v) SDS, BPB

Western blot

Anode 1 buffer	0.3 M Tris-HCl, 20% methanol, pH 10.4
Anode 2 buffer	25 mM Tris-HCl, 20% methanol, pH 10.4
Cathode buffer	25 mM Tris-HCl, 40 mM glycine, 20% methanol, pH 9.4
Washing buffer	0.1% (v/v) Tween20, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris HCl (pH 7.4)
Blocking buffer	10% skimmed milk (雪印乳業) solved by washing buffer

細胞分画

Hypotonic buffer	10 mM KCl, 20 mM Hepes (pH 7.4), 5 mM MgCl ₂ 0.1 mM EDTA
------------------	--

TritonX-114

X-114 hypotonic buffer	10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.15 M NaCl 0.5% (v/v) Triton X-114
X-114 separation buffer	10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.15 M NaCl 0.06% (v/v) Triton X-114, 6% (w/v) sucrose

糖鎖処理

O-lysis buffer	1% (v/v) NP-40, 10 mM EDTA, 1 mg/ml IAA 1 mM PMSF, 20 mM Tris-maleate (pH 6.0)
N-lysis buffer	1% (v/v) NP-40, 10 mM EDTA, 1 mg/ml IAA 1 mM PMSF, 50 mM Tris-maleate (pH 8.6)

Proteinase protection assay

Reaction buffer	10 mM CaCl ₂ , 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
Stop buffer	4 µl 0.2 M PMSF, 10 µl Sample buffer(×4), 26 µl D-PBS

FACS

FACS buffer	0.1% BSA, 0.1% NaN ₃ solved by D-PBS
-------------	---

免疫染色

細胞固定液	3% (v/v) Formaldehyde Solution in D-PBS
Blocking buffer	1% BSA solved by D-PBS
Blocking buffer 2	10% Block Ace solved by D-PBS
封入液	2.3% 1.4-diazabicyclo-2-octame (DABCO) 50% (v/v) glycerol in D-PBS

免疫沈降

Lysis buffer	1% (v/v) NP40, 10 mM EDTA (pH 7.4), 20 mM IAA 1 mM PMSF
Wash buffer	0.2% (v/v) NP40, 20 mM IAA, 1 mM PMSF solved by D-PBS

EMSA

EMSA Hypotonic buffer	10 mM Hepes-KOH (pH 7.8), 0.1 mM EDTA(pH 8.0) 10 mM KCl, 1mM DTT, 0.5 mM PMSE, 2 µg/ml Aprotinin 2 µg/ml Leupeptin, 1mM Sodium orthovanadate
EMSA Extraction buffer	50 mM Hepes-KOH (pH 7.8), 0.1 mM EDTA (pH8.0) 420 mM KCl, 5 mM MgCl ₂ , 20% (v/v) glycerol, 1mM DTT 0.5 mM PMSF, 2 µg/ml Aprotinin, 2 µg/ml Leupeptin 1mM Sodium orthovanadate

2-2 実験方法

2-2-1 6×His-SIMPLE の精製、抗体の作製

SIMPLE cDNA の ORF を、以下に配列を記したプライマーにより 1-1-14 で得た断片を鋳型として pfu polymerase を用いて増幅し、Blunt-end vector (Invitrogen) にサブクローニングした。目的断片を *Bam*HI と *Hind*III 消化により切り出し、精製後、インフレーションになるように pQE-30 ベクター (QIAGEN) に挿入し、大腸菌株 M15 [pREP4] (QIAGEN) に transform した。6×His-SIMPLE の精製には Ni-NTA agarose カラム (QIAGEN) を用い、方法は付属のマニュアルに準拠した。精製は変性条件下で行った。また精製後、変性剤である尿素、還元剤である 2-Mercaptoethanol (2-ME) を透析により除き、再生操作を行った。免疫には 100 µg の 6×His-SIMPLE を含む溶液、400 µl に 600 µl の Freund's complete adjuvant (DIFCO) を加えたものを用い、1 週間ごとに計 4 回、ウサギの両足のリンパ節付近に皮内投与した。4 回目の免疫後、ブーストを行い、採血を行った。血清中の IgG は、終濃度 33% の硫化アンモニウムを用いて沈殿させ、血清量の 1/10 量の D-PBS に懸濁後、D-PBS に対して透析した。また、IgG のタンパク質濃度は、その溶液の 280 nm の吸光度を測定し、IgG の比吸光係数 ($E^{1\%}$) を 13.6 として求めた。

<i>Bam</i> HI-SIMPLE	: 5'-ggATCCATgTCggTTCCAggACCTTA-3'
<i>Hind</i> III-SIMPLE	: 5'-AAgCTTCTACAAACgCTTgTAaggTgC-3'

2-2-2 GST-SIMPLEATM の精製

SIMPLE cDNA の膜貫通領域までの配列を、以下に配列を記したプライマーにより 1-1-14 で得た断片を鋳型として pfu polymerase を用いて増幅し、Blunt-end vector にサブクローニングした。目的断片を *Bam*HI と *Eco*RI 消化により切り出し、精製後、インフレーションになるように pGEX-2T ベクター (Amersham Pharmacia) に挿入し、大腸菌株 DH5a に transform した。GST-SIMPLEATM の精製は Salkosyl (N-Lauroylsarcosine) を用いる可溶化条件により行った (31)。200 ml の菌ベレットを 100 mg/ml の Lysozyme を含む STE buffer、12 ml で懸濁し、氷上で 15 分 incubate した。0.5 M DTT を終濃度 5 mM、STE buffer で 10% に調整した Salkosyl を終濃度 1.5% になるように加え vortex した後、sonication を行った。STE buffer で 10% に調整した Triton X-100 を終濃度 2% になるように加え、STE buffer で平衡化しておいた 4 ml の 50% Slurry Glutathione Sepharose 4B (Amersham Pharmacia) を含むカラムに apply した。30 ml の STE buffer で wash した後、10 ml の Elution buffer を用いて溶出を行った。得られたサンプルを D-PBS で透析後、吸光度よりタンパク濃度を測定し、glycerol を終濃度 10% になるように加え -20°C で保存した。

<i>Bam</i> HI-SIMPLE	: 5'-ggATCCATgTCggTTCCAggACCTTA-3'
----------------------	------------------------------------

EcoRI-SIMPLE

: 5'-gAATTCCTACAAACgCTTgTAaggTgC-3'

2-2-3 発現 construct およびトランスフェクション

SIMPLE の局在解析には CLONTECH 社の GFP 融合ベクターである pEGFP-C1、pEGFP-N1 それぞれに SIMPLE を組み込んだ construct を、その他の解析には Invitrogen 社の pcDNA3 ベクターに SIMPLE を組み込んだ construct を用いた。それぞれのベクターの構築は、以下に記した制限酵素サイトを含むプライマーにより 1-1-14 で得た断片を鋳型とした PCR で得られた増幅断片を用い行った。細胞への導入は、construct を EndoFree Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) により調整を行った後、Lipofection 法あるいはリン酸カルシウム法により行った。Lipofection には LipofectAMINE PLUS Reagent、Lipofectamine 2000 (GIBCO)、FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche) を用い、リン酸カルシウム法には Mammalian Transfection kit (Stratagen) を使用した。また、方法はそれぞれの試薬に付属のマニュアルに準拠した。

・ pEGFP-C1

XhoI kozak SIMPLE-5' : 5'-CTCgAgCCACCATgTCggTTCCAaggACCTTA-3'

HindIII-SIMPLE : 5'-AAgCTTCTACAAACgCTTgTAaggTgC-3'

・ pEGFP-N1

XhoI kozak SIMPLE-5' : 5'-CTCgAgCCACCATgTCggTTCCAaggACCTTA-3'

XbaI SacII SIMPLE-3' : 5'-TCTAgACCgCggCAAACgCTTgTAaggTgCCCA-3'

・ Flag-SIMPLE pcDNA3

BamHI-kozak Flag SIMPLE-5' : 5'-ggATCCCCACCATggACTACAAaggACgACgATgACAAgTCggT
TCCAaggACCTTACCA-3'

EcoRI-SIMPLE : 5'-gAATTCCTACAAACgCTTgTAaggTgC-3'

・ SIMPLE pcDNA3

BamHI kozak SIMPLE-5' : 5'-ggATCCCCACCATgTCggTTCCAaggACCTTA-3'

EcoRI-SIMPLE : 5'-gAATTCCTACAAACgCTTgTAaggTgC-3'

2-2-4 可溶化試料の調整および SDS-PAGE

Trypsin 液を用い細胞を回収した後、 1×10^7 cells/ml になるよう lysis buffer を加え室温で 20 分処理し細胞の可溶化を行った。可溶化後、4°C、12,000 rpm、20 分間遠心を行い、得られた上清を可溶化試料とした。可溶化試料のタンパク質量は PIERCE 社製 (Rockford, Illinois) の Micro BCA 液を用い、BSA 当量でキット付属のマニュアルに準拠し定量した。可溶化試料に、4×sample buffer および、還元する場合は 2-ME を総サンプルの 7%になるように加え、5 分間煮沸した後、12.5%の SDS-PAGE で分離を行った。

2-2-5 Western blot 解析

SDS-PAGE 後、ゲルから PVDF 膜 (MILLIPORE, Bedford, MA) への蛋白質の転写は以下の方法で行った。まず始めに、ゲル (6.5×5cm) を cathode buffer 中で 10 分間振とうした。また同時に PVDF 膜をメタノールによる励起後、anode buffer 2 中で 5 分間振とうした。振とう終了後、転写装置の陽極側から順に、anode buffer 1 を浸した 3MM 紙 2 枚、anode buffer 2 を浸した 3MM 紙 1 枚、同 buffer で平衡化した PVDF 膜 1 枚、cathode buffer に浸したゲル、最後に同 buffer を浸した 3MM 紙 4 枚を重ね、80 mA で 80 分間通電した。転写後、膜を blocking buffer で 1 時間反応させた。washing buffer で wash した後、任意の一次抗体および HRP 標識された二次抗体により反応を行い、ECL 試薬 (Amersham Pharmacia) により検出を行った。

2-2-6 細胞分画

THP-1 細胞 1.5×10^8 cells を 4°C、 $1,000 \times g$ で遠心し、回収後 D-PBS で 3 回 wash した。細胞ペレットを 2 ml hypotonic buffer で 1 回 wash し、4°C、 $1,000 \times g$ で 5 分遠心した。細胞ペレットを 200 μ l の hypotonic buffer で懸濁し、20 分氷上で incubate した後、Dounce homogenizer (WHEATON, MILLVILLE, NJ) を用い 50 ストロークすることで破碎を行った。核画分を $1,000 \times g$ 、mitochondria、lysosome 画分を $8,000 \times g$ 、microsome 画分を $100,000 \times g$ で遠心することで回収し、 $100,000 \times g$ の遠心後の上清を細胞質画分とした。それぞれの画分を適量の Sample buffer で懸濁後、SDS-PAGE で分離し、SIMPLE 抗体および LAMP-1 抗体を用い、Western blot により解析した。

2-2-7 Triton X-114 を用いた膜タンパクの確認

膜タンパクの分離は Bordier の方法に従った (32)。THP-1 細胞、約 5×10^6 cells に対して 0.5 ml の X-114 hypotonic buffer を加え懸濁し、氷上で 60 分 incubate した。4°C、 $1,800 \times g$ で 10 分間遠心した後、上清を上清の 1.5 倍量の冷却しておいた X-114 separation buffer に重層した。30°C で 3 分 incubate し、室温、 $300 \times g$ で 3 分間遠心した。再度、上清を回収し Triton X-114 を終濃度 0.5% になるように加え攪拌した。また、下層の溶液は水溶性画分として保存した。0.5% の Triton X-114 を含む上清に対して、1.5 倍量の X-114 separation buffer に、その上清を加え、30°C で 3 分 incubate した。室温、 $300 \times g$ で 3 分間遠心した後、下層の溶液は水溶性画分として先程の同画分に回収し、上清は Triton X-114 を終濃度 2% になるように加え攪拌した。2% の Triton X-114 を含む上清を、30°C で 3 分 incubate し、室温、 $300 \times g$ で 3 分間遠心し、得られた上清を detergent 画分とした。水溶性画分および detergent 画分に X-114 hypotonic buffer を加え同量になるよう調整し、SIMPLE 抗体および BIGM-103 抗体を用い、Western blot により解析した。

2-2-8 糖鎖消化処理

SIMPLE の糖鎖修飾の可能性を調べるために、N-glycosidase および O-glycosidase (Genzyme, Cambridge, MA) を用いて糖鎖消化処理を行った。THP-1 細胞あるいは

SIMPLE のリコンビナント体を一過的に発現させた RK13 細胞 (RK13-SIMPLE 細胞) を *N*-lysis buffer もしくは *O*-lysis buffer で 2 mg/ml になるように可溶化し、4°C で 45 分転倒混和した。4°C、15,000 rpm で 30 分遠心を行い、得られた上清 100 µl に 100 µU の neuraminidase (SIGMA) を加え、37°C、1 時間反応させた。次いで 250 mU の *N*-glycosidase もしくは 1 mU の *O*-glycosidase と 37°C、16 時間反応させた。反応させたサンプルを SDS-PAGE で分離し、SIMPLE 抗体および CD46 抗体を用い、Western blot により解析した。

2-2-9 Proteinase protection assay

遠心による細胞内小器官の分画により得た lysosome 画分を reaction buffer で wash し、4°C、10,000 rpm で 10 分遠心した。ペレットを 0.2 µg/µl の Proteinase K を含む reaction buffer で懸濁後、4°C で 1 時間 incubate した。4°C、10,000 rpm で 10 分遠心し、得られたペレットを stop buffer で懸濁しサンプルとした。サンプルを SDS-PAGE で分離し、SIMPLE および LAMP-1 抗体を用い、Western blot により解析した。

2-2-10 Flow cytometry analysis

培養液を 15 ml のチューブに回収し、培養皿に付着している細胞を剥がすため、5 ml の 10 mM EDTA 溶液を加え、4°C で 20 分間静置した。細胞を同溶液で懸濁後、先程のチューブに回収し、4°C、1,500 rpm で 5 分間遠心した。上清を捨て、D-PBS で洗浄後、適当量の FACS buffer に懸濁し、一検体当たり 500 µl になるように分注した。細胞内タンパクを検出する場合には、再度 4°C、1,500 rpm で 5 分間の遠心をした後、500 µl の 1×FACS Permeabilizing Solution (BECTON DICKINSON, San Jose, CA) で処理を施した。4°C、1,500 rpm で 5 分間の遠心後、20 µl の 5 µg/ml の LITAF 抗体もしくは LAMP-1 抗体を加え 30 分、氷上で反応させた。二度、FACS buffer で洗浄を行い、一次抗体のそれぞれの isotype に合う FITC 標識された二次抗体、25 µg/ml を 20 µl 加え氷上で 30 分反応させた。二度、FACS buffer で洗浄を行い、0.5% パラホルムアルデヒドを含む D-PBS 溶液を 500 µl 加えた。蛍光強度の測定には FACSCalibur (BECTON DICKINSON) を用い、データ解析には付属のソフトである Cell Quest を用いた。

2-2-11 免疫染色

4 well chamber slide (Nalge Nunc International, Naperville, IL) に細胞を約 3×10^4 cells/well になるように撚き終夜培養した。培養後、well を D-PBS で洗浄し、細胞固定液を加え室温で 30 分静置し、細胞を固定した。固定した細胞の膜を透過させる場合は 1ml の D-PBS で 0.2% に希釈した Triton X-100 溶液または 1% BSA を含む D-PBS で 0.5% に希釈した saponin 溶液を加え、Triton に関しては室温で 15 分、saponin に関しては室温で 30 分間静置した。固定、透過処理済みの細胞を D-PBS で洗浄した後、blocking buffer 1 で室温、10 分間振とうしブロッキングを行った。次いで、一次抗体として blocking buffer 1 で 500 倍希釈した SIMPLE 抗体または blocking buffer 1 で 5

$\mu\text{g/ml}$ に調整した LITAF 抗体を用いて 37°C で 1 時間反応した。細胞を 1% BSA を含む D-PBS 溶液洗浄し、1% BSA を含む D-PBS 溶液で 100 倍希釈した一次抗体の isotype に合った FITC で標識されている二次抗体により 37°C で 30 分反応した。二重染色を行う場合は、更に 1% BSA を含む D-PBS 溶液で細胞を洗浄した後、1% BSA を含む D-PBS 溶液で $5\ \mu\text{g/ml}$ に調整した LAMP-1 抗体で 1 時間、1% BSA を含む D-PBS 溶液で 100 倍希釈した rhodamine B-conjugated goat anti-mouse IgG 抗体で 30 分反応した。酸性器官の染色は細胞培養液に LysoTracker Red DND-99 (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) を最終濃度が $75\ \text{nM}$ になるように加え、 37°C で 1 時間反応させることで行った。検鏡には OLYMPUS 社製の共焦点レーザー顕微鏡を用い、画像の解析には同顕微鏡付属のソフト FLUOVIEW により行った。

2-2-12 免疫沈降法

Trypsin 液により回収した細胞、 1×10^7 cells を $200\ \mu\text{l}$ の lysis buffer で懸濁し、室温で 30 分間 incubate した。 4°C 、 $10,000\ \text{rpm}$ 、30 秒の遠心で得られた上清に、D-PBS で洗浄後、0.2% の NP40 を含む D-PBS で 50% slurry に調整しておいた Protein G Sepharose (Amersham Pharmacia) を $50\ \mu\text{l}$ 加えた。 4°C 、1 時間の転倒混和後、 4°C 、 $10,000\ \text{rpm}$ で 30 秒遠心し、得られた上清に $10\ \mu\text{g}$ の Flag 抗体を加え、氷上で 1 時間反応した。0.2% NP40 を含む D-PBS で 50% slurry に調整した Protein G Sepharose、 $25\ \mu\text{l}$ を加え 4°C で一晩転倒混和した。反応後、 4°C 、 $10,000\ \text{rpm}$ 、30 秒の遠心を行い、ペレットを回収した。ペレットを適量の wash buffer で 3 回、洗浄を行い、 $100\ \mu\text{l}$ の 1% の SDS を含む wash buffer で懸濁後、5 分間煮沸し免疫吸着物を溶出した。 4°C 、 $10,000\ \text{rpm}$ 、30 秒の遠心後、得られたサンプルを SDS-PAGE で分離し、SIMPLE 抗体、Nedd4 抗体および ubiquitin 抗体を用い、Western blot により解析した。

2-2-13 ゲルシフトアッセイ

1) 核抽出液の調整

単球細胞 1×10^8 cells を D-PBS で洗浄後、室温、 $1,500\ \text{rpm}$ で 5 分間遠心し回収した。得られた細胞を $1\ \text{ml}$ の hypotonic buffer で懸濁し、10 分氷上で incubate した後、Dounce homogenizer を用いて破碎した。 4°C 、 $2,000\ \text{rpm}$ で 10 分遠心し、細胞を回収後、extraction buffer、 $500\ \mu\text{l}$ で懸濁し、 4°C で 30 分間転倒混和した。 4°C 、 $15,000\ \text{rpm}$ で 30 分遠心し、上清を回収し核抽出物とした。

2) probe の作製

LITAF が結合すると報告されている 64-bp からなる nucleotide 断片を合成依頼した。sense と anti-sense の nucleotide 断片を TE buffer で $20\ \mu\text{M}$ に調整し、 $5\ \mu\text{l}$ ずつを混ぜ合わせ、 95°C で 2 分間 incubate した。室温になるまで放置した後、同反応液 $5\ \mu\text{l}$ に $5\ \mu\text{l}$ の $10 \times$ kinase buffer、 $15\ \mu\text{l}$ の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 、T4 Polynucleotide kinase $10\ \text{U}$ を加え、滅菌

超純水により 50 μ l に調整し 37°C で 15 分間 incubate した。反応後、2 μ l の 0.5 M EDTA (pH 8.0)、50 μ l の TE buffer を加え、MicroSpin G-25 columns (Amersham Pharmacia) を用いて精製を行った。

