

細胞の生育に関わる CARF の機能についての研究

(Study on cellular function of CARF (collaborator of ARF) that is involved in cell growth and proliferation)

応用生命科学専攻 応用生物化学大講座

佐藤 慈子

目次	
目次	I
略語表	III
学位論文要旨	VIII
第1章 序論	1
第1節 日本におけるがん	1
第2節 がんと細胞の生育調節機構について～がん抑制因子 ARF の働きを手がかりとして	2
第3節 がん抑制因子 ARF と相互作用するタンパク質 CARF について	3
図表	10
第2章 CARF 相互作用因子群構成タンパク質の同定	38
第1節 緒言	38
第2節 実験方法	39
第3節 結果	63
2-3-1 FLAG タグ融合ヒト CARF タンパク質薬剤誘導発現細胞株の樹立	63
2-3-2 CARF 相互作用因子群の単離	63
2-3-3 nanoLC-MS/MS による CARF 相互作用因子群の同定	64
第4節 小括	66
図表	72
第3章 CARF と XRN2 の相互作用	88
第1節 緒言	88
第2節 実験方法	90
第3節 結果	104
3-3-1 CARF 発現量による XRN2 共沈降量への影響	104
3-3-2 XRN2 相互作用因子群における CARF の検出	104
3-3-3 CARF と XRN2 の直接相互作用の証明	105
3-3-4 CARF の XRN2 相互作用領域の決定	107

3-3-5	XRN2 の CARF 相互作用領域の決定	108
第 4 節	小括	109
	図表	113
第 4 章	リボソーム生合成過程における CARF の働き	125
第 1 節	緒言	125
第 2 節	実験方法	128
第 3 節	結果	137
4-3-1	XRN2 が関与するリボソーム生合成過程の確認	137
4-3-2	CARF 一過的過剰発現細胞を用いた CARF によるリボソーム生合成過程の阻害	139
4-3-3	CARF 薬剤誘導発現細胞を用いた CARF によるリボソーム生合成過程の阻害	140
第 4 節	小括	141
	図表	143
第 5 章	XRN2 を介した CARF によるリボソーム生合成調節機構	153
第 1 節	緒言	153
第 2 節	実験方法	154
第 3 節	結果	171
5-3-1	CARF による XRN2 の 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性に対する影響	171
5-3-2	CARF による XRN2 の発現量への影響についての検証	173
5-3-3	CARF による XRN2 の細胞内局在の変動	174
第 4 節	小括	176
	図表	179
第 6 章	総括	199
	参考文献	204
	謝辞	230

略語表

• aa	amino acid
• APS	ammonium persulfate
• ARF	alternative reading frame protein
• ATM	ataxia telangiectasia mutated
• ATP	adenosine triphosphate
• ATR	ataxia telangiectasia and Rad3 related
• BCIP	5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate
• bp	base pair
• BPB	bromophenol blue
• CARF	CDKN2A-interacting protein あるいは collaborator of ARF
• <i>C. elegans</i>	caenorhabditis elegans
• CHK1	Serine/threonine-protein kinase Chk (Checkpoint kinase) 1
• CHK2	Serine/threonine-protein kinase Chk (Checkpoint kinase) 2
• CMV	cytomegalovirus
• CTP	cytidine triphosphate
• DAI	double-stranded RNA-activated inhibitor
• DAPI	4', 6'-diamidino-2-phenylindole
• DEPC	diethylpyrocarbonate
• DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
• DMSO	dimethyl sulfoxide
• DNA	deoxyribonucleic acid
• dsRAD	double-stranded RNA adenosine deaminase
• dsRNA	double-stranded RNA
• DTT	dithiothreitol

• DW	distilled water
• EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
• eIF-2	Eukaryotic translation initiation factor 2
• eIF-4B	Eukaryotic translation initiation factor 4B
• ERK1	Extracellular signal-regulated kinase 1 または Mitogen-activated protein kinase 3
• ESI	Electronic Spray Ionization
• ETS	external transcribed spacer
• FBS	Fetal bovine serum
• FRT	FLP Recombination Target
• GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
• GRP-78	78 kDa glucose-regulated protein
• GTP	guanosine triphosphate
• HA	hemagglutinin
• HBS	HEPES buffered saline
• HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
• hnRNP A1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
• hnRNP H	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H
• hnRNP K	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
• hnRNP L	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L
• hnRNP U	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
• HPLC	high-performance liquid chromatography
• HSP70-1	Heat shock 70 kDa protein 1
• HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein
• HSPA9	Stress-70 protein, mitochondrial

