

(千葉大学学位申請論文)

**Src family kinase に結合する新規タンパク質
CIN85 とその遺伝子 SH3KBP1 に関する研究**

2006 年 1 月

成田 雅

目次

目次	1
緒言	4
(1) 微生物資源からの選択性の高い抗ガン抗生物質の探索研究	7
(2) 酵母 1-ハイブリッド法を用いた FcγRIIB 遺伝子の転写因子探索研究	9
略号・記号	11
第 1 部 新規遺伝子 SH3KBP1 の同定とその産物(CIN85)の性質	12
第 1 節 緒言	13
第 2 節 材料・方法	15
1-2-1 材料	15
1-2-2 酵母 2-ハイブリッド法	15
1-2-3 プラークハイブリダイゼーション法	15
1-2-4 CIN85 cDNA のクローニング	16
1-2-5 ノーザンブロット法	16
1-2-6 発現ベクターの作製	16
1-2-7 293T 細胞の一過性形質転換 (transient transfection)	18
1-2-8 免疫沈降法	18
1-2-9 GSTpull-down アッセイ	18
1-2-10 ウェスタンブロット	18
1-2-11 SH3 ドメイン アレイ	19
1-2-12 蛍光 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション	19
第 3 節 結果	21
1-3-1 SH3KBP1 のクローニング	21
1-3-2 1 塩基多形(SNPs)	21
1-3-3 ノーザンブロット	24
1-3-4 Hck 及び Src との結合 (<i>in vivo</i>)	25
1-3-5 自己分子間(内)結合	26
1-3-6 GSTpull-down アッセイ	27
1-3-7 SH3 ドメイン アレイ	28
1-3-8 SH3KBP1 の染色体マッピング	29
第 4 節 考察	30

— CIN85 は TNF レセプター1 シグナル伝達複合体のメンバーで、
TNF- α 誘導アポトーシスを調節する —

第1節	緒言	33
第2節	材料・方法	35
2-2-1	材料	35
2-2-2	ポリクローナル抗 CIN85 抗体の作製	35
2-2-3	発現ベクターの作製	35
2-2-4	CEM 細胞及び U937 細胞の形質転換細胞の作製	36
2-2-5	TNF- α 刺激による CEM 細胞死の測定	36
2-2-6	<i>in vivo</i> タンパク質相互作用	36
2-2-7	フローサイトメトリー	36
2-2-8	TNF- α 刺激 CEM 細胞の細胞抽出液調製	37
第3節	結果	38
2-3-1	Src family kinase 阻害剤 PP1 は TNF- α 誘導アポトーシスを促進する	38
2-3-2	CIN85 は Src family kinase と普遍的に結合する	39
2-3-3	CEM 細胞中での CIN85 複合体の解析	40
2-3-4	内在性 CIN85 と Src との結合	41
2-3-5	形質転換された CEM 細胞の TNF- α 感受性	42
2-3-6	CEM 形質転換細胞表面での TNFR1 の発現	44
2-3-7	CEM 細胞中での CIN85 と TNFR1 複合体の解析	45
2-3-8	TNFR1 細胞内領域との結合	46
2-3-9	CIN85 及び Src の TNFR1 シグナル伝達複合体パートナーの解析	47
2-3-10	TNF- α 刺激による CIN85 複合体の変化	49
2-3-11	TNF- α 刺激による生存シグナルの変化	51
第4節	考察	54

第3部 単純ヘルペスウイルス増殖抑制に関する検討 57

— CIN85 は HeLa 細胞中で単純ヘルペスウイルスの増殖を抑制する —

第1節	緒言	58
第2節	材料・方法	60
3-2-1	材料	60
3-2-2	細胞及びウイルス	60
3-2-3	発現ベクターの作製	60
3-2-4	HeLa 細胞の形質転換	61
3-2-5	CHO-K1 細胞の形質転換	61
3-2-6	ウェスタンブロット	61

3-2-7	プラークアッセイ	61
3-2-8	ウイルス増殖曲線の測定	62
3-2-9	ウイルス感染効率の測定	62
3-2-10	細胞増殖の測定	62
3-2-11	LDH の測定	62
3-2-12	統計解析	62
第3節 結果		63
3-3-1	内在性 CIN85 と過剰発現 CIN85 のプラーク形成抑制効果	63
3-3-2	HeLa/V5-CIN85-BS 細胞の HSV-1 感染効率	64
3-3-3	形質転換 HeLa 細胞の増殖	65
3-3-4	Geneticin 耐性クローンも HSV-1 プラーク形成を抑制する	66
3-3-5	V5-CIN85-dSH3dPRR の過剰産生は HSV-1 プラーク形成を抑制しない	67
3-3-6	CIN85 の PRR がウイルス増殖抑制に重要であり、SH3ドメインは不要である	68
3-3-7	CIN85-PRR 発現 HeLa 細胞の HSV-1 感染効率	69
3-3-8	HSV-1 増殖曲線(replication)の比較	69
3-3-9	CHO-K1 形質転換細胞の HSV-1 感染	70
3-3-10	高濃度 HSV 感染による CIN85 の効果	72
第4節 考察		73
総括		75
謝辞		77
引用文献		78
原著論文目録		84

緒言

本研究では、第 1 部で、酵母 2-ハイブリッド法を用いて、Hck の SH3 ドメインの結合パートナーとして CIN85 を同定したことを報告する。CIN85[1]は複数の機能性ドメインを含んだアダプタータンパク質で、N 末に 3 つの SH3 ドメイン、中央にプロリンリッチな領域(PRR)、C 末に coiled-coil ドメインを持つ。第 2 部と第 3 部では CIN85 の新規機能について報告する。T 細胞において、CIN85 の過剰発現が TNF- α 誘導アポトーシスを促進することを第 2 部で示し、第 3 部で HeLa 細胞において CIN85 の過剰発現が単純ヘルペスウィルスの増殖を抑制することを報告する。

細胞は外界の化学物質、紫外線や放射線、熱、生理活性物質、微生物など様々な環境因子の作用に応答し、適応して生存している。環境因子と細胞との接点は細胞表面であり、第 1 の作用点となる。細胞表面は脂質の二重層からなる細胞膜と、これを貫通し、またはこれと結合するタンパク質、糖タンパク質、糖脂質で構成される。これらの多くが細胞の外から内へのシグナル伝達に関与しており、細胞は外界からのシグナルによってタンパク質の合成、酵素の活性化、細胞の増殖・分化などを誘導している。このシグナルを細胞の外から中へ伝えるのが膜を貫通するレセプター(受容体)である。細胞内へのシグナル伝達は、通常、このレセプターにリガンドが結合することで始動し、細胞内でタンパク質-リガンド、タンパク質-タンパク質間相互作用に変換して核などに至り、最終的に細胞の増殖・分化を誘導する。細胞内シグナル伝達系は真核生物になって急速に発展したシステムであり、その特徴は原核生物の場合と異なり、細胞内でシグナルは枝分かれし、相互にクロストークを行い、あるいは統合されるといったダイナミックな制御を受け、シグナル伝達ネットワークを形成している点である。これは外界の複雑な変化に的確に反応し、より柔軟なシグナル伝達制御を行う必要があるからである。本研究の目的は、このような複雑なシグナル伝達系を解きほぐし、そこから新しい創薬ターゲットの手がかりを得ることにある。

レセプターにリガンドが結合して細胞内シグナル伝達系が動き出す。多くの場合、このシグナル伝達の起点でチロシンキナーゼが活性化する。チロシンキナーゼにはレセプター分子内にキナーゼドメインが含まれるレセプター型 (RTK) と、細胞内にあってレセプターに会合する非レセプター型とがある。さらに非レセプター型は膜結合型と、Abl family のような細胞質型に分類される。膜結合型の非レセプター型チロシンキナーゼは Src family kinase に代表され、Src family kinase は細胞膜の裏打ちの部分に存在し、キナーゼ活性を持たないレセプターと共役して細胞外からの刺激に対する反応に関与すると考えられている。

Src family kinase は分子量約 50~60kDa の膜結合型のタンパク質であり、高等動物では 9 種類のメンバー (Src, Fyn, Yes, Yrk, Lyn, Hck, Fgr, Blk, Lck) が同定されている。これらは類似した構造を持ち、その基本構造は、N 末端に脂肪酸付加部位を持ち、ミスチン酸やパルミチン酸が付加され、これらを介して膜に局在する。続いて順にファミリー間で保存性が比較的低い領域 (unique region)、Src homology 3 (SH3)、Src homology 2 (SH2)ドメインと呼ばれる機能ドメインが存在する。SH2ドメインはリン酸化チロシン残基とその前後のアミノ酸配列を、SH3ドメインはプロリン残基に富むアミノ酸配列を認識してタンパク質-タンパク質間相互作用を担う。C 末端側の半分はキナーゼドメインからなっており、この中ほどに自己リン酸化部位(チロシン)が存在する。C 末端には 10 数残基からなる活性制御ドメインがあり、この部分のチロシン残基がリン酸化されると、チロシンキナーゼ活性が抑制されるこ

とが知られている (Fig. 1) [2]。最初に見出された Src family kinase は v-Src でラウス肉腫ウイルスのガン遺伝子である。v-src 遺伝子は正常細胞の c-src 遺伝子に由来し、C 末端制御ドメインのリン酸化チロシン残基を欠失して常時活性型となっている。Src family kinase の不活性型と活性型の調節機構は、不活性型の結晶構造解析によって解明されている [3, 4]。不活性型は、C 末端制御ドメインのリン酸化チロシン残基を含むペプチドが SH2ドメインと結合していること、SH2ドメインと触媒ドメインをつなぐリンカー配列が SH3ドメインと結合していることを見出された。すなわち不活性型 Src family kinase では機能ドメインが分子内で働いていることが明らかにされた (Fig. 2)。そして活性型に変化するには、C 末端制御ドメインのリン酸化チロシン残基が脱リン酸化するか、あるいは分子内結合に関与している SH2 及び SH3ドメインに他のより親和性の強い因子が結合することが必要である。

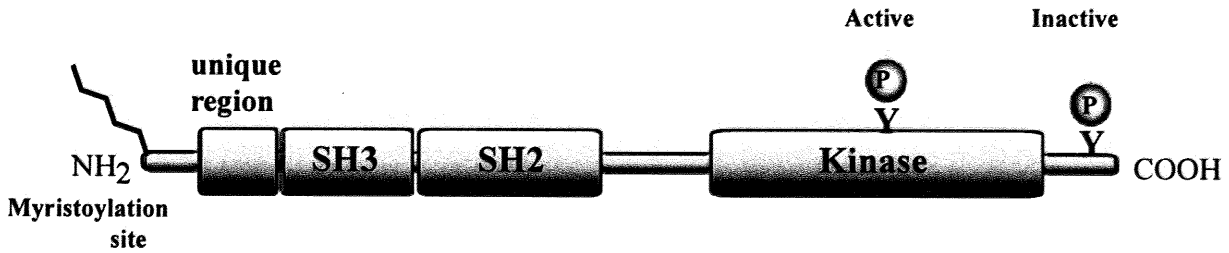


Fig. 1 Src family kinase の基本構造

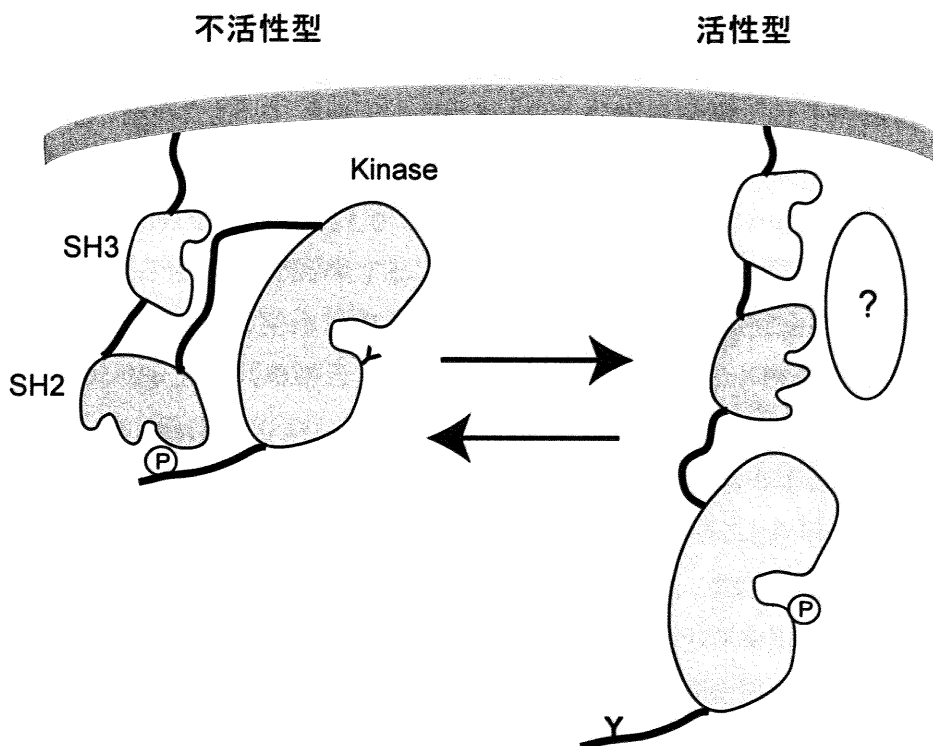


Fig. 2 Src family kinase の活性化機構

Src family kinase には組織遍在性に発現しているメンバーと、ある組織に特異的に発現しているメンバーが存在する。Src、Fyn、Yes、Yrk は広い組織全般に発現しているが、例えば Lck は T 細胞系に、Blk、Lyn、Fgr は B 細胞やマクロファージ系の細胞に、Hck は造血系の単球や顆粒球に発現してしており[5, 6]、それぞれの細胞の中で特異な機能を持っていると考えられている。Src family kinase の機能は免疫系細胞、特に T 及び B 細胞における Lck、Lyn、Fyn についてよく解析されており、それぞれ非チロシンキナーゼレセプターの B 細胞受容体、T 細胞受容体の触媒サブユニットのように振る舞って、抗原刺激の情報を細胞内チロシンリン酸化反応に変換する働きがあることが明らかにされている。Src family kinase の機能の特徴は極めて多様なシグナル伝達系で機能していることであり、また Src family kinase 相互の機能の重複や相補が認められることである。例えば、Src には多彩な機能が報告されているが、Src ノックアウトマウスの解析結果は osteopetrosis (大理石病) という骨細胞の異常が認められる以外は正常であった[7]。これは骨細胞以外では他の Src family kinase が Src の機能を補完しているためと考えられている。

さて、本研究は細胞内のシグナル伝達系、中でも Src family kinase が関与するシグナル伝達系に着目してスタートした。これまでシグナル伝達系を標的とした創薬は、GPCR などのレセプターとリガンドの反応のアゴニスト、アンタゴニストを対象としたものがほとんどであった。しかし近年抗ガン剤の分野でヒト上皮細胞成長因子受容体 EGFR のリン酸化を標的とした ZD1839 (Iressa) や Bcr-Abl を標的とした STI571 (Gleevec) [8] が認可され、分子標的薬の開発が急速に進んでいる。また低分子量 GTP 結合タンパク質の一つ、Rho からアクチン細胞骨格形成に至るシグナル伝達系で働くキナーゼ ROCK の阻害剤 Y-27632 についても緑内障などに臨床応用が探られている[9, 10]。Src family kinase の阻害剤に関しても Radicicol や Geldanamycin の誘導体の開発研究が進められており[11, 12]、これらのようなタンパク質リン酸化反応の阻害剤の分野は、創薬標的として GPCR に次ぐ分野になっている。一方、先に述べたように、Src family kinase の活性調節が分子内結合を含む SH2 及び SH3 ドメインのタンパク質-タンパク質間相互作用によって巧妙になされている。Src ノックアウトマウスは osteopetrosis (大理石病) を発症する[7]が、興味深いことに、この osteopetrosis はキナーゼドメインを欠失させた Src を発現させることで回復することは[13]、キナーゼ活性と関係なく、SH2 及び SH3 ドメインのタンパク質-タンパク質間相互作用の調節が創薬の標的となり得ることを示している。そして、近年 SH3 ドメインとプロリンリッチ配列の結合を阻害する初めての非ペプチド性化合物 UCS15A が見出され、新たなタイプのシグナル伝達阻害剤として注目を集めている[14-16]。

一方、主に造血系の細胞に発現している Hck に関する近年の研究は、好中球やマクロファージが担っている自然免疫に関して、Hck が重要な役割を担っていることを示している[17, 18]。Hck の発現レベルは単球/マクロファージや顆粒球の分化の際に増加し、またマクロファージの活性化の際にも増加する[19]。Hck-/-Fgr-/- や Hck-/-Fgr-/-Lyn-/- ノックアウトマウスを用いた報告は、好中球やマクロファージが担っている自然免疫や炎症反応に Hck が重要な役割を果たしていることを示している[17, 20-22]。すなわち、これらのノックアウトマウスは *Listeria monocytogenes* の感染に感受性を増加し、Fc γ レセプター誘導性の貪食を減少し、リポポリサッカライド(LPS)によるエンドトキシンショックに抵抗性を示す。更に恒状的に活性化状態にある Hck を導入した (knock-in) マウスは Hck-/-Fgr-/- や Hck-/-Fgr-/-Lyn-/- ノックアウトマウスに比べて自然免疫反応や肺炎が増加していた[23]。また、Hck の SH3 ドメインは、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の Nef タンパク質と強く結合し、この結合が阻害されると HIV の増殖が抑えられ、AIDS の進行も抑制されることが報告されている[24-26]。従って、Hck は感染

症の予防と治療の分野で非常に興味深い Src family kinase である。

さて、化学療法剤は、ガンや感染症の治療に欠くことのできない重要な薬剤である。しかし、ウイルス感染症やガンの治療は、これらの増殖するメカニズムが生体と極めて類似しているために、化学療法剤の作用に選択性が乏しく、非常に困難であった。近年になって、これらの増殖機構が分子レベルで詳細に解明され始めると、選択性を持つ分子を標的とした分子標的薬の開発が盛んに行われ、インフルエンザウイルスに対するノイラミダーゼ阻害剤や先に述べたような上皮細胞増殖因子受容体 EGFR のリン酸化阻害剤などが実用化され始めた。本研究の目的は、Src family kinase の関与するシグナル伝達系を詳細に解明し、新しい創薬の手がかりを提供することであるが、その前に、本研究を開始するに際して、その基礎になった研究を 2 つ紹介する。一つは選択性を持つ抗ガン物質を微生物資源から探索を試みた研究[27]であり、もう一つは酵母のシステムを用いて未知の転写因子を探索した研究[28]である。

(1) 微生物資源からの選択性の高い抗ガン抗生物質の探索研究[27]

土壌から分離された放線菌の一菌株は形態的観察と生化学的性状から *Streptomyces ravidus* S50905 と同定された。この菌株は抗ガン抗生物質 ravidomycin[29]を主産物として産生したが、培養液中に anthraquinone- β -sulfonate を 0.5% 添加して培養すると、deacetylavidomycin[30]を主産物として産生した。この anthraquinone- β -sulfonate を添加した培養液を更に詳細に精査したところ、新規物質 deacetylavidomycin *N*-oxide を発見した。deacetylavidomycin *N*-oxide は、deacetylavidomycin を *m*-Chloroperbenzoic Acid で酸化しても得られたので、ravidomycin も同様に酸化して ravidomycin *N*-oxide を得た。以上のようにして 4 つの化合物を得、Fig. 3 にこれらの構造を示した。

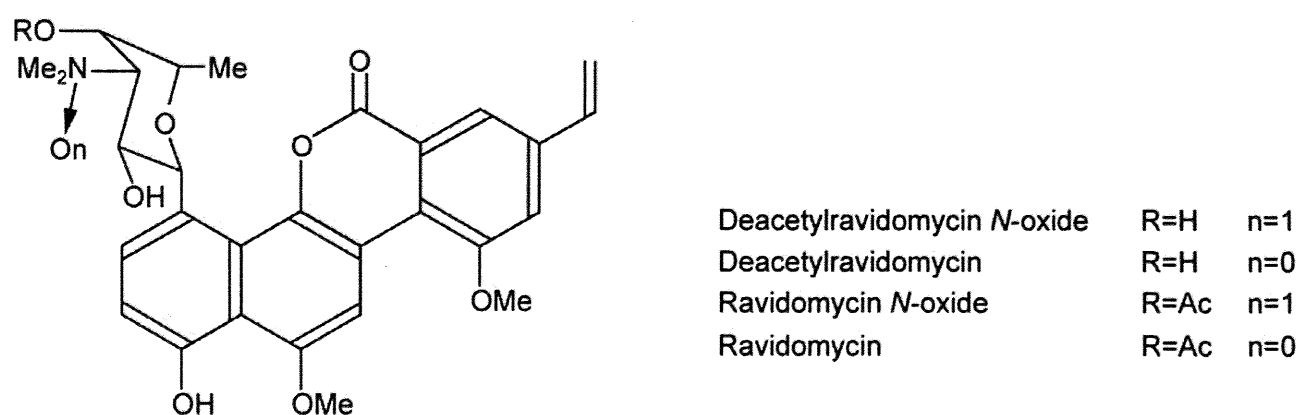


Fig. 3 Ravidomycin 群の構造

次にこれらの化合物の P388 leukemia に対する抗腫瘍活性を延命率で比較評価し、その結果を Table 1 に示した。4 つの化合物の最大延命率は類似しており、抗ガン活性の強さは同じと考えられた。しかし、deacetylavidomycin *N*-oxide は他の 3 化合物に比べて際立って広い有効投与濃度域を

示した。事実、deacetylravidomycin *N*-oxideの急性毒性は他の3化合物より極めて弱かった(LD₅₀: deacetylravidomycin *N*-oxide; >1,000 mg/kg, deacetylravidomycin; 50 mg/kg, ravidomycin *N*-oxide; 150 mg/kg, ravidomycin; 150 mg/kg)。また、Deacetylravidomycin *N*-oxideはMeth A fibrosarcomaとP815 mastcytomaにも抗腫瘍活性を示した(Table 2)。

Table 1 ravidomycin 類の P388 leukemia に対する抗腫瘍活性

Sample	Increase in lifespan (%)								
	Dose(mg/kg/day)								
	1	2	4	8	16	32	64	128	180
Deacetylravidomycin <i>N</i> -oxide									
(Test 1)		23	33	48	53	60	63		
(Test 2)								44	52
Deacetylravidomycin									
(Test 1)	27	24	0						
(Test 2)			34	58	-5	Toxic			
Ravidomycin <i>N</i> -oxide									
(Test 1)	24	27	33	58					
(Test 2)				44	45	64	Toxic		
Ravidomycin									
(Test 1)	22	24	27						
(Test 2)			34	40	50	65			
(Test 3)							5	Toxic	

Each mouse (CDF₁, male) was inoculated intraperitoneally with 1 x 10⁶ cells. The dose were administered intraperitoneally daily for 10 days from the next day after the inoculation.

Table 2 Deacetylravidomycin *N*-oxide の Meth A fibrosarcoma と P815 mastcytoma に対する抗腫瘍活性

Dose (mg/kg/day)	Meth A		P815	
	MSD	ILS(%)	MSD	ILS(%)
Control	13.1±1.5		10.6±0.5	
4	19.9±3.8	52**	11.4±0.8	8
8	18.6±1.3	42***	12.4±1.3	17
16	22.1±3.1	69***	12.7±2.4	20*
32	29.7±7.3	127 **	13.1±3.4	24
64	35.1±8.8	168 **	12.9±2.0	22*

Each mouse (CDF₁, male) was inoculated intraperitoneally with 1 x 10⁶ cells. The drag was administered intraperitoneally daily for 10 days from the next day after the inoculation.

ILS: Increase in lifespan.

MSD: Mean survival days (mean ± SD).

*, **, ***: P<0.05, 0.01, 0.001, respectively.

以上のように、放線菌の培養方法を工夫することによって、新規抗生物質 Deacetylravidomycin *N*-oxide を発見することができた。Deacetylravidomycin *N*-oxide の抗腫瘍効果は Deacetylravidomycin と変わらず、急性毒性が著しく減弱した化合物であり、化学療法剤として有用であると考えられた。

(2) 酵母 1-ハイブリッド法を用いた FcγRIIB 遺伝子の転写因子探索研究[28]

免疫グロブリン G (IgG) が結合する Fc 受容体は、ヒトでは 3 つのサブクラスがあり、このうち FcγRII はマクロファージ、好中球、血小板、B 細胞、上皮細胞を含む多様な細胞中に発現している。FcγRII の遺伝子は A、B、C の 3 種類がクローニングされており、これらから各々選択的スプライシングによって複数の転写物が生じる。その結果、様々な種類の細胞中のこれら 3 つの FcγRII 遺伝子発現制御には異なる制御メカニズムが存在している。ここでは FcγRIIB 遺伝子に注目し、このプロモーター領域の同定と、その 2 つの異なる領域に結合する核タンパクを酵母 1-ハイブリッド法を用いてクローニングした。

ヒト THP-1 細胞中に、プライマー伸長法による解析で 2 ヶ所の転写開始部位を見出し、さらに 5' 欠失変異体による CAT アッセイによって、FcγRIIB 遺伝子のプロモーター領域は、-154~+21 ヌクレオチドの間に同定された。次に電気泳動度シフト解析 (electrophoretic mobility shift assay: EMSA) によって、プロモーター領域の 2 つの異なる領域 (F2-3 及び F4-3) の、GGGAGGAGC (-105~-97) 及び AATTTGTTTGCC (-47~-36) 配列に複数の核因子が結合していることが発見された。次に、これらの配列に結合する核因子を同定するために酵母 1-ハイブリッド法を用いた。

酵母 1-ハイブリッド法は、酵母細胞内で標的塩基配列に結合する未知のタンパク質を検出する非常に有用な方法である。その原理は、HIS3 や lacZ のレポーター遺伝子の上流に標的配列を組み込んだベクター (bait plasmid) と、GAL4 activated domain と未知のタンパク質との融合タンパク質を発現するベクター (play plasmid) を同じ酵母に導入する。未知のタンパク質が標的配列に結合するとレポーター遺伝子が発現し、ヒスチジン欠損培地で生育し、かつ X-Gal 添加によってコロニーが青く染まる。このコロニーから play plasmid を取り出し、融合タンパクの塩基配列を解析すると未知タンパク質が同定される。

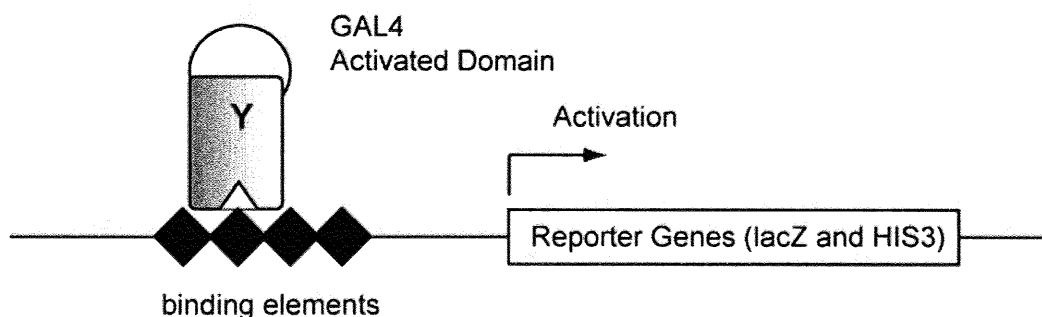


Fig. 4 酵母 1-ハイブリッド法の原理

F2-3 または F4-3 領域に結合する核タンパク質を同定するための bait plasmid 構築のために、(GGGAGGAGC) X 3、または(AATTTGTTTGCC) X 4 をそれぞれ用いた。ヒト胎盤から調製されたクローンをスクリーニングし、F2-3 結合タンパク質としてヒト Zinc-finger タンパク質 140 (ZNF140)[31]、及び F4-3 結合タンパク質としてヒト Zinc-finger タンパク質 91 (ZNF91)[32]を同定した。

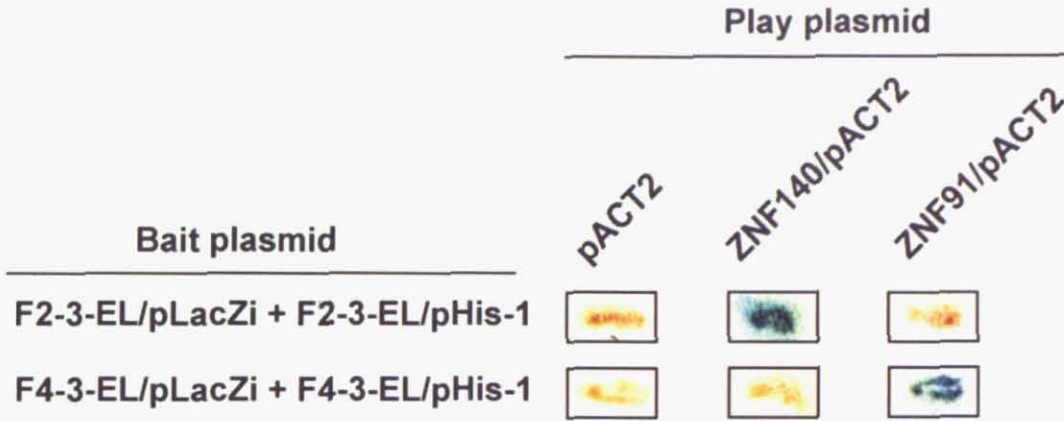


Fig. 5 酵母 1-ハイブリッド法による ZNF140 と ZNF91 の同定

Yeast strains containing F2-3-EL/placZi and F2-3-EL/pHISi-1 or F4-3-EL/ placZi and F4-3-EL/pHISi-1 were transformed with pACT2, ZNF140/pACT2 or ZNF91/pACT2. The colony was tested for β -galactosidase assay.