64 bp Forward	5'-TgAggCCTCAAgCTgCCACCAAgCCCCAgCTCCTTCTCCCCgCAgA CCCAAACACAggCCTCA-3'
64 bp Reverse	5'-TgAggCCTgTgTTTgggTCTgCggggAgAAggAgCTgggggCTTggT ggCAgCTTgAggCCTCA-3'
NF-kB Forward	5'-AgTTgAggggACTTTCCCAggC-3'
NF-kB Reverse	5'-gCCTgggAAAgTCCCCTCAACT-3'

3) binding reaction

1) で調整した核抽出物および、Gel Shift Assay Systems (Promega) に添付の HeLa 核抽出液を用いて、2) で作製した probe に結合するタンパク質の検出を行った。3-1-で調整した核抽出物を用いる場合、O.D 値より 2 mg を、Hela 核抽出液は 1 μ l を各反応系に使用した。Probe はシンチレーションカウンターにより測定を行い、5,000 cpm を各反応系に用いた。Competitor を使用する場合は probe の約 100 倍量を反応系に加えた。2 μ l の 5 $\times$ binding buffer、核抽出物、competitor、滅菌超純水を加え 9 μ l とし、室温で 10 分間 incubate した。Probe を加え、さらに 20 分間 incubate した後、3 μ l を準備しておいた 4% acrylamide gel に apply し、0.5 $\times$ TBE、350 V で 20 分泳動した。泳動後、ゲルを 3MM 紙に転写し、gel dryer を用いて乾燥した。乾燥したゲルを HyperfilmTM MP (Amersham Pharmacia) を用いて露光した。

2-3 実験結果

2-3-1 SIMPLE の motif 解析

SIMPLE の機能を推定すべく、SIMPLE の有する motif について data base により検索を行った。MotifScan および ScanProsite による検索の結果、SIMPLE は N 末端側、4-73 aa の領域で Proline 残基を多く有する事が、また、ScanProsite による検索の結果、C 末端側、119-151 aa の領域で Cystein 残基を多く有する事が示された。通常、タンパク質中に含まれる Proline 残基の割合は 4.92%であり、Cystein 残基の割合は 1.69%である。一方、SIMPLE は全アミノ酸残基、161 残基中、Proline 残基を 24 残基有し、割合にすると 14.9%と通常の 3 倍の Proline 残基を、Cystein 残基については 11 残基、割合にすると 6.8%と通常の 4 倍の Cystein 残基を有する。更に、領域を絞って、それぞれのアミノ酸残基の割合を見ると 4-73 aa の領域における Proline 残基の割合は 25%を越え、119-152 aa の領域における Cystein 残基の割合は 23%を越えていることが分かる。

多数の Proline-rich 配列を有するタンパクにおいて、Glutamine 残基が多く含まれることが知られている (33)。一方、SIMPLE は Glutamine 残基ではなく、Serine 残基や Threonine 残基、Tyrosine 残基を Proline-rich 配列中に含む。これまでに Proline-rich 配列の多種多様な機能について論じられてきたが (33-34)、それら報告にある配列の中で、Nedd4 等のタンパクが有する domain である WW domain との相互作用が報告されている PY motif (PPXY: X is any amino acid) を SIMPLE 配列中に確認することができた (34-36) (図 1-4)。Nedd4 は Ubiquitin ligase (E3) として機能することが報告されており、幾つかの膜タンパクは Nedd4 を介して lysosome へと輸送されている (36)。このことから、SIMPLE は Nedd4 と相互作用することで細胞内局在を規定されて可能性が考えられる。

Cystein-rich な領域に関しては ScanProsite による検索結果より、C3HC4 type zinc RING finger 様の構造を形成する可能性が示された (37-38)。この可能性の是非について、zinc finger 構造を有するタンパクと、SIMPLE の Cystein-rich な領域間において整列比較を行ったところ、SIMPLE の Cystein-rich な配列は FYVE domain や LIM domain ではなく、RING finger domain の consensus に最も類似していることが明らかとなった (37-39) (図 2-1)。RING finger domain の loop1 は Cystein、3 残基と Histidine、1 残基により構成される。一方で、SIMPLE の loop1 は全ての Cystein 残基により構成される。これまでに、loop を構成するアミノ酸残基の違いから RING H2 型と RING variant 型のそれぞれの motif が存在することが報告されており (38)、SIMPLE も同様に RING variant 型の構造を取るものと考えられた。SIMPLE は既知の核移行シグナル (nuclear localization signal: NLS) を配列中に持たないにも関わらず、PSORT による局在予測では核に存在する可能性が 52%であることが示された。幾つかの RING finger domain を有するタンパクにおいて核酸への RING finger domain を介した結合が報告されていることから (20-21)、先程の局在予測と併わせて、SIMPLE が LITAF で報告

されている様に、転写因子として機能している可能性が考えられた。

一方で、SIMPLE の hydropathy profile によるシグナル配列の有無について検索した結果では、SIMPLE の RING finger domain を形成すると考えられる領域内で膜貫通領域を形成している可能性が考えられた (図 2-4A)。この可能性について膜貫通領域を推定するサイト、PSORT および SOSUI による検索を行ったところ、同様に RING finger domain を形成する領域内で膜貫通領域を有する可能性が示された (図 1-4)。更に、興味深いことに、lysosome 局在シグナル (lysosome targeting signal : LTS) として知られる di-leucine motif および tyrosine based motif (YXXΦ : X represent any amino acid and Φ is a bulky hydrophobic amino acid) が SIMPLE の予測膜貫通領域よりも C 末端側の配列内に確認することができた (40-43) (図 1-4)。以上の検索結果より、SIMPLE が RING finger domain を有し、転写因子として機能する可能性と、膜タンパクとして lysosome に局在する可能性が考えられたので、次に SIMPLE の局在について検討することにした。

2-3-2 GFP による SIMPLE 細胞内局在の検討

SIMPLE の N 末端あるいは C 末端に GFP が融合したタンパクが発現するベクターを構築し、COS-7、HeLa、NIH3T3 細胞に一過的に発現させ、それぞれの細胞内局在について検討を行った。コントロールには insert を含まない pEGFP-N1 ベクターを用いた。ベクター導入、24 時間後に検鏡を行ったところ、コントロールでは細胞全体で蛍光を発しているのに対し、SIMPLE の C 末端に GFP を融合した construct (SIMPLE-GFP) では核に凝縮して蛍光が確認された。また、N 末端に GFP を融合した construct (GFP-SIMPLE) では、golgi、lysosome 等の細胞内小器官が存在する perinuclear 領域で強い蛍光が確認された (図 2-2A)。それぞれの蛍光が異なった細胞内局在を示したことから、次に、GFP 抗体および SIMPLE 抗体を用いた Western blot により、発現しているタンパクの正常性について確認を行った。その結果、GFP-SIMPLE のみが GFP の融合タンパクとして正常な発現をしていることが明らかとなった (data now shown)。以上の結果および、SIMPLE が LTS を有する可能性が motif 検索の結果より考えられたことから、SIMPLE のより詳細な細胞内局在について、特に SIMPLE の endogenous な局在について検証することにした。

2-3-3 SIMPLE 抗体を用いた SIMPLE 細胞内局在の同定

SIMPLE 抗体を用いた、細胞分画および免疫染色により SIMPLE 細胞内局在についての検討を試みた。単球細胞を常時調整することが困難であること、および、SIMPLE がヒト組織において遍在して発現していたことから、株化された細胞における SIMPLE の発現について Western blot により確認し、発現細胞を実験材料として用いることにした。また、THP-1 細胞および DLD-1 細胞に関しては、LITAF/PIG7 で報告されているタンパクの存在確認も兼ねた。コントロールには、SIMPLE のリコンビナント体を一過的に発現させた、ウサギ腎由来繊維芽細胞、RK13 細胞 (RK13-

SIMPLE 細胞) の可溶化試料を用いた。単球、HeLa 細胞、THP-1 細胞、DLD-1 細胞、RK13 細胞および RK13-SIMPLE 細胞を用い、検討を行ったところ、RK13 細胞を除く全ての細胞において 24 kDa のシングルバンドを確認した(図 2-2B)。LITAF の推定分子量は 24 kDa であり、今回、実験で確認したバンドと同サイズである。一方、RK13/SIMPLE で確認したバンドも同サイズであったことから、24 kDa で確認したバンドは全て SIMPLE 由来のバンドであると考えられた。

細胞株での発現が確認されたので、次に、免疫染色による局在検討を行った。実験には局在解析に高頻度に用いられている、付着細胞、HeLa 細胞を用いた。まず、SIMPLE 抗体のみを用い、透過あるいは不透過条件で調整した細胞の SIMPLE の局在について観察したところ、不透過条件では染色像を得ることはできず、透過条件により peri-nuclear 領域で染色像を得ることができた (図 2-3A)。この細胞内器官を特定すべく、次に lysosome 染色用試薬である LysoTracker Red DND-99 を用い SIMPLE 抗体との二重染色を行ったところ、染色像が一致する結果が得られた (図 2-3A)。さらに、lysosome および late endosome の膜を構成することが知られているタンパク、LAMP-1 に対する抗体との二重染色においても同様の結果を得た (43) (図 2-3A)。以上の結果より、SIMPLE は lysosome および late endosome に局在することが明らかとなった。この実験に用いた細胞が免疫系の細胞でなかったことから、次に、ヒト単球細胞株である THP-1 細胞を用い、一般的手法により細胞分画を行うことで、SIMPLE の細胞内局在について検討を行うことにした。数段階に分けて遠心操作を行い、得られたそれぞれの画分を SDS-PAGE で泳動後、SIMPLE 抗体を用いた Western blot により解析を行ったところ、免疫染色により得られた結果同様、8,000×g の遠心で得られた lysosome および mitochondria を多く含む画分においてシグナルを検出することができた。また、LAMP-1 抗体を用いた Western blot による結果においても、同画分で最も強いシグナルを検出した (図 2-3B)。以上の結果より、SIMPLE は細胞種を問わず、lysosome、late endosome に局在していることが明らかとなった。

2-3-4 SIMPLE の膜統合および糖鎖修飾の検証

early endosome に局在するタンパク、EEA1 は Zinc finger domain の一つである FYVE domain を有し、その domain を介して脂質膜に結合している (39, 44)。SIMPLE は免疫染色および細胞分画による実験結果より、lysosome / late endosome に局在することが明らかとなっており、また、motif 検索の結果より、Zinc finger domain の一つである RING finger domain および膜貫通領域を有する可能性が考えられている。これらのことは、SIMPLE の lysosome への局在が、RING finger domain を介した lysosome 膜への結合によるものか、あるいは、膜貫通領域による脂質二重層への統合によるものか、二つの可能性を示す。そこで、SIMPLE が膜統合タンパクであるか否かについて、Bordier によって報告されている Triton X-114 を用いた、膜統合タンパクを界面活性化剤画分に回収する方法により検討した (32)。結果、SIMPLE は界面活性化剤画分に回収されることが明らかとなった (図 2-4A)。また、ポジティブコントロー

ルとして、BCG-CWS により発現誘導される 7 回膜貫通型の Zn トランスポーターである BIGM-103 についても同様の検討を行ったところ、やはり界面活性剤画分に回収されることが明らかとなった (17) (data not shown)。この結果より、SIMPLE は lysosome 膜に RING finger domain を介して結合するのではなく、膜貫通領域で膜に統合されていることが明らかとなった。

大抵の lysosome 膜タンパクは lysosome 中に含まれる加水分解酵素による分解を免れるため、高度に糖鎖修飾を受けている。SIMPLE は推定分子量、17 kDa であるのに対し、SIMPLE 抗体を用いた Western blot の結果では SIMPLE は 24 kDa のバンドとして確認されることから、SIMPLE が糖鎖修飾を受けている可能性は極めて高い。しかし、SIMPLE の配列中には N 型糖鎖付加配列である NX(S/T)配列は見当たらない。そこで、SIMPLE の O 型糖鎖修飾の可能性について検討することにした。O 型糖鎖修飾される配列は、未だ consensus が得られていないが、NetOglyc 2.0 program により推定することが可能であり、SIMPLE の O-glycosylation 部位について推定したところ、9 つの部位で修飾を受けている可能性が示された (図 2-4B)。この可能性を確認すべく、THP-1 細胞および、RK13-SIMPLE 細胞の可溶化試料を O-glycosidase 処理したサンプルを調整し、そのサンプルと O-glycosidase 未処理サンプルの SDS-PAGE 泳動における移動度の差異を検証したところ、変化を確認することはできなかった (図 2-4B)。一方、同実験を O 型糖鎖の修飾を受けることが知られているタンパク、CD46 について行った結果、移動度の差を確認することができた (data not shown)。また、SIMPLE の N 型糖鎖修飾の可能性についても検証を行ったが、差異を確認することはできなかった (data not shown)。以上の結果から、SIMPLE の SDS-PAGE で確認される分子量の増加は、糖鎖修飾によるものではないことが明らかとなった。SIMPLE のリン酸化部位についても data base により推定を行ったが、顕著なリン酸化部位は見当たらず、SIMPLE の SDS-PAGE で確認される分子量の増加は他の Proline 残基を多く含むタンパク同様、Proline 残基の多さ故であると考えられる (45-46)。

2.3.5 SIMPLE のトポロジー解析

SIMPLE は lysosome 膜タンパクであるが、どのような機構により lysosome に輸送されているか定かでない。SIMPLE の motif 解析の結果、SIMPLE は膜貫通領域よりも N 末端側に幾つかのタンパクの lysosome 輸送に関与することが報告されている Nedd4 との相互作用部位を、また膜貫通領域よりも C 末端側に LTS を有する。SIMPLE はどちらかの機構により lysosome に輸送されていると考えられるが、前者の Nedd4 と相互作用するためには、SIMPLE は 2 型のトポロジーを取る必要があり、後者の LTS が機能するためには SIMPLE は 1 型のトポロジーを取る必要がある。一方、SIMPLE はその hydropathy profile より、シグナル配列を持たない可能性が高く、PSORT によるトポロジー予測でも 2 型のトポロジーを取る可能性が高く示されている。また、SIMPLE が糖鎖修飾を受けていないことから、SIMPLE が 2 型のトポロジーを取る可能性は極めて高い。そこで、まず、THP-1 から調整した lysosome を多く含む画分

を proteinase K で処理することで SIMPLE が分解されるか否か Western blot により検討することにした。また、ネガティブコントロールとして LAMP-1 の分解についても検討を行った。結果、LAMP-1 の proteinase K による分解は確認できないのに対し、SIMPLE は proteinase K により完全に分解されていることが確認された (図 2-5A)。次に、LITAF モノクローナル抗体を用いた SIMPLE のトポロジー解析を行った。lysosome の leumen 側に epitope がある場合、その epitope を免疫染色により検出する場合、細胞を saponin により処理を行う。この現象を利用し、LITAF モノクローナル抗体の epitope 部位を決定した後、その抗体を用いて免疫染色を行うことにした。まず、LITAF モノクローナル抗体が SIMPLE を認識していることを RK13-SIMPLE 細胞の可溶化試料を用いて Western blot により確認したところ、検出している事実を得ることができた (data not shown)。また、この結果から、LITAF 抗体は SIMPLE の膜貫通領域の N 末端側を認識していることが明らかとなった。この抗体を用い saponin 未処理の HeLa 細胞に対して免疫染色を行った結果、SIMPLE 抗体を用いた時と同様の染色像を得ることができた (data not shown)。また、saponin 未処理の HeLa 細胞を LAMP-1 抗体で染色を行ったものに関しては如何なる蛍光も検出することはできず、saponin 処理を行った細胞において染色像を得ることができた (data not shown)。以上の結果より、SIMPLE は 2 型のトポロジーを取ることが明らかとなった。また、SIMPLE が 2 型のトポロジーを取ることが明らかとなったことから、SIMPLE と Nedd4 との相互作用について免疫沈降法により確認を行った。SIMPLE の N 末端に Flag タグが融合したタンパクが発現する construct を Nedd4 が発現していることを確認した HeLa 細胞に一過的に強制発現させ Flag 抗体により免疫沈降後、SIMPLE および Nedd4 抗体を用いた Western blot により検出を行ったところ、相互作用が確認された (図 2-5B)。更に、同サンプルに対してユビキチン抗体により、Nedd4 と相互作用している SIMPLE のユビキチン化についても検証を行ったが、その現象は確認できなかった (data not shown)。

2-3-6 SIMPLE の核および膜移行の確認

SIMPLE は膜タンパクであり、転写因子として機能するには、膜から遊離する必要がある。これまでに、mammalian ではその証明が為されていないものの、酵母において、膜タンパクがユビキチン化を経て転写因子として機能するという報告が為されている。その膜タンパク、SPT23 は ER 膜タンパクであり、E3 である RSP5 により認識、ユビキチン化され、膜貫通領域の手前でプロテアソームによる分解を経て転写因子として機能する (47)。Nedd4 は RSP5 の mammalian ホモログであり、SIMPLE が Nedd4 と相互作用することは本研究で免疫沈降法により確認した。また、別のグループからマウス SIMPLE と、マウス Nedd4 の相互作用が far-western 法により確認されている (48)。SIMPLE が酵母と同様の機構により転写因子として機能しているという仮説を立て、SIMPLE の LPS 刺激後の核移行について、免疫染色による検討を試みた。また、同時に細胞膜への移行の可能性についても同方法および FACS

により検討した。まず、SIMPLE のタンパクレベルでの発現誘導時間について検討するため、LPS 刺激に対する SIMPLE の発現を継時的に Western blot により確認したところ、LPS 刺激後 4 時間で明確な SIMPLE の発現増加を確認することができた (図 2-5C)。また、その発現パターンは Northern blot による解析とほぼ同様の傾向を示した。一方で、ユビキチン化タンパクに見られる様な、スメアーなバンドおよび、24 kDa よりも低分子量のバンドを確認することはできなかった。次に、単球および iDC を LPS で 4 時間刺激し、SIMPLE の局在変化について免疫染色により検討したが、核での蛍光を確認することはできなかった (図 2-6A)。この結果より、SIMPLE の核移行は起こらないと予測されたため、膜への移行についても免疫染色により検討を行ったが、その現象に関しても確認することはできなかった (data not shown)。更に、LITAF 抗体を用いて細胞膜での SIMPLE の発現に関して FACS により検討を行ったところ、細胞を透過した条件のみでシフトを確認することができた (図 2-6B)。この結果より、SIMPLE が 1 型のトポロジーを取り、細胞膜に発現している可能性は否定された。

2-3-7 EMSA 法による SIMPLE の転写因子としての解析

LITAF は TNF- α プロモーター内の 64-bp からなる領域に結合するタンパクとしてクローニングされたことから (13, 16)、SIMPLE の DNA 結合能について EMSA 法により検討することにした。未刺激あるいは、LPS で 4 時間刺激した単球細胞から核抽出液を調整し、64-bp からなる LITAF 結合配列をプローブに解析を行ったところ、領域特異的に結合するタンパクの存在は確認できたが、刺激、未刺激間での差異は見られなかった (図 2-7A)。一方、ポジティブコントロールとして NF- κ B 結合配列をプローブに、同核抽出液を用いて検討した結果では、LPS 刺激により NF- κ B 結合タンパクが増加していることが確認できた (図 2-7B)。次に、LITAF 結合配列に結合するタンパクの SIMPLE 抗体に対する影響について検討したところ、結合の阻害および抗体との複合体形成によるバンドの上昇共に確認することはできなかった (図 2-7A)。最後に、膜貫通領域を含まない SIMPLE リコンビナントタンパクを大腸菌より精製し、LITAF 結合配列との結合についても検討を行ったが、その現象を確認することはできなかった (図 2-7B)。