次にこれら 2 つの Zinc-finger タンパク質の機能について検討した。ZNF140 及び ZNF91 の発現ベクターまたはこれらのコントロールプラスミドを、Fc γ RIIB プロモーター領域をルシフェラーゼレポーター遺伝子上流に挿入したベクター(pFcR2-154/pGL3EN)と共に JEG-3 細胞中に導入した。この際にキャリブレーション用として pSV β gal を同時に導入した。48 時間後、細胞抽出液を調製し、ルシフェラーゼ及び β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。その結果、ZNF140 及び ZNF91 はルシフェラーゼ活性を抑制し、さらに 2 つを同時に発現させた場合には相加的抑制効果を示した。この結果から、ZNF140 と ZNF91 はヒト Fc γ RIIB 転写におけるリプレッサーとして機能することが示唆された。

略号・記号

BSA: bovine serum albumin (牛血清アルブミン)
CHO: Chinese hamster ovary
CIN85: 85kDa Cbl interacting protein
CPE: cytopathic effect
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium
EGF: epidermal growth factor
ERK: extracellular signal-regulated kinase
FADD: Fas-associated death domain protein
FBS: fetal bovine serum (牛胎児血清)
FISH: fluorescence in situ hybridization (蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション)
GST: glutathione S-transferase (グルタチオン S-トランスフェラーゼ)
HAM: F-12 nutrient mixture medium
Hck: Hematopoietic cell kinase
HRP: horseradish peroxidase
HSV: herpes simplex virus (単純ヘルペスウイルス)
HVEM: herpes virus entry mediator A
IAP: inhibitor of apoptosis protein
IKK: I κ B kinase
JNK: Jun N-terminal kinase
LDH: lactate dehydrogenase
MAPK: mitogen-activated protein kinase
MEM: Eagle's MEM medium
MOI: multiplicity of infection
NF- κ B: nuclear factor kappa B
PFU: plaque-formation units
PI: post infection
PI3-K: phosphatidylinositol 3-kinase
PP1: 4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo[3,4-d] pyrimidine
PRR: proline rich region
RIP: receptor interacting protein
RTK: receptor tyrosine kinase (受容体型チロシンキナーゼ)
SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
(変性(SDS)ポリアクリルアミドゲル電気泳動)
SH2: Src homology 2
SH3: Src homology 3
SH3KBP1: SH3-domain, Kinase Binding Protein 1
TCID₅₀: 50% tissue culture infectious dose (50%組織培養感染量)
TNF- α : tumor necrosis factor- α (腫瘍壊死因子 α)
TNFR: TNF- α レセプター
TRADD: TNFR-associated death domain protein
TRAF: TNFR-associated factor
TRANCE: tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine

第 1 部 新規遺伝子 SH3KBP1 の同定とその産物(CIN85)の性質

要旨

Src family kinase は非レセプター型のチロシンキナーゼで、種々のレセプターからのシグナル伝達下流で重要な役割を担っているが、そのシグナル伝達経路の解明は未だ不十分である。本セッションでは Src family kinase から下流のシグナル伝達経路を解明することを目的として、Src family kinase に結合する新規タンパク質分子の探索を行った。Src family kinase の一つ、Hck の SH2 及び SH3 ドメインをベイトにした酵母 2-ハイブリッド法によって SH3 ドメインに結合する新規タンパク質の遺伝子 SH3KBP1 を同定した。SH3KBP1 は X 染色体の p22.1→p21.3 領域に存在し、CIN85 とそのスプライシングバリエントの CIN85-dSH3AB をコードしていた。両者はマルチアダプタータンパク質で、CIN85 は 665 アミノ酸残基からなり、その N 末に 3 つの SH3 ドメインを持ち、中央に PRR、C 末に coiled-coil ドメインを持つ。CIN85-dSH3AB は 404 アミノ酸残基からなり、CIN85 の N 末に存在する 2 つの SH3 ドメインを欠く。これらの mRNA は広く各種組織に発現していた。CIN85 と CIN85-dSH3AB は 293T 細胞内で Hck 及び Src と結合した。また CIN85 の各種欠失体と Src-SH3 ドメインとの *in vitro* の結合試験の結果、CIN85 の PRR が Src-SH3 ドメインの結合ユニットであった。その PRR は Src family kinase の SH3 ドメイン以外にも多くのタンパク質の SH3 ドメインと結合することができ、細胞内の多様なシグナル伝達に関与している可能性が示唆された。

第1節 緒言

先に述べたように、Src family kinase は種々のレセプターから細胞内に伝えられるシグナル伝達に関して、その下流で重要な役割を果たしている。Src family kinase はシグナル伝達に重要なタンパク質-タンパク質間の相互作用を担っている2つの機能性ドメイン、SH2ドメインとSH3ドメインを持っている。従って、Src family kinase のSH2ドメインとSH3ドメインに結合するタンパク質を同定することは、細胞内の Src family kinase が関与する種々のシグナル伝達の制御機構を解明し、ひいてはシグナル伝達制御機構の機能の異常に基ずくと考えられる疾患の病因解明のための新しい切り口を提供する上で非常に興味深い。

タンパク質間相互作用を検出する方法には、免疫沈降法や GST-pull down 法が知られているが、これらの方法は特異性に問題を有してすることが多く、未知のタンパク質を探索する場合には非常な労力を要するといった欠点があった。一方、今から15年程前に Fields ら[33]によって開発された酵母 2-ハイブリッド法は、細胞内でのタンパク質-タンパク質間の相互作用を検出するために非常に有用な方法である。酵母 2-ハイブリッド法の原理はタンパク質のドメイン構造を利用した系である。GAL4をはじめとする転写因子は、プロモーター上の特異配列を認識する DNA 結合ドメインと、基本転写因子群と相互作用し実際に転写を活性化させる活性化ドメインから構成されている。この2つのドメイン間の距離は活性発現に比較的フレキシブルであるので、相互作用を調べたい2種類のタンパク質をそれぞれ結合ドメインと活性化ドメインとの融合タンパク質として発現させる。すると、2種類のタンパク質が相互作用する場合にはその複合体が転写因子として機能し、酵母に組み込まれているレポーター遺伝子を活性化する。酵母には通常2つのレポーター遺伝子、例えば HIS3、lacZ などが組み込まれていて、ヒスチジン欠損培地で生育可能であるか、または X-Gal 添加によってコロニーが青く染まるかによって相互作用を検出する。目的のタンパク質と相互作用する未知のタンパク質をスクリーニングする場合は、まず目的のタンパク質をコードする cDNA を GAL4 の DNA 結合ドメインと融合した形で酵母に導入し発現させる。その後、GAL4 の活性化ドメインと融合する形で構築した cDNA ライブラリーを酵母に導入し、ヒスチジン欠損培地で生育し、かつ X-Gal 添加によって青く染まるコロニーを単離して、このコロニーから目的のタンパク質と相互作用する cDNA を単離する。現在、簡便な kit も発売され、非常に多くのタンパク質-タンパク質間相互作用が酵母 2-ハイブリッド法で検出され、その成果が報告されている。

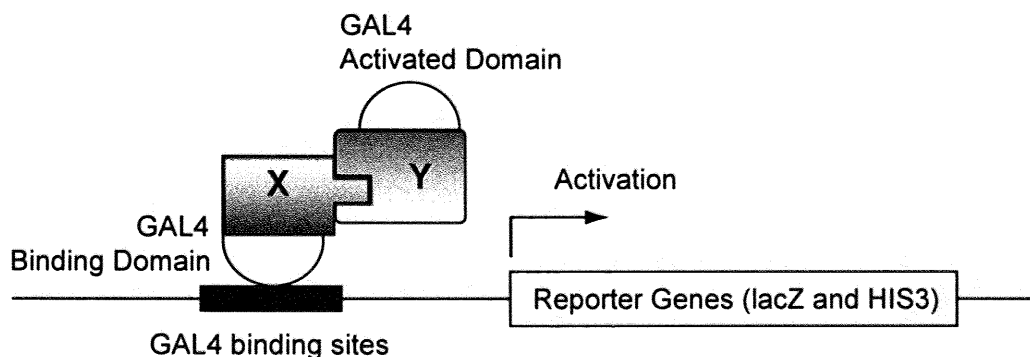


Fig.1-1 酵母 2-ハイブリッド法の原理

本セクションでは、Src family kinase の構成員の一つ、Hck の SH3ドメインに結合するタンパク質を酵母 2-ハイブリッド法によって探索した結果を示す。またその探索の結果、得られた新規遺伝子 SH3KBP1 とそれがコードするタンパク質(CIN85) の解析、Src family kinase との相互作用の解析結果、及び SH3KBP1 の染色体マッピングの解析結果について報告する。

第2節 材料と方法

1-2-1 材料

免疫沈降に用いたポリクローナル抗 Hck 抗体及び抗 Src 抗体は Santa Cruz Biotechnology から、抗 FLAG 抗体は Sigma 購入した。ウェスタンブロットでは horseradish peroxidase (HRP)-標識 抗-V5 抗体 (Invitrogen)、HRP-標識 抗-Myc 抗体 (Roche)、及び HRP-標識 抗-FLAG 抗体 (Sigma)を用いた。293T 細胞培養用培地として、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma)及び牛胎児血清(FBS; Gibco BRL)を用いた。

1-2-2 酵母 2-ハイブリッド法

酵母 2-ハイブリッド法は MATCHMAKER Two-Hybrid System kit (Clontech)を用い、キット添付のプロトコールに従って実施した。ヒト Hck の SH2 ドメインと SH3 ドメイン(ヒトHckのアミノ酸配列の第62~217番目)を発現するベイトプラスミドを以下のように作製した。ヒト Hck の SH2 ドメインと SH3 ドメインをコードする cDNA を、ヒト Hck cDNA (Dr. N. Quintrell から贈与された)[5] を鋳型にして PCR (センスプライマー; AAGAATTCGTGGTTGCCCTGTATGATTACGAG、アンチセンスプライマー; AAGTCGACCGACAGTTTCTGGCAGAGCCCGTC) で調製した。次に PCR 産物を TA Cloning Kits (Invitrogen)を用いてプラスミド pCR2.1 にサブクローニングし、これを *EcoRI* 及び *SaI* で切断し、得られたフラグメントを pAS-2 ベクターの *EcoRI/SaI* サイトに結合した(このベクターを pAS-2/Hck(SH2+SH3)と呼ぶ)。ベイトプラスミド pAS-2/Hck(SH2+SH3)を酢酸リチウム法によって酵母 Y190 株に導入し形質転換した。形質転換体をトリプシン(-)の培地で選別した。さらにGAL4転写活性化ドメインとの融合タンパク質として発現が可能なヒト胎盤由来cDNAライブラリー (Clontech)で形質転換した。形質転換体からの陽性クローンは、トリプトファン(-)、ロイシン(-)、ヒスチジン(-)及び 3-アミノトリアゾール (25 mM) 添加の培地で増殖したクローンを、更に β -ガラクトシダーゼ活性により選抜した。陽性クローンをシクロヘキシミド (1 μ g/ml) 添加培地で培養し、増殖してきたクローンからからプラスミドを精製し、次に大腸菌へ形質転換し、これよりプラスミドを精製した。得られたプラスミドの cDNA ライブラリー部分の塩基配列をダイターミネーター法により決定した。得られた塩基配列を GENETYX のデータベースを利用してホモロジー検索を行った。

1-2-3 プラークハイブリダイゼーション法

酵母 2-ハイブリッド法で得られた新規配列を持つクローンのcDNAを鋳型にして、ランダムプライマー法により³²P-CTPで標識された放射性標識プローブを作製した。ヒト胎盤由来 λ gt11 cDNAライブラリー (Clontech)を大腸菌 (Y1090r⁻)とともにLB寒天培地上にまき、プラークを作らせ、これをニトロセルロースメンブランに転写し、UV-クロスリンク後、前述の放射性標識プローブを用いてオートラジオグラフィを行った。次いで、陽性を示したプラークをかきとり、希釈して同様なスクリーニングを繰り返し、陽性を示すクローンを多数得た。得られた λ gt11 ファージから、cDNAライブラリーインサートをPCR (センスプライマー; GACACCAGACCAACTGGTAATGGTAGCGAC、アンチセンスプライマー; GAAGGCACATGGCTGAATATCGACGGTTTC) によって増幅し、インサート部分の塩基配列をダイターミネーター法によって解析し、CIN85-dSH3ABの全長の塩基配列を決定した。

1-2-4 CIN85 cDNA のクローニング

CIN85-dSH3AB の N 末に存在する制限酵素 *SspI* サイトを利用して CIN85 の N 末をクローニングした。ヒト白血球由来 cDNA ライブラリーをテンプレートにして、PCR (センスプライマー; AGGATCCACAATGGTGGAGGCCATAGTGGAGTTTGAC、アンチセンスプライマー; AAATATTACTTTGCAGTAATCCTTGCTCTTTG) で CIN85 の N 末 cDNA を得た。これを *BamHI* 及び *SspI* で切り出し、更に CIN85-dSH3AB の cDNA から *SspI* 及び *EcoRI* で切り出したフラグメントと共に、pEF1/V5-His C (Invitrogen) の *BamHI/EcoRI* サイトに挿入した (pEF1/V5-CIN85)。

1-2-5 ノーザンプロット法

Human 12-Lane MTN™ blots 及び human cancer cell line MTN™ blots (Clontech) を用い、添付のプロトコールに従って実施した。CIN85 の cDNA フラグメント (アミノ酸残基 331-665) を基にランダムプライマー法により ³²P-CTP で標識された放射性標識プローブを作製し、プロットした。X線フィルムに記録後、CIN85 プローブをストリッピングし、同様な方法で ³²P-CTP によって標識された β-アクチン放射性標識プローブとハイブリダイズさせた。

1-2-6 発現ベクターの作製

以下、PCR で調製された cDNA は全てシーケンサーで塩基配列を確認した。V5 タグを持つ CIN85 (V5-CIN85; アミノ酸残基 1~665) の発現ベクターは前項 (1-2-4) で報告した。また、CIN85 の各種欠失体 (Fig. 1-2) の発現ベクターを以下のように作製した。CIN85-dSH3AB (V5-CIN85-dSH3AB; アミノ酸残基 262~665) の発現ベクターは、N 末に *BamHI* サイト、C 末に *EcoRI* サイトを持つように PCR (センスプライマー; AAGGATCCACAGAAATGGACAGCAGGACAAAGAGC、アンチセンスプライマー; AAGAATTCCTTTTGATTGTAGAGCTTTCTTTATGTCGTT) で CIN85-dSH3AB の cDNA を作製し、pEF1/V5-His C の *BamHI/EcoRI* サイトに挿入した (pEF1/V5-CIN85-dSH3AB)。V5-CIN85-SH3ABC (アミノ酸残基 1~330) の発現ベクターは、V5-CIN85 の cDNA を鋳型にして、PCR (センスプライマー; AGGATCCACAATGGTGGAGGCCATAGTGGAGTTTGAC、アンチセンスプライマー; AAGAATTCCAAAGTCCGGTGAAGTAACTTCACGAA) で cDNA を調製し、pEF1/V5-His C の *BamHI/EcoRI* サイトに挿入した (pEF1/V5-CIN85-SH3ABC)。V5-CIN85-dSH3ABC 及び V5-CIN85-dSH3dPRR の発現ベクターは、それぞれ CIN85-dSH3AB の cDNA を鋳型にして PCR (CIN85-dSH3ABC、センスプライマー; AAGGATCCACAGAAATGGACAGCAGGACAAAGGAAAAGGAAGGGAATAGACCCAAGAAGCCA、アンチセンスプライマー; AAGAATTCCTTTTGATTGTAGAGCTTTCTTTATGTCGTT; CIN85-dSH3dPRR、センスプライマー; AAGGATCCACAGAAATGGACAGCAGGACAAAGGCCGGCAGTTCGCTATCTGGCATCCTGGA、アンチセンスプライマー; CIN85-dSH3ABC と同じ) で調製し、pEF1/V5-His C の *BamHI/EcoRI* サイトに挿入した (pEF1/V5-CIN85-dSH3ABC 及び pEF1/V5-CIN85-dSH3dPRR)。Myc タグを持つマウス Src (Myc-Src) の発現ベクターは以下のように作製した。マウス Src の cDNA を Upstate Biotechnology から購入し、*NheI* 及び *AflIII* で切り出

された 1152bp のフラグメントと、*Afl*III 及び *Sma*I で切り出された 493bp のフラグメントを分取した。これらのフラグメントを、*Bam*HI サイトを *Nhe*I サイトに改変した pcDNA/*myc*-His B (Invitrogen) の *Nhe*I/*Sma*I サイトに挿入した。*Myc* タグを持つヒト Hck (*Myc*-Hck) は PCR (センスプライマー; GAATTCATGGGGTGCATGAAGTCCAAGTTCCTC、アンチセンスプライマー; CTCGAGTGGCTGCTGTTGGTACTGGCTCTCTGT) で調製した Hck cDNA を pcDNA/*myc*-His A (Invitrogen) の *Eco*RI /*Xho*I サイトに挿入した。グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) とマウス Src の SH3 ドメインとの融合タンパク質の発現ベクター (GST-pull-down アッセイ用) は、マウス Src の SH3 ドメイン (アミノ酸残基 88 ~ 147) の cDNA を PCR (センスプライマー; AAGAATTCTTTGTGGCCCTCTATGACTATGAG、アンチセンスプライマー; AAGTCGACAGCCTGGATGGAGTCGGAGGGCGC) で調製し、pGEX-6P-1 (Amersham Biosciences) に挿入した。FLAG タグを持つ PRR (アミノ酸残基 331-451) の発現ベクター (pFLAG/CIN85-PRR) 及び 3 つの SH3 ドメイン (アミノ酸残基 1-330) の発現ベクター (pFLAG/CIN85-SH3ABC) は、CIN85 cDNA を鋳型にして PCR (FLAG-CIN85-PRR、センスプライマー; AAGAATTCCGAAAAGGAAGGGAATAGACCCAAGAAGCCA、アンチセンスプライマー; AAGGATCCTCAGTCCAGGATGCCAGATAGCGAACTGCCGGC: FLAG-CIN85-SH3ABC、センスプライマー; AAGAATTCCGTGGAGGCCATAGTGG AGTTTGACTAC、アンチセンスプライマー; AAGGATCCTCAAAAGTCCGGTGGGA AGTAACTTCACGAAG) で PRR 及び SH3ABC の cDNA フラグメントを調製し、pFLAG-CMV-4 (Sigma) の *Eco*RI/*Bam*HI サイトに挿入した。

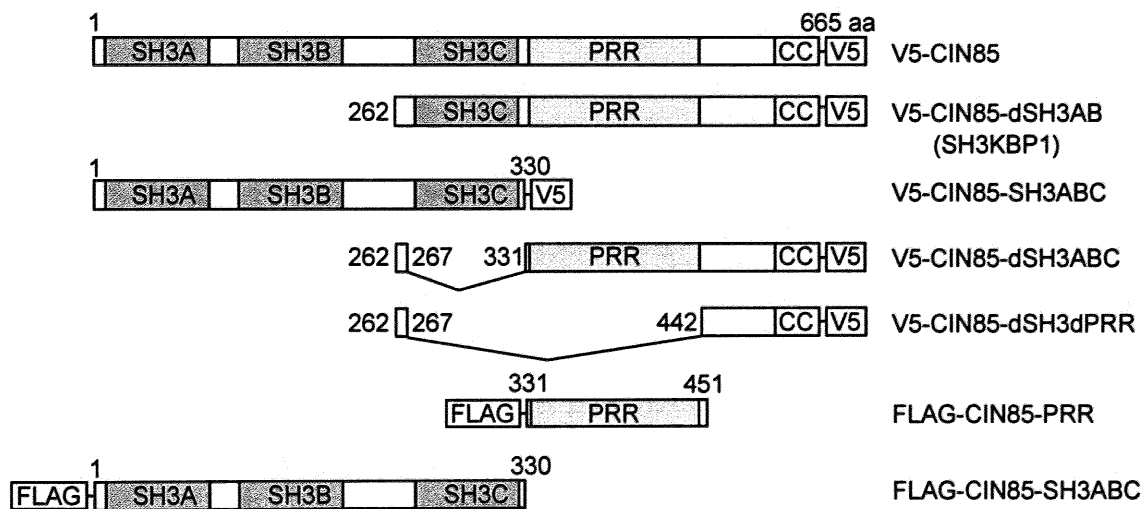


Fig. 1-2 CIN85 及びその欠失体の模式図

1-2-7 293T 細胞の一過性形質転換 (Transient transfection)

ヒト 293T細胞は、simian virus 40 のlarge T抗原を胎児腎臓上皮細胞(embryonic kidney epithelial cells)に導入発現させたセルラインで、10% FBS含有DMEM培地で継代・培養した。直径 10 cmのシャーレに 2×10^6 個の 293T細胞を撒き、一晚培養後、リン酸カルシウム法で形質転換した。リン酸カルシウム法はClontech社のキットを使用し、そのプロトコールに従って実施した。形質転換には2種類の発現ベクター(それぞれ $10 \mu\text{g}$ づつ使用した)を用い、対照には空ベクターを用いて発現ベクターの全量を $20 \mu\text{g}$ に保った。形質転換から48時間後に細胞を回収し、プロテアーゼ阻害剤(protease inhibitors cocktail, Roche)含有M-PER (PIERCE) 0.5 mlを加え、細胞を溶解した後、遠心分離して細胞抽出液を調製した。

1-2-8 免疫沈降法

細胞抽出液(0.3~0.5 ml)に $100 \mu\text{l}$ の 50%Protein G (または Protein A)-Sepharose (Amersham Biosciences)を加え、 4°C で1時間緩やかに攪拌した。遠心分離で Sepharose ビーズを取り除き、これに免疫沈降用の抗体を加え、 4°C で一晩緩やかに攪拌した。その後、 $100 \mu\text{l}$ の 50% Protein G (または Protein A)-Sepharose を加え、 4°C で4時間緩やかに攪拌して免疫複合体を回収した。遠心分離で Sepharose ビーズを得、low-salt wash buffer (150 mM NaCl, 2% Nonidet P-40, 2 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.5)、次いで high-salt wash buffer (0.5 M NaCl, 2% Nonidet P-40, 2 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.5) で洗浄し、最後にもう一度 low-salt wash buffer で洗浄した。

1-2-9 GST-pull-down アッセイ

293T 細胞 に V5-CIN85 、 V5-CIN85-dSH3AB 、 V5-CIN85-SH3ABC 、 V5-CIN85-dSH3ABCまたはV5-CIN85-dSH3dPRRを一過性に過剰発現させた細胞抽出液を調製した。Src SH3 ドメインと GST の融合タンパク質は発現ベクター(pGEX-6P-1/Src-SH3)を大腸菌 BL21 codom plus に導入し、IPTG で発現誘導して発現させ、プロテアーゼ阻害剤 (protease inhibitors cocktail, Roche) 含有 B-PER (PIERCE)で菌体を溶解し、遠心分離で抽出液を得、Glutathione-Sepharose beads (Amersham Biosciences)で精製した。 $45 \mu\text{g}$ の Src-SH3ドメインと GST の融合タンパク質を Glutathione-Sepharose beads に固定し、これにそれぞれ V5-CIN85 及び各種欠失体を一過性に過剰発現させた 293T 細胞抽出液を加え、 4°C で4時間緩やかに攪拌した。対照に $45 \mu\text{g}$ の GSTを固定した Glutathione-Sepharose beadsを用いた。遠心分離でビーズを回収し、low-salt wash buffer、次いで high-salt wash buffer、最後に low-salt wash buffer で洗浄した後、ウェスタンブロットで解析した。

1-2-10 ウェスタンブロット

得られた細胞抽出液、または免疫複合体を還元条件下に変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で分離した後、PVDF 膜(Millipore)にトランスファーして、牛血清アルブミン(BSA)またはブロックエース(大日本製薬)でブロッキングした。その後、HRP 標識抗体と反応させた後、化学発光法で検出し、X線フィルムに記録した。

1-2-11 SH3 ドメイン アレイ

TranSignal SH3 domain array (Panomics Inc.)を用いて、添付のプロトコールに従って実施した。SH3ドメインのリガンドとしてCIN85のPRR(V5タグを持つ、以下V5-PRRと称す)を以下のように調製した。CIN85のcDNAを鋳型にしてPCR(センスプライマー; AAGGATCCACCATGGAAAAGGAAGGGAATAGACCCAAGAAGCCA、アンチセンスプライマー; AAGAATTCCGTCCAGGATGCCAGATAGCGAACTGCCGGC)でPRR(アミノ酸残基331-451)のcDNAを調製し、これを*Bam*HI及び*Eco*RIで切り出してpEF1/V5-His Cの*Bam*HI/*Eco*RIサイトに挿入し、さらにこれを*Bam*HI及び*Age*Iで切断してV5-PRRのcDNAを得た。このcDNAをpEXPの*Bam*HI/*Age*Iサイトに挿入してV5-PRRの発現ベクターを構築し、これを大腸菌(Top10)に導入して形質転換した。この大腸菌を培養し、IPTGで発現誘導して細胞抽出液を調製し、リガンド溶液とした。SH3 domain arrayとリガンド溶液を反応させ、HRP標識抗V5抗体をプロットしてSH3ドメインとV5-PRRの反応を検出した。Arrayの奇数行にはSH3タンパク質が原液でスポットされ、偶数行にはその1/5に希釈されたSH3タンパク質がスポットされている。Arrayにスポットされている各SH3タンパク質の名称をTable 1-1に示した。

1-2-12 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション(FISH)

ヒト末梢血から分離されたリンパ球を、phytohemagglutinin 存在下 10%FBS 添加 α minimal essential medium (α -MEM)で 68-72 時間培養後、プロモデオキシウリジン (0.18 mg/ml, Sigma)で処理してS期に増殖を同調させた。生育が同調した細胞は血清無添加 α -MEMで3回洗浄後、thymidine (2.5 μ g/ml) 添加 α -MEMで6時間培養してM期の細胞を得た。その後、細胞を回収し、低張処理を行い、細胞を固定し、染色体標本作製した。DNAプローブには、 λ gt11 ファージ cDNAライブラリーから得られたCIN85-dSH3ABの全長cDNA (2.0 kb)をビオチン標識して用いた。ビオチン標識プローブを50%ホルムアミド、10%硫酸デキストランを含むハイブリダイゼーション溶液中で75°C、5分間、熱変性させた。FISH検出は、Hengらの方法[34, 35]に従って実施した。すなわち、染色体標本を55°Cで1時間、オープンで加熱し、RNase処理の後、70%ホルムアミド/2xSSC (standard saline citrate solution)液中に70°C、2分間浸して熱変性させた。エタノールで脱水後、熱変性させた染色体標本に、熱変性させたビオチン標識プローブを載せ、一晚ハイブリダイズさせた。染色体標本を洗浄後、ハイブリダイズしたビオチン標識プローブをヤギ抗ビオチン抗体、FITC標識抗ヤギIgG抗体で染色及びDAPIで染色し、FISHシグナルとDAPIバンドパターンを記録した。

Table 1-1. Complete names of SH3-domain proteins

Position code	Abbreviation	Full name
A1, 2	Amphiph.	Amphiphysin
A3, 4	Dlg2	Discs large homologue 2
A5, 6	VAV	Vav 1 oncogene product
A7, 8	BLK	Beta-lymphocyte specific protein tyrosine kinase
B1, 2	CCB4	Dihydropyridine-sensitive L-type calcium channel beta-4 subunit
B3, 4	EMP55	55K erythrocyte membrane protein
B5, 6	NCK(3)	SH3 domain #3 of the melanoma cDNA encoding a cytoplasmic protein consisting of the src homology units SH2 and SH3
B7, 8	Abl(1)	Abelsen tyrosine kinase, SH3 domain #1
C1, 2	SPCN	Spectrin alpha chain (non-erythrocytic)
C3, 4	FGR	Cellular Gardner-Rasheed feline sarcoma virus protein
C5, 6	Y124	PAK-interacting exchange factor beta
C7, 8	PLCr	Phospholipase C gamma 1
D1, 2	Cortactin	Cortactin
D3, 4	SLK	Proto-oncogene tyrosine protein kinase FYN
D5, 6	PEXD	Peroxisomal membrane protein pex13
D7, 8	Riz	Retinoblastoma-associated binding protein
E1, 2	MLPK3	Mixed-lineage protein kinase 3
E3, 4	Nebulin	Nebulin
E5, 6	BTK	Bruton Tyrosine Kinase
E7, 8	ITSN(2)	Intersectin, SH3 domain #2
F1, 2	Yes 1	Yamaguchi sarcoma virus oncogene homologue 1
F3, 4	c-Src	Cellular Rous Sarcoma Virus
F5, 6	RasGAP	GTPase-activating protein
F7, 8	ITSN(1)	Intersectin, SH3 domain #1
G1, 2	Lyn	Lyn protein non-receptor kinase
G3, 4	FYB	Fyn binding protein
G5, 6	PSD95	Presynaptic density protein 95
G7, 8	TXK	TXK tyrosine kinase
H1, 2	SJHUA	Spectrin alpha chain
H3, 4	Hck	Haematopoietic cell kinase
H5, 6	Tim	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5
H7, 8	GST	Glutathione S-transferase
I1, 2	Itk	Interleukin-2-inducible T-cell kinase
I3, 4	VAV2	Vav 2 oncogene product, SH3 domain #2
I5, 6	HS1	Haematopoietic specific protein 1
J1, 2	CRK	Avian sarcoma virus CT10 oncogene homologue, SH3 domain #2
J3, 4	NOF	Neurite outgrowth factor
J5, 6	Abl(2)	Abl, SH3 domain #2

第3節 結果

1-3-1 SH3KBP1 のクローニング

ヒトHckのSH2ドメインとSH3ドメインをベイトに用いた酵母2-ハイブリッド法によって、ヒト胎盤由来 cDNAライブラリーから約 3×10^6 個のクローンをスクリーニングし、トリプトファン(-)、ロイシン(-)、ヒスチジン(-)及び3-アミノトリアゾール(25 mM)添加の培地で増殖したクローンを150個ピックアップした。続いてこれらの中から51クローンの β -ガラクトシダーゼ陽性クローンを得た。この51クローンの塩基配列を決定し、ホモロジー検索を行ったところ、p130Cas[36]、Efs[37]及びGAP[38]のような既知のタンパク質が同定された。これらの他に新規配列のクローン(clone 58)が一つ見つかった。これは2.1kbのcDNAで364アミノ酸残基をコードしていたがN末の翻訳開始部位を欠いていた。このclone 58がHckのSH2ドメインとSH3ドメインのどちらに結合するかを酵母2-ハイブリッド法で調べた。HckのそれぞれSH2ドメイン(アミノ酸残基121~217)及びSH3ドメイン(アミノ酸残基62~120)単独のベイトを作製し、clone 58と反応させたところ、SH2ドメインのベイトとは β -ガラクトシダーゼ陰性であり、SH2ドメインには結合しなかった。一方、SH3ドメイン単独をベイトにした場合はclone 58の有無に関わらず、 β -ガラクトシダーゼ陽性となって結合は判定できなかった(Fig. 1-3)。従って、clone 58はHckのSH3ドメインと結合すると考えられた。Clone 58はN末の翻訳開始部位を欠いているため、全長のcDNAを得るためにヒト胎盤由来 λ gt11ファージcDNAライブラリーを用いてプラークハイブリダイゼーション法を行った。その結果、2.0kbのcDNAを得、これは404アミノ酸残基からなる完全長と考えられるタンパク質をコードしていた。従ってこの遺伝子をSH3KBP1と命名し、GenBankに寄託した(accession number AF329267)。ここで得られたタンパク質は、後に報告された665アミノ酸残基からなるCIN85[1]のスプライシングバリエーションと判明したので、CIN85-dSH3ABと称することとした。CIN85は複数の機能性ドメインを含んだアダプタータンパク質で、N末に3つのSH3ドメイン、中央にプロリンリッチな領域(PRR)、C末にcoiled-coilドメインを持っていた。CIN85-dSH3ABはN末に存在する2つのSH3ドメインを欠いていた。Fig. 1-4にこれらの塩基配列とアミノ酸配列を示した。

1-3-2 1塩基多形(SNPs)

SH3KBP1の塩基配列を、酵母2-ハイブリッド法で得られたクローン(accession number AF329268)と、 λ gt11ファージcDNAライブラリーから得られたクローン(accession number AF329267)について詳細に比較したところ、1塩基異なっており、SNPsの可能性が示唆された。これは382番目のアミノ酸がプロリン(CCA)からロイシン(CTA)に変化していた。ヒト白血球由来cDNAライブラリーをテンプレートにしてPPR領域のPCRを行い、得られたクローンの塩基配列を調べたところ、3/4がプロリン(CCA)、1/4がロイシン(CTA)であった。

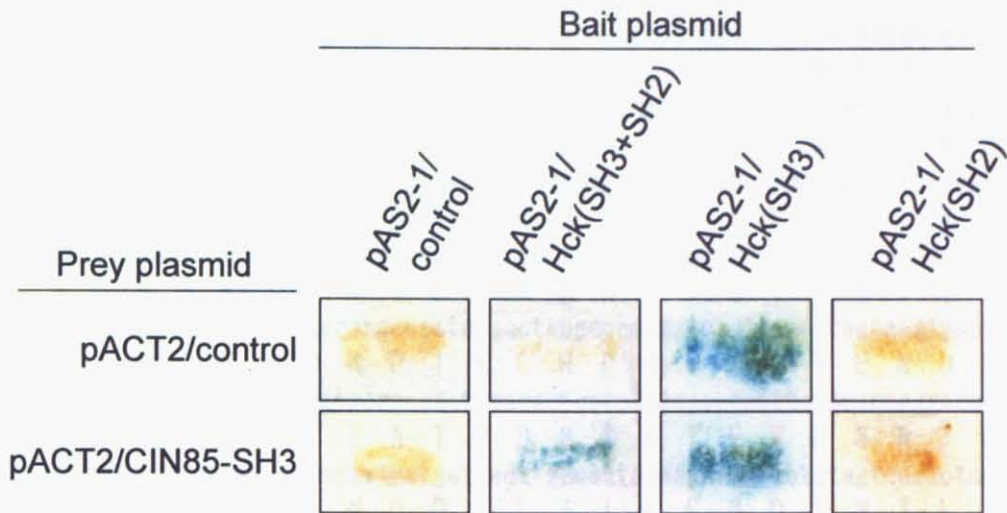


Fig. 1-3 酵母 2-ハイブリッド法による Hck SH3 ドメインとの結合

Yeast strains containing pAS2-1, pAS2-1/Hck(SH3+SH2), pAS2-1/Hck(SH3) or pAS2-1/Hck(SH2) were transformed with pACT2/control or pACT2/CIN85-dSH3AB. The colony was tested for β -galactosidase assay.

```

atggtggaggccatagtgaggtttgactaccaggcccagcacgatgatgagctgacgatcagcgtgggtgaaatcatcaccaacatcagg 90
M V E A I V E F D Y Q A Q H D D E L T I S V G E I I T N I R
aaggaggatggaggctggtgggaggagacagatcaacggcaggagaggtttgtccctgacaactttgtaagagaaataaagaaagagatg 180
K E D G G W W E G Q I N G R R G L F P D N F V R E I K K E M
aagaaagacctctcaccaacaaagctccagaaaagcccctgcacgaagtgccagtgaaactctttgctgtcttctgaaacgatttta 270
K K D P L T N K A P E K P L H E V P S G N S L L S S E T I L
agaaccaataagagaggcgagcgacggaggcgccggtgccaggtggcattcagctacctgccccagaatgacgatgaacttgagctgaaa 360
R T N K R G E R R R R R R C Q V A F S Y L P Q N D D E L E L K
Gttggcgacatcatagaggtggttaggagaggttagaggaaggatggtgggaaggtgttctcaacgggaagactggaatgttccctccaac 450
V G D I I E V V G E V E E G W W E G V L N G K T G M F P S N
ttcatcaaggagctgtcaggggagtcggatgagcttggcatttccaggatgagcagctatccaagtcaagttaagggaaccacaggc 540
F I K E L S G E S D E L G I S Q D E Q L S K S S L R E T T G
tccgagagtgtgggggtgactcaagcagcaccaagtctgaaggtgccaacgggacagtggcaactgcagcaatccagcccaagaaagt 630
S E S D G G D S S S T K S E G A N G T V A T A A I Q P K K V
aaggagtggtgctttggagacattttcaaagacaagccaatcaaactaagaccaaggtcaattgaagtagaaaatgactttctgccggtg 720
K G V G F G D I F K D K P I K L R P R S I E V E N D F L P V
gaaaagactattgggaagaagttacctgcaactacagcaactccagactcatcaaaaacagaatggacagcaggacaaagagcaaggat 810
E K T I G K K L P A T T A T P D S S K T E M D S R T K S K D
tactgcaaagtaatatattccatagtaggcacagaatgatgatgaattgacaatcaaagaaggagatagtagtactctcatcaataaggac 900
Y C K V I F P Y E A Q N D D E L T I K E G D I V T L I N K D
tgcacgacgtaggctggtgggaaggagagctgaacggcagacgaggcgtgttccccgataacttctgtaagttacttccaccggacttt 990
C I D V G W W E G E L N G R R G V F P D N F V K L L P P D F
gaaaaggaagggaatagaccaagaagccaccgctccatccgctcctgtcatcaacaaggggcaggcaccactgagagaaaacatgaa 1080
E K E G N R P K K P P P P S A P V I K Q G A G T T E R K H E
attaaagatacctcctgaaagaccagaaatgcttccaaacagaaacagaaagaaaagaccagagagagacccaaaactggattta 1170
I K K I P P E R P E M L P N R T E E K E R P E R E P K L D L
cagaagccctccgttctgcataccgcaaaaaagcctcggccacctaaagcaattctctcagcagacctggcgactgccccgaga 1260
Q K P S V P A I P P K K P R P P K T N S L S R P G A L P P R
aggccggagagaccggtgggtccgctgacacacaccaggggtgacagtccaaagattgacttggccggcagttcgctatctggcatcctg 1350
R P E R P V G P L T H T R G D S P K I D L A G S S L S G I L
gacaaagatctctcggaccgcagcaatgacattgacttagaaggttttgactccgtggtatcatctactgagaaactcagtcacccgacc 1440
D K D L S D R S N D I D L E G F D S V V S S T E K L S H P T
acaagcagacaaaagctacagggaggcggcctccgtccagtcacctcatcttcatcccttcaagccctgatattcttcgactcccca 1530
T S R P K A T G R R P P S Q S L T S S S L S S P D I F D S P
agtcccgaagaggataaggaggaacacatttcacttgcgcacagaggagtgacgcgtcaaagaaaacttccaagactgttaccatatcc 1620
S P E E D K E E H I S L A H R G V D A S K K T S K T V T I S
Caagtgtctgacaacaaagcatccctgccgccaagccggggaccatggcagcaggtggcgggtggccagcccctctgtcctcagcggcg 1710
Q V S D N K A S L P P K P G T M A A G G G G P A P L S S A A
Ccctccccctgtcatcctctttgggaacagctggacacagagccaactccccgtctctgttcggcacggaaggaaaaccaagatggag 1800
P S P L S S S L G T A G H R A N S P S L F G T E G K P K M E
Cctgcccagcagccagggcggcctggaggagctaaggacacaggtccgcgagctgaggagcatcatcgagaccatgaaggaccagcag 1890
P A A S S Q A A V E E L R T Q V R E L R S I I E T M K D Q Q
aaacgagagattaacagttattgtctgagttggatgaagagaagaaaatccggcttcggttcgagatggaagtgaacgacataaagaaa 1980
K R E I K Q L L S E L D E E K K I R L R L Q M E V N D I K K
gctctacaatcaaaatga 1998
A L Q S K *