A.

```

CPSCNKMIVSOLSYNAGALTWLSGSLCLLGCIAGCCFIPFCVDALQDQVDHYCPNCR SIMPLE
CSICTTEPMDLDKA-----LFTEC--GH-SFCEK-CLFEYIEFQNSKLGLK-CPNCR RAD5
CPLCVELFKDP-----VMVAC--GH-NFCRS-CIDKAWEGNSSFA----CPECR Xnf7
CPICLDMLKNTM-----TTKEC--LH-RFCSD-CIVTALRSGNKE-----CPTCR RING-1
CQICEHILADP-----VETNC--KH-VFCRV-CILRCLKVMGSY-----CPSCR RAG-1
CPVCFDYVLP-----PILOCSSGH-LVCVC-CRSKLTC-----CPTCR sina
CPICLELLKEP-----VSADC--NH-SFCRA-CITLNYESNRN-X----CPVCR rpt-1
CTICYENPIDS-----VLYMC--GHMCMCYD-CAIEQWRGVGGGQ----CPVCR neu
CTICMSTVSDLGKTM-----PC--LH-DFCFV-CIRAWTSTSVQ-----CPLCR ORF61
CAVCTDEIAPHLRC-----DTFPC--MH-RFCIP-CMKTWMQLRN-----TCPLCN Vmw110
CPICEEFIYKKQ-----IYQCKSGH-HACKE-CWEKSLETKKE-----CMTCK DG17
CPICLDVAATEA-----QTLPC--MH-KFCLD-CIQRWL-TSTA-----TCPLCN EPO
CCICLDAITGAA-----RALPC--LHA-FCLA-CIRRWLEGRP-----TCPLCR p135
CAICLDEYEDGDKL-----RILPC-S-HAYHC-K-CVDPWL-TKK-----TCPVCK CRZF

```

B.

```

CX2 CX 9-39 CX1-3HX2-3CX2 CX 4-48 CX2C RING
CX2 CX 16-23 CX2-4CX2 HX2 CX 16-23 CX2C/H/D LIM
CX1-4CX3-4FX4-14RXHHCRX CGX3 CX2-6CX11-31RXCX2C FYVE

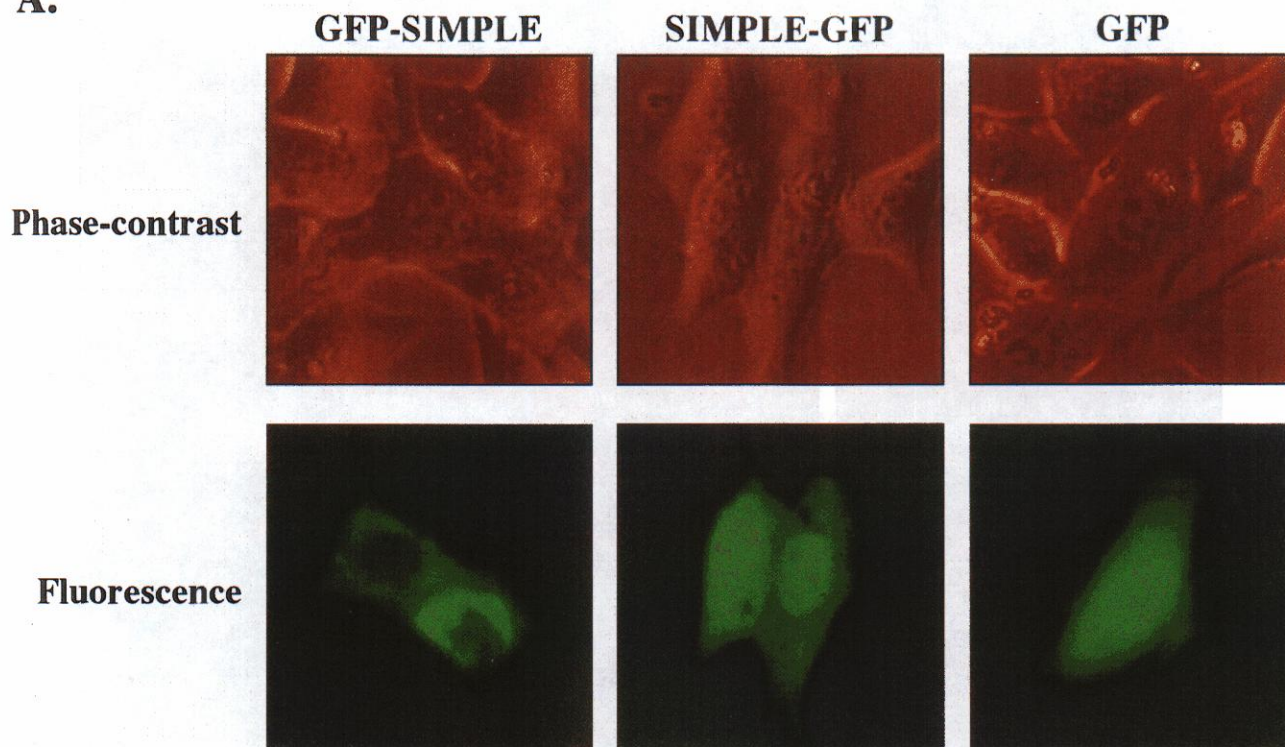
```

図2-1. SIMPLEとRING finger domainを有するタンパクとのalignment

A. SIMPLEおよびRING finger domainを有するタンパクとのalignmentの結果。これらタンパクの配列は参考文献(49)および(50)より引用した。

B. RING finger、LIM、FYVE domainにおけるconsensus。LIMおよびFYVE domainの構造維持に必須のアミノ酸を太字で示した。SIMPLEはRING finger domainに最も構造が似ている。

A.



B.

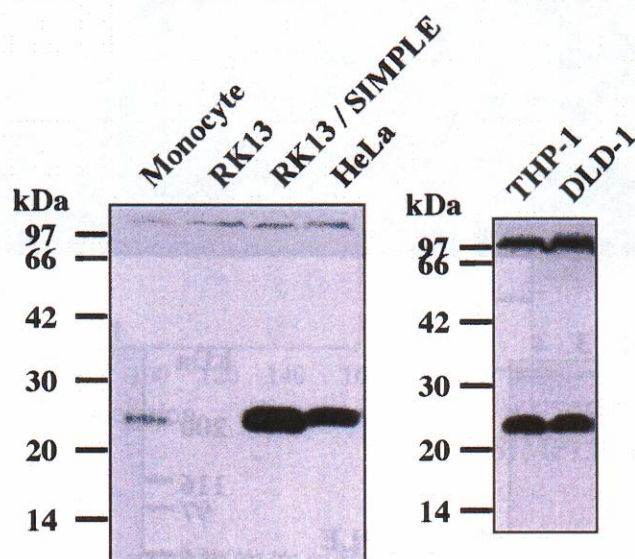
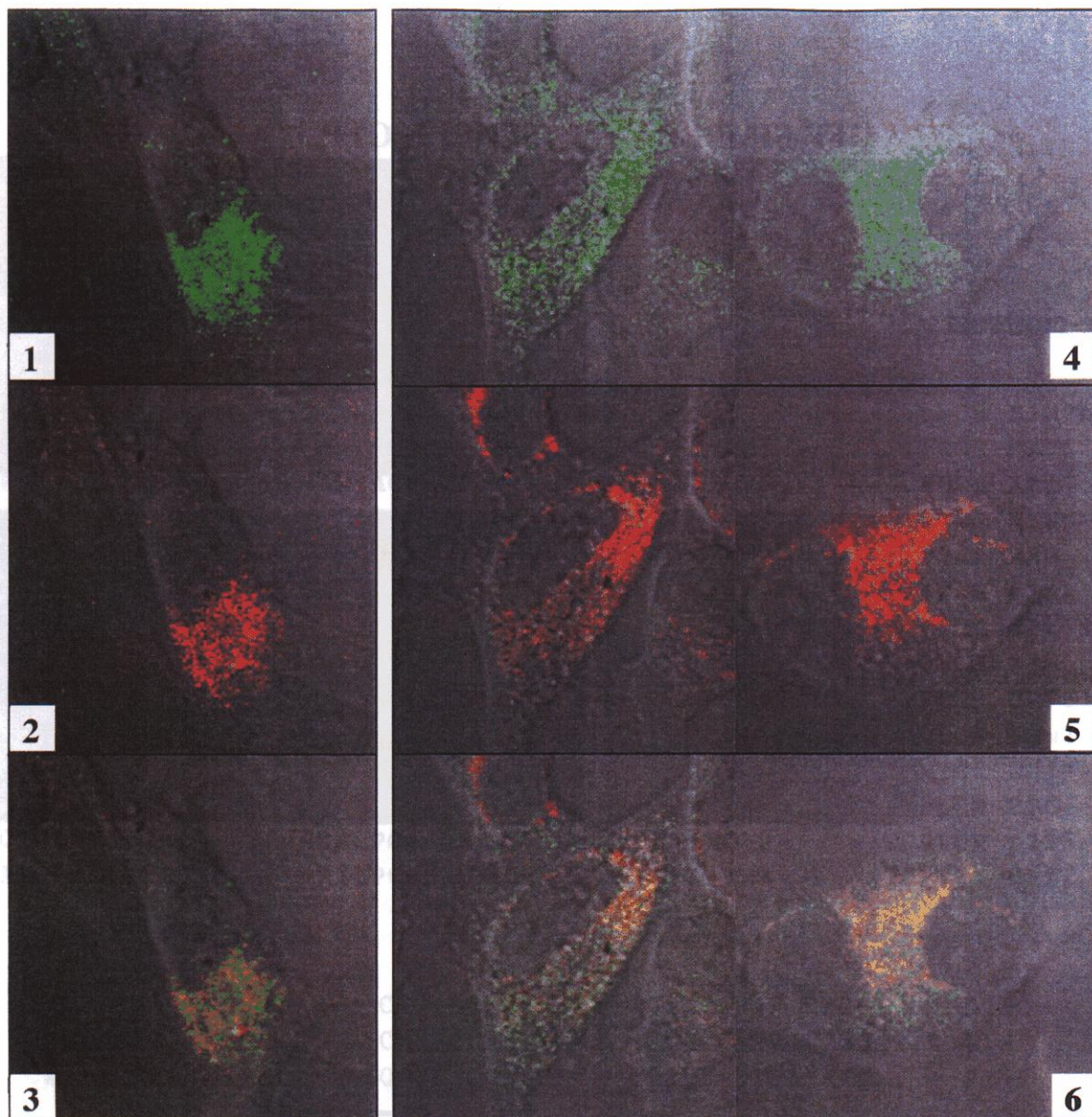


図2-2. GFP融合SIMPLEの発現局在と細胞株におけるSIMPLEの発現確認

A. HeLa細胞におけるGFP融合SIMPLEの局在。SIMPLEのN末端にGFPが融合したタンパクは核周辺に、SIMPLEのC末端にGFPが融合したタンパクは核において発現局在が確認された。コントロールにはGFPのみを発現させた。それぞれの細胞から可溶化試料を調整し、Western blotによる発現の正常性を確認した結果、N末端にGFPが融合されたSIMPLEのみが正常に発現していることが明らかとなった。

B. 各細胞におけるSIMPLEの発現。RK13細胞を除く、SIMPLEが単離された単球、LITAFが単離されたTHP-1細胞、PIG7が単離されたDLD-1細胞、HeLa細胞およびSIMPLEを一過的に発現させたRK13細胞、全ての細胞において同サイズ、24 kDaのバンドを確認した。

A.



B.

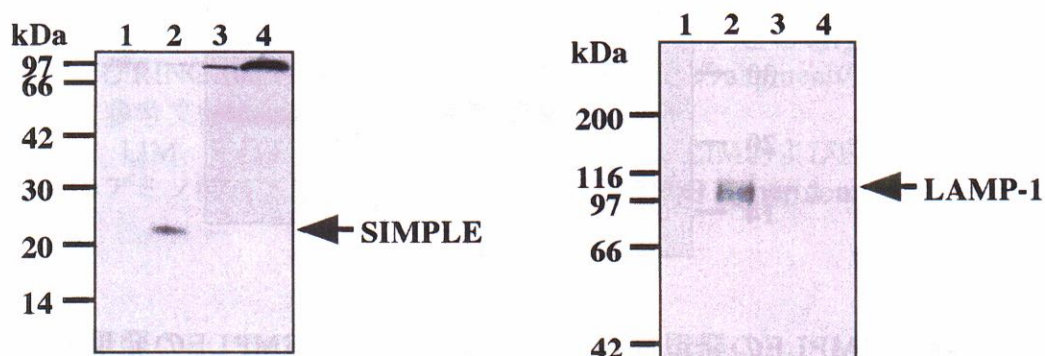
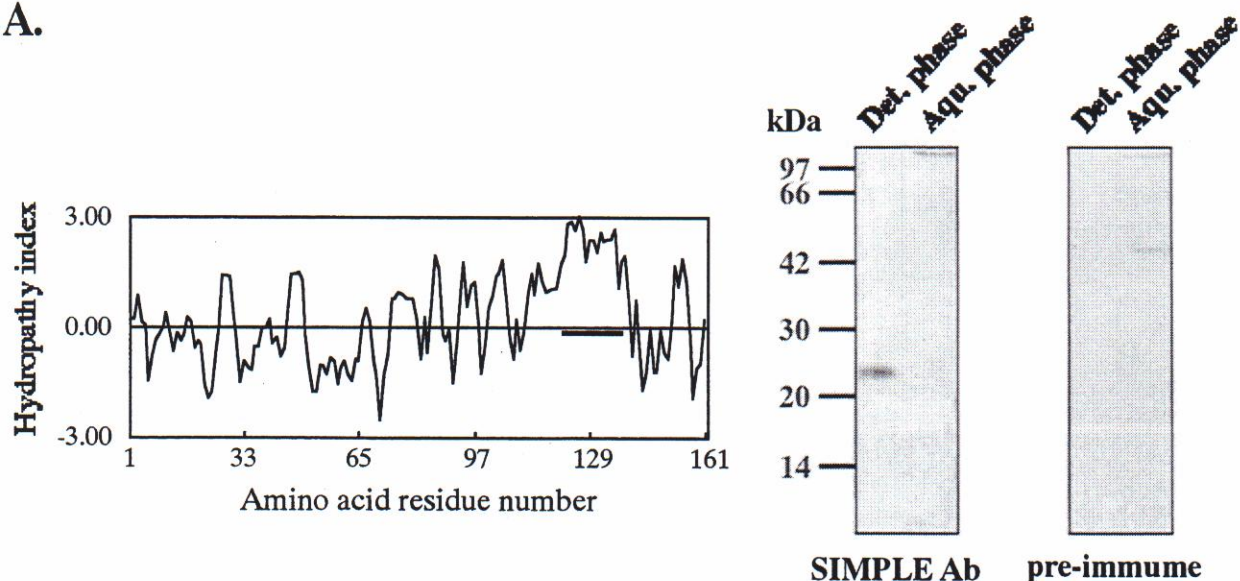


図2-3. SIMPLEのlysosomeでの発現局在

A. HeLa細胞を用いた免疫染色によるSIMPLEの局在解析。緑の染色はSIMPLEによる染色(panel.1, 4)を赤の染色はLysotracker(panel.2)およびLAMP-1(panel.5)による染色を示す。黄色は両染色の重ね合わせ像を示す(panel.3, 6)。

B. THP-1細胞を用いた細胞分画によるSIMPLEの局在解析。lane.1は核画分、lane.2はmitochondriaおよびlysosome画分、lane.3はmicrosome画分、lane.4は細胞質画分を示す。遠心により得られたそれぞれの画分、およそ60 μ gを12.5% (左) および7.5% (右) のSDS-PAGEで分離し、SIMPLE抗体およびLAMP-1抗体を用いてWestern blotによる解析を行った。

A.



B.

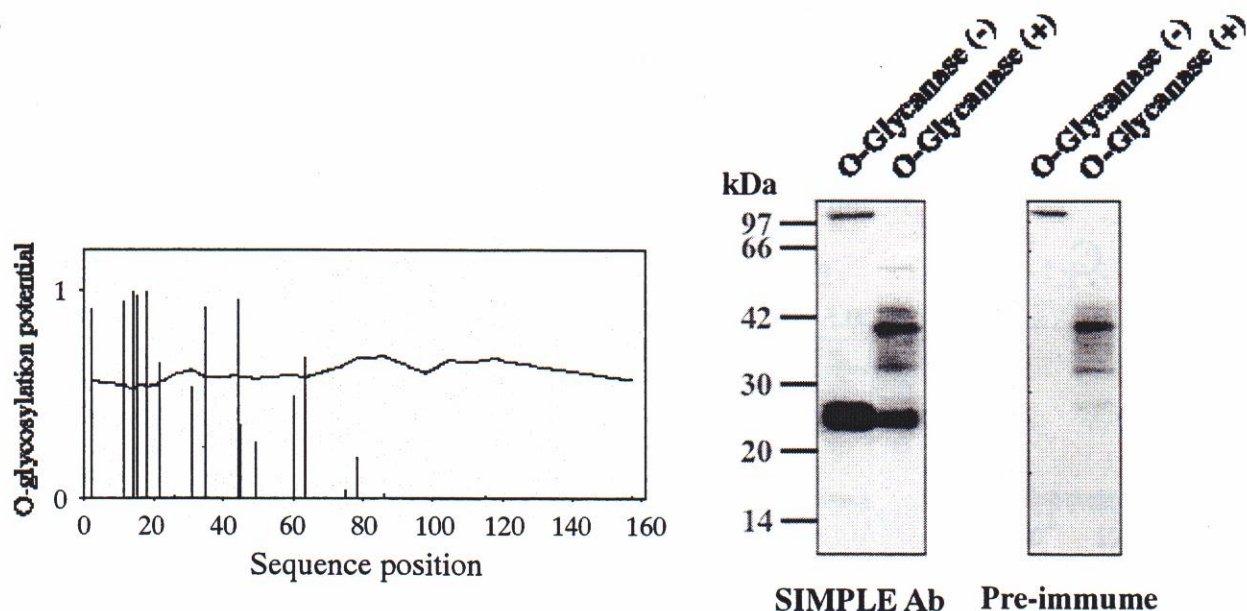


図2-4. SIMPLEの膜統合および糖鎖修飾の検証

A. Kyte-Doolittle法によるSIMPLEの疎水プロット。プロット内の下線は推定される膜貫通領域を示す。THP-1細胞よりTriton X-114を用いてSIMPLEタンパクの抽出を行った。水溶性画分および界面活性剤画分から得られたタンパクを等量、12.5%SDS-PAGEで分離し、2枚のblotを作製した。SIMPLE抗体およびpre-immune抗体を用いてWestern blotによる解析を行った。

B. NetOgly 2.0 programによるSIMPLEのO型糖鎖修飾部位の推定。プロット内の横線は糖鎖修飾の閾値を、縦線は修飾を受ける可能性のあるSerineおよびThreonine残基を示す。SIMPLEを一過的に発現させたRK細胞を可溶化し、O-glycanaseで16時間処理した。処理後のサンプルを用い、上記と同様の方法によりSIMPLEの糖鎖修飾の可能性について検討を行った。

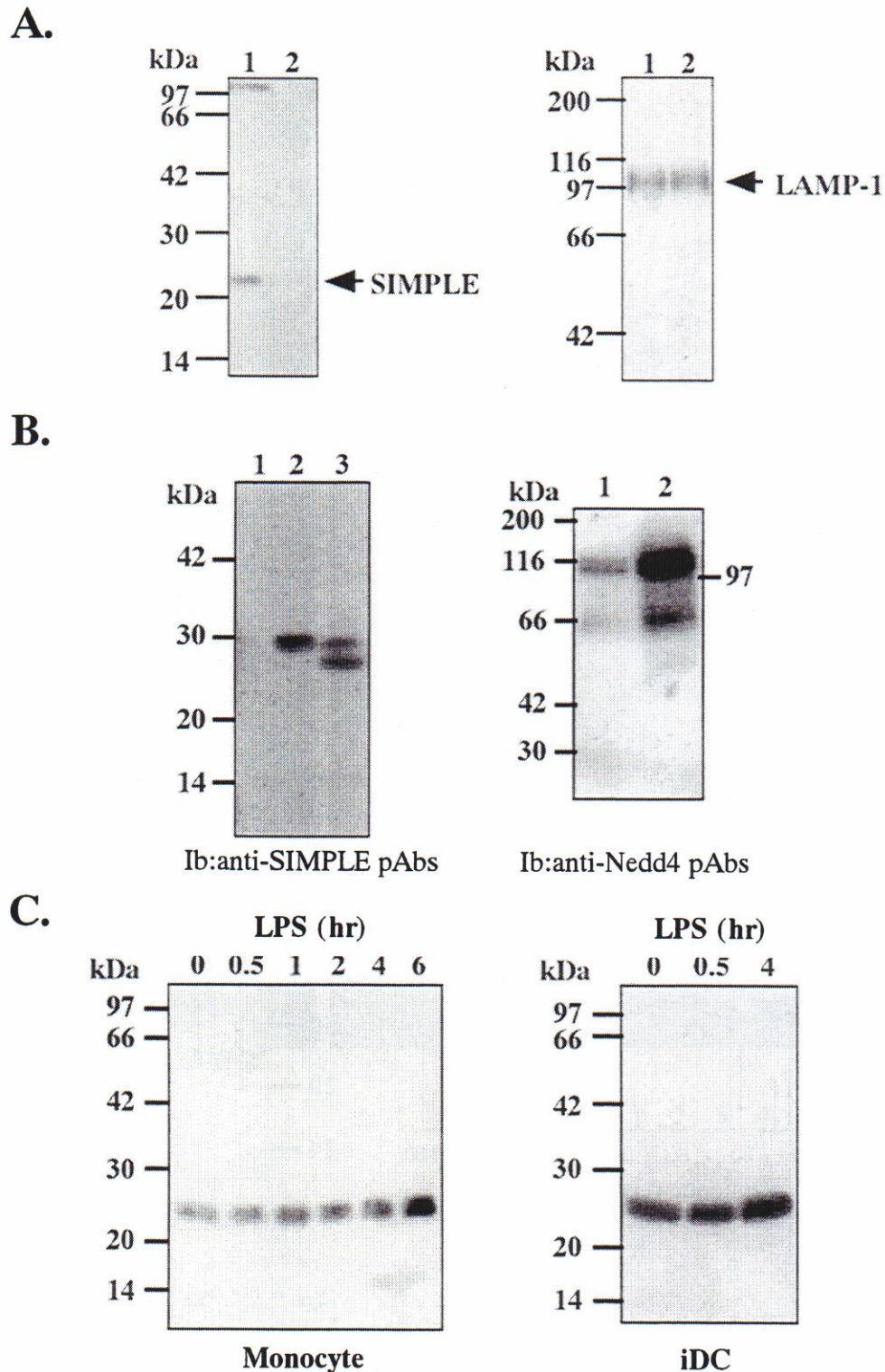


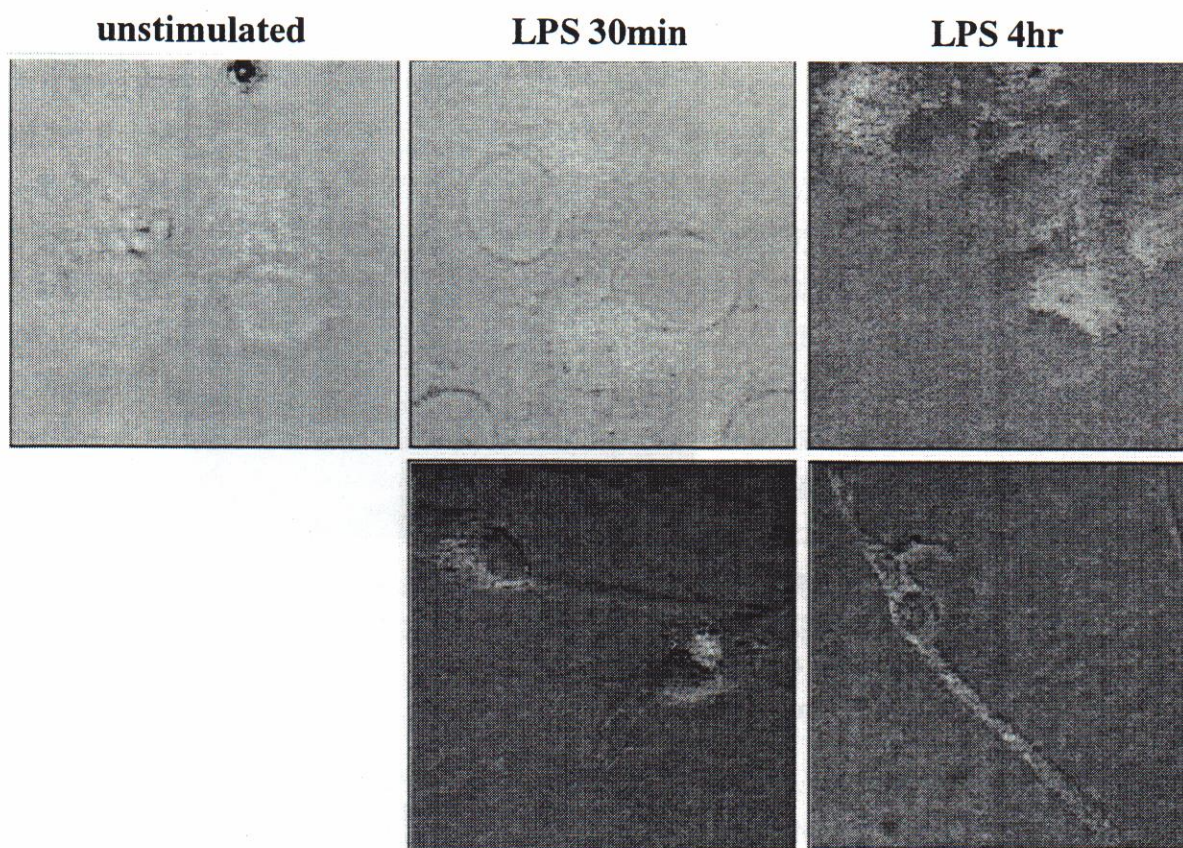
図2-5. SIMPLEのトポロジー解析

A. Proteinase Kで処理(lane 1)あるいは未処理(lane 2)の細胞分画により得られたmitochondria、lysosome画分をSDS-PAGEで分離後、SIMPLEおよびLAMP-1抗体を用いてWestern blotにより解析した。Proteinaseにより1型の膜タンパクであるLAMP-1は分解されていないのに対し、2型の膜タンパクであるSIMPLEは完全に分解される。

B. SIMPLEとNedd4の相互作用。SIMPLEが2型のトポロジーをとることから、Nedd4との相互作用について免疫沈降法により確認した。HeLa細胞にSIMPLEのN末端にFlag-tagが融合されたタンパクを一過的に発現させ、control mAbs (lane 1)およびFlag mAbs (lane 2)を用いて免疫沈降を行った。lane 2の免疫沈降前のサンプルをlane 3に示す。

C. SIMPLEタンパクレベルにおける発現誘導。単球、樹状細胞をLPS刺激後、図中に記した時間で可溶化し、SIMPLE抗体を用いてWestern blotを行った。

A.



B.

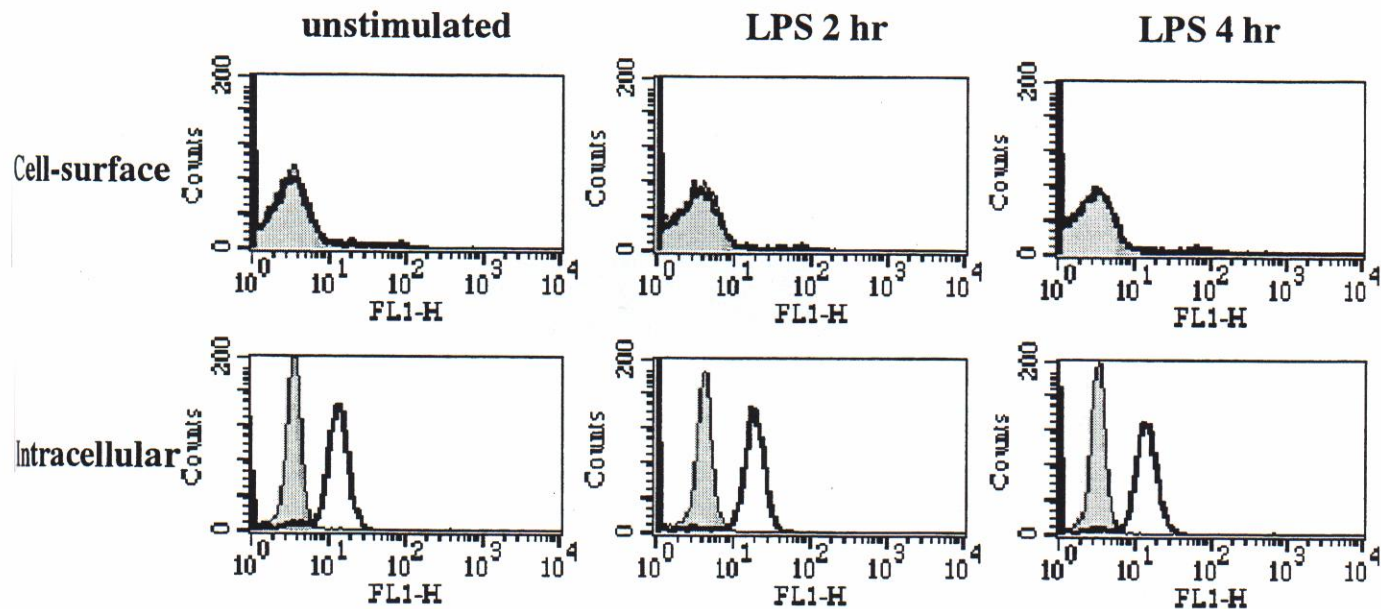
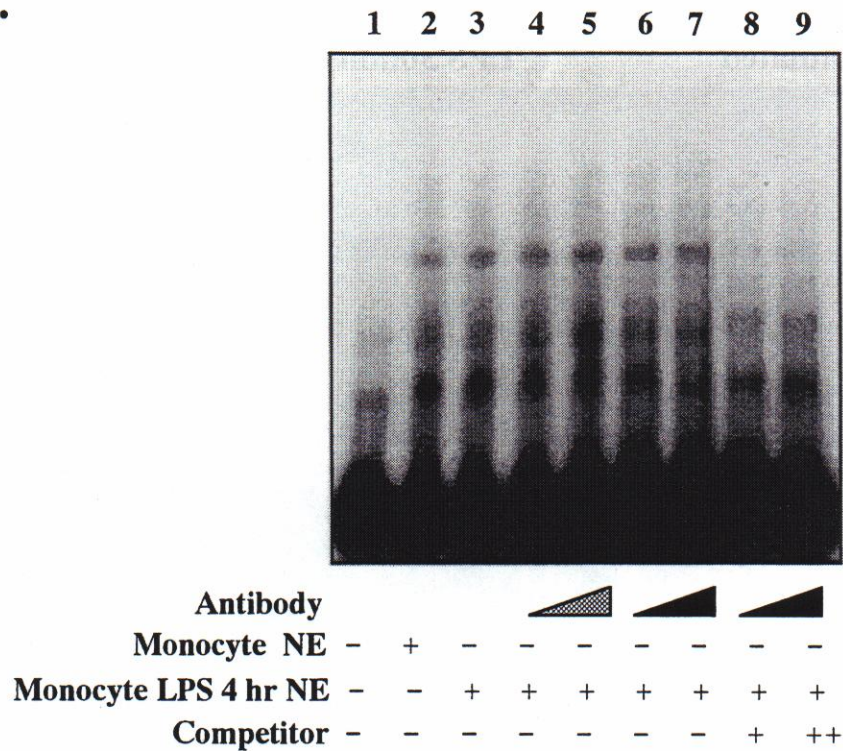


図2-6. SIMPLEの核および膜移行の確認

A. 樹状細胞をLPSで刺激後、SIMPLE抗体を用いて免疫染色を行った。図は、TritonX-100による透過を行った際の免疫染色の結果を示す。

B. SIMPLEの膜移行についてFACSにより検討を行った。SIMPLEは2型膜タンパクでありLITAF抗体のエピトープは細胞内に配向する。刺激によりSIMPLEが1型のトポロジーを取り細胞膜に発現する現象は確認できなかった。

A.



B.

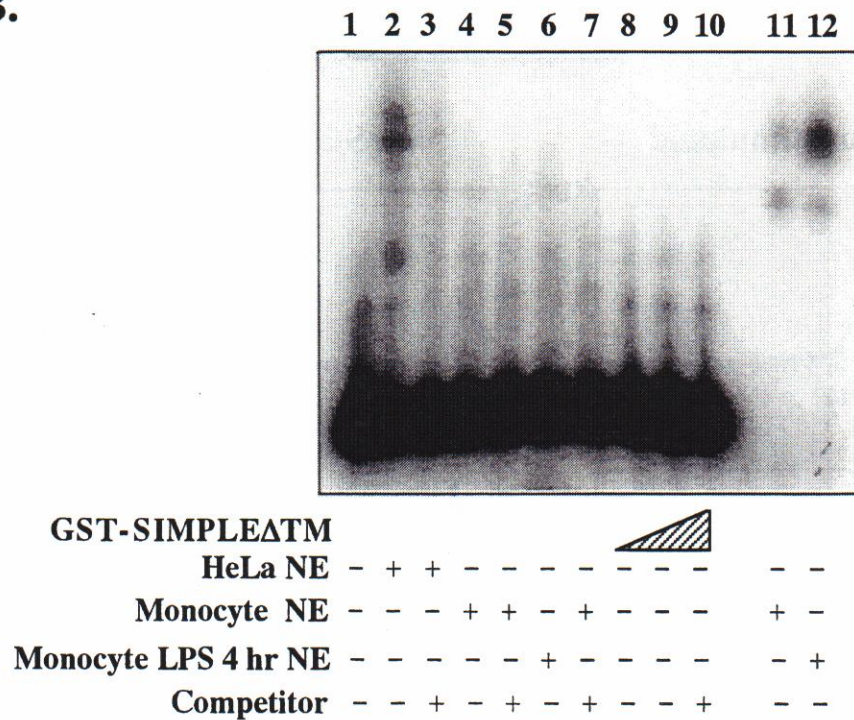


図2-7. LITAF結合配列に対するSIMPLE結合のEMSA法による確認

A. lane 4、6、8には0.5 μ gのlane 5、7、9には1.0 μ gの抗体を加えた。lane 4、5にはcontrol IgGをlane 6、7、8、9にはSIMPLE抗体を加えた。コンペティターには未標識のLITAF結合配列を用いた。

B. lane 8には1 μ gのlane 9、10には2 μ gの大腸菌より精製したGST-SIMPLEΔTMを加えた。lane 11、12のプロープにはNF- κ Bを用いた。

2-4 考察

SIMPLE の転写因子としての可能性

SIMPLE は膜タンパクであり、転写因子として機能するには、膜から遊離する必要がある。これまでに、酵母の ER 膜タンパクである SPT23 が Nedd4 の酵母 homologue である RSP5 により認識、ユビキチン化され、膜貫通領域の手前でプロテアソームによる分解を経て転写因子として機能することが報告されている (47)。また、SIMPLE と Nedd4 の相互作用が確認されたことから (48)、本章では、SIMPLE が RSP5 と同様の機構で転写因子として機能するという仮説を立て検討を行った。結果、SIMPLE の Nedd4 との相互作用を確認することはできたが、その他の現象、SIMPLE のユビキチン化、核移行、LITAF 結合配列への結合については確認することができなかった。SIMPLE のユビキチン化については、SIMPLE と同時にユビキチンあるいは Nedd4、またはその両方を過剰発現させた場合での変化について検討する必要があるが、これらの結果から SIMPLE は転写因子として機能していないものと考えられる。

SIMPLE の相互作用分子

マウス SIMPLE はヒト SIMPLE とアミノ酸レベルで 85.7% の相同性があり、両種とも 2 つの PY motif を有する。マウス SIMPLE とマウス Nedd4 との相互作用は far-Western の結果より、マウス SIMPLE の N 末端側の PY motif と、マウス Nedd4 が有する 3 つ全ての WW domain 間で起こっていることが示されている (48)。ヒト Nedd4 は 4 つの WW domain を有しており、それら WW domain のマウスとの相同性はヒト WW-1 とマウス WW-1、ヒト WW-2 とマウス WW-2、ヒト WW-4 とマウス WW-3 で高いことが確認されている (51)。よって、ヒト SIMPLE とヒト Nedd4 の相互作用は、ヒト SIMPLE に関しても、マウス同様に N 末端側の PY motif が、ヒト Nedd4 に関しては少なくとも WW domain-1、-3 および -4 が関与していると考えられる。

これまでに、Nedd4 はファミリーを形成することが報告されている (35)。そのファミリーの分子である、AIP2 および AIP5 は PY motif を bait とした yeast-two hybrid 法により cloning されており、AIP4 は PY motif を配列に含む atrophin-1 と相互作用する分子として cloning されている。このことから、相互作用する意義は現段階では不明であるが、SIMPLE がそれら分子と相互作用する可能性は十分にあると考えられる。

SIMPLE および Nedd4 の局在化

本章の結果より、SIMPLE は 2 型のリソソーム膜タンパクであることが明らかとなった。この結果は、SIMPLE の膜貫通領域より C 末端側に確認された LTS が ER、golgi および lysosome では lumen 側に、細胞膜では細胞の外側に存在することを意味する。SIMPLE の細胞膜での発現について、そのトポロジーを伴わせて FACS により検討を行ったが、SIMPLE が 1 型のトポロジーを取り細胞膜に発現している結果を

得ることはできなかったことから、SIMPLE 配列中に確認された LTS は機能していないものと考えられる。一方、本章の結果で SIMPLE との相互作用が確認された、Nedd4 は様々な細胞膜タンパクと結合し、ユビキチン化することで lysosome への運搬に関与することが知られている (36)。このことから、SIMPLE が一時的に、細胞膜に発現することで、Nedd4 と相互作用しユビキチン化され、lysosome へ輸送される可能性が考えられる。また最近、これとは反対の可能性を示す報告が為された。Nedd4 結合タンパクの一つである N4BP3 (KIAA0341) は核周辺の顆粒に局在し (52)、Nedd4 は通常、細胞質に拡散して局在する (53)。この局在の異なる、N4BP3 と Nedd4 を同一細胞に一過的に過剰発現させた場合、Nedd4 の局在は N4BP1 で確認される核周辺の顆粒に集積される。このことから、SIMPLE の発現増加が Nedd4 の lysosome への局在変化に寄与している可能性が考えられる。これまでに、Nedd4 の局在変化によって、影響を受けるステータスの一つにアポトーシスへの関与が報告されており、Nedd4 は IGF-receptor を介した抗アポトーシスシグナルによって、mitochondria 膜へと移行することが報告されている (54)。更に、Nedd4 は Caspase の基質でもあることが報告されている (55)。以上のことから、SIMPLE が Nedd4 を lysosome に留めることで、アポトーシスに関与している可能性が考えられる。

SIMPLE のタンパク分解への関与

上述した Nedd4 結合タンパクの一つである N4BP3 (KIAA0341) は、Nedd4 によるユビキチン化を受けない (52)。また、他の Nedd4 結合タンパクである Grb10 も同様に Nedd4 によるユビキチン化を受けないことが報告されている (56)。ヒトパピローマウイルス由来の E6 タンパクは、HECT domain を有する E6-AP による p53 の認識およびポリユビキチン化を介添えし、それ自身はユビキチン化されない (57-58)。このことから、N4BP3 や Grb10 は E6 の様に、Nedd4 による Nedd4 基質の認識に関与している可能性が考えられている。