```

Fig. 1-4 CIN85 の塩基配列とアミノ酸配列

262 番目のメチオニン(赤字)から下流が CIN85-dSH3AB の配列である。382 番目のプロリン(赤字)が 1 塩基多型 (CCA vs CTA) の位置。

1-3-3 ノーザンブロット

ノーザンブロット解析の結果を Fig. 1-5 に示した。SH3KBP1 の mRNA は広く各組織で発現しており、また各種の細胞株でも発現していた。3 ないし 4 種類の分子量の異なった転写体が観察され、3.5kb の転写体は広く各組織に分布しており、2.2kbの転写体は胎盤、脳、及び大腸で観察された。最も大きい 5kb の転写体は胎盤、脳その他に弱く観察され、最も小さく強い転写体(2kb) 発現が心臓と骨格筋に認められた。組織ごとに発現の強弱が認められ、胎盤、腎臓、末梢血球、及び心臓に強いシグナルが観察され、大腸、小腸、及び肺の組織では弱いシグナルであった。

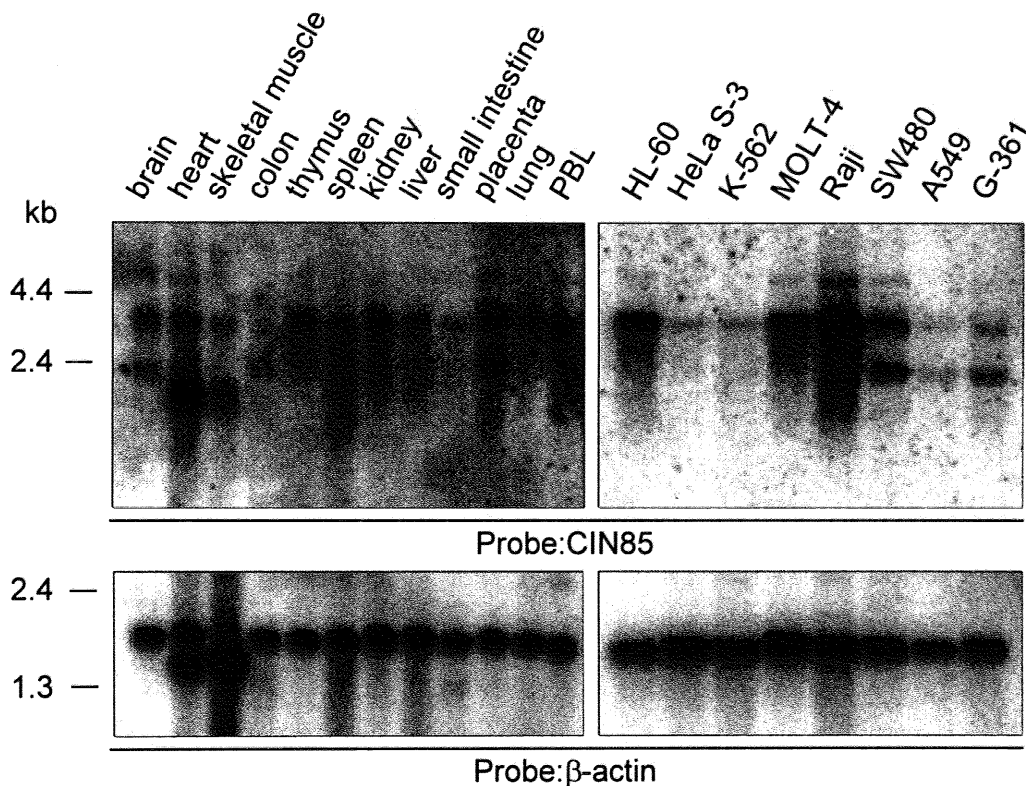


Fig. 1-5 SH3KBP1 のノーザンブロット解析

Human 12-Lane MTN™ and human cancer cell line MTN™ blots (Clontech) were hybridized with a ³²P-labeled probe corresponding to a CIN85 cDNA fragment (amino acids 331-665); after stripping, the filters were re-hybridized with ³²P-labeled human β-actin probe according to the manufacturer's instructions. Left: human 12-lane MTN blots, Right: human cancer cell line MTN blots.

1-3-4 Hck 及び Src との結合 (*in vivo*)

293T 細胞に、Myc-Hck または Myc-Src と、V5-CIN85 または V5-CIN85-dSH3AB をそれぞれ組み合わせて一過性に共発現させ、細胞抽出液を調製した。これを抗Hck抗体または抗Src抗体で免疫沈降した後、免疫複合体をウェスタンブロットで解析した。その結果、V5-CIN85 及び V5-CIN85-dSH3AB は Myc-Hck または Myc-Src と共に沈殿し、これらは 293T 細胞内で互いに結合していると考えられた (Fig. 1-6)。

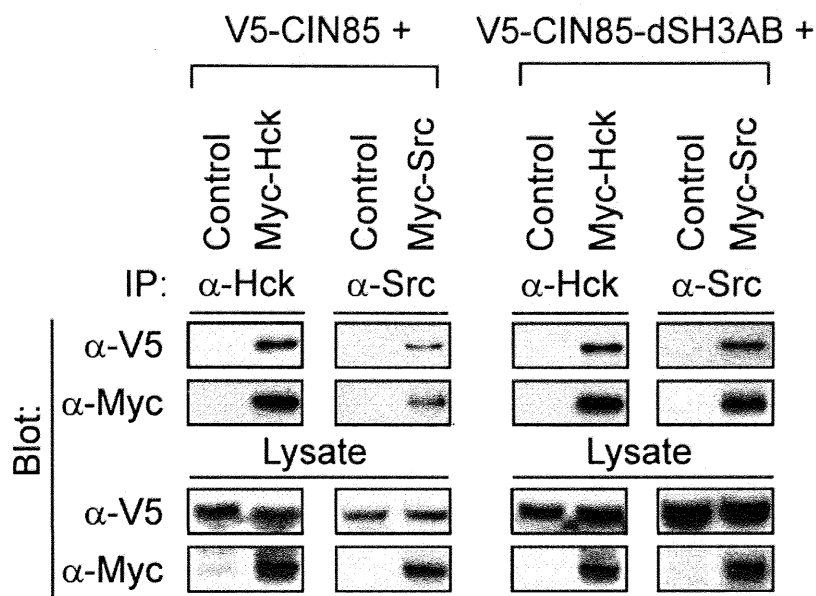


Fig. 1-6 CIN85、CIN85-dSH3AB と Hck 及び Src との結合

Human embryonic 293T cells were transfected with Myc-tagged Hck or Src expression vector in combination with V5-CIN85 or V5-CIN85-dSH3AB expression vector. Lysates were immunoprecipitated with anti-Hck or anti-Src antibody, and the blot probed with anti-V5 or anti-Myc antibody.

1-3-5 自己分子間(内)結合

CIN85はその分子内に3つのSH3ドメインとPRRを持つ。従ってこれらのSH3ドメインとPRRが互いに結合して多量体を形成し、また分子内結合をするかどうかは興味深い。既報では自己のSH3ドメインとPRRは結合するという報告[39, 40]と、結合しないという報告[41]が存在する。そこで、最初に293T細胞に、V5-CIN85-SH3ABCとFLAG-CIN85-PRRを一過性に共発現させ、得られた細胞抽出液を抗FLAG抗体で免疫沈降した後、免疫複合体をウェスタンブロットで解析した。その結果、V5-CIN85-SH3ABCはFLAG-CIN85-PRRと共沈し、自己のSH3ドメインとPRRが分子内結合をしていることが示された(Fig. 1-7A)。一方、V5-CIN85とFLAG-CIN85-SH3ABCまたはFLAG-CIN85-PRRを一過性に共発現させて抗FLAG抗体で免疫沈降した場合には、V5-CIN85は共沈しなかった。この相反する結果は、既報の異なる結果とも一致する。すなわち、結合する報告は、ドメイン(フラグメント)を用いて試験しており、結合しないという報告はCIN85分子全体を用いて試験している。これらの事実は、293T細胞内に発現したV5-CIN85は、すでにSH3ドメインとPRRが分子内結合をしており、共発現させたFLAG-CIN85-SH3ABCまたはFLAG-CIN85-PRRは結合相手を失っていた可能性を示している。

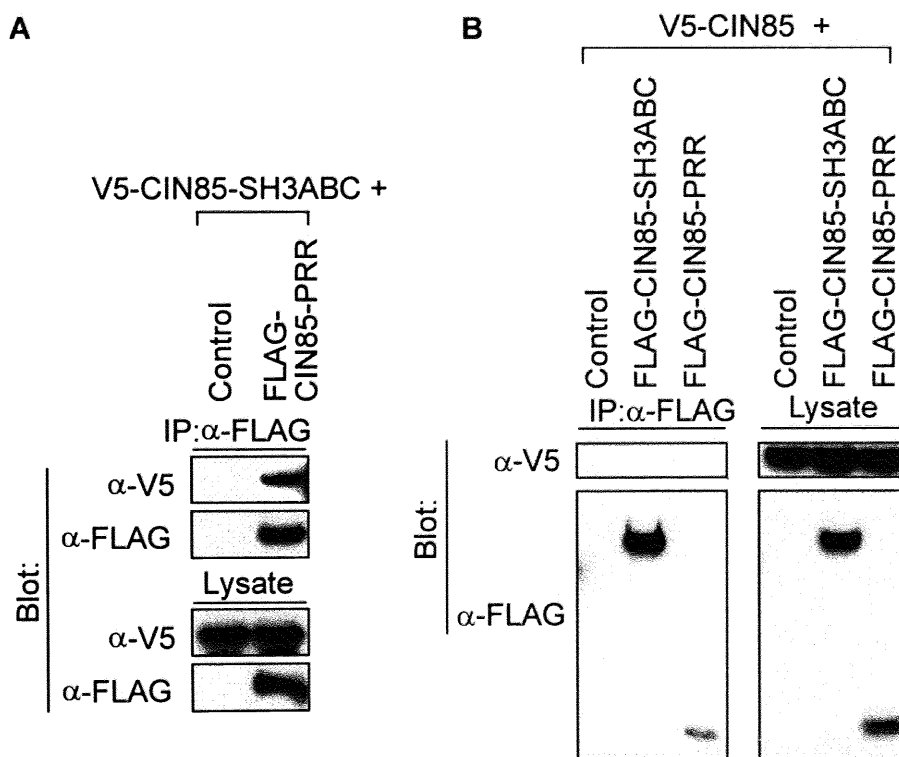


Fig. 1-7 CIN85のSH3ドメインとPRRの相互反応

(A) 293T cells were co-transfected with V5-CIN85-SH3ABC and FLAG-CIN85-PRR expression vectors (10 μ g each). Lysates were immunoprecipitated with anti-FLAG antibody and the blots probed with anti-V5 or anti-FLAG antibody. Bottom row indicates the presence of V5-CIN85-SH3ABC and FLAG-CIN85-PRR in the cell lysates. (B) 293T cells were co-transfected with V5-CIN85 and FLAG-CIN85-SH3ABC or FLAG-CIN85-PRR expression vectors. Lysates were processed as described in A.

1-3-6 GST-pull-down アッセイ

SrcのSH3ドメインとGSTの融合タンパクを結合させたビーズに、V5-CIN85及び各種欠失体を一過性に過剰発現させた293T細胞の抽出液を反応させ、SrcのSH3ドメインとの結合性を調べた。その結果、V5-CIN85、V5-CIN85-dSH3AB及びV5-CIN85-dSH3ABCはビーズに結合した。しかし、PRRを欠失したV5-CIN85-SH3ABC及びV5-CIN85-dSH3dPRRはビーズに結合しなかった。一方、対照においたGSTだけを結合させたビーズには、V5-CIN85及び各種欠失体は全く結合しなかった(Fig. 1-8)。従ってSrcのSH3ドメインにはCIN85のPRRが結合すると考えられる。

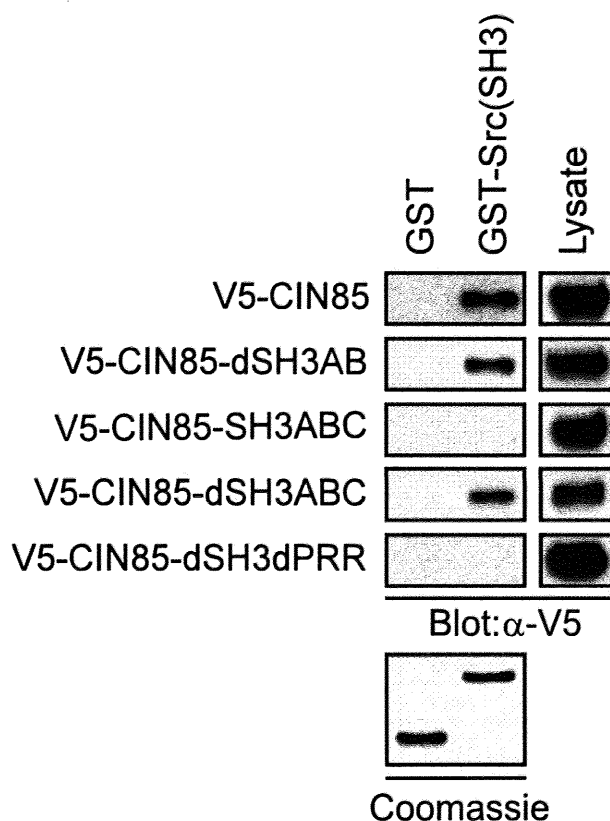
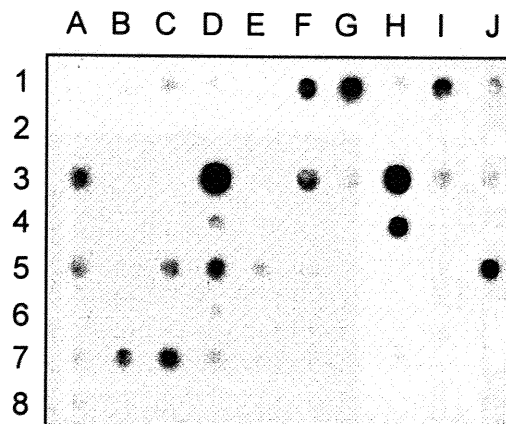


Fig. 1-8 GST-pull-down アッセイ

A pull-down assay was performed by incubating GST-Src (SH3) bound to Glutathione Sepharose beads with lysates of transfected 293T cells at 4 °C for 4 hours. After washing the beads, the bound proteins were resolved on SDS-PAGE and subjected to immunoblotting, and the blot probed with anti-V5 antibody. Lower panel is Coomassie staining.

1-3-7 SH3 ドメイン アレイ

CIN85 の PRR が Src family kinase 以外のタンパク質の SH3ドメインと結合するか否かを確認するため、SH3ドメインアッセイを行った。アレイには 37 種類の SH3ドメインタンパク質がスポットされているが、CIN85 の V5-PRR は Hck と Fyn (SLK) の SH3ドメインと最も強く結合した。次いで、Yes、Lyn、Interleukin-2-inducible T-cell kinase (Itk)、peroxisomal membrane protein pex 13 (PEXD)、Abl、そして phospholipase C γ 1 (PLC γ) に中程度の強度で結合した (Fig. 1-9)。



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Amphiph	CCB4	SPCN	Cortactin	MLPK3	Yes1	Lyn	SJHUA	Itk	CRK
2	Amphiph	CCB4	SPCN	Cortactin	MLPK3	Yes1	Lyn	SJHUA	Itk	CRK
3	Dlg2	EMP55	FGR	SLK	Nebulin	c-Src	FYB	Hck	VAV2	NOF
4	Dlg2	EMP55	FGR	SLK	Nebulin	c-Src	FYB	Hck	VAV2	NOF
5	VAV	NCK(3)	Y124	PEXD	BTK	RasGAP	PSD95	Tim	HS1	Abl(2)
6	VAV	NCK(3)	Y124	PEXD	BTK	RasGAP	PSD95	Tim	HS1	Abl(2)
7	BLK	Abl(1)	PLCr	Riz	ITSN(2)	ITSN(1)	TXK	GST		
8	BLK	Abl(1)	PLCr	Riz	ITSN(2)	ITSN(1)	TXK	GST		

Fig. 1-9 CIN85 PRR をリガンドにした SH3ドメインアレイ

A TranSignal SH3 domain array from Panomics Inc. was used according to the manufacturer's manual. The PRR of CIN85 (331-451 amino acids) with a V5 tag was used as the SH3 ligand. In the first row, proteins were spotted undiluted (odd numbers); in the second row they were diluted 1:5 (even numbers). The table on the under lists the SH3 domains on the array.

1-3-8 SH3KBP1 の染色体マッピング

FISH マッピングの結果を Fig. 1-10 に示した。FISH シグナルは X 染色体の short arm に特異的に検出された。従って SH3KBP1 遺伝子は X 染色体の p22.1→p21.6 領域にマッピングされた。

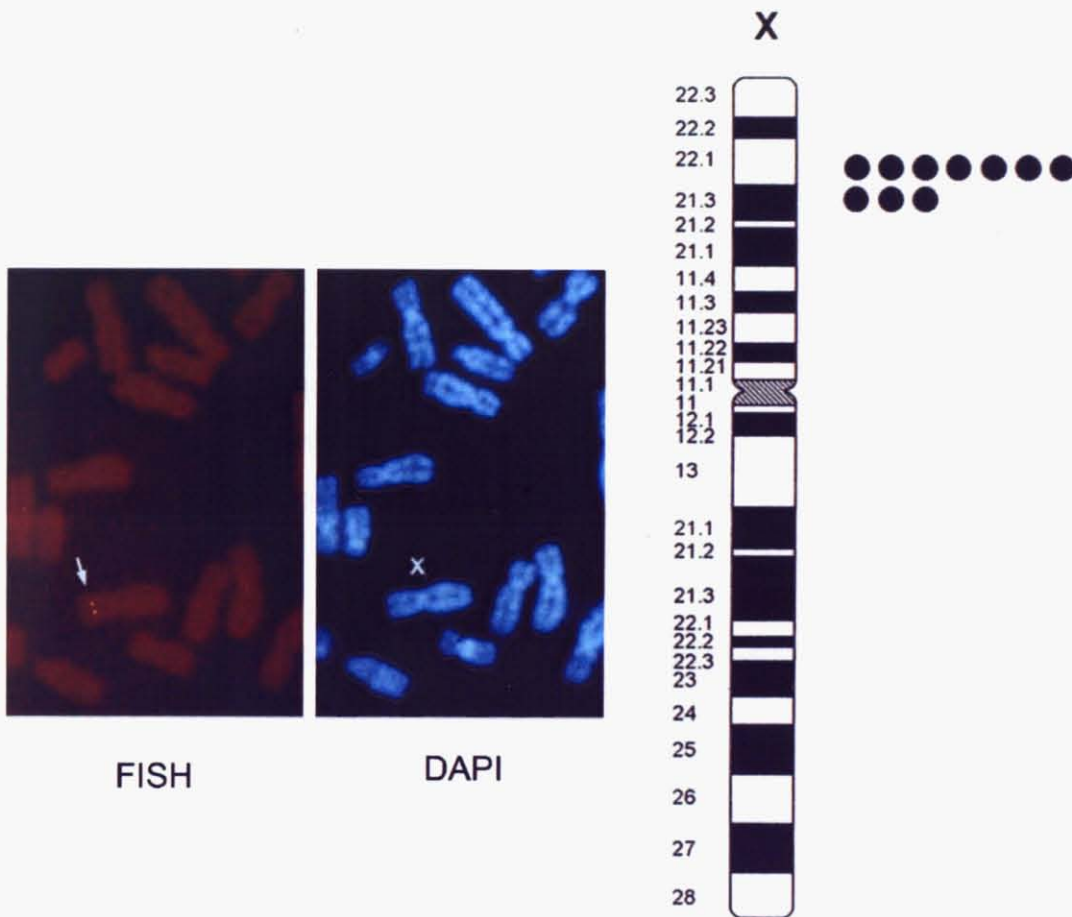


Fig. 1-10 SH3KBP1 の染色体マッピング

(A) Left panel shows the FISH signals on a human chromosome; right panel shows the same mitotic figure stained with DAPI to identify the X chromosome. Arrow indicates symmetrical double spots of SH3KBP1.
(B) Diagram of FISH mapping results. Each dot represents double FISH signals detected on the human X chromosome.

第4節 考察

酵母2-ハイブリッド法によって、Src family kinase の一員である Hck の SH3ドメインに結合する新規タンパク質の遺伝子として SH3KBP1 を見出した。我々が SH3KBP1 を見出した(特許出願 1999 年 10 月 29 日)[42]のとはほぼ同時期に、Take らのグループが Cbl に結合する新規タンパク質として CIN85 (Cbl-interacting protein of 85 kDa)を見出し、報告した(Received Dec. 29, 1999)[1]。SH3KBP1 は X 染色体の p22.1→p21.3 領域に存在し、2 つのタンパク質、CIN85 とそのスプライシングバリエーションの CIN85-dSH3AB をコードしていた。CIN85 は 665 アミノ酸残基からなり、その N 末に 3 つの SH3ドメインを持ち、中央に PRR、C 末に coiled-coilドメインを持つ[1]。CIN85-dSH3AB は 404 アミノ酸残基からなり、CIN85 の N 末に存在する 2 つの SH3ドメインを欠く。これらの mRNA は広く各種組織に発現しており、更に SH3ドメインアレイによって、CIN85 の PRR は、Src family kinase、特に Hck や Fyn の SH3ドメインに強く結合するが、その他の多くのタンパク質の SH3ドメインにも結合することが明らかになった。従って細胞内シグナル伝達において、CIN85 は、Src family kinase の関与するシグナル伝達のみならず、その他の多様なシグナル伝達に関与している可能性が示唆された。

CIN85 のラットホモログとして Ruk[43]と SETA[44]が 2000 年に相次いで報告された。また、非常に構造が類似しているヒトタンパク質として CMS[45]が報告されている(マウスホモログとして CD2AP[46]または METS-1[47]が報告されている)。これらはいずれも N 末に 3 つの SH3ドメイン、中央に PRR、C 末に coiled-coilドメインを持ち、この構造の類似性から、CIN85 と CMS は新しいアダプタータンパク質のファミリーを構成する[48]。CIN85 と CMS の相違は、CMS は CIN85 には無いアクチン結合モチーフを持つ点である。また、CMS 遺伝子は第 6 染色体(6p12)に局在している。CIN85/CMS family の相同遺伝子は系統発生的には保存されていないようで、ショウジョウバエ、線虫、酵母からは見出されていない[48]。

CIN85/CMS ファミリーのタンパク質には、SH3ドメイン及び PRR を介して多種多様なタンパク質が結合する。SH3ドメインには、Cbl[1, 49, 50]、Cbl-b[51]のユビキチンリガーゼ、B-cell linker protein BLNK[41]、CD2 receptors[44]、アポトーシスレギュレーター AIP1/Alix[52]及び SB-1[44]が結合することが報告されている。SH3ドメインには一般的に PxxP モチーフが結合し[53]、CMS の N 末の SH3ドメインは CD2 レセプターのタイプ II PxxP モチーフと結合する[46]。しかし、3 つの SH3ドメインの結合特異性は一様でない。CIN85/CMS の 3 つの SH3ドメインは、Cbl の中央付近に存在する一般的な PxxP モチーフではなく、Cbl の C 末に存在する特徴的なプロリンモチーフ、PxxxPR または Px(P/A)xxR に結合する[39, 54]。一方、CIN85/CMS の PRR には、PI3-K p85 α [43]、Grb2[43, 44]、p130Cas[41]、Src family kinase[45]、endophilins[49, 50]及び cortactin[55]が結合することが報告されている。CIN85 の PRR は多くの PxxP モチーフを持っており、よって例えば endophilin と cortactin のように CIN85 の PRR を介して複数のタンパク質と結合し得る[55]。

CIN/CMS の形成する複合体はまた、レセプターチロシンキナーゼ(RTK)のダウンレギュレーションやシグナル伝達制御、アクチン細胞骨格の制御、そして神経細胞アポトーシスの制御など多様な機能を示す[48]。最近、CIN85 は Cbl 及び endophilins と複合体(Cbl-CIN85-endophilins)を形成し、RTKs、すなわち、epidermal growth factor (EGF) や hepatocyte growth factor (HGF) 及び platelet-derived growth factor (PDGF) のレセプターのエンドサイトーシスに働いていることが明らかにされた[49, 50, 56-58]。Cbl は活性化された RTK に結合してこれをユビキチン化する一方で、

Cbl-CIN85-endophilins 複合体を形成し、endophilins が dynamin や amphiphysin と共同で RTK を細胞内のエンドソームに取り込む。また、Cbl によって CIN85 はモノユビキチン化されて、エンドソームに取り込まれた RTK を Multi vesicular body (MVB) に転換し、リソソーム分解系へと導く。このように CIN85 は RTK シグナル伝達のネガティブ制御に働いている[48, 57]。

一方、チロシンキナーゼを持たないレセプターには、Src family kinase などの膜結合型のチロシンキナーゼが結合してこのレセプターからのシグナル伝達に機能している場合が多い。本セクションで示したように、CIN85 の PRR は Hck や Fyn の SH3 ドメインと強く結合し、その他の Src family kinase とも結合する。従って CIN85 と Src family kinase 複合体は Src family kinase が担うシグナル伝達の機能制御に強く関わっていると予想されるが、この複合体の機能については不明な点が多い。次セクションでこの課題に一つの回答を示す。

第2部 TNF- α によって誘導されるアポトーシスに関する検討

- CIN85はTNFレセプター1シグナル伝達複合体のメンバー
で、TNF- α 誘導アポトーシスをレギュレートする —

要旨

腫瘍壊死因子- α レセプター1(TNFR1)は、レセプターと複合体を形成している種々のアダプタータンパク質を介して細胞内に「生」と「死」の両方向のシグナルを伝達する。そして、その生存シグナルはNF- κ BやMAPK及びAktを活性化する。SrcもまたTNF- α によって活性化され、活性化されたSrcはNF- κ BやAktを活性化する。また、v-Srcを細胞に過剰発現させるとTNF- α によって誘導される細胞死が減少する。このようにSrcはTNF- α 依存性の生存シグナルを増強し、TNF- α 誘導アポトーシスに関与しているが、その詳細なメカニズムははっきりしていない。前セクションでCIN85はSrc family kinaseと結合することを示した。本セクションでは、CIN85がSrcとともにTNFR1複合体に含まれ、TNFR1からのシグナル伝達を調節していることを報告する。

CEM細胞にCIN85を過剰発現させた細胞(CEM/V5-CIN85)はTNF- α 誘導アポトーシスに対する感受性が高まり、コントロール細胞より低濃度のTNF- α でアポトーシスが誘導されたが、CD95誘導アポトーシスに対する感受性は変化しなかった。CEM/V5-CIN85の細胞抽出液を抗TRADD抗体、抗cIAP-1抗体、抗TRAF1抗体、抗TRAF2抗体、及び抗TNFR1抗体で免疫沈降するとCIN85が共沈したが、抗FADD抗体、抗RIP抗体、抗caspase8抗体、及び抗TRAF6抗体では共沈しなかった。またCIN85はTNFR1細胞内領域に直接結合しなかったがSrc、Cbl及びphosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K)と直接結合した。TNFR1細胞内領域にSrcは直接結合したが、Cbl及びPI3-Kは結合しなかった。CIN85の各種欠失体の検討から、CIN85の3つのSH3ドメインはTNF- α 誘導アポトーシス促進効果に必須であり、またPRRも十分な促進効果を示すために必要であった。TNF- α 刺激によってSrcはリン酸化され、そしてSrcと、CIN85及びCblの結合が増加した。また、コントロール細胞ではTNF- α 刺激によってAktは活性化されるが、CEM/V5-CIN85細胞ではTNF- α 刺激によってAktの活性化が減弱した。以上の結果は、CIN85はSrcを介してTNFR1複合体に含まれ、TNFR1からのアポトーシスシグナルにSrcと共に関与していることを示している。

第1節 緒言

TNF- α の刺激によって、TNFR1は細胞をアポトーシスに至らせるデスシグナルと、NF- κ B、MAPK、及びAktを活性化してアポトーシスを抑制する生存シグナルの、2方向の異なったシグナルを細胞内に伝達する。TNFR1の細胞内ドメインにはdeath domainが存在し、TNFR-associated death domain protein (TRADD)のdeath domainと直接結合している。このTRADDを介して更にFas-associated death domain protein (FADD)、TNFR-associated factors (TRAF1 and TRAF2)、receptor interacting protein (RIP)、inhibitor of apoptosis proteins (cIAP1 and cIAP2)といったTNFR1と複合体を形成している多様なアダプタータンパク質を介して、このような両方向性のシグナルを伝達している[59, 60]。TNF- α のデスシグナルは、TRADD-FADD複合体を経由してcaspase 8に伝えられ、CD95誘導性アポトーシスの経路と同じように、caspase 8を活性化することによってアポトーシスのトリガーを引く[61]。一方、TNF- α の生存シグナルは複数の経路によって伝達される。TRAF2とTRAF1は、TNF- α の刺激によってcIAP1とcIAP2をリクルートし、caspase 8の活性化を阻害することによってアポトーシスを抑制する[62]。また、RIPはNF- κ Bの活性化に必須であり、RIPノックアウトマウスの細胞はTNF- α によりアポトーシスを起こしやすくなり、NF- κ Bの活性化が起こらない[63, 64]。更にTRAF2はc-Jun N-terminal kinase (JNK)を活性化してアポトーシスを抑制する[65]。このようにRIPとTRAF2は抗アポトーシスシグナルを伝達するが、これに加えて、いくつかの報告がTNF- α 刺激によって活性化されたSrcがI κ B α に結合する経路によってNF- κ Bを活性化することを示している。マウス骨髄性マクロファージにおいて、TNF- α 刺激はSrcの活性化とSrcとI κ B α の結合を誘導し、これがSrcによるI κ B α のリン酸化を引き起こしてNF- κ Bを活性化する。この現象はSrc-/-マウス由来マクロファージでは著明に減少していた[66]。またHuangら[67, 68]はTNF- α がPKC依存性にSrcを活性化し、活性化されたSrcはIKKと結合して、NF- κ Bを活性化することを報告した。