これまでに lysosome 膜タンパクである、LAPTM5 は配列に含まれる Proline-rich 配列を介してユビキチンを認識することが報告されており、ユビキチン化されたタンパクのリソソームへの取り込みへの関与が考えられている (59)。また、他の lysosome 膜タンパクである、LAMP-2 はリソソームへの選択的なタンパクの取り込みを行っていることが報告されている (60-62)。更に最近、SIMPLE のマウス homologue において NF- κ B の分解への関与が報告された (63)。以上の知見、および SIMPLE が lysosome 膜タンパクであることから、SIMPLE がユビキチン化されたタンパクの取り込みに関与している可能性は十分に考えられる。

第3章 DT40細胞を用いた SIMPLE 欠損細胞の作製および表現系解析

これまでに lysosome 膜タンパクをコードする数多くの遺伝子が cloning されているが、それらの多くの機能は明らかにされていない。LAMP-2 はその中においても解析が進んでいる分子であり、これまでに幾つかの機能に関する報告が為されている (60-62)。LAMP-2 の欠損マウスはおよそ 50% が生後 20~40 日の間に死亡することが報告されており、その原因は自食包の蓄積によることが明らかとなっている (64)。一方、LAMP-2 のファミリー分子である LAMP-1 の欠損マウスにおいては明確な異常が確認されておらず、その正常性は LAMP-2 の発現を上昇させることで補われていると考えられている (65)。

SIMPLE と相同性を示す分子の存在を data base より解析したところ、C16orf5 という脳で強い発現が確認されている分子のみにおいて相同性を見出すことができた (66)。このことから、SIMPLE がタンパク分解に寄与しているのであれば、SIMPLE 欠損マウスを作製した場合、そのマウスが致死になる可能性は極めて高いと考えられた。そこで、本研究では細胞レベルで SIMPLE の破壊を行うことを考え、その細胞には高頻度で相同性組み換えが起こることが報告されている、ニワトリ B 細胞株である DT40 細胞を用い (67)、実験を行ったので以下に得られた知見を報告する。

3-1 実験材料および試薬

3-1-1 抗体

抗ニワトリ Cremp 抗体 (rabbit pAb) は当研究室、井上直和博士より供与されたものを用いた (68)。抗ニワトリ SIMPLE 抗体 (rabbit pAb) は筆者が免疫精製したものを用いた。抗 p53 抗体 (P240, rabbit pAb) は Santa Cruz 社より購入した。二次抗体は、第 2 章と同様のものを用いた (2-1-1 参照)。

3-1-2 組織および細胞

ニワトリ (excel link, 20wk) の組織は当研究室、井上直和、福井理の両博士により供与された。DT40、ニワトリ B 細胞株は武田俊一博士 (京都大学) より、HD11、ニワトリマクロファージ細胞株は、Kirsten C. Weining 博士 (University of Freiburg, Germany) より、IN24、ニワトリ単球細胞株、1104B、ニワトリ B 細胞株、NSB1、ニワトリ T 細胞株は松田治男博士 (広島大学) より供与された。DT40 細胞は 1% chicken serum、10% FCS、100 U/ml penicillin G、100mg/ml streptomycin、50 mM 2ME を含む RPMI1640 (chicken medium) で、HD11 細胞は 2% chicken serum、8% FCS を含む DMEM で継代培養した。ニワトリ SIMPLE (chicken SIMPLE :cSIMPLE) の発現誘導を確認するため、HD11 細胞を 1 mg/ml の LPS (Salmonella typhimurium lyophilized; sterilized by g-irradiation; Lot:120K4016; SIGMA) で刺激を行った。

3-1-3 溶液および緩衝液の組成

本章で使用した主な緩衝液等の組成を項目ごとにまとめて示した。また、その他の溶液に関しては第 1 章、第 2 章に記述したものと同様のものを用いた。

HMW buffer	10 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 10 mM EDTA 0.1% (w/v) SDS
K buffer	0.5% (v/v) Tween20, 100 µg/ml Proteinase K in 1×PCR buffer

3-2 実験方法

3-2-1 cSIMPLE の cDNA クローニング

cSIMPLE の単離には後飯塚僚博士 (東京理科大学) より供与された chicken thymus cDNA ライブラリーを用いた。ヒト SIMPLE (human SIMPLE :hSIMPLE) の配列を基に EST による検索を行い (<http://www.ri.bbsrc.ac.uk/chickmap/>)、cSIMPLE の塩基配列情報を得た。得られた配列を基に cSIMPLE 特異的プライマーを作製し、chicken thymus cDNA ライブラリーを含む pME18s ベクターを鋳型に、pME18s 由来のプライマーを用いて nested PCR を行った。5'側の最初の増幅は2分間の 94°Cでの denature の後、94°C 30 秒、53.3°C 1 分、72°C 2 分の 20 サイクルで行った。2 度目の増幅は1度目の増幅産物を用い、94°C 30 秒、55.5°C 1 分、72°C 2 分の 35 サイクルで行った。3'側の最初の増幅は 94°C 30 秒、56.6°C 1 分、72°C 2 分、20 サイクルの条件で、2 度目の増幅は、94°C 30 秒、52.9°C 1 分、72°C 2 分、35 サイクルの条件で行った。尚、PCR は DNA polymerase として LA Taq polymerase (TAKARA) を用いた。以下に使用したプライマーの配列を示す。

pME18s 1st primer	: 5'-TAGgCCTgTACggAAgTgTTACTTCT-3'
pME18s 2nd primer	: 5'-TATTCTgCTCTAAAAGCTgCggAAT-3'
cSIMPLE 5'-1st primer	: 5'-CTgCACATACACAgTCTgAAC-3'
cSIMPLE 5'-2nd primer	: 5'-AgggTTCATTCCCTTCCCATC-3'
cSIMPLE 3'-1st primer	: 5'-gATgggAAGggAATgAACCT-3'
cSIMPLE 3'-2nd primer	: 5'-gTTCAGACTgTgTATgtgCAG-3'

3-2-2 Northern blot analysis

サルモネラ菌由来の LPS で刺激した HD11 細胞、未刺激の HD11 細胞、野生型 DT40 細胞、cSIMPLE hetero DT40 細胞および cSIMPLE negative DT40 細胞からの RNA 回収には QuickPrep *micro* mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia) を用い、方法はキット付属のマニュアルに準拠した。また、様々なニワトリ組織からの RNA 回収には TRIZOL を用いた。吸光度による濃度測定後、mRNA は 3 µg を total RNA は 20 µg を Northern 用のサンプルとし、1-2-10 に記述した方法により膜を作成した。また、プローブには cSIMPLE の ORF および、コントロールとして GAPDH を PCR で増幅した断片を精製使用した。以下に使用したプライマーの配列を示す。

cSIMPLE Forward	: 5'-ATgTCTgCTCCTAgTggCTT-3'
cSIMPLE Backward	: 5'-CTATAAACgCTTATAAGAAC-3'
GAPDH Forward	: 5'-gTCTTCACCACCATggAgAA-3'
GAPDH Backward	: 5'-TCATTgTCATACCAggAAA-3'

3-2-3 DT40 細胞からの genome 回収

8×10⁷ cells の DT40 細胞を 100 µg/ml の proteinase K を含む 10ml の HMW buffer で処理し、55°C で 90 分 incubation した。処理液に対して等量の TE 飽和フェノールを加え、室温、3000rpm、10 分間の遠心を行い、上清を得た。上清に等量のフェノール:クロロフォルム:イソアミルアルコール (25:24:1) 溶液を加え、先程と同条件にて遠心を行い、再び上清を得た。上清に 2 倍量の 100%エタノールを加え攪拌後、15,000 rpm、4°Cにて 10 分間の遠心を行い、genome DNA のペレットを得た。得られたペレットを 70%エタノールで wash し、最終的に TE buffer に懸濁した。

3-2-4 cSIMPLE を含む genome 領域のクローニング

DT40 細胞より調整した genome DNA を鋳型とし、nested PCR で得られた配列を元に設計したプライマーにより PCR を行った。5'側、3'側の増幅には LA PCR *in vitro* Cloning Kit (TAKARA) を用い、プロトコールはキット付属のマニュアルに準拠した。以下に 5'側、3'側の増幅に用いたプライマーの配列を示す。

1st primer/5'CSG seq-1	: 5'-CAggCACAAAAGAgCTgATg-3'
2nd primer/5'CSG seq-2	: 5'-CTTAAAGCCCACTCCCAAAC-3'
1st primer/3'CSGR35 1st	: 5'-CTggACAgAAATgTggTTTAACCTTCTTgTgTATg-3'
2nd primer/3'CSGR35 2nd	: 5'-ATgTggTTTAACCTTCTTgTgTATgTAACAAgTgg-3'
1st primer/Cassette C1	: 5'-gTACATATTgTCgTTAgAACgCgTAATACgACTCA-3'
2nd primer/Cassette C2	: 5'-CgTTAgAACgCgTAATACgACTCACTATAgggAgA-3'

3-2-5 cSIMPLE targeting ベクターの構築

Neomycin、Hygromycin の薬剤耐性遺伝子を含む pAGS-3 ベクター (両薬剤耐性遺伝子共 *Bam*HI により切り出し可能) は武田俊一教授 (京都大学) より供与された。cSIMPLE を含む genome 領域より、exon 1 を含む *Bgl*II サイト間 (5'arm) および、intron 2 から intron 4 の *Pst*I サイト間 (3'arm) を増幅可能なプライマーを設計し LA-Taq を用いて PCR を行った。それぞれの増幅断片を pGEM-T easy ベクターにサブクローニング後、5'arm を含むベクターを *Nco*I および *Bgl*II で、3'arm を含むベクターを *Sac*I で処理し、それぞれの断片の挿入方向を確認した。両ベクターを *Nco*I および *Bgl*II で処理し 3'arm を含むベクターに 5'arm 由来の断片をクローニングした。両 arm を含むベクターを *Bgl*II で処理後、*Bam*HI で切り出しておいた薬剤耐性遺伝子をクローニングし、Neomycin を含む targeting ベクター (pSIMPLE-Neo)、Hygromycin を含む targeting ベクター (pSIMPLE-Hygro) とした。以下に PCR に用いたプライマーの配列を示す。

5' arm-5' CSG	: 5'-CTCTgCAgCgAgggATgAAC-3'
5' arm-3' CSG	: 5'-AggTgTCCTCAgCCTCCTCC-3'

3' arm-5' CSG	: 5' -AgATCTgTAAgCCTCAggTCTgACTg-3'
3' arm-3' CSG	: 5' -CTgCAGAgACATgAACAgAC-3'

3-2-6 cSIMPLE negative DT40 cells の作成

50 µg の pSIMPLE-Neo targeting ベクターを *NotI* で処理し、両 arm および薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子断片をアガロースゲルより QIAEX II を用いて抽出した。回収した DNA をエタノール沈殿後、500 µl の D-PBS で懸濁し氷冷しておいたキュベットに移した。およそ 1×10^7 cells の DT40 細胞を回収、PBS による wash 後、300 µl の PBS で懸濁し DNA の含まれるキュベットに移し 10 分間氷冷した。GENE PULSER II (Bio-Rad Laboratories) を用いて 25 µF、500 volts の条件にてエレクトロポレーションし、10 分間氷冷した。20 ml の chicken medium にトランスフェクション後の細胞を移し、1 滴ずつ 96well plate に滴下した。24 時間後、4 mg/ml の chicken medium に溶かした G418 を 1 滴ずつ同プレートに滴下し、10 日間セレクションを行った。コロニーを目視により確認し、300、150、75 cells/10 ml になるよう細胞を 2mg/ml の G418 を含む chicken medium に懸濁した。それぞれの懸濁液を 1 滴ずつ 96well plate に滴下し、1 週間セレクションを行った。G418 抵抗性の細胞から genome を回収し、PCR により組み換えを確認後、pSIMPLE-Hygro による組み換えを行った。条件は pSIMPLE-Neo と同様の条件で行い、hygromycin は終濃度が 2 mg/ml になるようにして用いた。

3-2-7 PCR による組み換えの確認

薬剤抵抗性の細胞に 5000 cells/µl の K buffer を加え、56°C で 45 分間 incubate し、genome を回収した。回収した genome 溶液 2 ml を鋳型とし、薬剤耐性遺伝子由来のプライマー、genome 由来のプライマーにより rTaq polymerase を用いて 50 µl 系にて PCR を行った。pSIMPLE-Neo 組み換えの確認は Neo5'-3'プライマーと TARconf3'プライマーの組み合わせにより、98°C 10 秒、56.6°C 30 秒、72°C 2 分、30 サイクルの条件で行った。pSIMPLE-Hygro 組み換えの確認は Hygro5'-3'プライマーと TARconf3'プライマーの組み合わせにより 98°C 10 秒、56.6°C 30 秒、72°C 2 分の 30 サイクルの条件で行った。また、組み換え前の配列の伸長は TARconf5'プライマーと TARconf3'プライマーの組み合わせにより、98°C 10 秒、54.4°C 30 秒、72°C 2 分、30 サイクルの条件で行った。以下にプライマーの配列を示す。

TARconf-5'	: 5' -TCgTTTATTTACgCTgCAG-3'
TARconf-3'	: 5' -ACgCggTACAgTCAgACCTg-3'
Neo5'-3'	: 5' -CCgCTTTCTggATTCATCg-3'
Hygro5'-3'	: 5' -ggTCCACgACTggACTgAgC-3'

3-2-8 Southern blot analysis

1) サンプルの調整および hybridization

前項で記述した方法により DT40 細胞、cSIMPLE hetero DT40 細胞、cSIMPLE negative DT40 細胞それぞれから genome DNA を抽出した。抽出した genome DNA 50 µg を 20 µl の *Bam*HI を含む計 400 µl の反応液中で 37°C、16 時間処理した。処理液をフェノール・クロロホルム処理し、エタノール沈殿後、16 µl の TE buffer と 4 µl の 10×loading buffer に懸濁した。調整したサンプルおよび 40 µl の Hi-Lo DNA marker (アベテック株式会社, Tokyo) を 0.8% アガロースゲルで、35 V、16 時間の条件で電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルを 50 mM HCl で 30 分間振とうし、続いて 1.5 M NaCl を含む 0.5M NaOH で 30 分、1.5 M NaCl を含む 0.5M Tris-HCl (pH7.5) で 30 分振とうした。振とうしたゲル中の DNA を Hybond-N+ニトロセルロース膜 に 48 時間掛け転写し、2 時間のベーキング処理を膜に施し DNA を固定した。この膜と以下の方法で調整したプローブを用いて ExpressHyb solution により hybridization を行った。尚、条件は ExpressHyb solution に添付されているマニュアルに準拠した。

2) プローブの調整

DT40 細胞より調整した genome DNA、以下に記したプライマー、DNA polymerase として LA-Taq polymerase を用い、98°C 10 秒、55.1°C 30 秒、72°C 4 分の 30 サイクルで PCR を行った。得られた PCR 産物を pGEM-T Easy ベクターにサブクローニングし、プローブとして用いる断片を *Eco*RI で消化することにより切り出し、アガロースゲルより QIAEX II Gel Extraction kit を用いて DNA を回収した。回収した DNA 断片、約 50 ng を Megaprime DNA labeling kit を用いて標識し、プローブとした。

Target probe 5'	: 5'-CATCTTAAACggATCTgggC-3'
Target probe 3'	: 5'-CAgTTTgCAggCTTTACCTg-3'

3-2-9 6×His-cSIMPLETM の精製、抗体の作成

cSIMPLE の膜貫通領域を欠失させた配列を、以下に配列を記したプライマーにより cSIMPLE の cDNA を鋳型に pfu polymerase を用いて 94°C 30 秒、56.2°C 30 秒、72°C 2 分、25 サイクルの条件で増幅を行った。Blunt-end vector にサブクローニング後、目的断片を *Nco*I と *Eco*RI 消化により切り出し、精製後、pET-19b ベクター (Novagen) に挿入し、大腸菌株 BL21 (DE3) に transform した。6×His-cSIMPLETM の精製および、それを用いた抗体の作製は 2-2-1 に記述した方法により行った。

<i>Nco</i> I-His cSIMPLE-5'	: 5'-CCATgggCCATCACCATCACCATCACTCTgCTCCTAgTggCT TTCC-3'
<i>Eco</i> RI cSIMPLE ^Δ TM-3'	: 5'-gAATTCCCAAgTCAACgCTCCTgACTC-3'

3-2-10 GST-cSIMPLEDTM の精製、抗原結合ゲルの作製

cSIMPLE の膜貫通領域までの配列を、以下に配列を記したプライマーにより cSIMPLE の cDNA を鋳型に pfu polymerase を用いて増幅し、Blunt-end vector にサブクローニングした。目的断片を *Bam*HI と *Eco*RI 消化により切り出し、精製後、インフレームになるように pGEX-2T ベクターに挿入し、大腸菌株 DH5a に transform した。GST-SIMPLE Δ TM の精製は 2-2-2 に記述した方法により行った。次に、この精製した GST-SIMPLE Δ TM による抗原カラムを作製するため、抗原結合ゲルの作製を行った。精製した GST-SIMPLE Δ TM を 0.1 M の NaHCO₃ で透析し、sephadex G-50 を用いて濃縮後、吸光度よりタンパク濃度を測定した。精製タンパクの濃度を 1 mg/ml に NaHCO₃ で調整し、3 ml に Affi-gel 10 および 15 (Bio-Rad, 50% slurry, 冷水にて Wash) をそれぞれ 1 ml ずつ加えた。4°C で一晩転倒混和した後、1 M のエタノールアミン (pH 8.0) をゲル量の 10 分の 1 にあたる 200 μ l 加え、室温で 3 時間転倒混和した。3,000 rpm で 10 分遠心後、得られた上清 50 μ l に 50 μ l の 1 N、HCl を加え OD280 を測定することで結合率を確認し、得られたゲルを抗原カラム作製に用いた。

*Bam*HI cSIMPLE-5' : 5'-ggATCCTCTgCTCCTAgTggCTTTCCT-3'
*Eco*RI cSIMPLE Δ TM-3' : 5'-gAATTCCCAAgTCAACgCTCCTgACTC-3'

3-2-11 抗原カラムによる抗体の精製

抗原カラムにより cSIMPLE 抗体の精製を行った。抗原結合ゲルを過剰量の D-PBS で 3 回洗浄し、cSIMPLE 抗体を含む血清をゲル 1 ml に対し 3 ml 加え、4°C で一晩転倒混和した。PD-10 カラム (Amersham Pharmacia) に充填し、1 ml の D-PBS を加えた後、全ての溶液を排出した。カラムをゲルの 50 倍量の D-PBS で洗浄し、ゲルの 10 倍量の 20 mM Tris-buffer (pH 7.8) で調整した 3.5 M NaSCN を加え抗体の溶出を行った。溶出液の OD280 をバランスに水を用い測定後、抗体を含む画分を saline により透析した。3 時間後、透析液を D-PBS に変え、一晩透析を行い、sephadex G-50 を用いて濃縮した。得られた抗体の濃度測定を行い、NaN₃ を終濃度 0.1% になるように加え、4°C で保存した。

3-2-12 細胞周期解析

1 $\times$ 10⁶ cells の DT40 細胞を 500 μ l の D-PBS で一度 wash した後、1.5 ml の 70% エタノール/D-PBS に懸濁し、4°C で一晩固定を行った。4°C、2,000 rpm で 5 分間の遠心を行い、上清除去後、500 μ l の D-PBS で懸濁し、40 μ l の 0.1% propidium iodide/D-PBS と 6 μ l の 10 mg/ml RNase A を加え 40°C で 30 分反応した。蛍光強度の測定には FACSCalibur を用い、データ解析には付属のソフトである ModFit を用いた。

3-2-13 死細胞測定

それぞれの試薬が培地に対して終濃度、Adriamycin/saline (ADR, doxorubicin ; 協和

発酵) では 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、N-Acetyl-D-sphingosine/100%エタノール (C_2 -ceramide; SIGMA) では 100 μM 、Dexamethasone/50%エタノール (DEX : SIGMA) では 0.01 μM 、 H_2O_2 では 100 μM になるように加えることで DT40 細胞のアポトーシスを誘導した。死細胞の測定には ApoAlert (CLONTECH) を使用し、方法は試薬付属のマニュアルに準拠した。また、別法として、細胞周期解析と同処理を行うことで、断片化された DNA 量の測定も行った。

3-3 実験結果

3-3-1 ニワトリ SIMPLE cDNA の単離

SIMPLE の機能を明らかにすべく、SIMPLE 欠損細胞を作成し、その表現系について解析することを試みた。実験材料には相同性組み換えが高頻度で起こると報告されているニワトリ B 細胞株である、DT40 細胞を用いた。まず、ニワトリにおけるヒト SIMPLE 相同遺伝子の存在を確認するため、hSIMPLE のタンパク配列を基に、ニワトリ EST の検索を行った。Genome Mapping At Roslin Institute に収集されている EST (<http://www.ri.bbsrc.ac.uk/chickmap/>) について検索を行ったところ、hSIMPLE と高い相同性を示すニワトリ EST クローン (AI07789) を得ることができた。この EST クローンは N 末端領域が不完全ではあるものの、104 aa からなるアミノ酸をコードしており、hSIMPLE との相同性はタンパクレベルで 68.6%であった。また、コードされているアミノ酸配列が有する motif について検討したところ、hSIMPLE で確認されている膜貫通領域および PY motif 共に有していることが明らかとなった。以上の点より、この EST が含む塩基配列情報は hSIMPLE のニワトリ ortholog であると考えられたため、この塩基配列をニワトリ SIMPLE (chicken SIMPLE : cSIMPLE) と命名した。

cSIMPLE の全長が EST 検索では明らかとならなかったため、次に、先程の EST の塩基配列情報を基にプライマーを作製し、ニワトリファブリキウス囊のライブラリーを鋳型とした RACE 法による全長の単離を試みた。結果、polyadenylation signal および poly A tail を同定することは出来なかったものの、709 bp からなる cDNA を単離することに成功した (図 3-1)。この cDNA は 148 aa をコードする ORF を有し、その全長は hSIMPLE の 161 aa より 13 aa 短い。一方、その ORF を同フレームで翻訳した場合、開始 Methionine の上流で終始コドンを確認できるものの、他の開始 Methionine はを見つけることは出来なかった。このことより、cSIMPLE が hSIMPLE より 13 aa 短いのは種差によるものであると考えられた (図 3-4A)。

3-3-2 cSIMPLE の組織分布および株化細胞での発現確認

cSIMPLE の組織分布について Northern blot および Western blot により検討した。Northern blot における対象にはニワトリ GAPDH を、Western における対象には Cremp を用いた (68)。結果、cSIMPLE の発現を mRNA では精巣のみで、タンパクでは脾臓と精巣のみで確認することができた (図 3-2A,B)。Northern blot 解析において cSIMPLE の脾臓での発現を確認できなかった原因は、対象に用いた GAPDH の発現パターンより脾臓における mRNA の分解によるものと考えられた (図 3-2A)。cSIMPLE の発現が脾臓において特に際立っていたこと、および、DT40 細胞で発現を確認することができたことから、次にリンパ球系細胞での cSIMPLE の発現について Western blot により検討を行った。結果、ニワトリマクロファージ細胞株である HD11 細胞、ニワトリ単球細胞株である IN24 細胞、ニワトリ T 細胞株 NSB1 では、cSIMPLE の

発現を確認することはできず、ニワトリ B 細胞株である 1104B 細胞および DT40 細胞でのみ cSIMPLE の発現を確認した (図 3-3A)。ヒト単球を LPS で刺激した際、hSIMPLE の発現誘導が確認されていることから、HD11 細胞を LPS 刺激際に cSIMPLE が発現誘導されるか Northern blot により検討したところ、その現象を確認することはできなかった (data not shown)。

3-3-3 cSIMPLE genome 領域の cloning

targeting vector を構築するにあたり、LA PCR *in vitro* Cloning Kit を用いて cSIMPLE を含む genome 領域の cloning を行った結果、5912-bp からなる DNA 断片を得ることができた (図 3-4B, 5-A)。この断片の遺伝子情報に関して詳細に解析を行ったところ、cSIMPLE は hSIMPLE 同様 4 つの exon から構成されていること、更に、開始 Methionine に関しても第 2 exon に含まれていることが明らかとなった (図 3-4B)。

3-3-4 cSIMPLE 欠損 DT40 細胞の作製とその検証

exon 2 に開始 Methionine を含まれることから、exon 2 が Neomycin および Hygromycin 耐性遺伝子に置換されるべく targeting vector を構築した (図 3-5B)。また、相同組み換えの確認は抽出した genome DNA を *Bam*HI 消化したサンプルに対して、targeting vector の構築に用いた配列のさらに 5'側の配列を probe に用いた Southern blot 解析により行った。結果、野生型 (+/+) 細胞で 9-kb に、片側の allele が Neomycin に置換された (Neo/+) 細胞で 9-kb と 10kb に、両 allele がそれぞれ Neomycin と Hygromycin に置換された (Neo/Hygro) 細胞で 10-kb と 11-kb にバンドが検出された (図 3-5C,D)。

次に、cSIMPLE 欠損 DT40 細胞の cSIMPLE の転写、翻訳レベルでの発現について確認を行った。各 DT40 細胞より抽出した mRNA に対して、cSIMPLE の ORF を probe に Northern blot 解析を行ったところ、Neo/+細胞でほぼ cSIMPLE の発現は確認できず、Neo/Hygro 細胞で完全に cSIMPEL の発現が消失していることが明らかとなった (図 3-5E)。また、翻訳レベルについても Western blot および FACS により検討を行ったところ、Northern blot と同様の結果を得ることができた (図 3-3A,B)。

3-3-5 cSIMPLE 欠損における細胞周期および細胞増殖における影響

Nedd4 は様々なタンパクの分解に関与していることが報告されており、その中には転写因子も含まれる (45)。SIMPLE が Nedd4 と相互作用することがヒトおよびマウスにおいて明らかにされており、SIMPLE は Nedd4 による分解を介添えしている可能性が考えられる (第 2 章考察)。SIMPLE 欠損により、Nedd4 によるタンパク分解が支障を来せば、細胞周期等のステータスに変化が生じる可能性が考えられたため、細胞周期および細胞増殖の両ステータスに関して検討を行うことにした。野生型細胞および 2 種類の SIMPLE 欠損細胞 (2-B および 4-B) について細胞周期の変化を FACS により検討した結果、明確な変化を確認することはできなかった (図 3-6)。また、細胞増殖においても継時的に細胞数を測定したが、SIMPLE 欠損における影

響は確認できなかった (図 3-7A)。

3-3-6 ADR による cSIMPLE および p53 の発現誘導の確認

一般的に DT40 細胞は p53 の null 細胞であることが知られているが、最近、DT40 細胞を抗ガン剤である ADR で刺激することにより p53 が誘導されることが報告された (69)。SIMPLE は p53 により発現誘導されることがヒトにおいて確認されていることから、DT40 細胞を ADR により刺激することで SIMPLE が発現誘導されるか Northern blot および Western blot により検討した。また、p53 の発現誘導についても Western blot により検討した。結果、Northern blot および Western blot 共に、SIMPLE の発現誘導は確認されず、p53 においても発現誘導を確認することはできなかった (data not shown)。

3-3-7 SIMPLE/PIG7 のアポトーシスへの関与

PIG は mitochondria 膜の安定性を活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) を誘導することによって破綻させ、mitochondria 膜からの cytochrome C の放出を促し、effector caspase の活性化によりアポトーシスを誘導する (14)。また、mitochondria 膜からの cytochrome C の放出は ROS 誘導による ASK1 の活性化を経た、JNK の活性化、それに伴った Bcl-2 のリン酸化によって起こるとも指摘されている。一方で、最近、p53 によって誘導されるアポトーシスが lysosome 膜の破綻を切掛けに起こるという報告が為された (70)。その報告によると、lysosome 膜の破綻が続く、mitochondria 膜の安定性を壊す経路と、lysosome 内に含まれる酵素が直接 caspase を活性化する経路を誘起するとしている。このことから、SIMPLE は第 2 章の考察で述べたように Nedd4 を介してか、あるいは、SIMPLE が lysosome 膜タンパクであることから、lysosome 膜の分解もしくは安定性を維持することでアポトーシスに関与している可能性が考えられた。そこで、野生型細胞と SIMPLE 欠損細胞である 2-B および 4-B のアポトーシス刺激に対する感受性の差について FACS により検討を行った。アポトーシス刺激には、SIMPLE が ROS によって発現誘導されている可能性が考えられたため、ROS 産生が確認されている試薬には C_2 -ceramide および H_2O_2 を、ROS 産生が起こらない試薬には DEX を用いた (71)。更に、ROS 産生の有無は確認されていないが、ADR によるアポトーシス誘導も行った。結果、ADR においてのみ SIMPLE 欠損細胞においてアポトーシスへの感受性が増大していることが確認された (図 3-7B)。

gagcagggctgacacggatccgctgtggggcgtgcagtgctcgccaccaggcttccttc 60
 tgaggcatttggaagcagcgtttgggagtgggctttaagaagacaaaatttgcaggctgt 120
 ttctgcctctgccatcagctcttttgtgcctgtttatttcagtcatatatcatgtctgct 180
 M S A 3

cctagtggctttcctgccccatctgcaccaccttcatatgaggagacagtaggaatcaat 240
 P S G F P A P S A P P S Y E E T V G I N 23

gtgaactatcctcaccctaccctgtcccacaacctggcctcagaccagatgggaaggga 300
 V N Y P H P Y P V P Q P G L R P D G K G 43

atgaaccctccgcagtactcaggacagcctatgccaacaagtacacctgttacagttcag 360
 M N P P Q Y S G Q P M P T S T P V T V Q 63

actgtgtatgtgcagcaaccgtagtgctgttctatgaccgccagttcagatgagttgc 420
 T V Y V Q Q P V V L F Y D R P V Q M S C 83

ccttcctgtaaccagatgatcgtgacacgtctctgctatgagtcaggagcgttgacttgg 480
 P S C N Q M I V T R L C Y E S G A L T W 103

ctgtcgtgtggtggcctcttcctgctgggggtgcatagctgggtgttgcttaattcccttt 540
L S C G G L F L L G C I A G C C L I P F 123

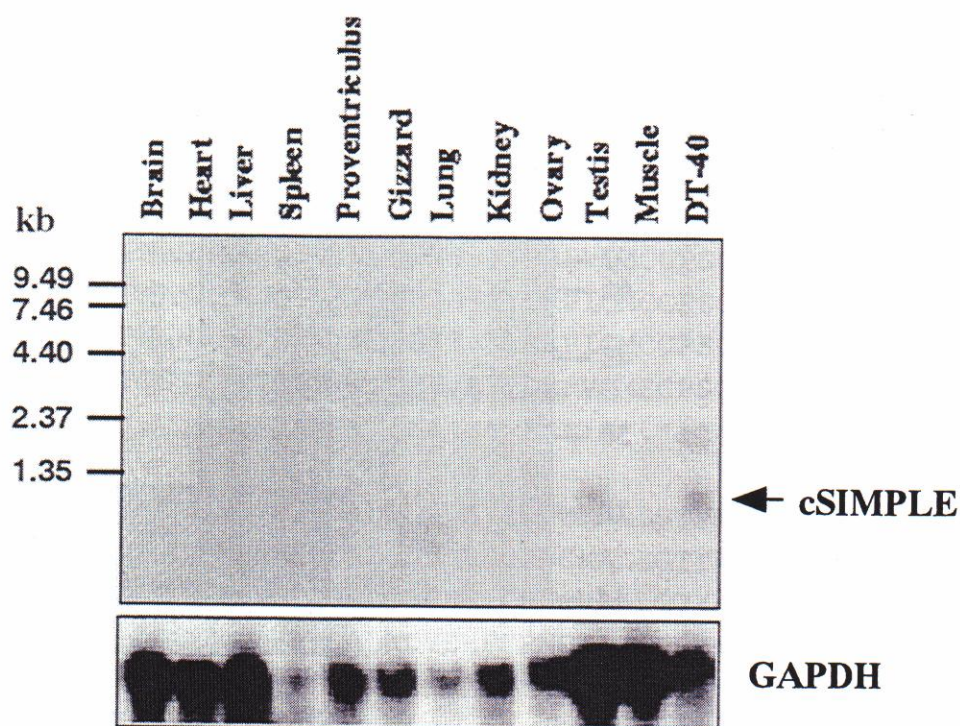
tgcgttgatgctctgaaagatgtggaacacttctgtccaaattgcaatgccacgttggt 600
C V D A L K D V E H F C P N C N A H V G 143

tcttataagcgttttatagccggtgtgtaagcactaagagttgattagcaactctctaaac 660
 S Y K R L * 148

ccatactgaagcttaatgaaggcttcctagtctcttttctgtcctgtcactggaaaccaat 720
 aaaaattaatgtttgttgcc 740

図3-1. cSIMPLEの塩基配列(AB058634)および予想されるアミノ酸配列
 PY motifをboxで示した。また、アミノ酸配列において予測された膜貫通領域を二重
 下線で示した。*はストップコドンを示す。

A.



B.

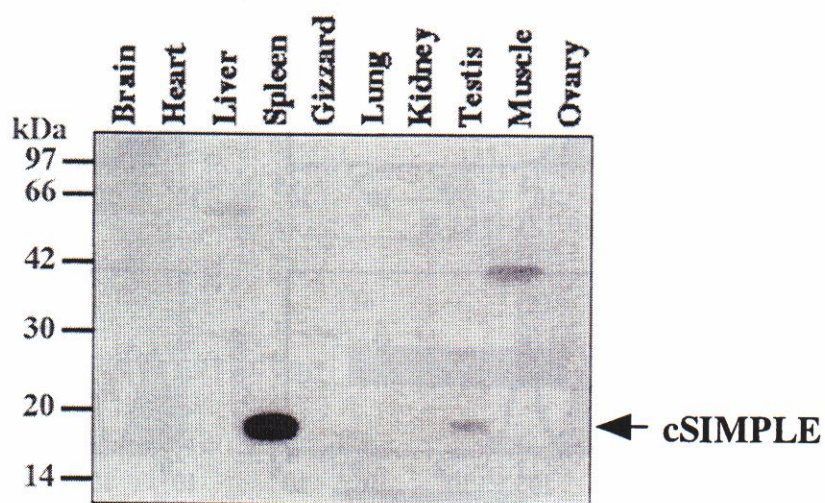
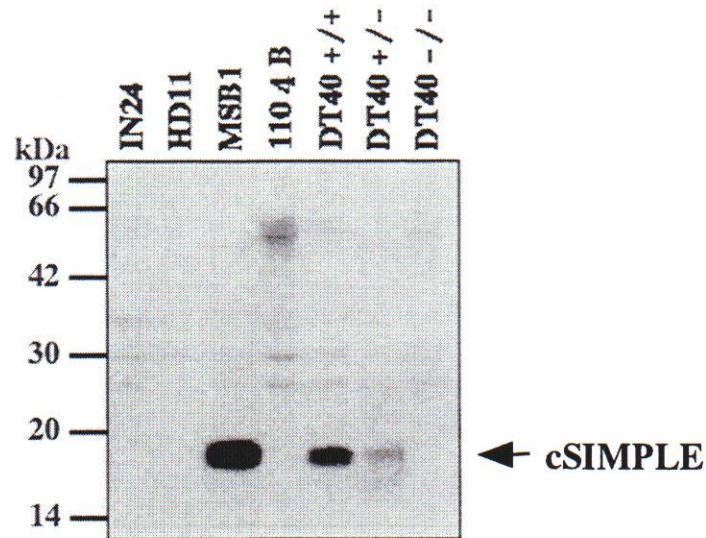


図3-2. cSIMPLEの組織分布

A. cSIMPLEのmRNAの組織分布。ニワトリの各組織より回収したtotal-RNA、それぞれ20 μ gずつを用いてNorthern blotによる解析を行った。probeにはcSIMPLEのORFおよびニワトリGAPDHをPCRで増幅した断片を用いた。

B. cSIMPLEのタンパク質の組織分布。ニワトリの各組織より回収したタンパク質を、それぞれ200 μ gずつ用いてWestern blotによる解析を行った。抗体は本研究により作製したcSIMPLEポリクローナル抗体を用いた。Northern blot解析において脾臓でのcSIMPLEの発現が確認できなかった原因は、コントロールのGAPDHのシグナルより、RNAが分解しているためと考えられる。

A.



B.

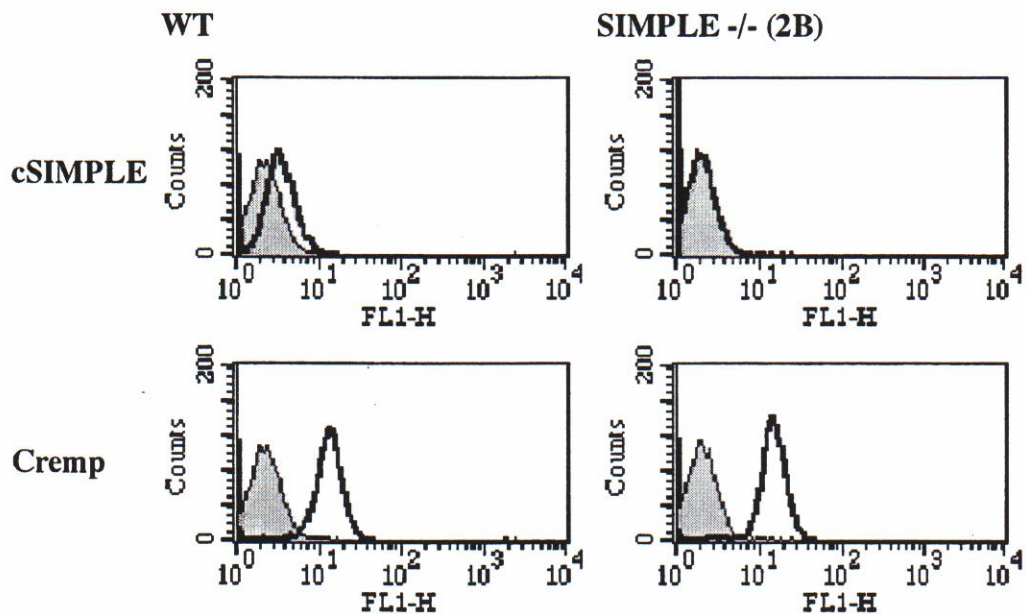


図3-3. cSIMPLE発現細胞の確認

A. cSIMPLEはB細胞に特異的に発現する。各血球系細胞株およびcSIMPLE欠損細胞(2B)より調整した可溶化試料、100 μ gを用いて、Western blotによる解析を行った。

B. cSIMPLE欠損細胞において他のタンパクの発現異常が誘起されていないか、FACSによる確認を行った。コントロールにはニワトリ補体制御膜タンパクであるCrempに対する抗体を用いた。図には細胞を透過処理した際の結果を示した。

A.

Mouse MSAPGPYQAAAGPSVVPTAPPTYEETVGVNSYYPTP-PAPMPGPATGLITGPDGKGMNPP
 Rat MSAPGPYQAAAGPSVMPTAPPTYEETVGVNSYYPTP-PAPQPGPATGLITGPDGKGMNPP
 Human MSVPGPYQAATGPSSAPSAPPSYEETVAVNSYYPTP-PAPMPGPTTGLVTGPDGKGMNPP
 Chicken -----MSAPSGFPAPSAPPSYEETVGINVNYPHPYPVPQPG-----LRPDGKGMNPP
 *:.. *:***:*****.:* ** * *. * ** *****

Mouse SYITQPVVPNANAIQVQTVYVQQPVS-FYDRPVQMCCPSCSKMIVTQLSYNAGALTWES
 Rat SYITQPVVPNANAIQVQTVYVQQPIS-FYDRPIQMCCPSCNKMIVTQLSYNAGALTWES
 Human SYITQPAPIPNNNPITVQTVYVQHPIT-FLDRPIQMCCPSCNKMIVSQLSYNAGALTWES
 Chicken QYSGQ--PMPTSTPVTVQTVYVQQPVVLFYDRPVQMCCPSCNQMIIVTRLCYESGALTWES
 . * * *:.. .:*****.: * ***:*.*****.:*****:*****

Mouse CGLLELLGCVAGCCLEPFCVIALQDVDHYCPNCKALLGTYKRL
 Rat CGLLELLGCVAGCCLEPFCVIALQDVDHYCPNCKALLGTYKRL
 Human CGLLELLGCVAGCCLEPFCVIALQDVDHYCPNCRALLGTYKRL
 Chicken CGLLELLGCVAGCCLEPFCVIALKDVEHFPCNCNAHVGSYKRL
 .* ***:*****:*****:*****:*****.* :*:*****

B.