Src family kinaseは非レセプタータイプのチロシンキナーゼで、多様な細胞に発現し、種々のレセプターからのシグナル伝達の下流に働いている。TNF- α に於いても、Src family kinaseの活性とTNF- α によるガン細胞死が関連しており、human colorectal carcinoma細胞株ではTNF- α による増殖抑制がc-Src活性の減少によることが報告されている[69]。更にv-Srcを過剰発現させるとTNF- α による細胞死が抑制されることも報告されている[70]。TNF- α による重要な生存シグナルにはNF- κ Bの活性化の他にMAPKとAktの活性化が知られている。TNF- α はosteoclastの生存を増強するが、これはAktとERKが活性化され、アポトーシスが抑制されることによる。このAktとERKの活性化はSrc family kinase阻害剤のPP1とPI3-K阻害剤のLY294002によって抑制されることから、TNF- α のosteoclast生存増強効果はSrcがPI3-K/Aktシグナル経路とERKシグナル経路に関与していることを示している[71]。また、IL-1 β とTNF- α はBalb3T3細胞においてAktとERKを活性化するが、この活性化もPP1によって抑制される[72]。このようにSrcはTNF- α によって誘導される生存シグナルを増強することが知られているが、アポトーシスに関するシグナル経路における詳細な役割は未だ不明である。

第1部でSrc family kinaseのSH3ドメイン結合タンパク質としてCIN85及びCIN85-dSH3ABを見出したことを報告した。TNF- α は生体内で多様な応答を引き起こし、数多くの疾患に関わっている。また最近、抗TNF- α 抗体が臨床応用され、リュウマチ治療に大きな成果をあげている。先に述べたよう

に TNF- α が起こすシグナル伝達に Src family kinase は明らかに関与を示している。従って Src family kinase の TNF- α が起こすシグナル伝達調節機構を明らかにすることは TNF- α が関わる疾患の病因解明や治療薬開発の手がかりを与え得る。本セクションでは、CIN85 が Src の下流で働いていること、Src-CIN85 複合体が TNFR1 シグナリング複合体に含まれていること、そして CIN85 の過剰発現が TNF- α 誘導アポトーシスを促進するが CD95 誘導アポトーシスには影響しないことを報告する。また、このアポトーシスの促進効果には CIN85 の 3 つの SH3 ドメインが必須であり、PRR も必要であることを示す。更に、TNF- α が Src を活性化し、CIN85 と Cbl をリクルートし、結果として Akt 活性を減少させることを報告する。

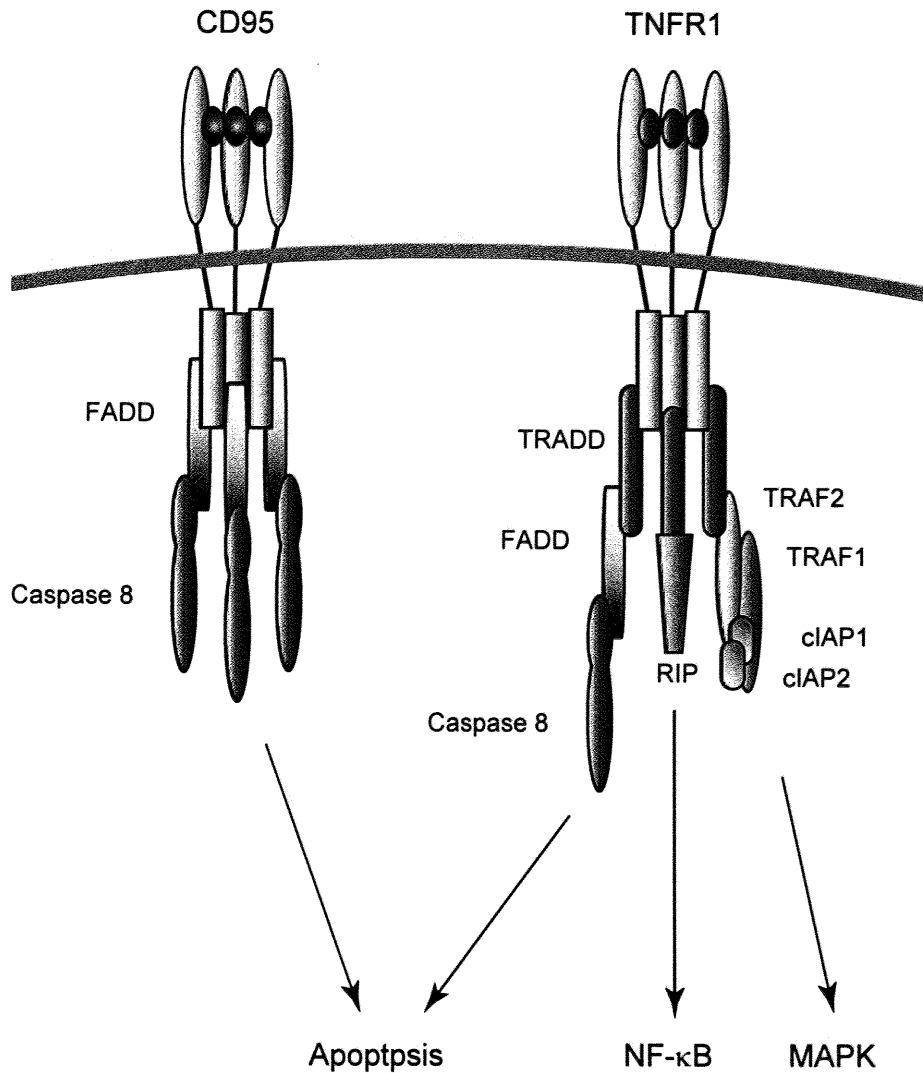


Fig. 2-1 TNFR1 及び CD95 からのシグナル伝達模式図

第2節 材料・方法

2-2-1 材料

ヒト リコンビナント TNF- α は Serotec Ltd. から、抗 CD95 抗体は(株)医学生物研究所から、PP1 は BIOMOL Research Laboratories Inc. から購入した。形質転換細胞の選択用抗生物質として、geneticin (GIBCO BRL) を用いた。免疫沈降実験に用いた各種抗体は以下のように調達した。ポリクローナル抗 Src、抗 Lck、抗 Lyn、抗 Fgr、抗 Fyn、抗 Hck、抗 TRADD、抗 FADD、抗 RIP、抗 cIAP1、抗 TRAF1 抗 TRAF2、抗 TRAF6、抗 TNFR1、抗 caspase 8、及び抗 Cbl 抗体は、Santa Cruz Biotechnology から購入した。ポリクローナル抗 PI3-K p85 α 抗体は Upstate Biotechnology から購入した。モノクローナル抗ヘマグルチニン(HA)抗体と抗 Myc 抗体は Roche から、モノクローナル抗 FLAG 抗体は Sigma から購入した。ウェスタンブロットティングに用いた各種抗体は以下のように調達した。モノクローナル抗 Src 抗体、ポリクローナル抗 Fgr、抗 cIAP1、抗 TRAF1 抗 TRAF2、抗 TRAF6、抗 TNFR1、及び抗 Cbl 抗体は、Santa Cruz Biotechnology から購入した。一方、モノクローナル抗 Fyn、抗 Hck、抗 Lck、抗 Lyn、抗 TRADD、抗 FADD、抗 RIP、抗 caspase 8、及び抗 PI3-K p85 α 抗体は Transduction Laboratories から購入した。HRP 標識抗 V5 抗体は Invitrogen から、HRP 標識抗 HA 抗体及び HRP 標識抗 Myc 抗体は Roche から、HRP 標識抗 FLAG 抗体は Sigma から購入した。HRP 標識抗 phospho-tyrosine (4G10) 抗体は Upstate Biotechnology から、抗 phospho-ERK、抗 ERK、抗 phospho-JNK、抗 JNK、抗 phospho-Akt (Ser473)、及び抗 Akt 抗体は Cell Signaling Technology から購入した。HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体及び HRP 標識抗マウス IgG 抗体は、それぞれ Cell Signaling Technology 及び Amersham Biosciences から購入して使用した。

2-2-2 ポリクローナル抗 CIN85 抗体の作製

ポリクローナル抗 CIN85 抗体は以下のように調製した。CIN85 の C 末ペプチド(645-665 アミノ酸残基: KKIRLRLQMEVNDIKKALQSK) を N 末にシステインを付加して合成し、Keyhole limpet hemocyanin (KLH) をキャリアープロテインにしてコンジュゲートし、フロイントの完全アジュバントでエマルジョンを作製してウサギ(日本白色種オス 2 羽、2.8~3.0kg) に 500 μ g/匹ずつ、背部皮下に初回免疫投与した。その後、2 週間に 1 回ずつ計 4 回追加免疫した(フロイントの不完全アジュバントでエマルジョンを作製し、500 μ g/匹ずつ背部皮下に免疫)。最終免疫から 1 週間後、全採血し、血清を得た(約 65ml x 2)。血清は抗体価を ELISA で測定後、凍結保存した。NHS-Sepharose HiTrap (Amersham Biosciences) を用いて添付のプロトコールに従い、同じ抗原ペプチドをカラムに固定してペプチドカラムを作製し、20 ml の血清から約 2.5 mg の精製抗 CIN85 抗体を得た。

2-2-3 発現ベクターの作製

V5-CIN85 、 V5-CIN85-dSH3AB 、 V5-CIN85-SH3ABC 、 V5-CIN85-dSH3ABC V5-CIN85-dSH3dPRR 及び Myc-Src の発現ベクターの作製は第 1 部(1-2-6)で報告した。FLAG タグを持つ TNFR1 細胞内領域(FLAG-TNFR1-CYT)の発現ベクターは、TNFR1 の cDNA (Dr. Niitsu から贈与された)を鋳型にして、細胞内領域の cDNA を PCR (センスプライマー; AAGAATTCCAAAAGAAGAAAGCCAAGGGGTGATGTA、アンチセンスプライマー;

AAGGATCCTCAGTGGTTTGGGCTCCTCCCCGTGAATG)で調製し、フラグメントを *EcoRI* と *SaI* で切断して pFLAG-CMV-2 (Sigma)の *EcoRI/SaI* サイトに挿入した。FLAG タグを持った TRAF1 と TRAF2 の発現ベクター(FLAG-TRAF1 及び FLAG-TRAF2)、及び HA タグを持った TRADD と cIAP1 の発現ベクター(HA-TRADD 及び HA-cIAP1)は、Dr. Choi[73]から贈与された。HA タグを持った Cbl の発現ベクター(HA-Cbl)は Dr. Langdon[74]から、HA タグを持った Akt の発現ベクター(HA-Akt)とタグを持たない PI3-K p85 α の発現ベクターは Dr. Downward[75]から贈与された。HA タグを持った PI3-K p85 α の発現ベクター(HA-PI3-K p85 α)は、Dr. Ueki と Dr. Kahn[76]から贈与された発現ベクターを pcDNA6/*myc*-His A (Invitrogen)に再構築した。

2-2-4 CEM 細胞及び U937 細胞の形質転換細胞の作製

ヒトCEM A301 T leukemia細胞は 10% FBS添加RPMI 1640 培地(Sigma)で継代・培養した。1x10⁷個のCEM細胞に 10 μ gの各発現ベクターをエレクトロポレーションで導入した。2 日間培養後、各細胞培養液に 1.2 mg/mlの geneticin を加えて各形質転換細胞を選択した(それぞれ CEM/V5-CIN85 、 CEM/V5-CIN85-dSH3AB 、 CEM/V5-CIN85-SH3ABC 、 CEM/V5-CIN85-dSH3ABC、及びCEM/V5-CIN85-dSH3dPRRと称する)。その後、各形質転換細胞における、それぞれ V5-CIN85 、 V5-CIN85-dSH3AB 、 V5-CIN85-SH3ABC 、 V5-CIN85-dSH3ABC、及びV5-CIN85-dSH3dPRRの発現をウェスタンブロットで確認した。同様な方法で空ベクターを導入してコントロール細胞とした(CEM/controlと称する)。各発現細胞は限界希釈法で 2 回クローニングを行い、細胞株を確立した。ヒトU937 monocytic細胞の形質転換細胞は、CEM 細胞の場合と同様な方法で作成したが、形質転換細胞の選択には 0.8 mg/mlの geneticin を用いた。

2-2-5 TNF- α 刺激による CEM 細胞死の測定

各種形質転換CEM細胞をRPMI 1640 培地で 1 回洗浄後、96-wellマイクロプレートの各ウェルに 2 x 10⁴ cells/0.05 ml (10% FBS添加RPMI 1640 培地)で細胞をまき込んだ。これに 10% FBS添加RPMI 1640 培地で希釈した各種濃度のTNF- α または抗CD95 抗体を添加して 37°Cで 2 日間培養後、生細胞数をWST-1 法(Roche)で測定した。

2-2-6 *in vivo* タンパク質相互作用

293T 細胞を用いた一過性の形質転換は第 1 部 1-2-7 に報告した方法で実施し、得られた細胞抽出液を、同じく 1-2-8 に報告した方法で免疫沈降した。これを 1-2-10 に報告したウェスタンブロット法で分析した。但し、検出用の抗体は HRP 標識 1 次抗体の他に、未標識の 1 次抗体、次いで HRP 標識 2 次抗体(HRP-標識抗ウサギ IgG 抗体、又は HRP-標識抗マウス IgG 抗体)を用いた。また、形質転換された CEM 細胞抽出液の免疫沈降法による細胞内タンパク質複合体の解析も 1-2-8 及び 1-2-10 に示した方法で行った。

2-2-7 フローサイトメトリー

各種CEM細胞を集め、0.5% 牛血清アルブミン(BSA)添加リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で 3 回洗浄した。2 x 10⁵ 個の細胞を氷上で冷却下、6.25 μ gのフルオレッセイン標識抗ヒトTNFR1 モノクロー

ナル抗体(R&D Systems)と 30 分間反応させた。その後、細胞を 0.5% BSA添加PBSで洗浄し、FACS Calibur (BD Biosciences)を使用して解析した。対照細胞として、フルオレッセイン標識マウス IgG1(R&D Systems)と同じように反応させた細胞を用いた。

2-2-8 TNF- α 刺激 CEM 細胞の細胞抽出液調製

10% FBS添加RPMI 1640 培地で培養した対数増殖後期のCEM/V5-CIN85 細胞及び CEM/control細胞は、それぞれ 1.5×10^7 個の細胞をRPMI 1640 培地で 1 回洗浄後、3 mlのRPMI 1640 培地に懸濁し 1mlずつ 3 等分した (5×10^6 個/tube)。これにRPMI 1640 培地で希釈したTNF- α を加え、直ちに緩やかに混合し 37°Cで 5 分間及び 10 分間反応した(各 1 tubeは無刺激対照)。反応後、直ちに細胞を集め(10,000 rpm x 1 second)、150 μ l のM-PER(50 mM NaF, 2 mM EDTA, 2 mM Na-orthovanadate, 4 mM Pefabloc, protease inhibitor cocktailを含む)を加え、攪拌後 4°Cで 20 分間置いた後に遠心分離で細胞抽出液を得た。細胞抽出液は、DC Protein Assay kit (Bio-Rad)を用い、Microplate Assay Protocolに従ってタンパク量を測定し、10 μ gの細胞抽出液をウェスタンブロット法(1-2-10)で解析した。

細胞抽出液を免疫沈降法(1-2-8)で解析する場合は、同様にそれぞれ 6×10^7 個の細胞を洗浄後、3 等分してTNF- α で刺激して 600 μ l のM-PER(同様の阻害剤添加)で抽出して細胞抽出液を得、タンパク量を測定し、300 μ gの細胞抽出液を免疫沈降して免疫複合体を回収した後、ウェスタンブロット法(1-2-10)で解析した。

第3節 結果

2-3-1 Src family kinase 阻害剤 PP1 は TNF- α 誘導アポトーシスを促進する

TNF- α 誘導アポトーシスにSrc family kinaseが関与しているか否かを確認するためにSrc family kinase阻害剤PP1を用いて、CEM細胞に対するTNF- α 誘導アポトーシスを調べた。CEM細胞はTNF- α 単独でアポトーシスが誘導され、そのIC₅₀は 1.05 \pm 0.34 ng/mlであった。同じTNF- α によるアポトーシス誘導反応をSrc family kinase選択的阻害剤PP1 存在下(10 μ M)で行うとIC₅₀は 0.35 \pm 0.12 ng/mlに低下した。一方、抗CD95 抗体もCEM細胞にアポトーシスを誘導し、そのIC₅₀は 0.057 \pm 0.018 ng/mlであった。しかし、抗CD95 抗体誘導アポトーシスはPP1の添加によって影響を受けなかった(PP1 添加時のIC₅₀は 0.063 \pm 0.007 ng/ml)(Fig. 2-2)。従って、Src family kinaseはTNF- α 誘導アポトーシスに何らかの関与をしていると示唆された。尚、TNF- α 及び抗CD95 抗体処理によって起こるCEM細胞死がアポトーシスによることは、terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling (TUNEL)アッセイで確認した(データは示さない)。

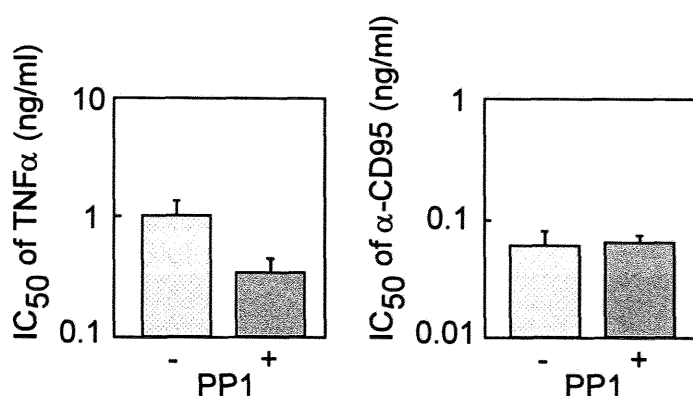


Fig. 2-2 Src family kinase 選択的阻害剤 PP1 の TNF- α 誘導アポトーシス促進効果

Human CEM cells were pretreated for 2 hours with PP1 (10 μ M) or vehicle (DMSO), and cell death in response to TNF- α or anti-CD95 antibody determined.

2-3-2 CIN85 は Src family kinase と普遍的に結合する

CIN85 は Src family kinase の Hck 及び Src に結合するアダプタータンパク質であることを第 1 部で報告した。そこで、V5-CIN85 を恒常的に過剰発現する CEM 細胞及び U937 細胞を作製し、CIN85 が形成する複合体に含まれる Src family kinase の種類を免疫沈降法で調べた。CEM/V5-CIN85 細胞の抽出液を 6 種類の抗 Src family kinase (Src、Lck、Lyn、Fgr、Fyn 及び Hck) 抗体で免疫沈降したところ、全ての抗体でそれぞれの Src family kinase と共に V5-CIN85 が共沈した。しかし、Lyn と Hck の発現量は CEM 細胞では少なかったため、CIN85 と Lyn 及び Hck との結合を更に確認するために U937/V5-CIN85 細胞の抽出液を抗 Lyn 及び抗 Hck 抗体で免疫沈降した。その結果、明確に CIN85 と Lyn 及び Hck との結合が確認された。従って CIN85 は何れかの Src family kinase に選択的に結合するのではなく、普遍的に Src family kinase に結合すると考えられた。また、共沈した V5-CIN85 のバンド強度から、CEM 細胞中では比較的 Src と複合体を多く形成していると考えられた。

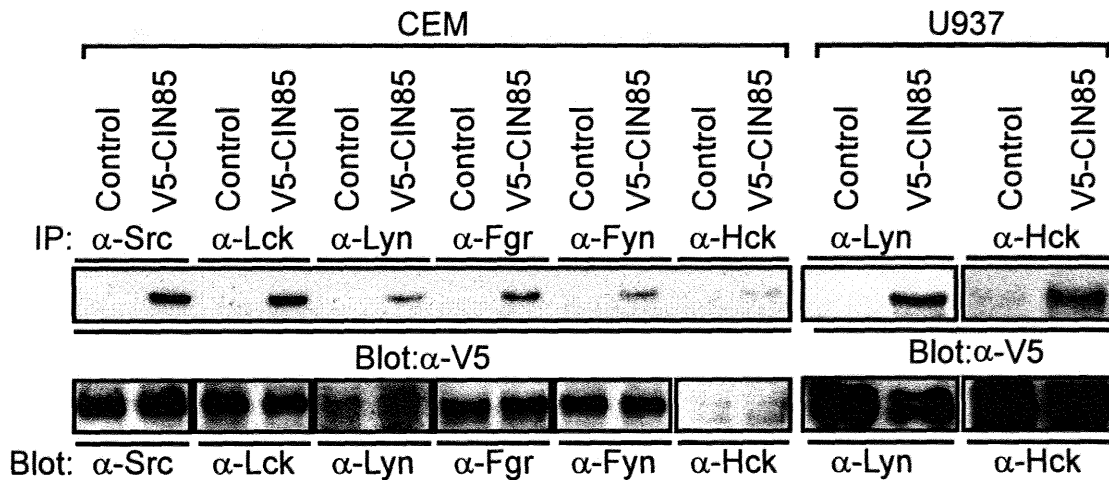


Fig. 2-3 CEM/V5-CIN85 及び U937/V5-CIN85 細胞中での Src family kinase と CIN85 の結合

6×10^7 CEM/V5-CIN85 or U937/V5-CIN85 cells were lysed and aliquots of the cleared lysates were incubated overnight at 4 °C with antibodies against Src, Lck, Lyn, Fgr, Fyn and Hck, immunoprecipiated using Protein G-Sepharose, resolved on SDS-PAGE, analysed by Western blotting and probed with anti-V5 antibody (Top), to show co-precipitation of CIN85 with various Src family kinases, or with anti-Src family kinases (Bottom), to show the presence of the Src family kinases in the immunoprecipitates.

2-3-3 CEM 細胞中での CIN85 複合体の解析

CIN85 はその SH3ドメインを介して Cbl と結合し[1]、また PRR を介して PI3-K p85 α と結合する[43]。従って、次に各種 CIN85 欠失体中での CIN85 複合体形成を解析した。各種 CIN85 欠失体を発現する CEM 細胞の抽出液を、抗 Src 抗体、抗 Cbl 抗体、及び抗 PI3-K p85 α 抗体で免疫沈降したところ、V5-CIN85 及び V5-CIN85-dSH3AB はこれら全てと共沈した。V5-CIN85-SH3ABC は Cbl と共沈したが Src 及び PI3-K p85 α とは共沈しなかった。一方、V5-CIN85-dSH3ABC は Src 及び PI3-K p85 α と共沈したが Cbl とは共沈しなかった。また、V5-CIN85-dSH3dPRR はいずれとも共沈しなかった (Fig. 2-4)。これらの結果は既報[1, 43]に合致していた。

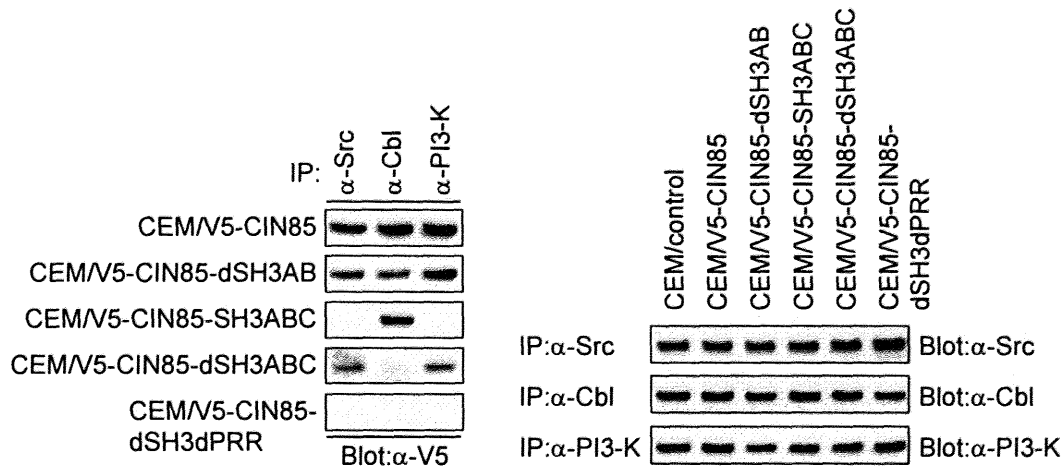


Fig. 2-4 CEM 細胞中での、Src、Cbl 及び PI3-K p85 α と各種 CIN85 欠失体の複合体形成

CEM/V5-CIN85, CEM/V5-CIN85-dSH3AB, CEM/V5-CIN85-SH3ABC, CEM/V5-CIN85-dSH3ABC, CEM/V5-CIN85-dSH3dPRR and CEM/control cells were lysed and immunoprecipitated with antibodies against Src, Cbl and PI3-K p85 α , as described in the legend of Fig. 2-3. Left panel indicates each co-precipitated V5-tagged proteins, and right panel indicates Src, Cbl and PI3-K p85 α in the each precipitated protein.

2-3-4 内在性 CIN85 と Src との結合

これまでに CEM 細胞中で内在性の Src と外来性の過剰発現させた V5-CIN85 が結合することを示した。ここでは、内在性の CIN85 も同様に内在性の Src と結合することを示す。Fig. 2-5 に示すように、CEM/control 細胞、及び CEM/V5-CIN85 細胞の細胞抽出液を抗 Src 抗体で免疫沈降すると内在性の CIN85 及び外来性の V5-CIN85 が同じように共沈した。

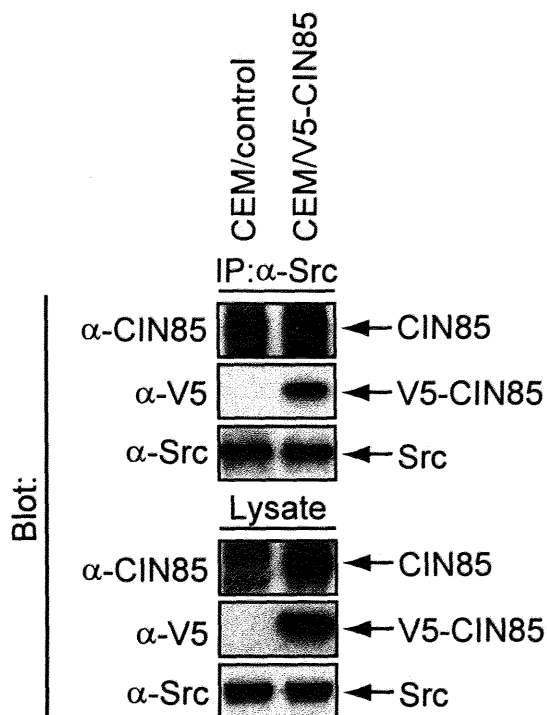


Fig. 2-5 内在性 CIN85 と Src との結合

Lysates from CEM/control and CEM/V5-CIN85 cells were immunoprecipitated with anti-Src antibody and the blot was then probed with anti-V5, anti-Src or anti-CIN85 antibody. Polyclonal anti-CIN85 antiserum was produced by immunizing a rabbit with KLH-conjugated CKKIRLRLQMEVNDIKKALQSK (645-665 amino acid of CIN85). IgG antibodies were affinity purified on a Sepharose column (Amersham Biosciences) to which the same peptide was bound. Bottom row indicates the presence of endogenous Src and CIN85, and V5-CIN85 in the cell lysates.

2-3-5 形質転換された CEM 細胞の TNF- α 感受性

Src family kinase を阻害すると CEM 細胞の TNF- α 誘導アポトーシスが促進された (Fig. 2-2) ので、CEM 細胞での TNF- α 誘導アポトーシスにおける CIN85 の関与を調べるために、CEM/V5-CIN85 細胞を用いて TNF- α 誘導アポトーシスを調べた。独立して構築された 3 つのクローンについて TNF- α によって誘導される細胞死を調べたが、いずれのクローンもコントロール細胞 (CEM/control) と比較して 10 分の 1 以下の濃度の TNF- α でアポトーシスが誘導された (Fig. 2-6)。

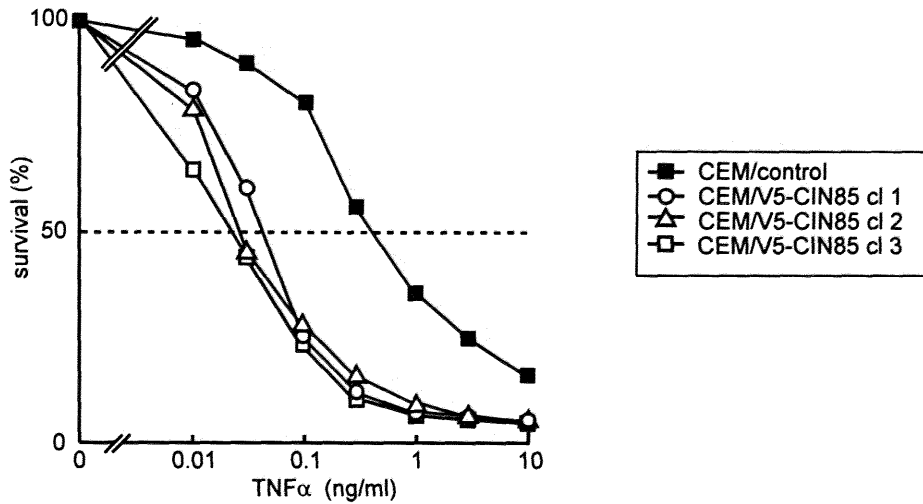


Fig. 2-6 CEM/V5-CIN85 細胞の TNF- α に誘導されるアポトーシス

Aliquots of 2×10^4 cells of CEM/V5-CIN85 (three independent clones) and CEM/control were distributed in 96-well tissue culture plates and cell death in response to TNF- α .

次に CIN85 の各種欠失体 (V5-CIN85-dSH3AB、V5-CIN85-SH3ABC、V5-CIN85-dSH3ABC、及び V5-CIN85-dSH3dPRR) を恒常的に過剰発現する CEM 細胞を用いて、これらの細胞の TNF- α によって誘導される細胞死を測定した。Fig. 2-7 にこれら各種欠失体の細胞抽出液中の V5 標識タンパク質をウェスタンブロットで解析した結果を示し、Fig. 2-8A に、TNF- α によって誘導される細胞死を測定した結果を示した。CEM/V5-CIN85 細胞は Fig. 2-6 の結果と同様にコントロール細胞がアポトーシスを誘導される 1/10 濃度の TNF- α でアポトーシスが誘導された。CEM/V5-CIN85-dSH3AB 細胞及び CEM/V5-CIN85-SH3ABC 細胞がアポトーシスを誘導される TNF- α の濃度もコントロール細胞に比較して小さかったが CEM/V5-CIN85 細胞のそれよりも大きかった。しかし、CEM/V5-CIN85-dSH3ABC 細胞及び CEM/V5-CIN85-dSH3dPRR 細胞がアポトーシスを誘導される TNF- α の濃度はコントロール細胞と同じであった。従って、CIN85 の TNF- α 誘導アポトーシスの促進効果には、3 つの SH3 ドメインが必須であり、PRR も十分な促進効果を示すために必要であった。一方、Fig. 2-8B に示したように、これらの細胞の抗 CD95 抗体によるアポトーシス誘導効果は全て同様であり、抗 CD95 抗体に対する感受性は変化しなかった。

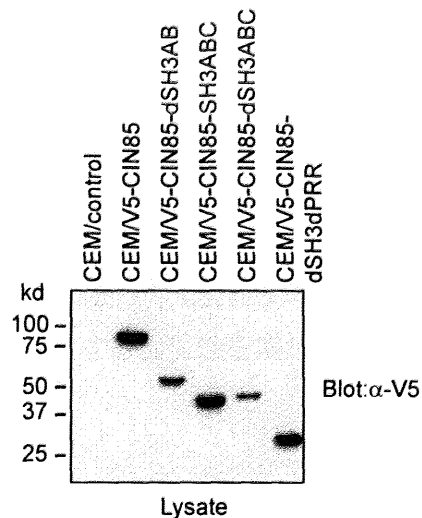


Fig. 2-7 CEM 細胞中での各種 V5 標識 CIN85 欠失体タンパクの発現

Expression of V5-CIN85 and its deletion mutants in CEM cells were assessed by western blots. A 10- μ g sample of each cell lysate was applied to each lane and the blots probed with HRP-labeled anti-V5 antibody.

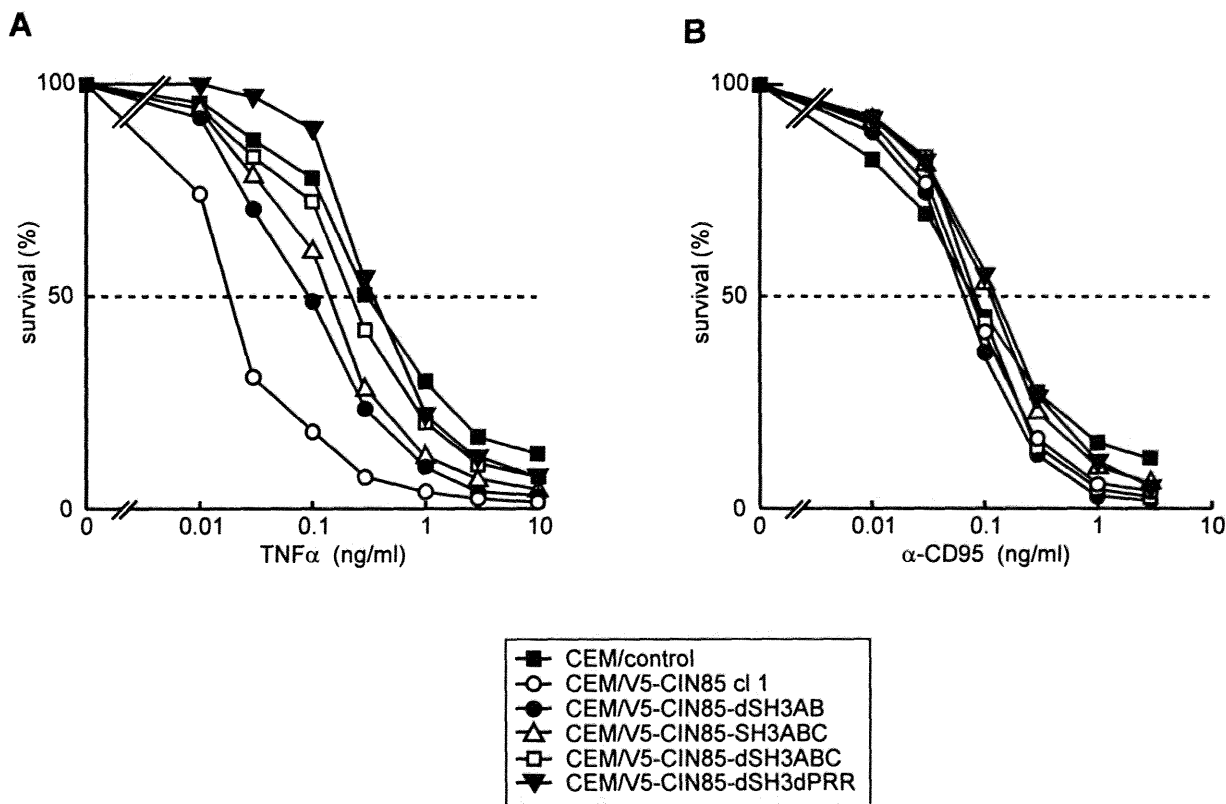


Fig. 2-8 CIN85 の TNF- α 及び CD95 誘導アポトーシスに対する影響

Aliquots of 2×10^4 cells of CEM/V5-CIN85, CEM/V5-CIN85-dSH3AB, CEM/V5-CIN85-SH3ABC, CEM/V5-CIN85-dSH3ABC, CEM/V5-CIN85-dSH3dPRR and CEM/control cells were distributed in a 96-well tissue culture plate, and cell death analyzed in response to TNF- α (A) or anti-CD95 antibody (B).

2-3-6 CEM 形質転換細胞表面での TNFR1 の発現

前項(2-3-5)で示したように CEM/V5-CIN85 細胞は TNF- α に対する感受性を増加した。従って V5-CIN85 の過剰発現が、TNFR1 の発現量に影響しているか否か、フローサイトメトリーを用いて調べた。その結果、V5-CIN85 及びその欠失体を発現する CEM 細胞表面の TNFR1 発現量はコントロール細胞と変化なかった(Fig. 2-9)。従って CIN85 の過剰発現はレセプターからのシグナル伝達に影響を与えることによって TNF- α に対する感受性を増加する。

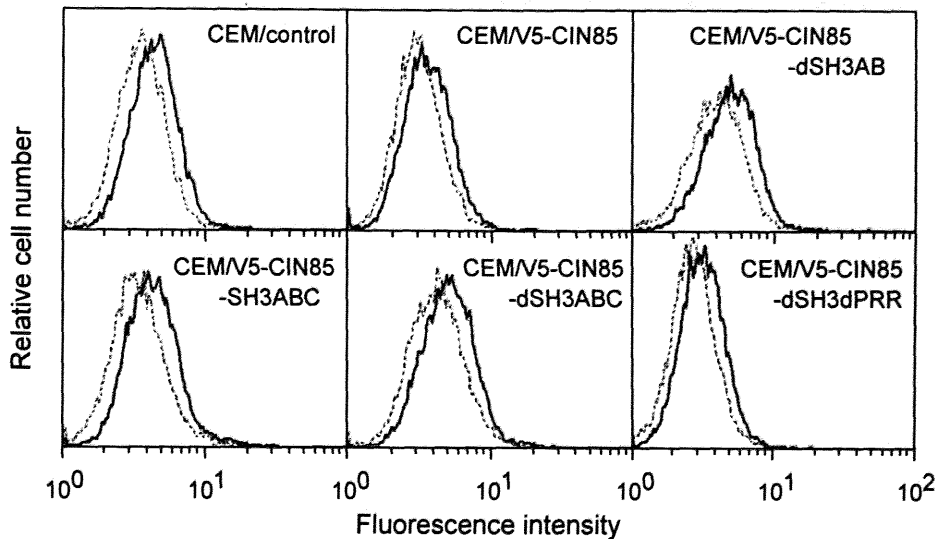


Fig. 2-9 V5-CIN85 及びその欠失体を発現する CEM 細胞表面の TNFR1 発現量

The expression of TNFR1 in individual CEM clones was assessed by flow cytometry. Cells were stained with fluorescein-labeled anti-human TNFR1 monoclonal antibody (solid line) or fluorescein-labeled mouse IgG1 as a control (dotted curve). Ten thousand cells were analyzed per sample. Histograms show relative cell number (y axis) versus log fluorescence (x axis).

2-3-7 CEM 細胞中での CIN85 と TNFR1 複合体の解析

CEM/V5-CIN85 細胞は TNF- α に対する感受性を増大させたので、TNFR1 及び TNFR1 シグナル伝達複合体に含まれている各種タンパク質群と CIN85 が、複合体を形成しているか否かを免疫沈降法で調べた。Fig. 2-10 に示したように、V5-CIN85 は、TRADD、cIAP1、TRAF1、TRAF2、及び TNRR1 と共沈した。しかし、RIP、TRAF6 と共沈せず、CD95 シグナル伝達複合体にも含まれている FADD 及び caspase 8 と共沈しなかった。従って、CIN85 は TNFR1 シグナル伝達複合体に結合しているが、CD95 シグナル伝達複合体には結合していない。

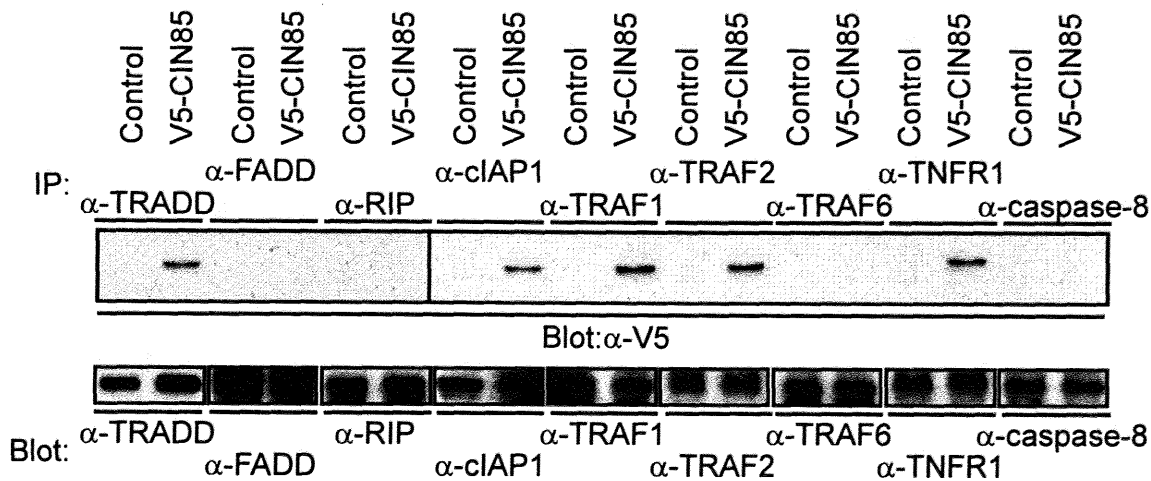


Fig. 2-10 CEM 細胞中での CIN85 と TNFR1 複合体タンパク質との結合

Characterization of TNFR1- or CD95-associated signaling complexes. CEM/V5-CIN85 cells (1×10^8 cells) were lysed with 2.0 ml M-PER solution containing proteinase inhibitors as described in Materials and Methods to 2-2-6. Immunoprecipitation with antibodies against TRADD, FADD, RIP, cIAP1, TARF1, TRAF2, TRAF6, TNFR1 or caspase-8 and western blot analysis was performed. Top: CIN85 protein co-precipitated with various TNFR1- or CD95-associated proteins. Bottom: Various TNFR1- or CD95-associated proteins in the immunoprecipitates.

2-3-8 TNFR1 細胞内領域との結合

前項(2-3-7)で CIN85 は TNFR1 シグナル伝達複合体に結合することが明らかになった。そこで初めに、293T 細胞の一過性共発現の系を用いて、CIN85 及び CIN85 が複合体を形成する Src、Cbl 及び PI3-K p85 α が、TNFR1 の細胞内領域(TNFR1-CYT)に直接結合するか否かを調べた。Fig. 2-11 に示したように、CIN85、Cbl 及び PI3-K p85 α は TNFR1 の細胞内領域と直接結合しなかった。しかし、Src は直接結合した。

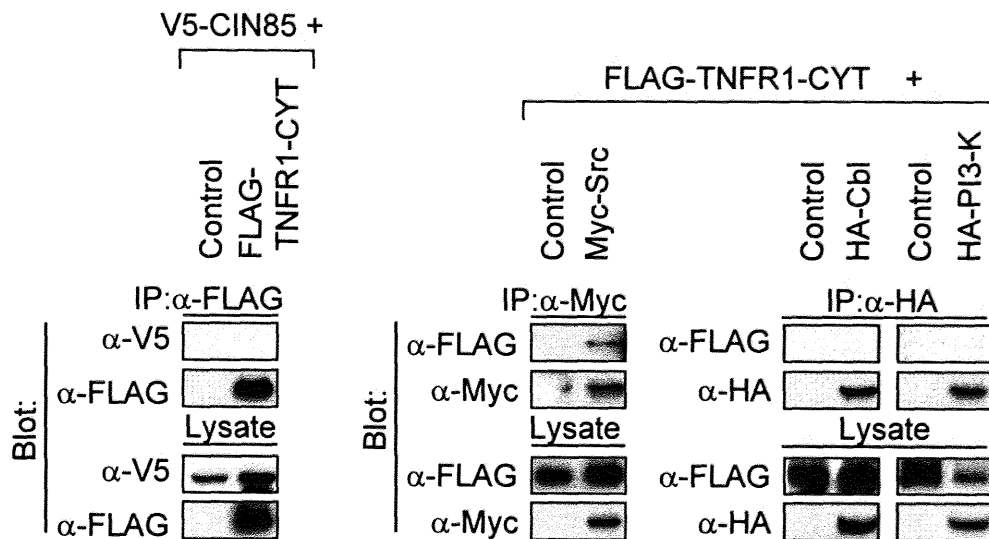


Fig. 2-11 TNFR1 細胞内領域との結合

Human embryonic 293T cells were transfected with FLAG-TNFR1-CYT expression vector in combination with V5-CIN85, Myc-Src, HA-Cbl or HA-PI3-K p85 α expression vector (10 μ g each). Total lysates were immunoprecipitated with anti-FLAG, anti-Myc or anti-HA antibody and the blots probed with the appropriate antibodies.

2-3-9 CIN85 及び Src の TNFR1 シグナル伝達複合体パートナーの解析

次に、CIN85 及び Src が TNFR1 シグナル伝達複合体及び PI3-K/Akt 経路の各タンパク質と直接結合するか否かを調べた。その結果、CIN85 は Cbl 及び PI3-K p85 α と結合したが、TRAF1、TRAF2、TRADD、cIAP1 及び Akt とは結合しなかった (Fig. 2-12)。一方、Src は TRAF1 及び Cbl と結合し、TRAF2、TRADD、cIAP1、PI3-K p85 α 及び Akt とは結合しなかった (Fig. 2-13)。Src が Cbl と結合し、PI3-K p85 α と結合しなかったことは、既報告 [77] と同じ結果であった。

以上の結果から、CIN85 は Src を介して TNFR1 複合体に結合していると考えられたので、これを確認するために、293T 細胞に TNFR1-CYT、Src、CIN85 の 3 成分を発現させた系、及び TRAF1、Src、CIN85 の 3 成分を発現させた系を用いて免疫沈降法で解析した。その結果、TNFR1-CYT または TRAF1 を免疫沈降させると Src-CIN85 複合体が共沈した (Fig. 2-14A)。更に、293T 細胞に TNFR1-CYT、Src、CIN85 の 3 成分を発現させた系で、Src の発現量を増加させて CIN85 の共沈する量が増加するか否かを試験したところ、予想通り V5-CIN85 の共沈する量は増加した (Fig. 2-14B)。従って、TNFR1-Src-CIN85 複合体、及び TRAF1-Src-CIN85 複合体が、TNFR1 シグナル伝達複合体中に形成されていることが明らかになった。

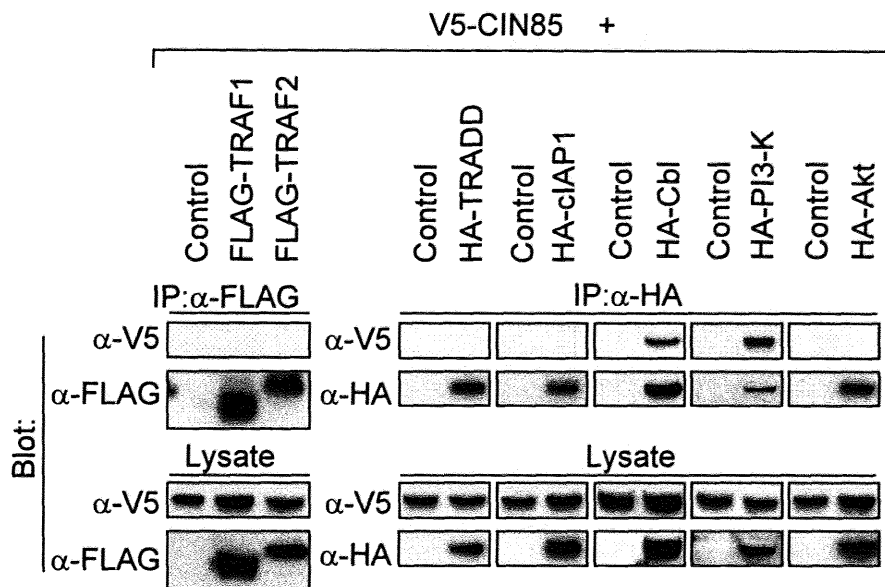


Fig. 2-12 CIN85 と TNFR1 複合体及び PI3-K/Akt 系路タンパク質との結合

Human embryonic 293T cells were transfected with V5-CIN85 expression vector in combination with FLAG-TRAF1, FLAG-TRAF2, HA-TRADD, HA-cIAP1, HA-Cbl, HA-PI3-K p85 α or HA-Akt expression vector (10 μ g each). Lysates were immunoprecipitated with anti-FLAG or anti-HA antibody, and the blots probed with anti-V5, anti-FLAG or anti-HA antibody.

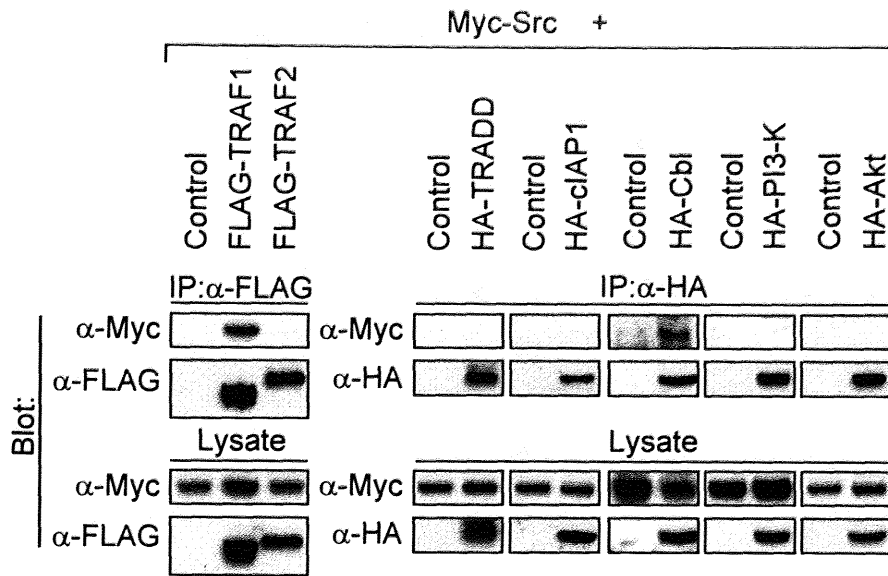


Fig. 2-13 Src と TNFR1 複合体及び PI3-K/Akt 系路タンパク質との結合

Human embryonic 293T cells were transfected with Myc-Src expression vector in combination with FLAG-TRAF1, FLAG-TRAF2, HA-TRADD, HA-cIAP1, HA-Cbl, HA-PI3-K p85 α or HA-Akt expression vector. Total lysates were processed as described in Fig. 2-12.

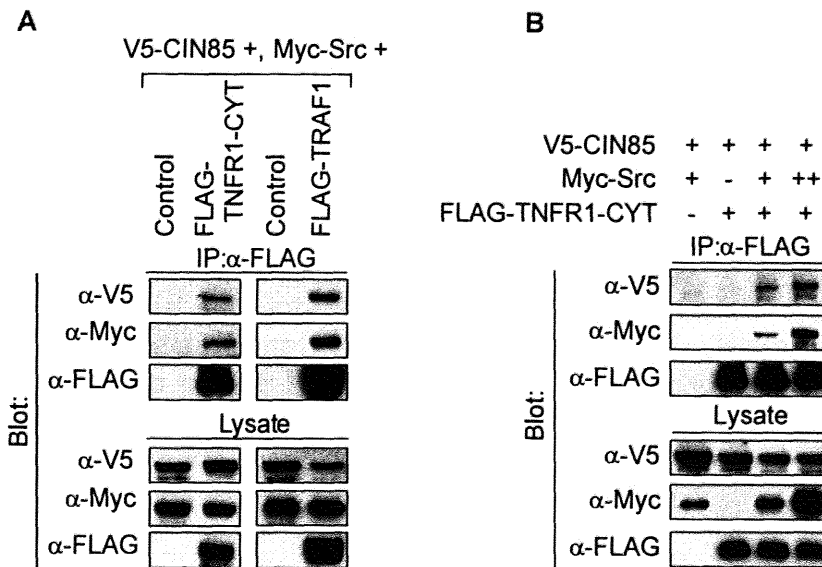


Fig. 2-14 CIN85 は Src を介して TNFR1-CYT 及び TRAF1 と結合する

(A) Src links between CIN85 and TNFR1 or TRAF1. Cells were co-transfected with Myc-Src, V5-CIN85 and either FLAG-TNFR1-CYT or FLAG-TRAF1 expression vectors. Lysates were processed as described in Fig. 2-12. (B) The increasing expression of Src enhances the interaction of CIN85 with the cytoplasmic domain of TNFR1. 293T cells were co-transfected with V5-CIN85, Myc-Src and FLAG-TNFR1-CYT expression vectors as shown on the top of each lane. Lysates including same amount of FLAG-TNFR1-CYT (lane no. 2 to 4) or Myc-Src (lane no. 1 and 3) were adjusted to same volume and immunoprecipitated with anti-FLAG antibody and the blots probed with anti-V5, anti-Myc or anti-FLAG antibody. Lower panels indicate the presence of V5-CIN85, Myc-Src and FLAG-TNFR1-CYT in the adjusted cell lysates. The ratio of the proteins was determined by densitometry.

2-3-10 TNF- α 刺激による CIN85 複合体の変化

これまでに、TNFR1 シグナル伝達複合体に CIN85 は TNFR1-Src-CIN85 複合体、及び TRAF1-Src-CIN85 複合体の形で結合していることを明らかにした。次に、CEM 細胞中で Src-CIN85 複合体の TNFR1 への結合が TNF- α の刺激に応答しているか否かを試験した。CEM/V5-CIN85 細胞を 1ng/ml の TNF- α で 10 分間刺激し、TNFR1 複合体に結合している V5-CIN85 及び Src の量を無刺激時と比較したところ、V5-CIN85 の結合量は無刺激時の 199%に、Src の結合量は 151%に増加していた(Fig. 2-15)。従って、CEM 細胞中では、CIN85 と Src は TNF- α の刺激に応答して複合体を形成し、TNFR1 に結合すると考えられた。

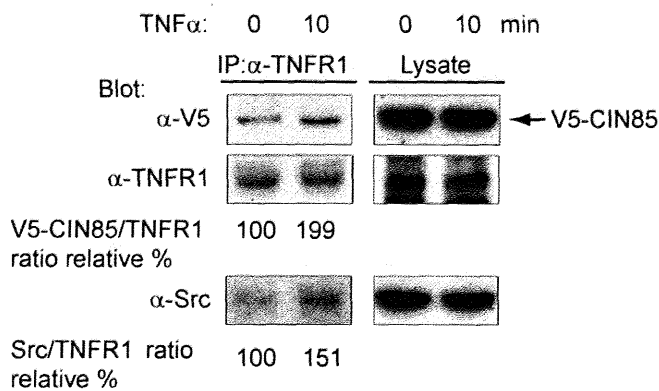


Fig. 2-15 TNF- α 刺激による CIN85 複合体の変化

The interaction of TNFR1 and the CIN85-Src complex is regulated by ligand binding. CEM/V5-CIN85 cells were treated with 1 ng/ml TNF- α for 10 min and then lysed. 600 μ g aliquots of the extract were immunoprecipitated with anti-TNFR1 antibody and analysed by Western blotting. Blots were probed with the antibodies shown in the figure. The ratio of the proteins shown below each track was determined by densitometry (ATTO, Tokyo, Japan). (right) The presence of CIN85, TNFR1 and Src in the cell lysates.

シグナル伝達はタンパク質-タンパク質相互作用とともにチロシンリン酸化によって伝達される。次に Src キナーゼが TNF- α 刺激によってリン酸化されるか否かを確認した。CEM/V5-CIN85 及び CEM/control 細胞を 10 ng/ml の TNF- α で刺激し、その細胞抽出液を抗 Src 抗体で免疫沈降し、共沈した免疫複合体を解析した。Fig. 2-16 に示したように、両方の細胞とも TNF- α 刺激によって Src のリン酸化は増加した。また、Src と共沈した CIN85 または V5-CIN85、及び Cbl の量も明らかに増加した。一方、抗 Cbl 抗体で免疫沈降した場合には、Cbl と共沈した CIN85 または V5-CIN85 の量は TNF- α 刺激によって変化しなかった。従って、TNF- α 刺激に応答して TNFR1 複合体に結合した Src はリン酸化されるとともに、Src-CIN85、Src-Cbl 複合体の量を増加させる。一方、CIN85-Cbl 複合体の量は TNF- α 刺激に応答しなかった。これらの結果から、CIN85 は Cbl と恒常的に結合しており、TNF- α 刺激に応答して TNFR1 複合体に Src を介して結合し、Src、CIN85 及び Cbl の 3 者の複合

体を形成すると考えられる。一方、CEM/control 細胞において、TNF- α 刺激に応答して形成される Src-CIN85 複合体の増加量が、CEM/V5-CIN85 細胞のそれよりも少ない傾向が認められたが、これは細胞中の CIN85 発現量が CEM/control 細胞中では CEM/V5-CIN85 細胞よりも少ないためと考えられる。

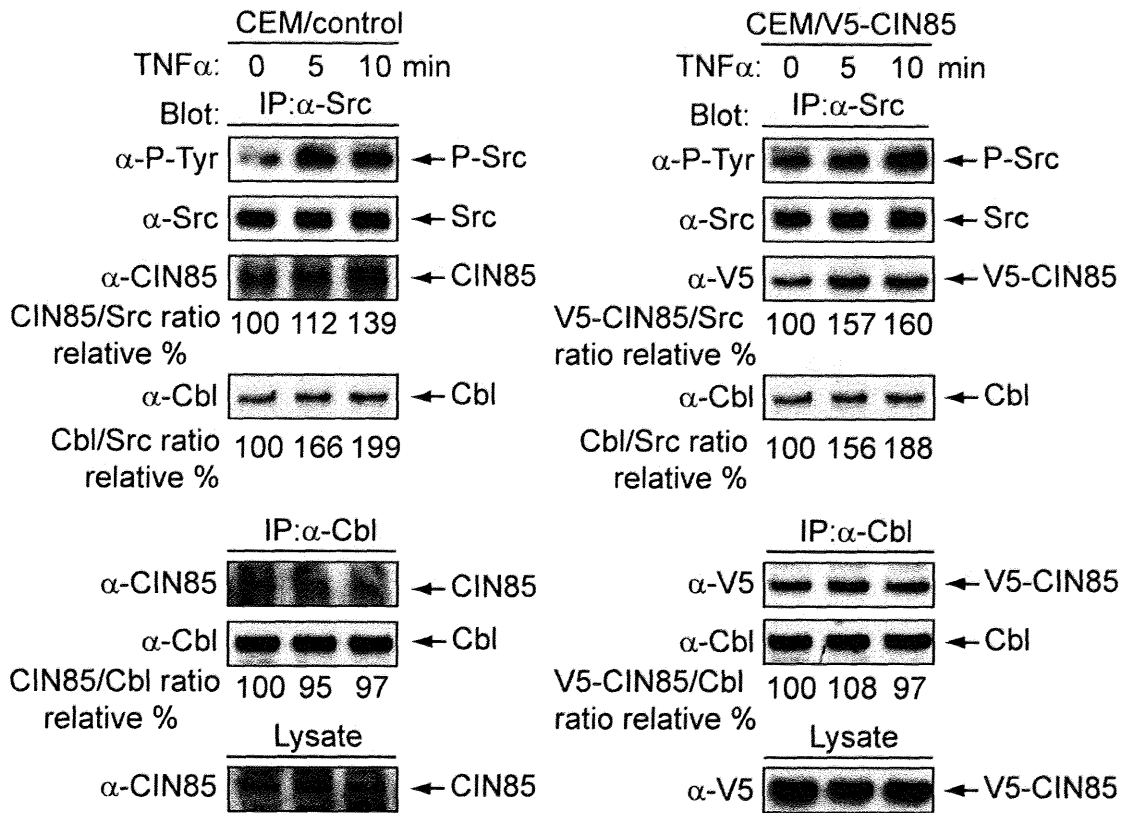


Fig. 2-16 TNF- α 刺激による Src のリン酸化と CIN85 複合体の変化

CEM/V5-CIN85 and CEM/control cells (2×10^7 cells) were stimulated with 10 ng/ml TNF- α for 5 or 10 minutes, and lysed with 600 μ l of M-PER containing protease and phosphatase inhibitors. Aliquots of the extracts were immunoprecipitated with anti-Src or anti-Cbl antibody, and the blot was probed with the antibodies shown in the figure. The ratio of the CIN85 and Cbl proteins recruited was determined by densitometer (ATTO, Tokyo, Japan).

2-3-11 TNF- α 刺激による生存シグナルの変化

TNF- α はアポトーシス誘導シグナルの他に、NF- κ B、MAPK 及び Akt といった抗アポトーシスシグナルも活性化する。従って、本研究の最後にこれらの抗アポトーシスシグナルに対する CIN85 の影響を調べた。CEM/V5-CIN85 細胞及び CEM/control 細胞を 10 ng/ml の TNF- α で刺激し、その細胞抽出液中の NF- κ B 活性を、Trans-AM NF- κ B p50 activation kit (ACTIVE MOTIF)を用いて測定したところ、両方の細胞で明らかに NF- κ B 活性は増強されていた(Fig. 2-17)。また、同じ細胞抽出液中の MAPK の活性化を、抗リン酸化 MAPK 抗体を用いて測定したところ、MAPK の ERK 及び JNK は両方の細胞で同じようにリン酸化されていた(Fig. 2-18 及び Fig. 2-19)。しかし、抗リン酸化 Akt 抗体を用いて Akt の活性化を調べたところ、CEM/control 細胞ではリン酸化 Akt が増加していたが、CEM/V5-CIN85 細胞では減少していた(Fig. 2-20)。一方、CEM/V5-CIN85 細胞及び CEM/control 細胞を無血清の RPMI1640 培地中に一晩置いた後に TNF- α 刺激を行うと、両方の細胞とも著しいリン酸化 Akt の増加が起こり、Fig. 2-20 に示したような CEM/V5-CIN85 細胞でのリン酸化 Akt の抑制は起こらなかった(Fig. 2-21)。

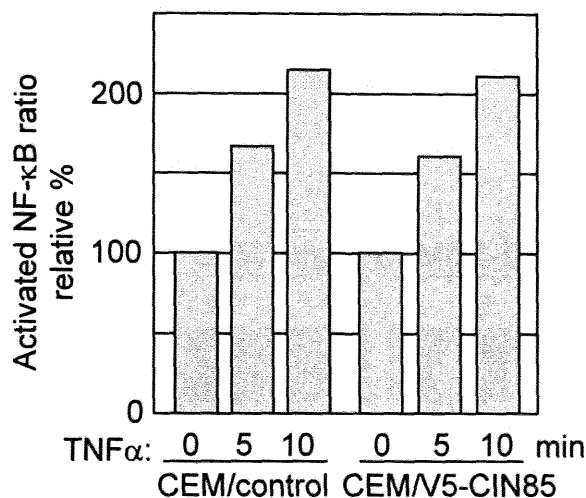


Fig. 2-17 TNF- α 刺激による NF- κ B の活性化

Cells were stimulated with 10 ng/ml of TNF- α without stabilization, and NF- κ B activity was assessed with a Trans-AM NF- κ B p50 activation kit (ACTIVE MOTIF).

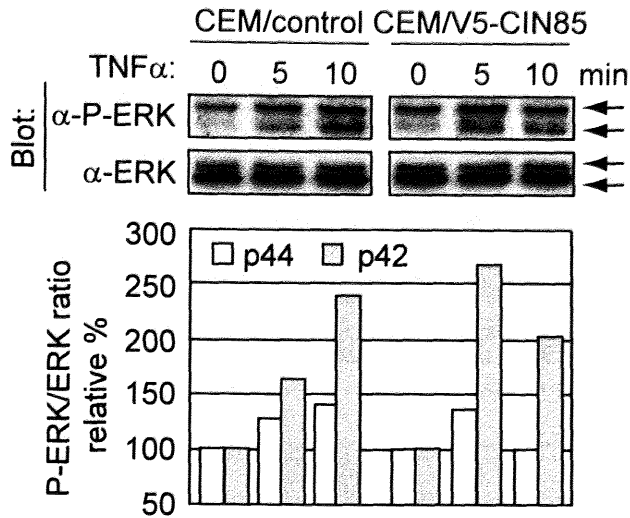


Fig. 2-18 $\text{TNF}\cdot\alpha$ 刺激による ERK の活性化

Cells were stimulated with 10 ng/ml of $\text{TNF}\cdot\alpha$ without stabilization, and extracts examined by western blot analysis using anti-phospho-ERK antibody. The phospho-ERK/ERK ratio was determined by densitometer.

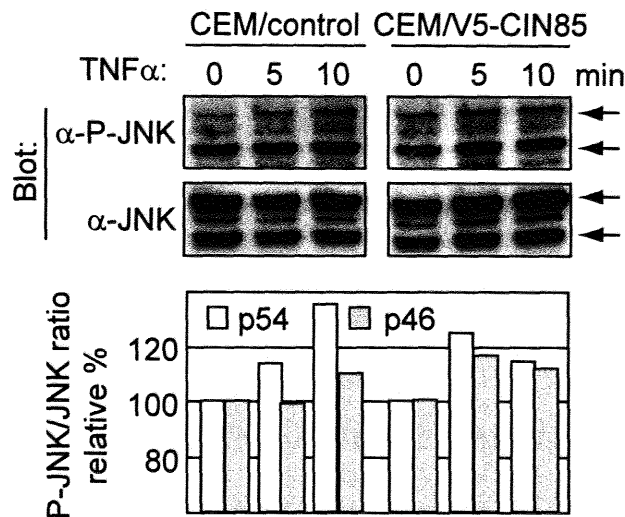


Fig. 2-19 $\text{TNF}\cdot\alpha$ 刺激による JNK の活性化

Cells were stimulated with 10 ng/ml of $\text{TNF}\cdot\alpha$ without stabilization, and extracts examined by western blot analysis using anti-phospho-JNK antibody. The phospho-JNK/JNK ratio was determined by densitometer.

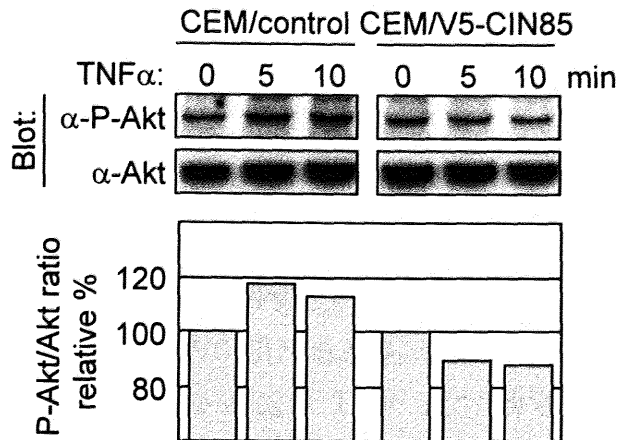


Fig. 2-20 TNF- α 刺激による Akt の活性化

Cells were stimulated with 10 ng/ml of TNF- α without stabilization, and extracts examined by western blot analysis using anti-phospho-Akt (Ser473) antibody. The phospho-Akt/Akt ratio was determined by densitometer.