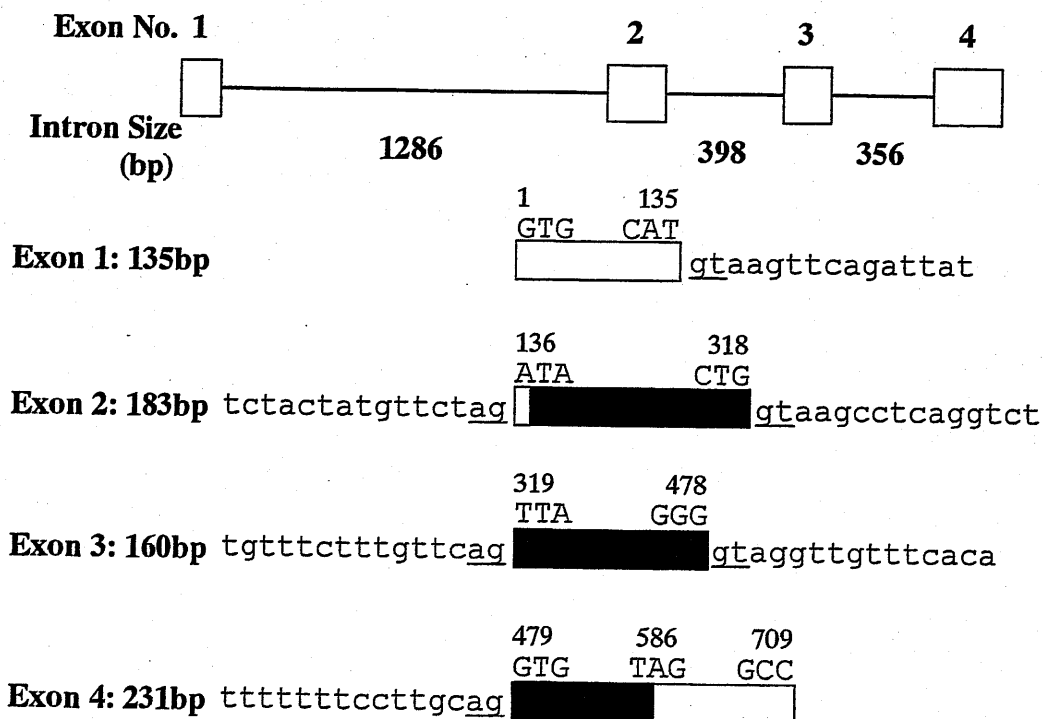


図3-4. 他種間におけるSIMPLEのalignment

A. *は4種間において完全に保存されているアミノ酸を、:は4種間において同一性が保たれているアミノ酸を、.は3種間において同一性が保たれているアミノ酸を示す。保存されているPY motifをboxで、保存されている膜貫通領域を斜線で囲った。

B. ヒト同様SIMPLEは4つのexonより構成され、全てのexonがGT/AGルールにより転写されていると考えられる。黒塗りの部分はORFを示す。

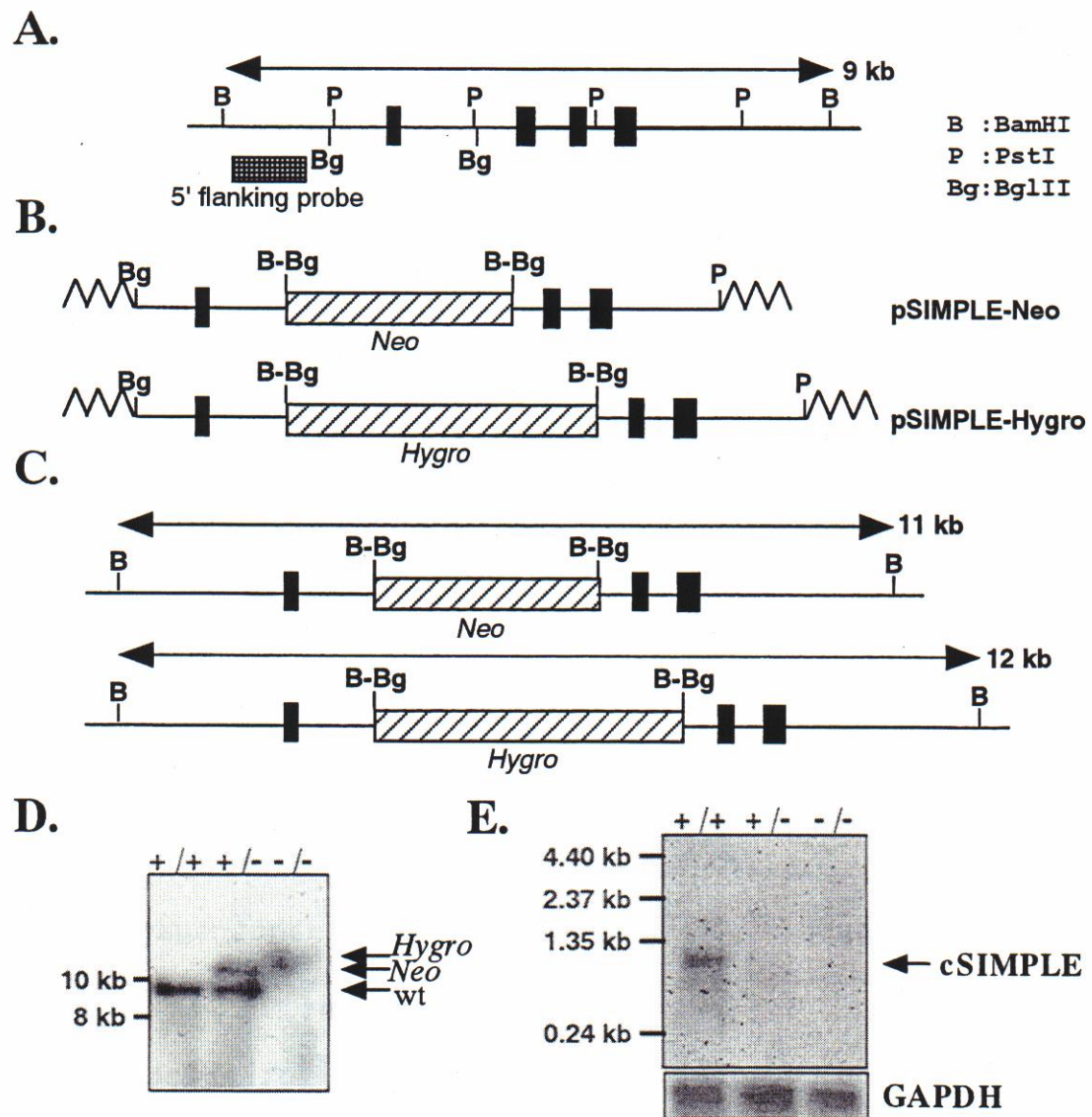
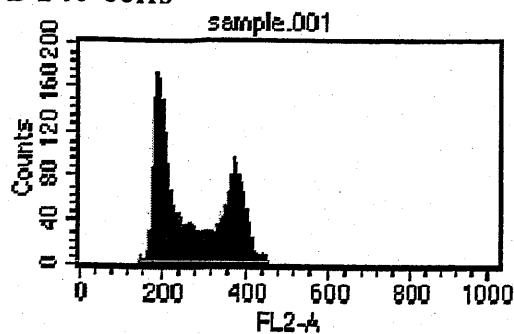


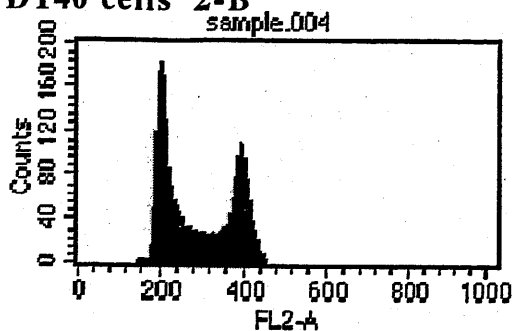
図3-5. SIMPLE遺伝子欠損細胞の作製

A. cSIMPLEを含むgenome DNAの制限酵素マップ。B. 本研究に用いたtargeting vectorの構造。C. 組み換え後の予想されるcSIMPLE genome領域。D. Southern blotによる組み換え確認。E. Northern blotによるSIMPLEの発現確認。genome DNAを野生型細胞(+/+), neo-組み換え細胞(+/-), neo/hygro組み換え細胞(-/-)より回収し、*Bam*HIで処理後、図中に示したtargeting vectorの外側の領域にある配列を用いてSouthern blotを行った。Northern blotには各細胞から回収したmRNA、3 μ gを使用した。

Wild type
DT40 cells



SIMPLE KO
DT40 cells 2-B



SIMPLE KO
DT40 cells 4-B

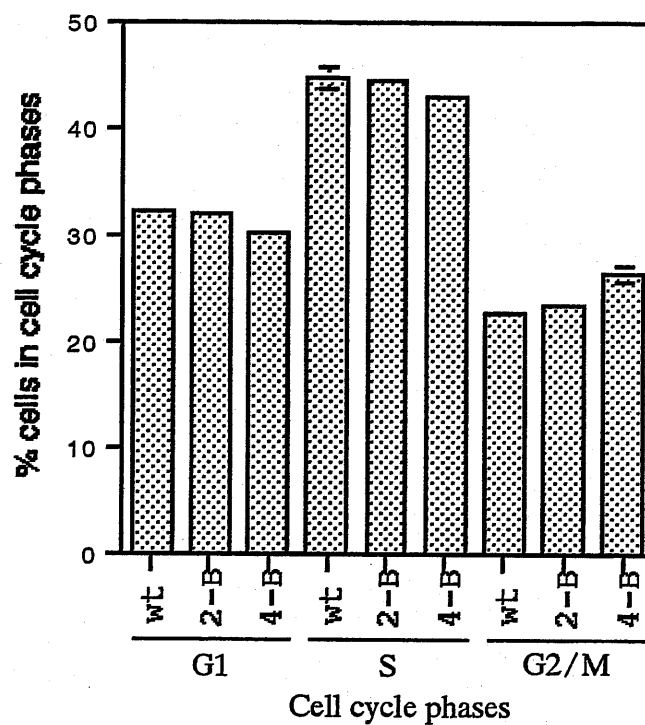
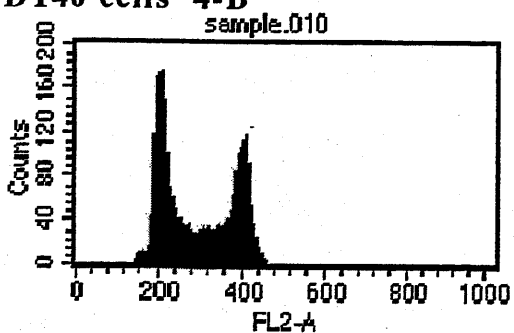


図3-6. SIMPLE欠損における細胞周期への影響

野生型細胞および2種類のcSIMPLE欠損細胞 (2B, 4B)の細胞周期についてFACSにより検討した。グラフは図示したヒストグラムをModFitにより解析した値を示す。

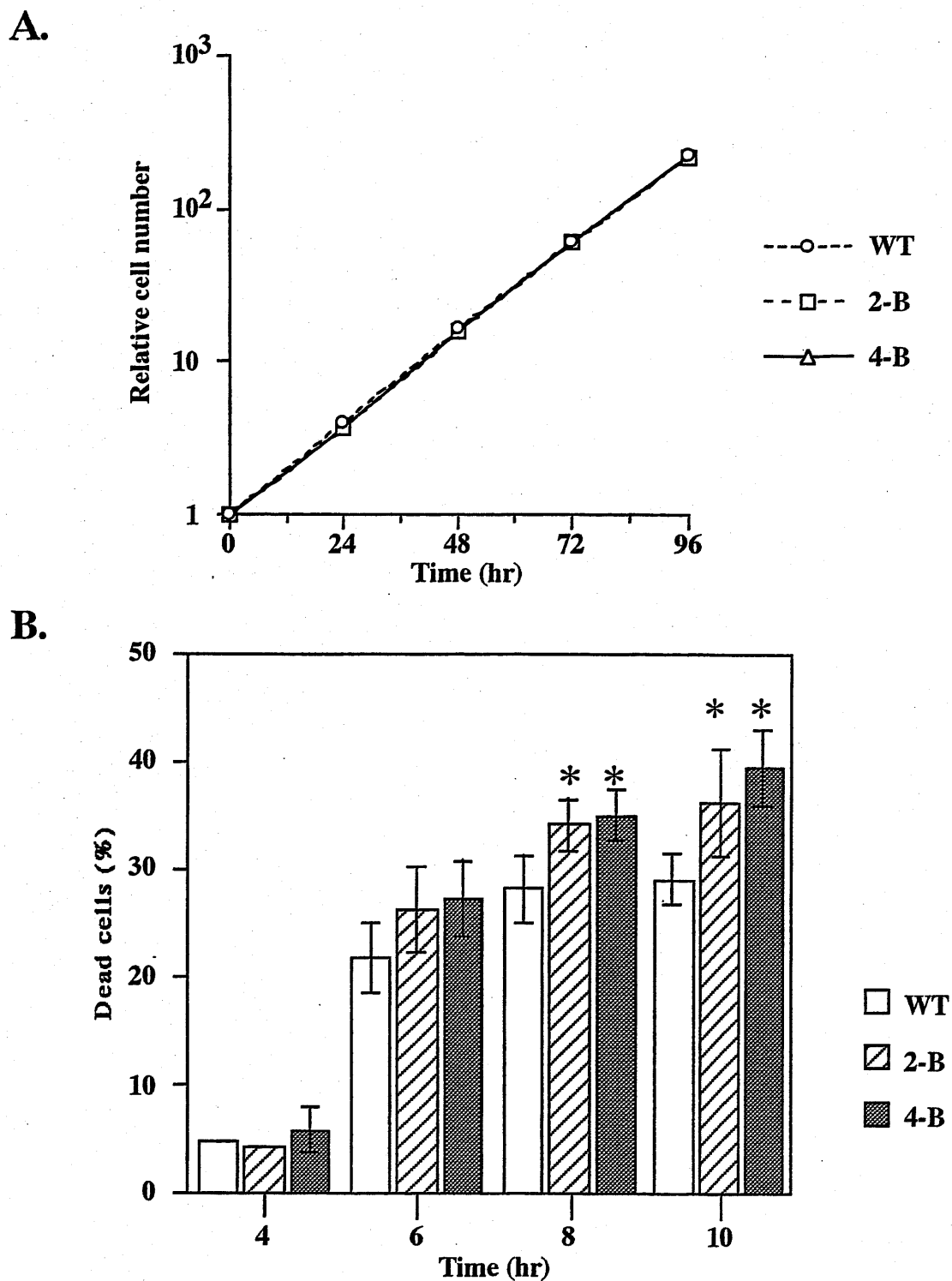


図3-7. SIMPLE欠損による細胞増殖とアポトーシスへの影響

A. 1×10^5 の細胞をシャーレに蒔き24時間置きに細胞数を計測した。

B. SIMPLE欠損によるADRに対するアポトーシス感受性の増大。ADR刺激後、2時間置きに細胞を回収し、核の断片化をFACSにより測定した。*は有意差を示す($p < 0.05$)

3-4 考察

SIMPLE のアポトーシスへの関与

SIMPLE のアポトーシスへの関与について検討を行った結果、抗ガン剤である ADR 刺激においてのみ SIMPLE 欠損細胞でアポトーシス感受性の増大が確認された。ADR は topoisomerase II と DNA 切断物の複合体を安定化することでアポトーシスを誘導すると考えられており、最近の報告によると、Tyrosine kinase である Lyn を欠損した DT40 細胞は ADR 刺激によるアポトーシスに抵抗性を示すことが確認されている (72)。また、同報告によると、他の抗ガン剤である 1-β-D-arabinofuranosylcytosine (Ara-C)、Camptothecin (CPT) および cis-diamminedichloroplatinum(II) (CDDP; cisplatin) では Lyn 欠失によるアポトーシス抵抗性は確認されておらず、ADR と同様の作用機序を持つ etoposide (VP16) のみが Lyn 欠損により阻害されることが確認されている。更に、その報告によると ADR 刺激による、アポトーシスにおいて重要な役割を果たすと考えられている JNK の活性化は Lyn 欠損細胞および野生型細胞共に変化は確認されていない。一方で、DT40 細胞における C₂-ceramide によるアポトーシスには Lyn 欠損は関与しないことが報告されている (73)。これらの事実より、DEX や H₂O₂ がどのような経路で DT40 細胞に対してアポトーシスを誘導しているか明らかではないものの、現段階において SIMPLE が Lyn 特異的なアポトーシスに関与している可能性は否定できない。また、興味深い事に、Lyn の分解が Nedd4 により、Epstein-Barr ウイルスの LMP-2 存在下において促進されとの報告がある (74)。SIMPLE は Nedd4 と相互作用することから、SIMPLE 欠損細胞における ADR 刺激によるアポトーシス感受性の増大は Lyn の分解が起こらないために誘起されている可能性が考えられる。DT40 細胞の UV 刺激や Radiation によるアポトーシスにも Lyn の活性化が必須であることが報告されていることから (75)、今後、それら刺激による SIMPLE 欠損細胞と野生型細胞でのアポトーシス感受性の差および Lyn の分解について検討する必要がある。現在、この可能性について検討を行っている。

SIMPLE のタンパク分解への関与

SIMPLE のマウス homologue において NF-κB の分解への関与が報告された (61)。DT40 細胞は細胞膜に発現している B cell antigen receptor を IgM 抗体でクロスリンクすることで NF-κB が活性化されること、またアポトーシスが誘導されることが報告されている (76)。このことから、SIMPLE 欠損細胞および野生型細胞を IgM 抗体で刺激した際に NF-κB の分解に変化について確認する必要があると考えられる。現在、この可能性について検討を行っている。

終章

SIMPLE 欠損細胞において、Protein Tyrosine kinase である Lyn 依存的にアポトーシスを誘導することが知られる Adriamycin 刺激に対してのみアポトーシス感受性の増大を確認した。興味深い事に、Lyn は Nedd4 により、Epstein-Barr ウィルス由来のタンパクである LMP-2 存在下において分解されることが報告されている (75)。本研究でも確認したが、SIMPLE は Nedd4 と相互作用することから、SIMPLE 欠損細胞の Adriamycin 刺激によるアポトーシス感受性の増大は Lyn の分解が誘導されないために起きたものと考えられる。また、最近の報告では SIMPLE は NF- κ B の分解に関与することが報告されており (76)、更に、末梢神経疾患の一つである Charcot-Marie Tooth 病の原因遺伝子の一候補であることがポジショナルクローニングにより明らかにされた (77)。近年、パーキンソン病やアルツハイマー病を代表とする神経変性疾患は異常タンパクの蓄積による神経細胞のアポトーシスに原因があると考えられており、これらの知見より、SIMPLE がタンパク分解に寄与する可能性は非常に高いと思われる。