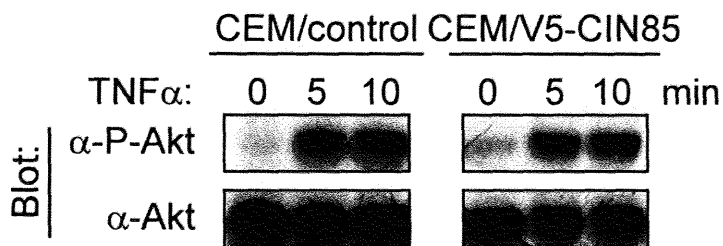


Fig. 2-21 スタビライズ後、TNF- α 刺激による Akt の活性化

Cells were washed with FBS-free RPMI 1640 medium and incubated for 24 hours into FBS-free RPMI 1640 medium. The cells were stimulated with 10 ng/ml of TNF- α , and extracts examined by western blot analysis using anti-phospho-Akt (Ser473) antibody.

第4節 考察

CEM細胞は、TNF- α 及び抗CD95抗体によってアポトーシスが誘導される。そしてSrc family kinase 選択的阻害剤PP1によってTNF- α に感受性が強くなる。しかし抗CD95抗体に対する感受性はPP1によって影響を受けないことから、Src family kinaseがCEM細胞においてTNFR1からのシグナル伝達に何らかの関与をしていると考えられた。従ってSrc family kinaseに結合するアダプタータンパク質CIN85のTNFR1シグナル伝達経路に対する役割を調べた。最初にCEM/V5-CIN85細胞中でどのSrc family kinaseとCIN85が結合するかを調べたところ、調べた6種類全てのSrc family kinaseと結合した。Src family kinaseは相互に相互の機能を補完することが知られている。従ってCIN85はSrc family kinaseの機能全般に関与し得る。

CIN85を過剰発現するCEM/V5-CIN85細胞はTNF- α に対する感受性が強くなった。CIN85の各種欠失体を過剰発現するCEM細胞のTNF- α に対する感受性変化の結果(Fig. 2-8A)は、CIN85の3つのSH3ドメインがTNF- α に対する感受性の増強に必須であることを示している。すなわち、3つのSH3ドメインを欠失したV5-CIN85-dSH3ABCはTNF- α に対する感受性に影響を与えないし、SH3ドメインを2つ欠失したV5-CIN85-dSH3ABの感受性増強効果はV5-CIN85より弱かった。一方、3つのSH3ドメインだけを持つV5-CIN85-SH3ABCの感受性増強効果はV5-CIN85より弱く、これはPRRも十分なTNF- α に対する感受性増強効果を示すために必要であることを示している。以上の結果は、CIN85のTNF- α に対する感受性増強効果は、SH3ドメインとPRRの両方が必要で、これはCIN85のアダプターとしての機能が必要であることを示している。このことからCIN85がSH3ドメインでCblなどと結合し、PRRでSrcやPI3-K p85 α などと結合して複合体を形成することが必要である可能性が想像された。

CEM/V5-CIN85細胞はTNF- α に対する感受性増強効果を示すことから、CIN85のTNFR1シグナル伝達複合体に対する結合性を調べた。TNFR1シグナル伝達複合体を形成しているタンパク質群の中で、CIN85はTRADD/TRAF1/TRAF2/cIAP1と複合体を形成し、RIP及びFADDとは複合体を形成しないことが判明した。FADDはCD95シグナル伝達複合体の中心的タンパク質であり、これと複合体を形成しないことは、CEM/V5-CIN85細胞が抗CD95抗体に対する感受性を変化させないことと符合する。また、RIPと複合体を形成せず、TRAF1/2と複合体を形成したことから、CIN85はTRAFを経由するTNFR1シグナル伝達に関与している可能性が示された。

更に詳細にCIN85のTNFR1シグナル伝達複合体に対する直接の結合性を調べるために、293T細胞を用いた共発現系で、2つのタンパク質間の結合性を試験した。その結果、TNFR1の細胞内領域はSrcと結合するが、CIN85、Cbl及びPI3-K p85 α とは直接結合しない。また、SrcはTRAF1とも直接結合するが、CIN85はTRAF1を含め、TRADD、TRAF2及びcIAP1とも直接結合しない。故に、CIN85はSrcを介してTNFR1に結合する。一方、CIN85は、Cbl及びPI3-K p85 α と直接結合する。CblはSrcからのシグナル伝達下流に位置してSrcの基質となることが知られている[78]。従って、CIN85はSrcを介してTNFR1シグナル伝達複合体に含まれており、TNFR1からのシグナルを、Srcを介して受け取り、CblまたはPI3-Kに伝えていると考えられた。

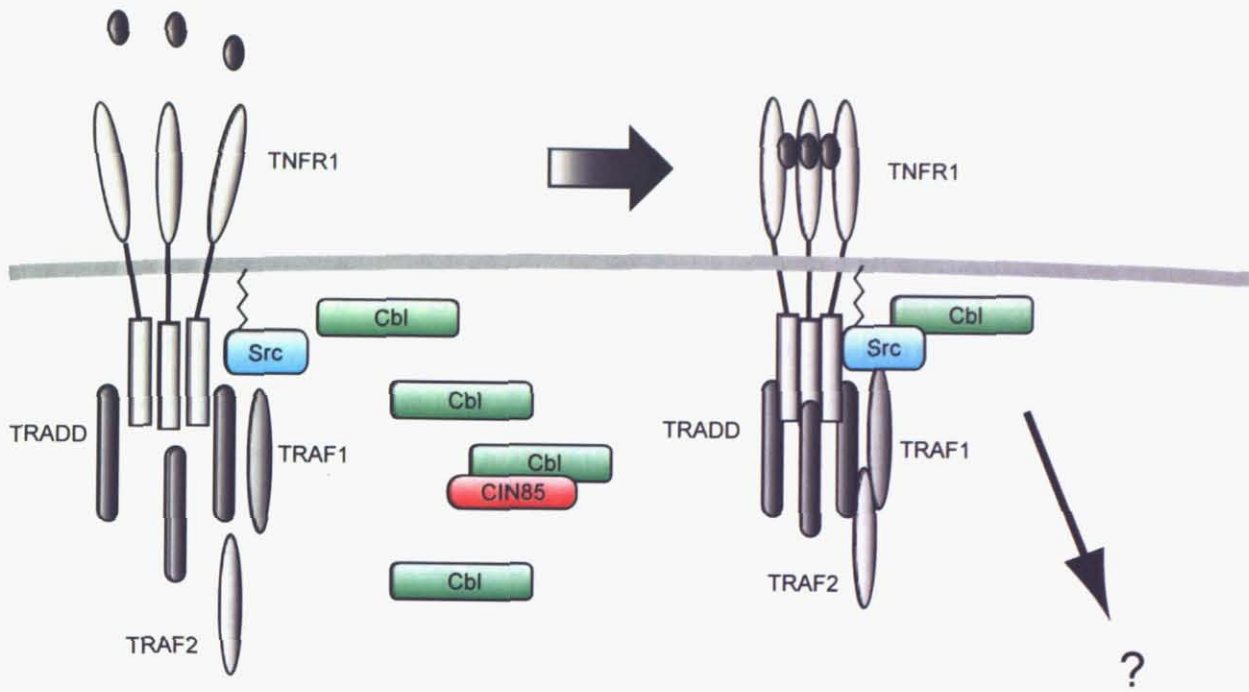
本セクションではTNF- α はSrcを活性化し、活性化されたSrcはCIN85とCblを引き寄せることを報告した。TNFR1から伝達された生存シグナルはCEM/V5-CIN85細胞とCEM/control細胞では同じようにNF- κ B、ERK及びJNKを活性化した。しかし、AktはCEM/control細胞では活性化し

たが CEM/V5-CIN85 細胞では活性を減弱した。従って、CEM/V5-CIN85 細胞における TNF- α 感受性の増強は、Akt 活性の減弱による可能性が考えられた。一方、TNF ファミリーに属する tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine (TRANCE) 及び CD40 ligand は、Src を活性化し、活性化された Src は Cbl と PI3-K を引き寄せて、結果的に Akt を活性化することが報告されている[73, 79, 80]。また、epidermal growth factor (EGF) が Src-Cbl-PI3-K 複合体によるシグナル伝達によって Akt を活性化することも報告されている[81]。これらの観点は、CIN85 が Src-Cbl-PI3-K 複合体に加わり、TNFR1 から Akt へのシグナル伝達を修飾している可能性を示唆する。

EGF レセプターや c-Met のシグナル伝達において、CIN85 は Cbl 及び endophilin と複合体を形成し、レセプターのエンドサイトーシスを促進することが報告されている[49, 50]。この現象を起こすレセプターからのシグナル伝達は、レセプターキナーゼから始まり、Cbl から CIN85 を介して endophilin へと伝達される。本セクションで、非キナーゼ型のレセプターである TNFR1 からのシグナル伝達が、非レセプター型のキナーゼ、Src から CIN85 を介して Cbl に伝達されることを明らかにした。更に、CIN85 は Akt 活性を減弱することで TNF- α 感受性を増強する可能性を示したが、これは Gout らが報告した、神経細胞において、Ruk の過剰発現が nerve growth factor (NGF) に反応して起こる PI3-K/Akt 活性化経路を阻害することによってアポトーシスを誘導する知見[43]と重ね合わせることができる。すなわち、CEM 細胞において、CIN85 の過剰発現が TNF- α によって引き起こされる Src から Cbl を経由して PI3-K に至るシグナル伝達経路を阻害して Akt 活性の減弱を引き起こす可能性が考えられる。

本セクションでは、CIN85 の新しい機能を明らかにした。すなわち、CIN85 は Src を介して、TNFR1 シグナル伝達複合体に含まれる。さらに、Src-CIN85-Cbl 複合体を介するシグナル伝達によって、Akt 活性化を修飾している可能性を示した。

CEM/control cells



CEM/V5-CIN85 cells

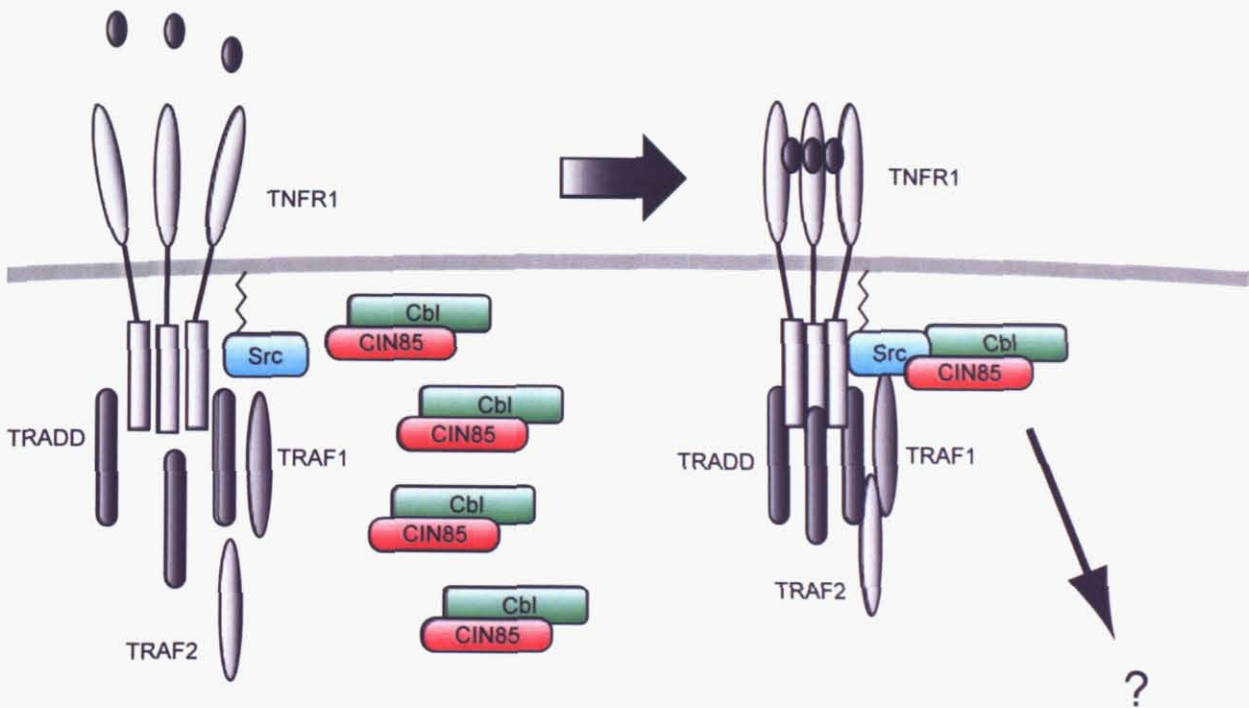


Fig. 2-17 TNFR1 複合体への CIN85 結合モデル

CEM/control 細胞では CIN85-Cbl 複合体が少なく、Cbl 単体が多いので TNFR1 シグナル伝達には CIN85 の影響が少ない。CEM/V5-CIN85 細胞では CIN85 が過剰発現しているため、CIN85-Cbl 複合体が多く、TNFR1 シグナル伝達に CIN85 の影響が大きい。

第3部 単純ヘルペスウイルス増殖抑制に関する検討

— CIN85 は HeLa 細胞中で単純ヘルペスウイルスの増殖を抑制する —

要旨

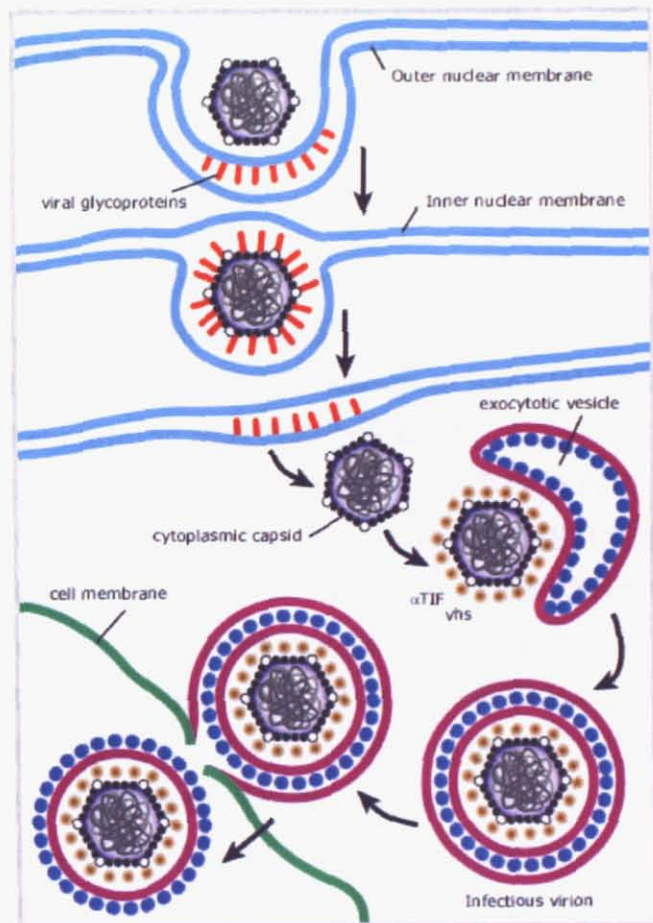
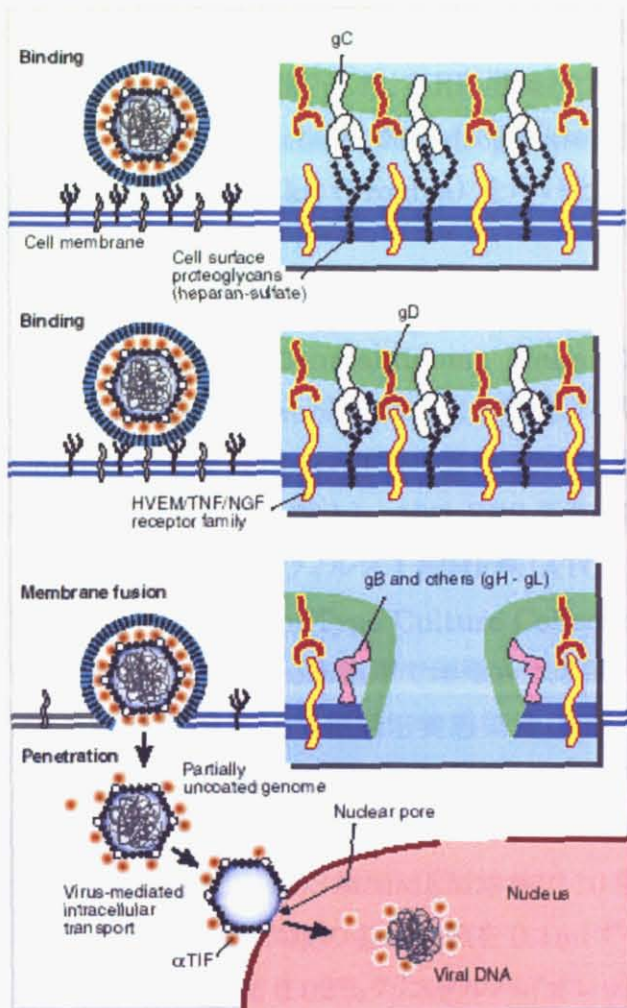
CIN85 は N 末に 3 つの SH3 ドメイン、次いでプロリンリッチな領域、C 末に coiled-coil ドメインを持つアダプタータンパク質であり、組織に広く分布し、多くのタンパク質と複合体を作る。Src family kinase の一つ、Hck は自然免疫に重要な役割を担っており、これも CIN85 と結合する。我々は HeLa 細胞中で単純ヘルペスウイルス(HSV)の増殖に関わる CIN85 の新しい機能を見出した。V5-CIN85 を HeLa 細胞に過剰発現させると HSV 感染によるプラーク形成を減少させ、HSV の増殖を減少させた。更に CIN85 の PRR 領域を HeLa 細胞に過剰発現させると HSV の増殖を抑制したが 3 つの SH3 ドメインを過剰発現させた場合は HSV の増殖を抑制しなかった。V5-CIN85 及び PRR を過剰発現させた HeLa 細胞の、HSV-1 感染に対する感受性はコントロール細胞に比べて 1/100 に減少していた。CHO-K1 細胞に単純ヘルペスウイルスが侵入する際に結合するレセプター、例えば herpes virus entry-mediator A (HVEM)を導入すると HSV 感染に感受性になる。この HSV 感染に感受性となった CHO-K1 細胞に CIN85 を過剰発現させると HSV-1 の増殖を抑制した。しかし、CIN85 は直接 HVEM と結合しなかったことから、CIN85 はウイルス侵入過程を阻害せず、むしろ侵入後の増殖過程を阻害している。以上より、CIN85 は HSV 感染に重要な役割を担っていると考えられる。

第1節 緒言

ヘルペスウイルス科は α 、 β 、 γ の3つの亜科より構成され、全ての脊椎動物から昆虫にいたるまで約130種類が分離されている。単純ヘルペスウイルス(HSV)はヒトヘルペスウイルスの中で最初に発見され、1型(HSV-1)と2型(HSV-2)の2つの血清型が存在し、 α herpesvirus subfamilyに分類される。HSV-1は歯肉口内炎、口唇ヘルペス、皮膚ヘルペス、角膜ヘルペス、ヘルペス脳炎、陰部ヘルペスなど多様な病像を示し、HSV-2は主に陰部ヘルペスの病原体となる。HSVは上皮細胞への初感染後、三叉神経節あるいは坐骨神経節に終生続く潜伏感染を起こし、再活性化(再発)を繰り返す[82, 83]。このようなHSV感染は、易感染性患者には初感染・再発ともに生命の危機となる。HSV感染症に対するワクチンは未だ開発されておらず、HSV感染症の治療にはアシクロビルなどの抗ヘルペスウイルス剤が使用されているが効力は十分とは言いがたい。従って、HSV感染防御法やHSV病原性の減弱化法の開発には大きな興味を持たれる。

ウイルスの感染・増殖サイクルは、初めに宿主細胞表面の特異的レセプターにウイルスが結合し、細胞内に侵入することから始まる。その後、ウイルス核酸が細胞内へ放出され、ウイルス特異的タンパク質及び核酸が合成され、そして新しいウイルス粒子の形成が行われ、最後にウイルス粒子が細胞外へ放出される。HSVと結合する宿主細胞表面の特異的レセプターには、HVEM (herpes virus entry mediator A) [84, 85]、nectins[86]そして3-O-sulfonated derivatives of heparan sulfate[87]が知られている。HSVはこれらのレセプターと結合し、細胞内に侵入し、核内にそのゲノムを放出する。HSVのウイルスゲノムは約150kbpの線状2本鎖DNAであり、約80種類のタンパク質がコードされている。これらのウイルスタンパク質をコードするウイルス遺伝子はその発現時期によって3群に大別される。最初に遺伝子発現制御因子などの α (ImmediateEarly; IE) 遺伝子群が発現し、次いで主にウイルスゲノムの複製を行う β (Early) 遺伝子群が発現し、最も遅れてカプシドを構成するタンパク質などの γ (Late) 遺伝子群が発現する。これらの発現はカスケード状に制御されている[88]。このようなウイルス因子は、宿主細胞側の多様なタンパク質と相互作用してそれらを制御することによって自己の増殖に利用し、また宿主細胞の防御因子を抑制している。

CIN85の発現は幅広い組織分布を示し、多種のタンパク質と結合する。従って、CIN85がHSVタンパク質と結合したり、CIN85の結合パートナーがHSVタンパク質と結合する可能性は十分予想される。事実、ごく最近、CIN85がICP0と結合することが報告された[89]。また、CIN85と結合するHckは自然免疫に重要な役割を担っている[17, 20-22]。従って、CIN85がHSVの増殖に何らかの関与を及ぼしているか否かは大変興味深い。第3部で報告する研究の目的は、HSV感染におけるCIN85の役割を解明することにある。本セクションでは、CIN85を過剰発現させたHeLa細胞でHSVの感染が抑制されることを示す。



The Homepage of Dr. Edward K. Wagner から、HSVの侵入(左)と放出(右)

第2節 材料と方法

3-2-1 材料

細胞培養用培地として、DMEM (Sigma)、Eagle's MEM medium (MEM; 日水製薬)、F-12 nutrient mixture medium (HAM; GIBCO BRL)、FBS (Gibco BRL) を用いた。形質転換細胞の選択用抗生物質として、Blasticidin S (フナコシ)、zeocin (Invitrogen) 及び geneticin (GIBCO BRL) を用いた。ウサギ抗 CIN85 抗体は 2-2-2 項で述べたものを使用した。HRP 標識抗 V5 抗体は Invitrogen から、HRP 標識抗 FLAG 抗体は Sigma から購入した。抗 HVEM 抗体は Santa Cruz Biotechnology から購入した。HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体は、Cell Signaling Technology から購入して使用した。Lactate dehydrogenase (LDH) 測定用に Cyto Tox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit (Promga) を用いた。

3-2-2 細胞及びウイルス

ヒト cervix adenocarcinoma HeLa 229 (HeLa) 細胞と African green monkey kidney fibroblast Vero (Vero) 細胞は大日本製薬から購入し、10% FBS 添加 DMEM 培地で継代・培養した。Chinese hamster ovary (CHO-K1) 細胞は Health Science Research Resources Bank (HSRRB, Osaka, Japan) から購入し、10% FBS 添加 HAM containing 培地で継代・培養した。

単純ヘルペスウイルス 1 型 HF 株 (ATCC VR-260) 及び単純ヘルペスウイルス 2 型株 (ATCC VR-540) は American Type Culture Collection から購入した。各ウイルスは、2% FBS 添加 MEM 培地で培養されている Vero 細胞中で増殖させ、3 回の凍結融解によってウイルス液を回収した。回収されたウイルス液の力価は、50% 組織培養感染量 (50% tissue culture infectious dose: TCID₅₀) を測定し、HSV-1 が 3.4×10^7 TCID₅₀/ml、HSV-2 が 2.1×10^6 TCID₅₀/ml であった。TCID₅₀ の測定は以下のように行った。96 ウェルマイクロプレートに Vero 細胞を巻き込んでコンフルエントな単層培養細胞を調製した。ウイルス液は 2% FBS 添加 MEM 培地で 10 倍ごと 8 段階の希釈を行った。Vero 細胞の培養上清を取り除き、これにウイルス液の各希釈液を 0.1ml ずつ添加 (n=5) し、37°C で 4 日間培養した。培養後、2% ホルムアルデヒド添加 0.02% クリスタルバイオレット水溶液を加えて細胞を染色・固定した。細胞変性効果 (CPE) を起こしているウェルを陽性として TCID₅₀ を Reed and Munch 法 [90] で算出した。この HSV-1 ウイルス液は Vero 細胞に対して、 2.2×10^7 plaque-formation units (PFU)/ml のプラーク形成能を示した。

3-2-3 発現ベクターの作製

Blasticidin S を選択マーカーに持つ、V5 標識された CIN85 の発現ベクターを以下のように作製した。CIN85 の cDNA フラグメントを pEF1/V5-CIN85 (1-2-4 で作製) から *Bam*HI 及び *Eco*RI で切り出し、pEF6/V5-His C (Invitrogen) の *Bam*HI/*Eco*RI サイトに挿入した (pEF6/V5-CIN85)。pEF1/V5-CIN85-dSH3dPRR、及び FLAG 標識された PRR (FLAG-CIN85-PRR; アミノ酸残基 331-451) と FLAG 標識された 3 つの SH3 ドメイン (FLAG-CIN85-SH3ABC; アミノ酸残基 1-330) のそれぞれ発現ベクターの作成は 1-2-6 で述べた。V5 標識された HVEM の発現ベクター (pcDNA3.1/GS/V5-HVEM, clone ID#, RG000784) は、Invitrogen から購入した。

3-2-4 HeLa 細胞の形質転換

1x10⁷個のHeLa細胞に 10 μgの各発現ベクターをエレクトロポレーションで導入した。2 日間培養後、各細胞培養液に終濃度 2μg/mlのBlasticidin S(pEF6/V5-His C用)または 0.8 mg/mlのgeneticin(pEF1/V5-His C及びpFLAG-CMV-4 用)を加えて各形質転換細胞を選択した。その後、各形質転換細胞のV5-CIN85、V5-CIN85-dSH3dPRR、FLAG-CIN85-PRR及びFLAG-CIN85-SH3ABCの産生能をウェスタンブロットで確認した後、限界希釈によるクローニングを2回行って細胞株を確立した。同様な方法で空ベクターを導入してコントロール細胞とした。確立した細胞株は以下のように称する。Blasticidin Sで選択されたV5-CIN85 産生細胞株及びそのコントロール株をHeLa/V5-CIN85-BS及びHeLa/control-BSと称し、geneticinで選択されたV5-CIN85 産生細胞株及びそのコントロール株をHeLa/V5-CIN85-GN及びHeLa/control-GNと称する。

3-2-5 CHO-K1 細胞の形質転換

CHO-K1細胞は、HeLa細胞と同様な方法でpcDNA3.1/GS/V5-HVEMをエレクトロポレーションで導入し、1 mg/mlのzeocinで選択し、V5-HVEMの産生をウェスタンブロットで確認し、クローニングを行った。その後、HSV-1を感染させ、プラークを形成するクローンを選抜した。これにpEF1/V5-CIN85を導入し、1 mg/mlのzeocinと0.8 mg/mlのgeneticin存在下で選択培養を行い、V5-HVEM及びV5-CIN85の産生をウェスタンブロットで確認し、クローニングを行った(CHO-K1/V5-HVEM/V5-CIN85)。コントロール細胞は同様な方法で空ベクターを導入して作成した(CHO-K1/control; pcDNA3.1/GS及びpEF1C/V5-His Cを導入、CHO-K1/V5-HVEM; pcDNA3.1/GS/V5-HVEM及びpEF1C/V5-His Cを導入、CHO-K1/V5-CIN85; pcDNA3.1/GS及びpEF1/V5-CIN85を導入)。

3-2-6 ウェスタンブロット

細胞抽出液はプロテアーゼ阻害剤(protease inhibitors cocktail, Roche)存在下、M-PER(PIERCE)を用いて細胞を溶解し、遠心分離して調製した。得られた細胞抽出液を1-2-10に示した方法でウェスタンブロットを行い、解析した。免疫沈降は1-2-8に示した方法で行った。

3-2-7 プラークアッセイ

形質転換されたHeLa細胞のコンフルエントな単層培養細胞を12ウェルプレートに調製した。これをMEM培地で1回洗浄した後、0.2mlのHSV-1液(6 x 10² TCID₅₀/0.2ml/well)またはHSV-2液(1.2 x 10⁸ TCID₅₀/0.2 ml/well)を各ウェルに添加して37°Cで1時間反応させた。その後、ウイルス液を取り除き、2mlの0.6%メチルセルロース含有2%FBS添加MEM培地を各ウェルに重層し、HSV-1の場合は3日間、HSV-2の場合は2日間、37°Cで培養した。培養終了後、培養液を取り除き、2%ホルムアルデヒド添加0.02%クリスタルバイオレット水溶液を加えて細胞を染色・固定した後、形成されたプラーク数を計測した(n=3)。CHO-K1形質転換細胞には同様に単層培養細胞を作成し、これをHAM培地で1回洗浄した後、0.2mlのHSV-1液(1.2 x 10⁴ TCID₅₀/0.2 ml/well)を各ウェルに添加して37°Cで1時間反応させた。その後、ウイルス液を取り除き、2mlの0.6%メチルセルロース含有2%FBS添加HAM培地を各ウェルに重層し、4日間、37°Cで培養した。培養終了後、培養液を取り除き、2%ホルムアルデヒド添

加 0.02%クリスタルバイオレット水溶液を加えて細胞を染色・固定した後、形成されたプラーク数を計測した(n=3)。

3-2-8 ウィルス増殖曲線の測定

形質転換されたHeLa細胞のコンフルエントな単層培養細胞を 24 ウェルプレートに調製した。これをMEM培地で 1 回洗浄した後、0.1mlのHSV-1 液(1×10^2 TCID₅₀ / 0.1ml / well)を各ウェルに添加して 37°Cで 1 時間反応させた。その後、ウィルス液を取り除き、1mlの 2%FBS添加MEM培地を各ウェルに重層し、37°Cで培養した。培養 1 日、2 日、3 日、4 日及び 5 日後に、プレートを取り出し、3 回凍結融解を繰り返して、ウィルス粒子を培養細胞及び培養液から回収した(n=3)。回収されたウィルス液の力価を、Vero細胞を用いてTCID₅₀として測定した。

3-2-9 ウィルス感染効率の測定

96 ウェルマイクロプレートに形質転換されたHeLa細胞を 2.5×10^4 cells/well に巻き込み、37 °Cで 16 時間培養した。形成された単層培養細胞を 2%FBS添加MEM培地 1 回洗浄した後、0.1mlのHSV-1 液を各ウェル添加した。添加したHSV-1 液は、10 倍ずつ 8 段階希釈され、各々 2.5×10^4 PFU/well (MOI=1) から 2.5×10^3 PFU/well (MOI= 1×10^{-7})のHSV-1 を含む。37°Cで 1 時間反応させた後、ウィルス液を取り除き、0.1mlの2%FBS添加MEM培地を各ウェルに加え、37°Cで 4 日間培養した。培養後、2%ホルムアルデヒド添加 0.02%クリスタルバイオレット水溶液を加えて細胞を染色・固定した。各希釈段階で 5 ウェルずつ試験した。ウィルス感染効率は、細胞変性効果(CPE)を起こしているウェルを陽性として、5 ウェル中の陽性ウェルの割合で示した。

3-2-10 細胞増殖の測定

96 ウェルマイクロプレートに形質転換されたHeLa細胞を 2×10^3 cells/well に巻き込み、10% FBS添加DMEM培地で 37 °C、5 日間培養した。1 日目、3 日目及び 5 日目に 10 μ lのWST-1 液 (Roche)を加え、450nmの吸光度を測定して細胞数を計測した。

3-2-11 LDH の測定

3-2-9 項と同様に 96 ウェルマイクロプレートに形質転換されたHeLa細胞の単層培養細胞を作成し、形成された単層培養細胞を 2%FBS添加MEM培地 1 回洗浄した後、0.1mlのHSV-1 液を MOI=10 PFU/cellsで各ウェル添加した(2.5×10^5 PFU/0.1 ml/well)。37°Cで 1 時間反応させた後、ウィルス液を取り除き、0.1mlの 2%FBS添加MEM培地を各ウェルに加えた。各々 3、6、9、16 時間培養後に 0.05 mlの培養上清をとり、新しい 96 ウェルマイクロプレートに移して、LDH測定のサンプルとした(n=3)。培養上清中のLDH測定は、キット添付のプロトコールに従って実施した。

3-2-12 統計解析

各群間の平均値の有意差検定は、SAS (Statistical Analysis System)ソフトウェア (SAS Institute Inc.)を用い、Dunnett's t-test によって行った。

第3節 結果

3-3-1 内在性 CIN85 と過剰発現 CIN85 のプラーク形成抑制効果

CIN85 の HSV 感染に対する作用を確かめるために、初めに V5-CIN85 を過剰発現する HeLa 細胞(HeLa/V5-CIN85-BS)を作成したところ、V5-CIN85 の発現レベルが異なる2つのクローンを得た。そこで、これらの V5-CIN85 の発現レベルを内在性 CIN85 の発現レベルと比較した(Fig. 3-1A)。その結果、cl. 1 は内在性 CIN85 の 16 倍、cl. 2 は 2 倍の発現レベルであった。次に、これらの細胞に HSV-1 及び HSV-2 を感染させてプラークを形成させたところ、cl. 1 はコントロール細胞の約 1/2 にプラーク数が減少したが cl. 2 のプラーク数はコントロール細胞と変化なかった(Fig. 3-1B)。従って V5-CIN85 の過剰発現がプラーク形成を抑制したと考えられた。一方、HeLa/V5-CIN85-BS cl. 1 の HSV-1 と HSV-2 のプラーク数の減少効果が類似していたので、以後の試験は HSV-1 のみを用いて実施した。

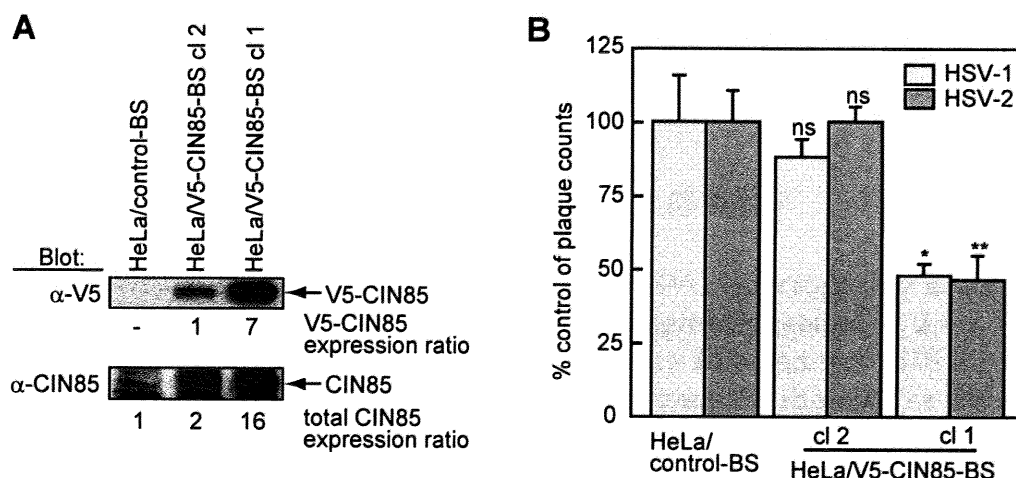


Fig. 3-1 内在性 CIN85 発現量との比較、及び CIN85 過剰発現によるプラーク形成抑制効果

(A) Expression of V5-CIN85 in HeLa/V5-CIN85-BS cells (top) and endogenous or total CIN85 in each cell line (bottom). A 20- μ g sample of each cell lysate was applied to each lane. The ratio of the proteins shown below each track was determined by densitometry (ATTO, Tokyo, Japan). (B) Plaque-formation assays were performed as described in the Materials and Methods section. The numbers of plaques obtained with HSV-1 and HSV-2 are indicated as a % control ratio. The numbers of HSV-1 and HSV-2 plaques on HeLa/control cells were 84.7 ± 13.3 and 181 ± 20.0 , respectively. The data are the means and standard deviations (SDs) from an experiment conducted in triplicate. Significant differences between HeLa/V5-CIN85-BS cells and HeLa/control cells are indicated by asterisks (** $P < 0.01$; ns, not significant).