NF- κ B が TNF- α の転写誘導において必須の因子であること (22)、また、SIMPLE が TNF- α によって誘導されることを考えると、SIMPLE が NF- κ B を分解することにより TNF- α の negative regulator として機能している可能性は十分に考えられる。その意味で NF- κ B の分解に SIMPLE が如何なる機序により関与しているか興味を持たれる。一方、Lyn の分解の場合、SIMPLE は Nedd4 を介して分解に関与している可能性が考えられ、Lyn 以外の Nedd4 の基質の分解および、Nedd4 以外の Nedd4 ファミリータンパクによるタンパク分解に SIMPLE が寄与している可能性は十分に考えられる。Nedd4 が有する WW domain は 4 つの class に分類される WW domain の内、class 1 に分類され、PY motif を好んで認識するのに対し、class 4 の WW domain はリン酸化 Serine および Threonine と相互作用すること報告されている (36)。このことから、Nedd4 がリン酸化 Serine および Threonine に結合する可能性は否定できないことから、Nedd4 および Nedd4 ファミリータンパクがリン酸化ステータスにあるタンパクを特異的に認識し、過剰なシグナルが入らないよう、SIMPLE を介した分解を行っている可能性が考えられる。

細胞は種々の刺激に対して様々なアウトプットを起こす。それは、増殖や分化、アポトーシス等の表現系として確認することができる。通常、細胞はそれらアウトプットを促進するタンパクを発現するか、あるいは抑制タンパクを発現させることで分化やアポトーシスが起きないように制御している。この抑制に関与するタンパクが刺激依存的に分解されるのであれば、SIMPLE が様々な刺激により発現誘導されること、また、ほぼ全ての組織において発現が確認されることを説明しうると考えられる。SIMPLE の Lyn 分解への関与を証明することにより、Nedd4 ファミリーによる lysosome を介した新たなタンパク分解経路に対する知見が得られるばかりでなく、Nedd4 ファミリーによるタンパク分解の方向性を示すことができると考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始適切な御指導、御討論を賜りました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科、大阪府立成人病センター研究所免疫学部門、瀬谷司教授に深く感謝致します。

終始適切な御助言、御討論を賜りました大阪府立成人病センター研究所免疫学部門、松本美佐子博士、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞増殖学講座、竹家達夫教授に深く感謝致します。

終始熱心な御指導を賜り、また研究のすばらしさを教えて下さいました大阪府立成人病センター研究所免疫学部門、Nasim. Ara. Begum 博士に心から感謝致します。

5 年間、唯一の学生同期として終始有意義な討論を頂いた白鳥行大博士に心から感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、実験材料を御供与下さいました大阪府立公衆衛生研究所、鈴木定彦博士、東京理科大学、後飯塚僚教授、京都大学、武田俊一教授、University of Freiburg、Kirsten C. Weining 教授、広島大学、松田治男教授、大阪府立成人病センター研究所、井上直和博士、福井理博士に深く感謝致します。

本論文を審査して下さいました、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科動物遺伝子機能学講座、川市 正史教授ならびに細胞増殖学講座、石田 靖雅助教授に深く感謝致します。

研究および様々な面で大変お世話になりました、大阪府立成人病センター研究所免疫学部門の皆様、そして終始筆者を支えてくれた友人達に深く感謝致します。

筆者の研究の一部は日本学術振興会の援助の基行われました。

最後に、21 年間にも及ぶ長い学生生活を経済的、精神的に支え、筆者の意志を尊重して下さいました両親に心から感謝致します。

2003 年 3 月 森脇康博

参考文献

1. Fearon, D. T. and Locksley, R. M. (1996) The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*. **272**, 50-54.
2. Medzhitov, R. and Janeway, C. A. Jr. (1997) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*. **91**, 295-298.
3. Medzhitov, R. (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 135-145.
4. Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., Marincola, F. M., Topalian, S. L., Restifo, N. P., Dudley, M. E., Schwarz, S. L., Spiess, P. J., Wunderlich, J. R., Parkhurst, M. R., Kawakami, Y., Seipp, C. A., Einhorn, J. H. and White, D. E. (1998) Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med*. **4**, 321-327.
5. Seya, T., Begum, N. A., Nomura, M., Tsuji, S., Matsumoto, M., Hayashi, A., Azuma, I. and Toyoshima, K. (2000) Innate immune therapy for cancer. Screen for molecules capable of activating the innate immune system. *Adv. Exp. Med. Biol.* **465**, 229-237.
6. Hayashi, A. (1994) Interferon- γ as a marker for the effective cancer immunotherapy with BCG-cell wall skeleton. *Proc. Jpn. Acad.* **70**, 205-209.
7. Hayashi, A., Doi, o., Azuma, I. And Toyoshima K. (1998) Immuno-friendly use of BCG-cell wall skeleton remarkably improves the survival rate of various cancer patients. *Proc. Jpn. Acad.* **74**, 50-55.
8. Begum, N. A., Tsuji, S., Nomura, M., Shida, K., Azuma, I., Hayashi, A., Matsumoto, M., Seya, T. and Toyoshima, K. (1999) Human MD-1 homologue is a BCG-regulated gene product in monocytes: its identification by differential display. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**, 325-329.
9. Tsuji, S., Matsumoto, M., Takeuchi, O., Akira, S., Azuma, I., Hayashi, A., Toyoshima, K. and Seya, T. (2000) Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of Toll-like receptors. *Infect Immun.* **68**, 6883-6890.
10. Seya, T., Matsumoto, M., Tsuji, S., Begum, N. A., Azuma, I. and Toyoshima, K. (2002) Structural-functional relationship of pathogen-associated molecular patterns: lessons from BCG cell wall skeleton and mycoplasma lipoprotein M161Ag. *Microbes. Infect.* **4**, 955-961.
11. Capone, M. C., Gorman, D. M., Ching, E. P. and Zlotnik, A. (1996) Identification through bioinformatics of cDNAs encoding human thymic shared Ag-1/stem cell Ag-2. A new member of the human Ly-6 family. *J. Immunol.* **157**, 969-973.
12. Mao, M., Fu, G., Wu, J. S., Zhang, Q. H., Zhou, J., Kan, L. X., Huang, Q. H., He, K.L., Gu, B. W., Han, Z. G., Shen, Y., Gu, J., Yu, Y. P., Xu, S. H., Wang, Y. X., Chen, S. J. and Chen, Z. (1998) Identification of genes expressed in human CD34(+) hematopoietic

- stem/progenitor cells by expressed sequence tags and efficient full-length cDNA cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 8175-8180.
13. Myokai, F., Takashiba, S., Lebo, R. and Amar, S. A. (1999) novel lipopolysaccharide-induced transcription factor regulating tumor necrosis factor alpha gene expression: molecular cloning, sequencing, characterization, and chromosomal assignment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 4518-4523.
 14. Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1997) A model for p53-induced apoptosis. *Nature*. **389**, 300-305.
 15. Everett, L. M., Li, A., Devaraju, G., Caperell-Grant, A. and Bigsby, R. M. (1997) A novel estrogen-enhanced transcript identified in the rat uterus by differential display. *Endocrinology*. **138**, 3836-3841.
 16. Takashiba, S., Van Dyke, T. E., Shapira, L. and Amar, S. (1995) Lipopolysaccharide-inducible and salicylate-sensitive nuclear factor(s) on human tumor necrosis factor alpha promoter. *Infect. Immun.* **63**, 1529-1534.
 17. Begum, N. A., Kobayashi, M., Moriwaki, Y., Matsumoto, M., Toyoshima, K. and Seya, T. (2002) Mycobacterium bovis BCG Cell Wall and Lipopolysaccharide Induce a Novel Gene, BIGM103, Encoding a 7-TM Protein: Identification of a New Protein Family Having Zn-Transporter and Zn-Metalloprotease Signatures. *Genomics*. **80**, 630-645.
 18. Rescigno, M., Martino, M., Sutherland, C. L., Gold, M. R. and Ricciardi-Castagnoli, P. (1998) Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J. Exp. Med.* **188**, 2175-2180.
 19. Underhill, D. M. and Ozinsky, A. (2002) Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 103-110.
 20. Le, X. F., Yang, P. and Chang, K. S. (1996) Analysis of the Growth and Transformation Suppressor Domains of Promyelocytic Leukemia Gene, PML. *J. Biol. Chem.* **271**, 130-135.
 21. Kim, M., Tezuka, T., Suzuki, Y., Sugano, S., Hirai, M. and Yamamoto, T. (1999) Molecular cloning and characterization of a novel cbl-family gene, cbl-c. *Gene*, **239**, 145-154.
 22. Swantek, J. L., Christerson, L. and Cobb, M. H. (1999) Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha promoter activity is inhibitor of nuclear factor-kappaB kinase-dependent. *J. Biol. Chem.* **274**, 11667-11671.
 23. Aliprantis, A. O., Yang, R. B., Mark, M. R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J. D., Klimpel, G. R., Godowski, P. and Zychlinsky, A. (1999) Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science*. **285**, 736-739.
 24. Aliprantis, A. O., Yang, R. B., Weiss, D. S., Godowski, P. and Zychlinsky, A. (2000) The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *EMBO. J.* **19**, 3325-3336.
 25. Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V. and Baldwin, A. S. Jr. (1998) NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to

- suppress caspase-8 activation. *Science*. **281**, 1680-1683.
26. Orth, K., Palmer, L. E., Bao, Z. Q. Stewart, S., Rudolph, A. E., Bliska, J. B. and Dixon, J. E. (1999) Inhibition of themitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a *Yersnia* effector. *Science*. **285**, 1920-1923.
 27. Zhu, J., Jiang, J., Zhou, W., Zhu, K. and Chen, X. (1999) Differential regulation of cellular target genes by p53 devoid of the PXXP motifs with impaired apoptotic activity. *Oncogene*. **18**, 2149-2155.
 28. Molloy, A., Laochumroonvorapong, P. and Kaplan, G. (1994) Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin. *J. Exp. Med.* **180**, 1499-1509.
 29. Klingler, K., Tchou-Wong, K. M., Brandli, O., Aston, C., Kim, R., Chi, C. and Rom, W. N. (1997) Effects of mycobacteria on regulation of apoptosis in mononuclear phagocytes. *Infect. Immun.* **65**, 5272-8.
 30. Garcia, I., Miyazaki, Y., Marchal, G., Lesslauer, W. and Vassalli, P. (1997) High sensitivity of transgenic mice expressing soluble TNFR1 fusion protein to mycobacterial infections: synergistic action of TNF and IFN-gamma in the differentiation of protective granulomas. *Eur. J. Immunol.* **27**, 3182-90.
 31. Frangioni, J. V. and Neel, B. G. (1993) Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal. Biochem.* **210**, 179-187.
 32. Bordier, C. (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* **256**, 1604-1647.
 33. Williamson, M.P. (1994) The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.* **297**, 249-260.
 34. Kay, B. K., Williamson, M. P. and Sudol, M. (2000) The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB. J.* **14**, 231-241.
 35. Harvey, K. F. and Kumar, S. (1999) Nedd4-like proteins: an emerging family of ubiquitin-protein ligases implicated in diverse cellular functions. *Trends Cell Biol.* **9**, 166-169.
 36. Rotin, D., Staub, O. and Haguenauer-Tsapis, R. (2000) Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J. Membr. Biol.* **176**, 1-17.
 37. Borden, K. L. and Freemont, P. S. (1996) The RING finger domain : a recent example of a sequence structure family. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 395-401.
 38. Saurin, A. J., Borden, K. L. Boddy, M. N. and Freemont, P. S. (1996) Does this have a familiar RING? *Trends Biochem. Sci.* **21**, 208-214.
 39. Stenmark, H. and Aasland, R. (1999) FYVE-finger proteins--effectors of an inositol lipid. *J. Cell. Sci.* **112**, 4175-4183.
 40. Simmen, T., Schmidt, A., Hunziker, W. and Beermann, F. (1999) The tyrosinase tail

- mediates sorting to the lysosomal compartment in MDCK cells via a di-leucine and a tyrosine-based signal. *J. Cell. Sci.* **112**, 45-53.
41. Bonifacino, J. S. and Dell'Angelica, E. C. (1999) Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J. Cell. Biol.* **145**, 923-926.
 42. Tang, B. L. and Hong, W. (1999) A possible role of di-leucine-based motifs in targeting and sorting of the syntaxin family of proteins. *FEBS. Lett.* **446**, 211-212.
 43. Fukuda, M. (1991) Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J. Biol. Chem.* **266**, 21327-21330.
 44. Kutateladze, T. G., Ogburn, K. D., Watson, W. T., de Beer, T., Emr, S. D. and Burd, C. G. (1999) Overduin M. Phosphatidylinositol 3-phosphate recognition by the FYVE domain. *Mol. Cell.* **3**, 805-811.
 45. Hamilton, M. H., Tcherepanova, I., Huibregtse, J. M. and McDonnell, D. P. (2001) Nuclear import/export of hRPF1/Nedd4 regulates the ubiquitin-dependent degradation of its nuclear substrates. *J. Biol. Chem.* **276**, 26324-26331.
 46. Sadler, I., Crawford, A. W., Michelsen, J. W. and Beckerle, M. C. (1992) Zyxin and cCRP: two interactive LIM domain proteins associated with the cytoskeleton. *J. Cell. Biol.* **119**, 1573-1587.
 47. Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H. D. and Jentsch, S. (2000) Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell.* **102**, 577-586.
 48. Jolliffe, C. N., Harvey, K. F., Haines, B. P., Parasivam, G. and Kumar, S. (2000) Identification of multiple proteins expressed in murine embryos as binding partners for the WW domains of the ubiquitin-protein ligase Nedd4. *Biochem. J.* **351**, 557-565.
 49. Tranque, P., Crossin, K. L., Cirelli, C., Edelman, G. M. and Mauro, V. P. (1996) Identification and characterization of a RING zinc finger gene (C-RZF) expressed in chicken embryo cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **93**, 3105-3109.
 50. Mackay, J. P. and Crossley, M. (1998) Zinc fingers are sticking together. *Trends. Biochem. Sci.* **23**, 1-4.
 51. Kumar, S., Harvey, K. F., Kinoshita, M., Copeland, N. G., Noda, M. and Jenkins, N. A. (1997) cDNA cloning, expression analysis, and mapping of the mouse Nedd4 gene. *Genomics.* **40**, 435-43.
 52. Murillas, R., Simms, K. S., Hatakeyama, S., Weissman, A. M. and Kuehn, M. R. (2002) Identification of developmentally expressed proteins that functionally interact with Nedd4 ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* **277**, 2897-2907.
 53. Anan, T., Nagata, Y., Koga, H., Honda, Y., Yabuki, N., Miyamoto, C., Kuwano, A., Matsuda, I., Endo, F., Saya, H. and Nakao, M. (1998) Human ubiquitin-protein ligase Nedd4: expression, subcellular localization and selective interaction with ubiquitin-conjugating enzymes. *Genes. Cells.* **3**, 751-763.

54. Peruzzi F, Prisco M, Morrione A, Valentinis B, Baserga R. (2001) Anti-apoptotic signaling of the insulin-like growth factor-I receptor through mitochondrial translocation of c-Raf and Nedd4. *J. Biol. Chem.* **276**, 25990-25996.
55. Harvey, K. F., Harvey, N. L., Michael, J. M., Parasivam, G., Waterhouse, N., Alnemri, E. S., Watters, D. and Kumar, S. (1998) Caspase-mediated cleavage of the ubiquitin-protein ligase Nedd4 during apoptosis. *J. Biol. Chem.* **273**, 13524-13530.
56. Morrione, A., Plant, P., Valentinis, B., Staub, O., Kumar, S., Rotin, D. and Baserga, R. (1999) mGrb10 interacts with Nedd4. *J. Biol. Chem.* **274**, 24094-24099.
57. Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D. and Howley, P. M. (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. **75**, 495-505.
58. Scheffner, M., Nuber, U. and Huibregtse, J. M. (1995) Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature*. **373**, 81-83.
59. Adra, C. N., Zhu, S., Ko, J. L., Guillemot, J. C., Cuervo, A. M., Kobayashi, H., Horiuchi, T., Lelias, J. M., Rowley, J. D. and Lim, B. (1996) LAPTM5: a novel lysosomal-associated multispinning membrane protein preferentially expressed in hematopoietic cells. *Genomics*. **35**, 328-337.
60. Cuervo, A. M. and Dice, J. F. (1996) A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*. **273**, 501-503.
61. Cuervo, A. M., Hu, W., Lim, B. and Dice, J. F. (1998) IkappaB is a substrate for a selective pathway of lysosomal proteolysis. *Mol Biol Cell*. **9**, 1995-2010.
62. Cuervo, A. M. and Dice, J. F. (2000) Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms. *J. Cell. Sci.* **113**, 4441-4450.
63. Xie, L. P., Fu, W. X., Jin, C., Dong, X. Y. and Chen, W. F. (2002) Negative regulation of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression by a mouse estrogen-enhanced transcript. *Eur. J. Immunol.* **32**, 2837-2846.
64. Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E. L., Hartmann, D., Lullmann-Rauch, R., Janssen, P. M., Blanz, J., von Figura, K. and Saftig, P. (2000) Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature*. **406**, 902-906.
65. Andrejewski, N., Punnonen, E. L., Guhde, G., Tanaka, Y., Lullmann-Rauch, R., Hartmann, D., von Figura, K. and Saftig, P. (1999) Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **274**, 12692-12701.
66. Bhalla, K., Eyre, H. J., Whitmore, S. A., Sutherland, G. R. and Callen, D. F. (1999) C16orf5, a novel proline-rich gene at 16p13.3, is highly expressed in the brain. *J. Hum. Genet.*, **44**, 383-387.
67. Lahti, J. M. (1999) Use of gene knockouts in cultured cells to study apoptosis. *Methods*. **17**, 305-312.
68. Inoue, N., Fukui, A., Nomura, M., Matsumoto, M., Nishizawa, Y., Toyoshima, K. and

- Seya, T. (2001) A novel chicken membrane-associated complement regulatory protein: molecular cloning and functional characterization. *J. Immunol.* **166**, 424-31.
69. Tanikawa, J., Ichikawa-Iwata, E., Kanei-Ishii, C., Nakai, A., Matsuzawa, S., Reed, J. C. and Ishii, S. (2000) p53 suppresses the c-Myb-induced activation of heat shock transcription factor 3. *J. Biol. Chem.* **275**, 15578-15585.
 70. Yuan, X. M., Li, W., Dalen, H., Lotem, J., Kama, R., Sachs, L. and Brunk, U. T. (2002) Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**, 6286-6291.
 71. Takao, N., Li, Y. and Yamamoto, K. (2000) Protective roles for ATM in cellular response to oxidative stress. *FEBS. Lett.* **472**, 133-136.
 72. Maruo, A., Oishi, I., Sada, K., Nomi, M., Kurosaki, T., Minami, Y. and Yamamura, H. (1999) Protein tyrosine kinase Lyn mediates apoptosis induced by topoisomerase II inhibitors in DT40 cells. *Int. Immunol.* **11**, 1371-1380.
 73. Qin, S., Ding, J., Kurosaki, T. and Yamamura, H. (1999) A deficiency in Syk enhances ceramide-induced apoptosis in DT40 lymphoma B cells. *FEBS. Lett.* **427**, 139-143.
 74. Ikeda, M., Ikeda, A., Longan, L. C. and Longnecker, R. (2000) The Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A PY motif recruits WW domain-containing ubiquitin-protein ligases. *Virology.* **268**, 178-191.
 75. Qin, S., Minami, Y., Kurosaki, T. and Yamamura, H. (1997) Distinctive functions of Syk and Lyn in mediating osmotic stress- and ultraviolet C irradiation-induced apoptosis in chicken B cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 17994-17999.
 76. Niino, H., Maeda, A., Kurosaki, T. and Clark, E. A. (2002) The B lymphocyte adaptor molecule of 32 kD (Bam32) regulates B cell antigen receptor signaling and cell survival. *J. Exp. Med.* **195**, 143-149.
 77. Street, V. A., Bennett, C. L., Goldy, J. D., Shirk, A. J., Kleopa, K. A., Tempel, B. L., Lipe, H. P., Scherer, S. S., Bird, T. D. and Chance, P. F. (2003) Mutation of a putative protein degradation gene LITAF/SIMPLE in Charcot-Marie-Tooth disease 1C. *Neurology.* **60**, 22-26.