3-3-2 HeLa/V5-CIN85-BS 細胞の HSV-1 感染効率

次にHSV-1 感染効率をHeLa/V5-CIN85-BS cl. 1 細胞とHeLa/control-BS細胞で比較した。

Fig. 3-2 に示したように、50%の感染効率を示すMOIは、HeLa/V5-CIN85-BS cl. 1 細胞では 2×10^{-3} MOI (PFU/cell) であったのに対して、HeLa/control-BS細胞では 3×10^{-5} MOI (PFU/cell) であった。従って、HeLa/V5-CIN85-BS cl. 1 細胞はコントロール細胞より約 100 倍HSV-1 感染に対する感受性が低いと言える。

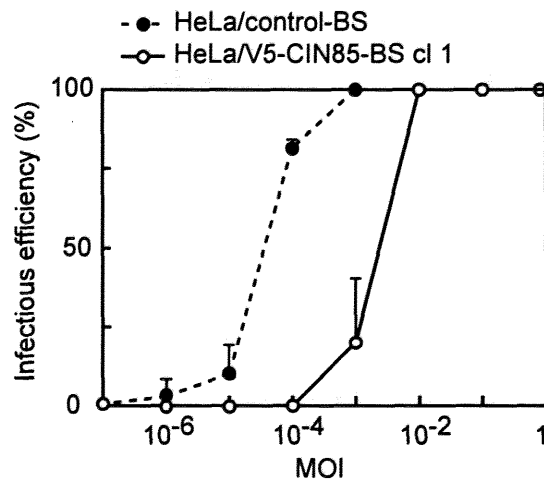


Fig. 3-2 HeLa/V5-CIN85-BS 細胞の HSV-1 感染効率

The sensitivity of HeLa/V5-CIN85-BS cells to HSV-1 infection was determined using confluent monolayers of HeLa transformants, originally seeded at 2.5×10^4 cells/well in 96-well tissue culture dishes. Monolayers were infected with HSV-1 at the MOI, indicated on the x axis, with 5 replicate wells for each dilution. After 1 h at 37 °C, the virus inocula were replaced with 0.1 ml MEM containing 2% FBS. After incubation for 4 days, the medium was removed and the monolayers were stained with 0.02% crystal violet containing 2% formaldehyde to visualize the CPE. The infectious efficiency (y axis) was determined as the percentage of wells detecting a CPE over five wells. Data are the means \pm SDs (n = 3).

3-3-3 形質転換 HeLa 細胞の増殖

宿主細胞の増殖速度や代謝活性の違いがウイルスの増殖に影響を与えることが知られている。HeLa/V5-CIN85-BS cl. 1 細胞は HSV のプラーク形成を抑制したが、この抑制効果が CIN85 の過剰発現による直接の作用であり、過剰発現によって宿主細胞の増殖速度や代謝活性に影響を与えていないことを確かめるために、HeLa/V5-CIN85-BS cl. 1 細胞と HeLa/control-BS 細胞の増殖速度を WST-1 を用いて比較した。その結果、両細胞間に増殖速度に差はなかった (Fig. 3-3)。従って、HeLa/V5-CIN85-BS cl. 1 細胞は V5-CIN85 の過剰発現によって宿主細胞の増殖速度や代謝活性に影響を与えていない。

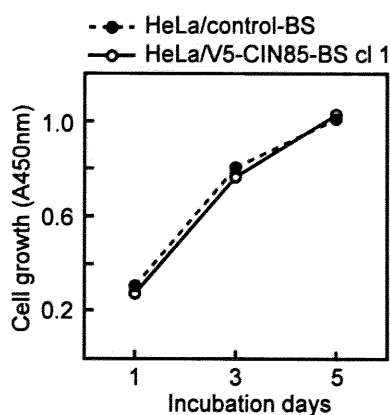


Fig. 3-3 増殖速度の比較

Growth of HeLa/V5-CIN85-BS and HeLa/control-BS cells. Cells were plated into 96-well tissue-culture dishes at 2×10^3 cells/100 μ l in DMEM containing 10% FBS. After incubation for 1, 3 and 5 days, 10 μ l WST-1 was added in each well and incubated for 2 h, and absorbance at 450 nm was measured.

3-3-4 Geneticin 耐性クローンも HSV-1 プラーク形成を抑制する

CIN85 の過剰発現が HSV 増殖を抑制することを更に確認するために、Blasticidin S 耐性誘導ベクター(pEF6/V5-His C)以外に geneticin 耐性誘導ベクター(pEF1/V5-His C)を用いて CIN85 を過剰発現する HeLa 細胞(2 クローン; HeLa/V5-CIN85-GN)を作成した。Fig. 3-4 に作成した形質転換細胞の V5-CIN85 産生を解析した結果を示した。次に、これらの細胞に HSV-1 を感染させ、プラーク形成数をコントロール細胞(HeLa/control-GN)と比較した。その結果、HeLa/V5-CIN85-GN 細胞は 2 クローンとも HeLa/V5-CIN85-BS 細胞と同じように HSV-1 によるプラーク形成を抑制した(Fig. 3-5)。従って、HeLa 細胞における CIN85 の過剰発現は発現ベクターの違い、及び誘導される抗生物質耐性に依存しなかった。

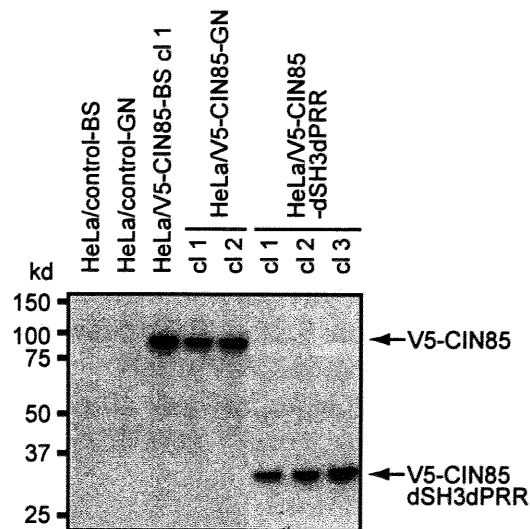


Fig. 3-4 形質転換 HeLa 細胞発現タンパク質の確認

Expression of V5-CIN85 in HeLa/V5-CIN85-BS and HeLa/V5-CIN85-GN cells, and expression of V5-CIN85-dSH3dPRR in HeLa/V5-CIN85-dSH3dPRR cells, in western blots. A 20- μ g sample of each cell lysate was applied to each lane.

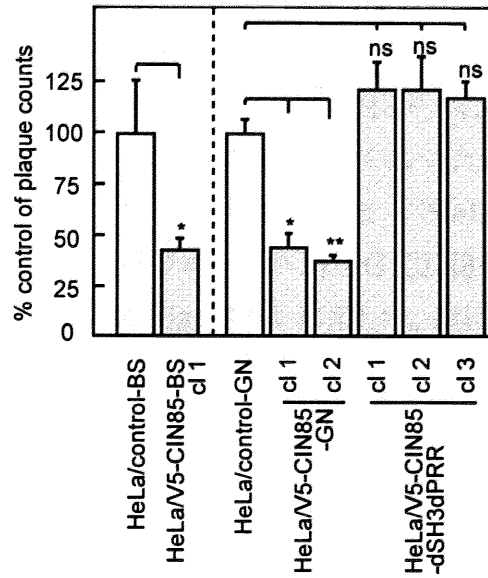


Fig. 3-5 V5-CIN85 及び V5-CIN85-dSH3dPRR 過剰産生 HeLa 細胞の HSV-1 プラーク形成

Effects of V5-CIN85 and V5-CIN85-dSH3dPRR expression of HSV-1 plaque formation. Plaque formation assays were performed as described in the Materials and Methods section. The numbers of plaques obtained with HSV-1 are expressed as the % of control plaques. Data are the means \pm SDs ($n = 3$). The numbers of plaques on HeLa/control-BS and HeLa/control-GN cells were 50.0 ± 12.3 and 59.3 ± 4.9 , respectively. Significant differences between HeLa/V5-CIN85-BS, HeLa/V5-CIN85-GN or HeLa/V5-CIN85-dSH3dPRR cells and HeLa/control cells are indicated by asterisks (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; ns, not significant).

3-3-5 V5-CIN85-dSH3dPRR の過剰産生は HSV-1 プラーク形成を抑制しない

CIN85 は 3 つの SH3 ドメインと PRR を持つアダプター分子である。アダプター機能は SH3 ドメインと PRR に由来しているため、CIN85 の HSV プラーク形成抑制作用がアダプター機能に由来するか否かを調べるために、3 つの SH3 ドメインと PRR を欠いた CIN85-dSH3dPRR を発現する HeLa 細胞(HeLa/V5-CIN85-dSH3dPRR)を作成し、これに HSV-1 を感染させた。V5-CIN85-dSH3dPRR のウェスタンブロットによる発現解析を Fig. 3-4 に、HSV-1 によるプラーク形成数を Fig. 3-5 に示した。独立した 3 つのクローンについて試験したが、いずれのクローンも HSV プラーク形成抑制作用を示さなかった。従って、CIN85 のアダプター機能が HSV プラーク形成抑制作用に必要であることが示唆された。一方、細胞内におけるタンパク質の過剰発現は、宿主細胞のストレスとなり、ウィルスの増殖に影響を与える可能性がある。しかし、V5-CIN85-dSH3dPRR の過剰発現はウィルスの増殖に影響を与えなかった。従って、V5-CIN85 の HSV プラーク形成抑制作用は、タンパク質の過剰発現による宿主細胞のストレスによるものではなく、V5-CIN85 の機能によるものと考えられる。

3-3-6 CIN85 の PRR がウイルス増殖抑制に重要であり、SH3ドメインは不要である

前項(3-3-5)で、アダプター機能を欠いた V5-CIN85-dSH3dPRR の過剰発現がウイルスの増殖に影響を与えなかったことから、CIN85 のアダプター機能がウイルス増殖抑制に機能している可能性が示された。従って、次にアダプター機能を担う 3 つの SH3ドメインと PRR のどちらか、または両方がウイルス増殖抑制に必要と考えられたので、3 つの SH3ドメインまたは PRR を単独で発現する HeLa 細胞をそれぞれ 3 クローンずつ作成した (HeLa/FLAG-CIN85-SH3ABC 、及び HeLa/FLAG-CIN85-PRR)。これらのクローンの FLAG-CIN85-SH3ABC 及び FLAG-CIN85-PRR のウェスタンブロットによる発現解析を Fig. 3-6A に示した。次に、これらのクローンに HSV-1 を感染させ、プラーク形成数を調べたところ、HeLa/FLAG-CIN85-PRR 細胞は 3 つのクローンともプラーク形成を抑制したが、HeLa/FLAG-CIN85-SH3ABC 細胞は変化しないか、むしろ増加傾向にあった(Fig. 3-6B)。従って、CIN85 のウイルス増殖抑制作用には、その PRR が重要であり、3 つの SH3ドメインは不要であった。

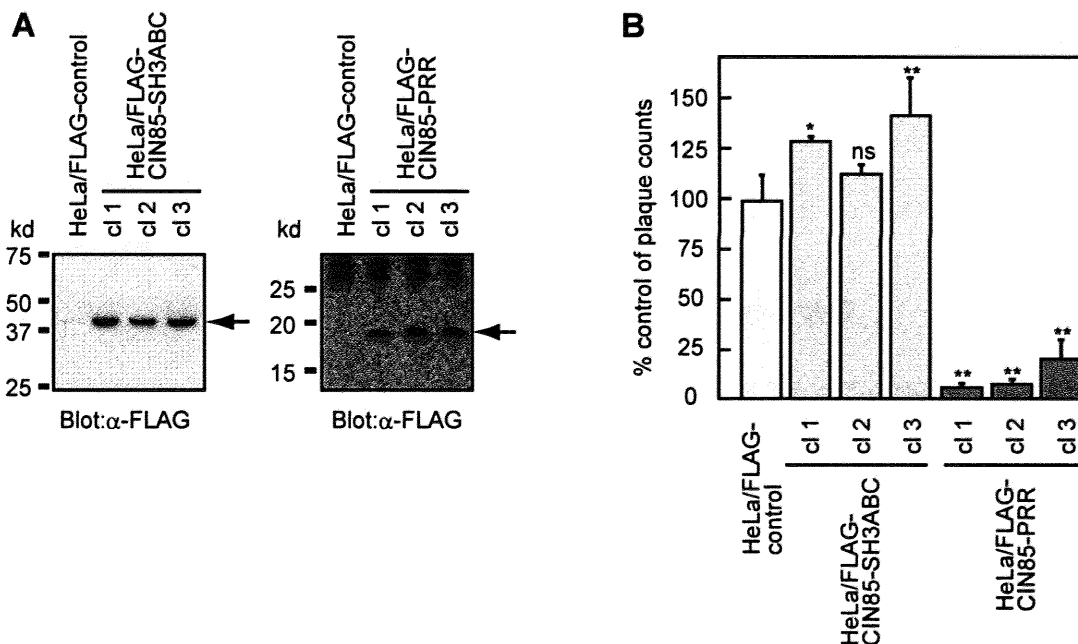


Fig. 3-6 CIN85 の PRR がウイルス増殖抑制に重要であり、SH3ドメインは不要である

The PRR, and not the SH3 domains, of CIN85 suppressed plaque formation by HSV-1 in HeLa cells. (A) Expressions of FLAG-CIN85-SH3ABC (left) and FLAG-CIN85-PRR (right), in western blots. A 20- μ g sample of each cell lysate was applied to each lane. (B) Plaque formation assays were performed as described in the *Materials and Methods* section. The numbers of plaques obtained with HSV-1 are expressed as the % of control plaques. Data shown are the means \pm SDs (n = 3). The number of plaques on HeLa/FLAG-control was 73.3 ± 10.4 . Significant differences between HeLa/FLAG-CIN85-SH3ABC or HeLa/FLAG-CIN85-PRR cells and HeLa/FLAG-control cells are indicated by asterisks (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; ns, not significant).

3-3-7 CIN85-PRR 発現 HeLa 細胞の HSV-1 感染効率

次に 3-3-2 項と同様の方法で、HeLa/FLAG-CIN85-PRR 細胞の HSV-1 感染効率を HeLa/FLAG-control 細胞及び HeLa/FLAG-CIN85-SH3ABC 細胞と比較した(Fig. 3-7)。その結果、プラーク形成の場合と同じように、HeLa/FLAG-control 細胞と HeLa/FLAG-CIN85-SH3ABC 細胞の HSV-1 感染効率は類似していたが、HeLa/FLAG-CIN85-PRR 細胞の HSV-1 感染効率は前 2 者と比較して、約 100 倍低下していた。コントロール細胞からの感染効率の低下度合いは、HeLa/V5-CIN85-GS 細胞と HeLa/FLAG-CIN85-PRR 細胞は同じであった。

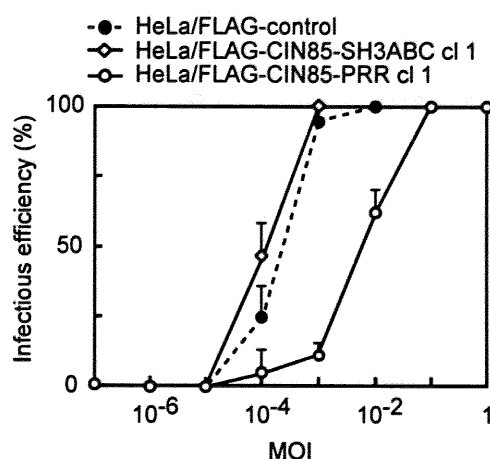


Fig. 3-7 HeLa/FLAG-CIN85-PRR 細胞の HSV-1 感染効率

The sensitivity of HeLa/FLAG-CIN85-PRR and HeLa/FLAG-CIN85-SH3ABC cells to HSV-1 infection were tested. Experiments were performed as described in the legend to Fig. 3-2.

3-3-8 HSV-1 増殖曲線(replication)の比較

ここまでは、CIN85 の HSV 増殖抑制作用をプラーク形成法によって試験してきた。しかし、プラークの大きさには大小があり、またプラークを形成するのに必要な細胞内のウィルス粒子数も細胞株間で同じとは限らない。従って、CIN85 の HSV 増殖抑制作用をさらに正確に調べるために、形質転換 HeLa 細胞を宿主にして、HSV-1 の増殖を経日的に測定した。HSV-1 の力価は Vero 細胞に対する TCID₅₀ 値として測定した。HeLa/V5-CIN85-BS 細胞とそのコントロール細胞、HeLa/FLAG-CIN85-PRR 細胞とそのコントロール細胞をそれぞれ比較したところ、いずれもコントロール細胞中の HSV-1 増殖に比較して、2 日目以降、約 1/100 に増殖が抑制されていた(Fig. 3-8A 及び B)。この抑制度合いは、これらの形質転換細胞の HSV-1 感染効率の差(3-3-2 及び 3-3-7)と類似していた。

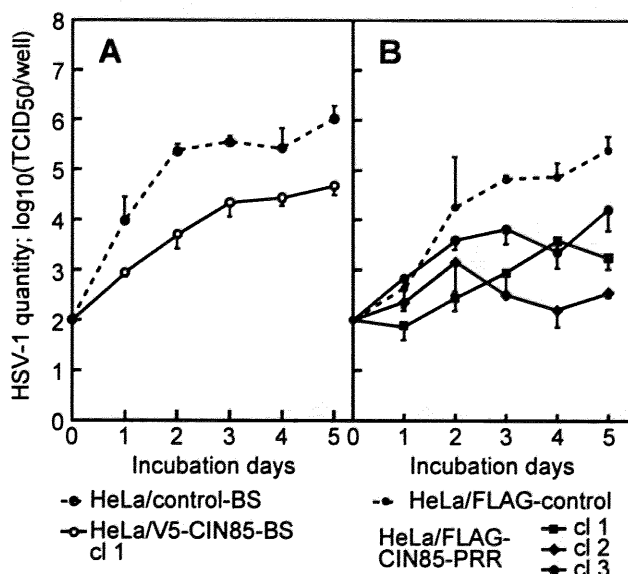


Fig. 3-8 形質転換細胞中での HSV-1 増殖曲線

Inhibition of HSV-1-replication by CIN85 expression in HeLa cells was shown. An HSV-1-replication assay was performed as described in the *Materials and methods* section. The quantities of HSV-1 were indicated as TCID₅₀ values (y axis). Solid lines indicate HSV-1 quantity in HeLa/V5-CIN85-BS cells (A) and HeLa/FLAG-CIN85-PRR cells (B). Dotted lines indicate HSV-1 quantity in each of the HeLa/control cells. Data are the means \pm SDs (n = 3).

3-3-9 CHO-K1 形質転換細胞の HSV-1 感染

CHO-K1 細胞は天然には HSV の細胞内侵入に抵抗性を示す細胞株である。しかし、HVEM などの HSV レセプターを導入・発現させると HSV の侵入に感受性となり、細胞内で HSV は増殖する。従って、CHO-K1 細胞を用いた HSV 感染系は、HSV の細胞内侵入に関する研究に有用である[84]。我々はこの細胞系を用いて、CIN85 が HSV の侵入段階に関与しているか否かを検討した。すなわち、CHO-K1 細胞に HVEM を導入して HSV 感染に対して感受性を示す細胞株を作製し、更に、これに CIN85 を導入して、HSV-1 の増殖が抑制されるか否かを試験した。CHO-K1 細胞に発現させた V5-HVEM 及び V5-CIN85 のウェスタンブロット解析の結果を Fig. 3-9B (下段) に示した。CHO-K1 細胞への HSV-1 の接種量は HeLa 細胞への場合の 20 倍量を接種した。Fig. 3-9A に示したように、CHO-K1/control 及び CHO-K1/V5-CIN85 細胞はプラークをほとんど形成しなかった。一方、CHO-K1/V5-HVEM 及び CHO-K1/V5-HVEM/V5-CIN85 細胞はプラークを形成したが、形成されたプラーク数は CIN85 を発現した CHO-K1/V5-HVEM/V5-CIN85 細胞は CHO-K1/V5-HVEM 細胞の約 1/2 に抑制されていた。従って、CIN85 は、HeLa 細胞の場合と同様に CHO-K1 細胞中でも HSV-1 の増殖を抑制した。次に、CIN85 が HSV の侵入段階に関与しているか否かを確認するために、HVEM と CIN85 が結合しているか否かを試験した。CHO-K1/V5-HVEM/V5-CIN85 細胞の細胞抽出液を抗

HVEM 抗体で免疫沈降し、免疫複合体をウェスタンブロットで解析したところ、V5-CIN85 は共沈しなかった(Fig. 3-9B)。従って、HVEMとCIN85は直接に結合しておらず、CIN85はHSVの侵入段階を阻害していない。

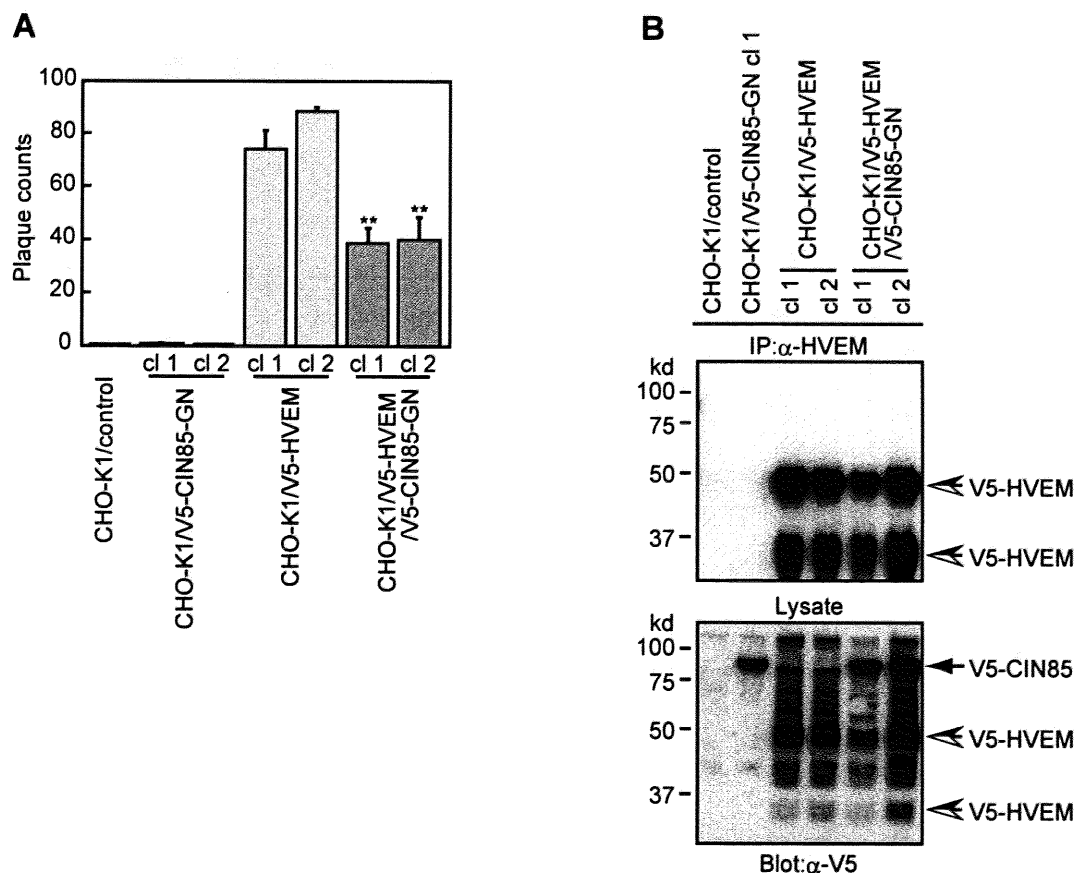


Fig. 3-9 CHO-K1 細胞中でも CIN85 は HSV-1 増殖を抑制する

Inhibition of HSV-1 growth by CIN85 in CHO-K1 cells expressing V5-HVEM does not involve a direct interaction between CIN85 and HVEM. (A) Plaque formation assays were performed as described in the *Materials and Methods* section. Two clones from each transfection were tested. HSV-1 was inoculated at 1.2×10^4 TCID₅₀/well and incubated for 4 days. Data shown are the means \pm SDs ($n = 3$). Significant differences between CHO-K1/V5-HVEM/V5-CIN85 and CHO-K1/V5-HVEM cells are indicated by asterisks (** $P < 0.01$). (B) One-mg aliquots of cell lysates from each CHO-K1 transformant were immunoprecipitated with 10 μ g anti-HVEM antibody. Western blots of the immunoprecipitates were probed with anti-V5 antibody (top panel). To determine the expression of V5-HVEM and V5-CIN85 in each cell line, a 20- μ g sample of each cell lysate was applied on each lane (bottom).

3-3-10 高濃度 HSV 感染による CIN85 の効果

これまで、CIN85 の HSV 増殖抑制作用は低濃度の HSV 感染条件下で測定してきた(例えば Fig. 3-8 では MOI は 0.0002 pfu/cell である)。次に高濃度で HSV を感染させ(MOI=10)、感染後の細胞死に与える CIN85 の効果を検討した。細胞死は遊離する LDH を測定して比較した。Fig. 3-10 に示すように、遊離した LDH は HeLa/V5-CIN85-BS 細胞の方がコントロール細胞に比べて多く、従って HeLa/V5-CIN85-BS 細胞は HSV-1 感染後にコントロール細胞に比べて早く細胞死を迎えた。

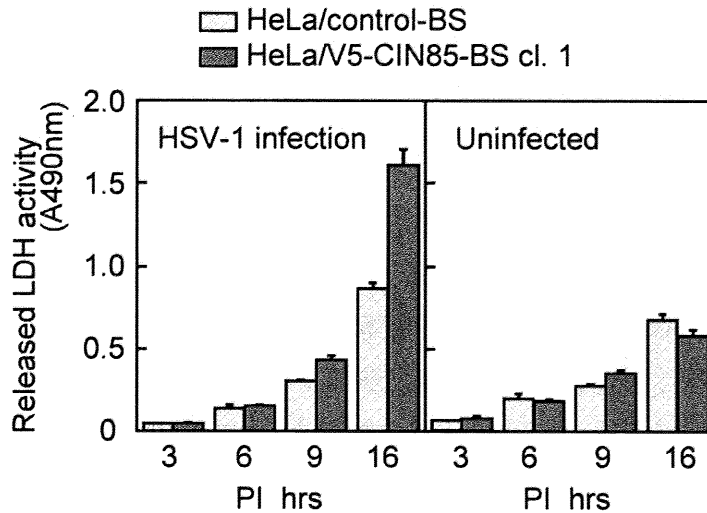


Fig. 3-10 HSV-1 感染後の LDH 遊離

Time distribution of LDH release after HSV-1 infection in HeLa/V5-CIN85-BS (shaded bars) and HeLa/control-BS cells (open bars). At 3, 6, 9 and 16 hours PI, 0.05 ml of medium was pooled and LDH activity in the medium was determined using Cyto Tox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit (Promega). The right panel indicates HSV-1 infected cells and the left panel shows uninfected cells. The data are the means and SDs from an experiment conducted in triplicate.

第4節 考察

本研究でCIN85の過剰発現がHSVの増殖を抑制することを見出した。そして、この事実を以下の実験によって確実なものとして示した。

- (1) CIN85の発現量に応じてHSV増殖の抑制効果が得られること(Fig. 3-1)。
- (2) 形質転換細胞の増殖が変化しないこと(Fig. 3-3)。
- (3) 発現ベクターを変えて過剰発現させてもHSVの増殖を抑制すること(Fig. 3-5)。
- (4) V5-CIN85-dSH3dPRRの過剰発現がHSVの増殖を抑制しないこと(Fig. 3-5)。
- (5) プラーク形成抑制だけでなく、複製(replication)も抑制すること(Fig. 3-8)。

次に、CIN85のアダプター機能を担う2つの機能ドメインのうち、HSVの増殖抑制には3つのSH3ドメインは不要で、PRRが重要であり、PRR単独でHSVの抑制効果を示した。PRRはSrc family kinaseを含む多くのタンパク質のSH3ドメインと結合する。SH3ドメインアレイを用いた実験でも多くのPRR結合パートナーを示している(1-3-7項、Fig. 1-9)。従ってこれらのPRR結合パートナーがHSV増殖に関与しているかもしれない。一方、PRRとSH3ドメインの結合機構は良く研究されている[53, 91]ので、CIN85-PRRのHSV増殖抑制メカニズム解明を進めることによって、そのメカニズムを抗HSV活性化化合物スクリーニングシステム開発に応用できる可能性が考えられる。

CIN85のHSV増殖抑制メカニズム解明の第一歩として、HSVの細胞内侵入過程阻害を検討した。HSVの細胞への侵入は、細胞表面のレセプターとウィルスのエンベロープの結合から始まり、次いで細胞膜と融合し、そして細胞内へ侵入する。最初のHSVと細胞の結合は、ウィルス外殻の糖タンパク質、gCとgBが細胞表面のヘパラン硫酸と結合する。次にgDが細胞表面のレセプターに結合する[92]。このレセプターにはHVEM (herpes virus entry mediator A) [84, 85]、nectins[86]そして3-O-sulfonated derivatives of heparan sulfate[87]が知られている。HVEMはHveAとも呼ばれ、TNFR superfamilyに属するレセプター(TNFRSF14)でその生理的なりガンドはlymphotoxin- α とTNF様リガンドのLIGHTが知られている[93]。HVEMはリガンドが結合することによってNF- κ BとAP-1転写活性化経路を、TRAFs、特にTRAF2とTRAF5を介して活性化する[94]。TRANCEレセプターのシグナル伝達経路で、SrcはTRAF1とTRAF6に結合してシグナルを伝達する[73]。さらに第2部でSrcがTRAF1に結合し、CIN85がSrcとの結合を介してTNFR1のシグナル伝達複合体に含まれることが明らかになった。従って、CIN85は、TRAFsとSrc family kinaseの複合体を介して、HVEMシグナリング経路に含まれる可能性が考えられる。すなわち、HSVがHVEMの細胞外領域に結合することによってHVEMから始まるシグナル伝達下流に、CIN85が何らかの影響を与えることによってHSVの感染を抑制する可能性が考えられる。この仮説をもとに、CHO-K1細胞を用いたHSV-1感染系でCIN85の効果を調べたところ、CIN85はCHO-K1細胞中でもHSV-1の増殖を抑制した。しかし、免疫沈降でHVEMとCIN85は共沈しなかったことから、CIN85はHVEMを介したHSV侵入過程に関与していないと結論付け、むしろCIN85はHSVの細胞内侵入以降の過程でHSV増殖に関与していると考えられた。

本研究では、CIN85のHSV増殖抑制メカニズムを解明するに到らなかった。HSVゲノムには約80種類のタンパク質がコードされており、それらはHSVが細胞に感染すると、細胞内でのHSVの増殖段階に呼応してそれぞれが発現される。そして、宿主因子とインタラクションし、また宿主機能を制

御している。このような宿主の一つが CIN85 である可能性が考えられる。最近、HSV-1 のタンパク質の一つ、ICP0 (infected cell protein 0)が CIN85 及び Cbl と結合し、細胞表面からの EGF レセプターのエンドサイトーシスを修飾することが報告された[89]。ICP0 は、ウィルス感染後のごく初期 (immediately early phase) に発現し、培養細胞系でのウィルス増殖に必須ではないが、増殖期の遺伝子発現及び潜伏感染からの再活性化の両方を制御し、かつ病原性にも関与している重要なウィルス因子である[95]。一方、CIN85 が HSV の他のタンパク質ともインタラクションしている可能性がある。一つの興味深いタンパク質として、HSV-2 の ribonucleotide reductase (ICP10)があげられる。このタンパク質はセリン/スレオニンキナーゼ活性を持ち、ウィルス感染によって宿主細胞が引き起こすアポトーシスを妨げる機能を示す[96, 97]。さらに SH3 ドメイン結合部位を持ち、Grb2 と結合する[98]。CIN85 も Grb2 と結合する[41, 43, 44]。従って、CIN85 は ribonucleotide reductase の機能を阻害することによって HSV タンパク質が示す「アポトーシスを妨げる機能」を抑制し、HSV の増殖を抑制する、という仮説が考えられる。すなわち、HSV が感染後、細胞内で十分に増殖する時間を与えずに宿主細胞が死を迎え、結果として HSV の増殖が抑制される。CIN85 過剰発現細胞は HSV-1 感染によってコントロール細胞よりも早く死ぬ (Fig. 3-10)ことから、この仮説は追求する価値があると考えられる。

CIN85 の HSV 増殖抑制メカニズムを解明するには更なる検討が必要であるが、本研究によって、CIN85 が HSV の増殖に関与していることが明らかになった。

総括

Src family kinase は非レセプター型のチロシンキナーゼで種々のレセプターからの下流で重要な役割を担っている。本研究の目的は Src family kinase が関与するシグナル伝達制御機構を明らかにし、この制御機構の異常に基づくと考えられる疾患の病因の解明に手がかりを提供し、かつ、この領域を標的とする創薬研究に役立てることである。そして Src family kinase からのシグナル伝達下流に位置する分子に着目し、そのクローニングを行って一つの新規アダプタータンパク質を同定した。以下に本研究で明らかになった結果を総括する。

- (1) 酵母 2-ハイブリッド法により、Src family kinase の一員である Hck の SH3 ドメインに結合する新規タンパク質をコードする遺伝子 SH3KBP1 を見出し、クローニングした。SH3KBP1 は CIN85 と CIN85-dSH3AB の 2 つのタンパク質をコードしており、X 染色体の p22.1→p21.6 にマッピングされた。
- (2) CIN85 は広く各種組織及び各種細胞株に発現しており、Src family kinase 全般に結合する。また CIN85 の PRR は Src family kinase の他にも多様な SH3 ドメイン含有タンパク質に結合可能であった。よって、Src family kinase が関与するシグナル伝達に幅広く関与している可能性が示唆された。
- (3) CIN85 は CEM 細胞において、TNF- α によって誘導されるアポトーシスを促進した。しかし、CD95 によって誘導されるアポトーシスには影響しなかった。CIN85 は Src と複合体を形成し、Src を介して TNFR1 及び TRAF1 に結合して TNFR1 シグナル伝達複合体に含まれていた。
- (4) CIN85 の TNF- α 誘導アポトーシス促進効果に CIN85 の SH3 ドメインが必須であり、PRR も必要であったことから、CIN85 のアダプター機能が重要であった。更に CIN85 は Cbl と構成的に複合体を形成し、この複合体は TNF- α 刺激によって Src にリクルートされた。よって、Src-CIN85-Cbl 複合体が TNFR1 シグナル伝達複合体に含まれ、TNFR1 からの Src を介するシグナル伝達を修飾していると示唆された。
- (5) CIN85 の TNF- α 誘導アポトーシス促進効果は Src を介する TNF- α の生存シグナルの抑制によるもので、NF- κ B、ERK 及び JNK の活性化には無関係であり、Akt の活性化抑制の可能性が示唆された。
- (6) CIN85 は HeLa 細胞において、HSV 増殖を抑制した。この増殖抑制効果の本質は PRR であり、SH3 ドメインは HSV の増殖を抑制しなかった。
- (7) CIN85 は CHO-K1 細胞中でも HSV-1 の増殖を抑制した。しかし、CIN85 は HVEM と結合しなかったことから、HVEM を介する HSV-1 の細胞内侵入は阻害せず、侵入後の増殖過程を阻害していると考えられた。

以上の結果から Src family kinase と CIN85 の役割を総括する。CIN85 は EGFR などの RTK からのシグナル伝達において Cbl と複合体を形成し、Cbl-CIN85-endophilin 複合体によるシグナル伝達系によってレセプターのエンドサイトーシスを促進し、また Cbl はユビキチン化によってタンパク質

の分解に関与していることが知られている。従って、CIN85 は Cbl とともに RTK のネガティブ制御に係わっていることが報告されている[57]。一方、非チロシンキナーゼ型のレセプターでは Src family kinase を代表とする膜結合型のチロシンキナーゼがシグナル伝達に働いていると考えられている。本研究では TNF- α 刺激において Src family kinase から Cbl に至る Src-CIN85-Cbl 複合体によるシグナル伝達系を明らかにした。さらに詳細は不明であるが Src-CIN85-Cbl 複合体が Akt の活性化をネガティブに制御する可能性を示した。Src の異常な活性化は発ガンと大きな関係がある。また、EGFR のリン酸化を標的とした抗ガン剤 (Iressa など) も臨床応用されている。従って Src の活性化に伴う Akt の活性化制御機構の解明は発ガン制御の一助となることを期待したい。

一方、メカニズムは不明であるが、CIN85 の HSV 抑制効果は非常に興味深い。また、CIN85 の PRR が HSV の増殖を抑制したことは、この PRR が HSV の増殖に必要な何れかのタンパク質に結合して HSV の増殖阻害を起こしていると考えられる。これらは抗ヘルペス剤探索において新しい標的のヒントを与えるものである。

以上、CIN85 は Src family kinase (特に Hck) 及び Cbl と複合体を形成し、細胞内においてこれまでに報告されている以外にも多様な役割を演じていると考えられる。よって、これらの機構を解明することが新しい創薬の手がかりになることを期待して総括を終える。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、終始ご指導、ご助言を賜りました、国立感染症研究所免疫部第二室谷山忠義室長に心より感謝いたします。

また、本稿をまとめるにあたり、ご指導、ご助言を賜りました、千葉大学大学院自然科学研究科安藤昭一教授、ならびに千葉大学真菌医学研究センター長三上襄教授に深く感謝いたします。

本研究の初期に、ご援助、ご助言を頂きました、大阪薬科大学衛生化学教室天野富美夫教授に感謝いたします。

本研究を遂行する機会を与えて頂きました、エスエス製薬株式会社沼田洋取締役(現、久光製薬株式会社)、ならびに宮下晶中央研究所長(現、久光製薬株式会社)に深謝いたします。

また、終始ご援助、ご助言をいただきましたエスエス製薬株式会社中央研究所浅岡健光部長に深く感謝いたします。さらに、本研究中、終始暖かいご援助ご協力をいただきました、旧微生物研究室の皆様心から感謝いたします。

引用文献

- [1] H. Take, S. Watanabe, K. Takeda, Z.-X. Yu, N. Iwata, S. Kajigaya, Cloning and characterization of a novel adaptor protein, CIN85, that interacts with c-Cbl, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268 (2000) 321-328.
- [2] P. Kefalas, T. R. P. Brown, P. M. Brickell, Signalling by the p60^{c-src} family of protein-tyrosine kinases, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27 (1995) 551-563.
- [3] W. Xu, S. C. Harrison, M. J. Eck, Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src, *Nature* 385 (1997) 595-602.
- [4] M. A. Young, S. Gonfloni, G. Superti-Furga, B. Roux, J. Kuriyan, Dynamic coupling between the SH2 and SH3 domains of c-Src and Hck underlies their inactivation by C-terminal tyrosine phosphorylation, *Cell* 105 (2001) 115-126.
- [5] N. Quintrell, R. Lebo, H. Varmus, J. M. Bishop, M. J. Pettenati, M. M. Le Beau, M. O. Diaz, J. D. Rowley, Identification of a human gene (HCK) that encodes a protein-tyrosine kinase and is expressed in hemopoietic cells, *Mol. Cell. Biol.* 7 (1987) 2267-2275.
- [6] S. F. Ziegler, J. D. Marth, D. B. Lewis, R. M. Perlmutter, Novel protein-tyrosine kinase gene (*hck*) preferentially expressed in cells of hematopoietic origin, *Mol. Cell. Biol.* 7 (1987) 2276-2285.
- [7] P. Soriano, C. Montgomery, R. Geske, A. Bradley, Targeted disruption of the *c-src* proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice, *Cell* 64 (1991) 693-702.
- [8] R. Nimmanapalli, K. Bhalla, Novel targeted therapies for Bcr-Abl positive acute leukemias: beyond STI571, *Oncogene* 21 (2002) 8584-8590.
- [9] T. Ishizaki, N. Uehara, I. Tamechika, J. Keel, K. Nonomura, M. Maekawa, S. Narumiya, Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases, *Mol. Pharmacol.* 57 (2000) 976-983.
- [10] M. Honjo, H. Tanihara, M. Inatani, N. Kido, T. Sawamura, B. Y. Yue, S. Narumiya, Y. Honda, Effects of rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 on intraocular pressure and outflow facility, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42 (2001) 137-144.
- [11] S. Soga, L. M. Neckers, T. W. Schulte, Y. Shiotsu, K. Akasaka, H. Narumi, T. Agatsuma, Y. Ikuina, C. Murakata, T. Tamaoki, S. Akinaga, KF25706, a novel oxime derivative of radicicol, exhibits in vivo antitumor activity via selective depletion of Hsp90 binding signaling molecules, *Cancer Res.* 15 (1999) 2931-2938.
- [12] A. Maloney, P. Workman, HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds, *Expert Opin. Biol. Ther.* 2 (2002) 3-24.
- [13] P. L. Schwartzberg, L. Xing, O. Hoffmann, C. A. Lowell, L. Garrett, B. F. Boyce, H. E. Varmus, Rescue of osteoclast function by transgenic expression of kinase-deficient Src in *src*^{-/-} mutant mice, *Genes. Dev.* 11 (1997) 2835-2844.
- [14] S. V. Sharma, C. Oneyama, Y. Yamashita, H. Nakano, K. Sugawara, M. Hamada, N. Kosaka, T. Tamaoki, UCS15A, a non-kinase inhibitor of Src signal transduction, *Oncogene* 20 (2001) 2068-2079.
- [15] C. Oneyama, H. Nakano, S. V. Sharma, UCS15A, a novel small molecule, SH3 domain-mediated protein-protein interaction blocking drug, *Oncogene* 21 (2002) 2037-2050.
- [16] C. Oneyama, T. Agatsuma, Y. Kanda, H. Nakano, S. V. Sharma, S. Nakano, F. Narazaki, K. Tatsuta, Synthetic inhibitors of proline-rich ligand-mediated protein-protein interaction. Potent analogs of UCS15A, *Chem. Biol.* 10 (2003) 443-451.
- [17] F. Meng, C. A. Lowell, Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn, *J. Exp. Med.* 185 (1997) 1661-1670.
- [18] E.-N. N'Diaye, X. Darzacq, C. Astarie-Dequeker, M. Daffe, J. Calafat, I. Maridonneau-Parini, Fusion of Azurophil granules with phagosomes and activation of the tyrosine kinase Hck are specifically inhibited during phagocytosis of Mycobacteria by human neutrophils, *J. Immunol.* 161 (1998) 4983-4991.

- [19] S. F. Ziegler, C. B. Wilson, R. M. Perlmutter, Augmented expression of a myeloid-specific protein tyrosine kinase gene (*hck*) after macrophage activation, *J. Exp. Med.* 168 (1988) 1801-1810.
- [20] C. A. Lowell, P. Soriano, H. E. Varmus, Functional overlap in the *src* gene family: inactivation of *hck* and *fgr* impairs natural immunity, *Genes. Dev.* 8 (1994) 387-398.
- [21] C. J. Fitzner-Attas, M. Lowry, M. T. Crowley, A. J. Finn, F. Meng, A. L. DeFranco, C. A. Lowell, Fc γ receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases *Hck*, *Fgr*, and *Lyn*, *J. Exp. Med.* 191 (2000) 669-681.
- [22] C. A. Lowell, G. Berton, Resistance to endotoxic shock and reduced neutrophil migration in mice deficient for Src-family kinases *Hck* and *Fgr*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 7580-7584.
- [23] M. Ernst, M. Inglese, G. M. Scholz, K. W. Harder, F. J. Clay, S. Bozinovski, P. Waring, R. Darwiche, T. Kay, P. Sly, R. Collins, D. Turner, M. L. Hibbs, G. P. Anderson, A. R. Dunn, Constitutive activation of the Src family kinase *Hck* results in spontaneous pulmonary inflammation and an enhanced innate immune response, *J. Exp. Med.* 196 (2002) 589-604.
- [24] C.-H. Lee, B. Leung, M. A. Lemmon, J. Zheng, D. Cowburn, J. Kuriyan, K. Saksela, A single amino acid in the SH3 domain of *Hck* determines its high affinity and specificity in binding to HIV-1 Nef protein, *EMBO J.* 14 (1995) 5006-5015.
- [25] K. Tokunaga, E. Kiyokawa, M. Nakaya, N. Otsuka, A. Kojima, T. Kurata, M. Matsuda, Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 virion entry by dominant-negative *Hck*, *J. Virol.* 72 (1998) 6257-6259.
- [26] S. Arold, R. O'Brien, P. Franklin, M.-P. Strub, F. Hoh, C. Dumas, J. E. Ldbury, RT loop flexibility enhances the specificity of *src* family SH3 domains for HIV-1 Nef, *Biochemistry* 37 (1998) 14683-14691.
- [27] T. Narita, T. Matsumoto, K. Mogi, K. Kukita, R. Kawahara, T. Nakashima, Deacetylavidomycin N-oxide, a new antibiotic. Taxonomy and fermentation of the producing organism and isolation, structure and biological properties of the antibiotic, *J. Antibiot.* 42 (1989) 347-356.
- [28] T. Nishimura, T. Narita, E. Miyazaki, T. Ito, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, J. A. Martial, E. J. Bellefroid, H. Vissing, T. Taniyama, Characterization of the human Fc γ RIIB gene promoter: human zinc-finger proteins (ZNF140 and ZNF91) that bind to different regions function as transcription repressors, *Int. Immunol.* 13 (2001) 124-251.
- [29] S. N. Sehgal, H. Czerkawski, A. Kudelski, K. Pandev, R. Saucier, C. Vezina, Ravidomycin (AY-25,545), a new antitumor antibiotic, *J. Antibiot.* 36 (1983) 355-361.
- [30] S. Rakhit, C. Eng, H. Baker, K. Singh, Chemical modification of ravidomycin and evaluation of biological activities of its derivatives, *J. Antibiot.* 36 (1983) 1490-1494.
- [31] N. Tommerup, H. Vissing, Isolation and fine mapping of 16 novel human zinc finger-encoding cDNAs identify putative candidate genes for developmental and malignant disorders, *Genomics* 27 (1995) 259-264.
- [32] E. J. Bellefroid, J.-C. Marine, T. Ried, P. J. Lecocq, M. Riviere, C. Amemiya, D. A. Poncelet, P. G. Coulie, P. de Jong, C. Szpirer, D. C. Ward, J. A. Martial, Clustered organization of homologous KRAB zinc-finger genes with enhanced expression in human T lymphoid cells, *EMBO J.* 12 (1993) 1363-1374.
- [33] S. Fields, O. Song, A novel genetic system to detect protein-protein interactions, *Nature* 340 (1989) 245-246.
- [34] H. Heng, J. Squire, L.-C. Tsui, High resolution mapping of mammalian genes by in situ hybridization to free chromatin., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 9509-9513.
- [35] H. Heng, L.-C. Tsui, Models of DAPI banding and simultaneous in situ hybridization, *Chromosoma* 102 (1993) 325-332.
- [36] R. Sakai, A. Iwamatsu, N. Hirano, S. Ogawa, T. Tanaka, H. Mano, Y. Yazaki, H. Hirai, A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes in vivo with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner, *EMBO J.* 13 (1994) 3748-3756.

- [37] M. Ishino, T. Ohba, H. Sasaki, T. Sasaki, Molecular cloning of a cDNA encoding a phosphoprotein, Efs, which contains a Src homology 3 domain and associates with Fyn, *Oncogene* 11 (1995) 2331-2338.
- [38] S. D. Briggs, S. S. Bryant, R. Jove, S. D. Sanderson, T. E. Smithgall, The Ras GTPase-activating protein (GAP) is an SH3 domain-binding protein and substrate for the src-related tyrosine kinase, Hck, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 14718-14724.
- [39] K. Kowanetz, I. Szymkiewicz, K. Haglund, M. Kowanetz, K. Husnjak, J. D. Taylor, P. Soubeyran, U. Engstrom, J. E. Ladbury, I. Dikic, Identification of a novel proline-arginine motif involved in CIN85-dependent clustering of Cbl and downregulation of EGF receptors, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 39735-39746.
- [40] E. V. Tibaldi, E. L. Reinherz, CD2BP3, CIN85 and the structurally related adaptor protein CMS bind to the same CD2 cytoplasmic segment, but elicit divergent functional activities, *Int. Immunol.* 15 (2003) 213-329.
- [41] S. Watanabe, H. Take, K. Takeda, Z.-X. Yu, N. Iwata, S. Kajigaya, Characterization of the CIN85 adaptor protein and identification of components involved in CIN85 complexes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278 (2000) 167-174.
- [42] T. Taniyama, T. Narita, Human proteins binding to human tyrosine kinase Hck and genes encoding the same, PCT/JP00/07500 (10 May 2001).
- [43] I. Gout, G. Middleton, J. Adu, N. N. Ninkina, L. B. Drobot, V. Filonenko, G. Matsuka, A. M. Davies, M. Waterfield, V. L. Buchman, Negative regulation of PI 3-kinase by Ruk, a novel adaptor protein, *EMBO J.* 19 (2000) 4015-4025.
- [44] S. C. Borinstein, M. A. Hyatt, V. W. Sykes, R. E. Straub, S. Lipkowitz, J. Boulter, O. Bogler, SETA is a multifunctional adaptor proteins with three SH3 domains that binds Grb2, Cbl, and the novel SB1 proteins, *Cell. Signal.* 12 (2000) 769-779.
- [45] K. H. Kirsch, M.-M. Georgescu, S. Ishimaru, H. Hanafusa, CMS: An adaptor molecule involved in cytoskeletal rearrangements, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 6211-6216.
- [46] M. L. Dustin, M. W. Olszowy, A. D. Holdorf, J. Li, S. Bromley, N. Desai, P. Widder, F. Rosenberger, P. A. van der Merwe, P. M. Allen, A. S. Shaw, A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts, *Cell* 94 (1998) 667-677.
- [47] S. Lehtonen, A. Ora, V. M. Olkkonen, L. Geng, M. Zeria, S. Somlo, E. Lehtonen, *In Vitro* interaction of the adaptor protein CD2-associated protein with the Type 2 polycystic kidney disease protein, Polycystin-2, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 32888-32893.
- [48] I. Dikic, CIN85/CMS family of adaptor molecules, *FEBS Lett.* 529 (2002) 110-115.
- [49] P. Soubeyran, K. Kowanetz, I. Szymkiewicz, W. Y. Langdon, I. Dikic, Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors, *Nature* 416 (2002) 183-187.
- [50] A. Petrelli, G. F. Gilestro, S. Lanzardo, P. M. Comoglio, N. Migone, S. Giordano, The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met, *Nature* 416 (2002) 187-190.
- [51] I. Szymkiewicz, K. Kowanetz, P. Soubeyran, A. Dinarina, S. Lipkowitz, I. Dikic, CIN85 participates in Cbl-b-mediated down-regulation of receptor tyrosine kinases, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 39666-39672.
- [52] B. Chen, S. C. Borinstein, J. Gillis, V. W. Sykes, O. Bogler, The Glioma-associated protein SETA interacts with AIP1/Alix and ALG-2 and modulates apoptosis in Astrocytes, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 19275-19281.
- [53] H. Yu, J. K. Chen, S. Feng, D. C. Dalgarno, A. W. Brauer, S. L. Schreiber, Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains, *Cell* 76 (1994) 933-945.
- [54] A. V. Kurakin, S. Wu, D. E. Bredesen, Atypical recognition consensus of CIN85/SETS/Ruk SH3 domains revealed by target-assisted iterative screening (TAIS), *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 34102-34109.
- [55] D. K. Lynch, S. C. Winata, R. J. Lyons, W. E. Hughes, G. M. Lehrbach, V. Wasinger, G. Corthals, S. Cordwell, R. J. Daly, A cortactin-CD2-associated protein (CD2AP)

- complex provides a novel link between Epidermal Growth Factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 21805-21813.
- [56] K. Kowanetz, J. Terzic, I. Dikic, Dab2 links CIN85 with clathrin-mediated receptor internalization, *FEBS Lett.* 554 (2003) 81-87.
- [57] I. Dikic, S. Giordano, Negative receptor signalling, *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 (2003) 128-135.
- [58] T. Sakakibara, Y. Nemoto, T. Nukiwa, H. Takeshima, Identification and characterization of a novel Rho GTPase activating protein implicated in receptor-mediated endocytosis, *FEBS Lett.* 566 (2004) 294-300.
- [59] F. K.-M. Chan, R. M. Siegel, M. J. Lenardo, Signaling by the TNF receptor superfamily and T cell homeostasis, *Immunity* 13 (2000) 419-422.
- [60] S. J. Baker, E. P. Reddy, Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily, *Oncogene* 17 (1998) 3261-3270.
- [61] S. Nagata, Apoptosis by death factor, *Cell* 88 (1997) 355-365.
- [62] N. Roy, Q. L. Deveraux, R. Takahashi, G. S. Salvesen, J. C. Reed, The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases, *EMBO J.* 16 (1997) 6914-6925.
- [63] M. A. Kelliher, S. Grimm, Y. Ishida, F. Kuo, B. Z. Stanger, P. Leder, The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF- κ B signal, *Immunity* 8 (1998) 297-303.
- [64] A. T. Ting, F. X. Pimentel-Muinos, B. Seed, RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF- κ B but not Fas/APO-1-initiated apoptosis, *EMBO J.* 15 (1996) 6189-6196.
- [65] W. C. Yeh, A. Shahinian, D. Speiser, J. Kraunus, F. Billia, A. Wakeham, J. L. de la Pompa, D. Ferrick, B. Hum, N. Iscove, P. Ohashi, M. Rothe, D. V. Goeddel, T. W. Mak, Early lethality, functional NF- κ B activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice., *Immunity* 7 (1997) 715-725.
- [66] Y. Abu-Amer, F. P. Ross, K. P. McHugh, A. Livolsi, J.-F. Peyron, S. L. Teitelbaum, Tumor necrosis factor- α activation of nuclear transcription factor- κ B in marrow macrophages is mediated by c-*Src* tyrosine phosphorylation of I κ B α , *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 29417-29423.
- [67] W.-C. Huang, J.-J. Chen, C.-C. Chen, c-*Src*-dependent tyrosine phosphorylation of IKK β is involved in tumor necrosis factor- α -induced intercellular adhesion molecule-1 expression, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 9944-9952.
- [68] W.-C. Huang, J.-J. Chen, H. Inoue, C.-C. Chen, Tyrosine phosphorylation of I- κ B Kinase α/β by protein kinase C-dependent c-*Src* activation is involved in TNF- α -induced Cyclooxygenase-2 expression, *J. Immunol.* 170 (2003) 4767-4775.
- [69] C. L. Novotny-Smith, G. E. Gallick, Growth inhibition of human colorectal carcinoma cell lines by tumor necrosis factor-alpha correlates with reduced activity of pp60^{c-*Src*}, *J. Immunother.* 11 (1992) 159-168.
- [70] B. B. Aggarwal, K. Totpal, F. Ali-Osman, R. J. A. Budde, E. Pocsik, pp60^{v-src} kinase overexpression leads to cellular resistance to the antiproliferative effects of tumor necrosis factor, *FEBS Lett.* 345 (1994) 219-224.
- [71] S. E. Lee, W. J. Chung, H. B. Kwak, C.-H. Chung, K. Kwack, Z. H. Lee, H.-H. Kim, Tumor necrosis factor- α supports the survival of osteoclasts through the activation of Akt and ERK, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 49343-49349.
- [72] A. R. M. R. Amin, K. Machida, K. Oshima, M. L. Oo, A. A. Thant, T. Senga, S. Matsuda, A. A. Akhand, A. Maeda, T. Kurosaki, M. Hamaguchi, A role of SHPS-1/SIRP α 1 in IL-1 β - and TNF α -dependent signaling, *Oncogene* 21 (2002) 8871-8877.
- [73] B. R. Wong, D. Besser, N. Kim, J. R. Arron, M. Vologodskaya, H. Hanafusa, Y. Choi, TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-*Src*, *Mol. Cell* 4 (1999) 1041-1049.
- [74] R. M. Scaife, W. Y. Langdon, c-*Cbl* localizes to actin lamellae and regulates lamellipodia formation and cell morphology, *J. Cell Sci.* 113 (2000) 215-226.

- [75] A. Khwaja, J. Downward, Lack of correlation between activation of Jun-NH2-terminal kinase and induction of apoptosis after detachment of epithelial cells, *J. Cell Biol.* 139 (1997) 1017-1023.
- [76] K. Ueki, P. Algenstaedt, F. Mauvais-Jarvis, C. R. Kahn, Positive and negative regulation of phosphoinositide 3-Kinase-dependent signaling pathways by three different gene products of the p85 α regulatory subunit, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 8035-8046.
- [77] P. M. Dombrosky-Ferlan, S. J. Corey, Yeast two-hybrid in vivo association of the Src kinase Lyn with the proto-oncogene product Cbl but not with the p85 subunit of PI 3-kinase, *Oncogene* 14 (1997) 2019-2024.
- [78] S. Tanaka, M. Amling, L. Neff, A. Peyman, E. Uhlmann, J. B. Levy, R. Baron, c-Cbl is downstream of c-Src in a signalling pathway necessary for bone resorption, *Nature* 383 (1996) 528-531.
- [79] J. R. Arron, M. Vologodskaya, B. R. Wong, M. Naramura, N. Kim, H. Gu, Y. Choi, A positive regulatory role for Cbl family proteins in tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine (TRANCE) and CD40L-mediated Akt activation, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 30011-30017.
- [80] L. Xing, A. M. Venegas, A. Chen, L. Garrett-Beal, B. F. Boyce, H. E. Varmus, P. L. Schwartzberg, Genetic evidence for a role for Src family kinases in TNF family receptor signaling and cell survival, *Genes. Dev.* 15 (2001) 241-253.
- [81] C. K. Kassenbrock, S. Hunter, P. Garl, G. L. Johnson, S. M. Anderson, Inhibition of Src family kinases blocks epidermal growth factor (EGF)-induced activation of Akt, phosphorylation of c-Cbl, and ubiquitination of the EGF receptor, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 24967-24975.
- [82] L. Corey, P. G. Spear, Infections with herpes simplex viruses, *N. Engl. J. Med.* 314 (1986) 686-691.
- [83] B. Roizman, A. E. Sears, An inquiry into the mechanisms of herpes simplex virus latency, *Ann. Rev. Microbiol.* 41 (1987) 543-571.
- [84] R. I. Montgomery, M. S. Warner, B. J. Lum, P. G. Spear, Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family, *Cell* 87 (1996) 427-436.
- [85] J. C. Whitbeck, C. Peng, H. Lou, R. Xu, W. S.H., M. P. De Leon, T. Peng, A. V. Nicola, R. I. Montgomery, M. S. Waener, A. M. Soulika, L. A. Spruce, W. T. Moore, J. D. Lambris, P. G. Spear, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, Glycoprotein D of herpes simplex virus (HSV) binds directly to HVEM, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily and a mediator of HSV entry, *J. Virol.* 71 (1997) 6083-6093.
- [86] F. Cocchi, L. Menotti, P. Mirandola, M. Lopez, G. Campadelli-Fiume, The ectodomain of a novel member of the immunoglobulin subfamily related to the poliovirus receptor has the attributes of a bona fide receptor for herpes simplex virus types 1 and 2 in human cells, *J. Virol.* 72 (1998) 9992-10002.
- [87] D. Shukla, J. Liu, P. Blaiklock, N. W. Shworak, X. Bai, J. D. Esko, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, R. D. Rosenberg, P. G. Spear, A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry, *Cell* 99 (1999) 13-22.
- [88] E. K. Wagner <http://darwin.bio.uci.edu/%7Efaculty/wagner/index.html>.
- [89] Y. Liang, A. Kurakin, B. Roizman, Herpes simplex virus 1 infected cell protein 0 forms a complex with CIN85 and Cbl and mediates the degradation of EGF receptor from cell surfaces, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 5838-5843.
- [90] L. J. Reed, H. Muench, A simple method of estimating fifty per cent endpoints, *Am. J. Hyg.* 27 (1938) 493-497.
- [91] K. Alexandropoulos, G. Cheng, D. Baltimore, Proline-rich sequences that bind to Src homology 3 domains with individual specificities, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 3110-3114.
- [92] P. G. Spear, R. J. Eisenberg, G. H. Cohen, Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry, *Virology* 275 (2000) 1-8.
- [93] M. R. Sarrias, J. C. Whitbeck, I. Rooney, C. F. Ware, R. J. Eisenberg, G. H. Cohen, J. D.

- Lambris, The three HveA receptor ligands, gD, LT- α and LIGHT bind to distinct sites on HveA, *Mol. Immunol.* 37 (2000) 665-673.
- [94] S. A. Marsters, T. M. Ayres, M. Skubatch, C. L. Gray, M. Rothe, A. Ashkenazi, Herpesvirus entry mediator, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, interacts with members of the TNFR-associated factor family and activates the transcription factors NF- κ B and AP-1, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 14029-14032.
- [95] R. Hagglund, B. Roizman, Role of ICP0 in the strategy of conquest of the host cell by herpes simplex virus 1, *J. Virol.* 78 (2004) 2169-2178.
- [96] Y. Langelier, S. Bergeron, S. Chabaud, J. Lippens, C. Guilbaut, A. M.-J. Sasseville, S. Denis, D. D. Mosser, B. Massie, The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase protects cells against apoptosis at, or upstream of, caspase-8 activation, *J. Gen. Viol.* 83 (2002) 2779-2789.
- [97] D. Perkins, E. F. R. Pereira, M. Gober, P. J. Yarowsky, L. Aurelian, The herpes simplex virus type 2 R1 protein kinase (ICP10 PK) blocks apoptosis in hippocampal neurons, involving activation of the MEK/MAPK survival pathway, *J. Virol.* 76 (2002) 1435-1449.
- [98] J. W. Nelson, J. Zhu, C. C. Smith, M. Kulka, L. Aurelian, ATP and SH3 binding sites in the protein kinase of the large subunit of herpes simplex virus type 2 of ribonucleotide reductase (ICP10), *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 17021-17027.

原著論文目録

- (1) T. Narita, F. Amano, K. Yoshizaki, N. Nishimoto, T. Nishimura, T. Tajima, H. Namiki and T. Taniyama: Assignment of SH3KBP1 to human chromosome band Xp22.1→p21.3 by in situ hybridization, *Cytogenetics and Cell Genetics*, 93, (2001) 133-134.
- (2) T. Narira, T. Nishimura, K. Yoshizaki and T. Taniyama: CIN85 associates with TNF receptor 1 via Src and modulates TNF- α -induced apoptosis, *Experimental Cell Research*, 304, (2005) 256-264.
- (3) T. Narita, A. Ando, Y. Mikami and T. Taniyama: Overexpression of CIN85 suppresses the growth of herpes simplex virus in HeLa cells, *Experimental Cell Research*, 311, (2005) 265-271.