- IB immunoblot
- IE62 immediate-early 62 protein
- IF immunofluorescence
- Ig immunoglobulin
- IP immunoprecipitation
- ITS internal transcribed spacer
- LC liquid chromatography
- MAPK mitogen-activated protein kinase
- Mdm2 transformed mouse 3T3 cell double minute 2/E3 ubiquitin-protein ligase
Mdm2 (mouse)
- MDM2 MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin-protein ligase/
E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2 (human)
- mKG monomeric Kusabira-Green
- MLH1 mutL homolog 1
- MOPS 3-morpholinopropanesulfonic acid
- MS mass spectrometry
- MSH2 mutS homolog 2
- mTOR mammalian target of rapamycin
- NBT nitro blue tetrazolium chloride
- NPAS2 neuronal PAS domain protein 2
- NPM nucleophosmin あるいは B23
- NTP nucleoside triphosphate
- OD optical density
- p53 Cellular tumor antigen p53 あるいは TP53
- PAXT-1 R05D11.6/Partner of Xrn-Two-1

• PBS	phosphate buffered saline
• PBST	0.05 % (w/v) Tween 20, PBS
• PCR	polymerase chain reaction
• PEG	polyethylene glycol
• PIPES	piperazine-1, 4-bis (2-ethanesulfonic acid)
• PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
• pol I	RNA polymerase I
• pol II	RNA polymerase II
• pre-rRNA	precursor ribosomal RNA
• PVDF	polyvinylidene difluoride
• RB	Retinoblastoma protein
• rDNA	ribosomal DNA
• RNA	ribonucleic acid
• RNAi	RNA interference
• RNase	ribonuclease
• rRNA	ribosomal RNA
• RP-A p14	Replication protein A 14 kDa subunit
• RP-A p32	Replication protein A 32 kDa subunit
• RPS7	ribosomal protein S7
• <i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
• <i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
• siRNA	short interfering RNA
• snoRNA	small nucleolar RNA
• snoRNP	small nucleolar ribonucleoprotein
• SRT	serine-rich tract

- TAE Tris-acetic acid-EDTA
- TBS Tris Buffered Saline
- TEMED tetramethylethylenediamine
- TOCARF 細胞 pcDNATM5/FRT/TO-FLAG-CARF/Flp-In T-Rex 293 細胞
- TOF time-of-flight
- TRF2 telomeric repeat binding factor 2
- tRNA transfer RNA
- Tris tris (hydroxymethyl) aminomethane
- U unit
- UTP uridine triphosphate
- VZV Varicella-zoster virus
- WCL whole cell lysate
- XRN2 5'-3' exoribonuclease 2

学位論文要旨

細胞の生育に関わる CARF の機能についての研究

(Study on cellular function of CARF (collaborator of ARF) that is involved in cell growth and proliferation)

応用生命科学専攻 応用生物化学大講座

佐藤 慈子

CARF がどのように細胞増殖に関与し、がん化を抑制しているかの分子機構についてはいくつか仮説が提唱されているがまだ明らかになっていない。もし、CARF の細胞内における新しい役割を明らかにできれば、新たながん抑制メカニズムの解明や新規抗がん剤ターゲットの発見につながる可能性がある。CARF 欠損が p53 不活化細胞や p53 欠損細胞においてもアポトーシスと異常細胞分裂を誘導することから、CARF が関与する p53 非依存的細胞増殖調節機構が存在すると推論された。この p53 非依存的細胞増殖調節機構において CARF 相互作用因子が重要な役割を担うと考えられ、機能既知 CARF 相互

作用因子：p53、MDM2、ARF、CHK2、ERK1 以外の CARF 相互作用因子が p53 非依存的細胞増殖調節機構解明の鍵となる可能性が考えられた。本研究では、CARF による p53 非依存的細胞増殖調節機構の分子メカニズムを明らかにする手がかりを得ることを目的とし、最新のプロテオーム解析技術を用いて新規 CARF 相互作用因子を探索することから研究を進めることとした。

FLAG タグタンパク質に対する pull down 法により CARF 相互作用因子群の単離を試み、その構成タンパク質を nano-LC-MS/MS を用いたプロテオーム解析により同定した。その結果、5'-3'エキソリボヌクレアーゼ(XRN2)および他 18 種類の新規 CARF 相互作用タンパク質を同定した。同定した XRN2 と CARF の相互作用についてさらに調べた。作製した CARF 薬剤発現誘導細胞を用いた pull down において CARF の量依存的に CARF 相互作用因子群に含まれる XRN2 の量が変化した。また、XRN2 相互作用因子群に CARF が含まれることを明らかにした。双方向から相互作用を調べることで CARF と XRN2 が相互作用することを示した。また、CARF も XRN2 も RNA と相互作用することが報告されていることから、RNA を介して CARF と XRN2 が相互作用する可能性が考えられた。この可能性について調べ、RNA を介さず CARF と XRN2 が相互作用することを明らかにした。さらに、mKG レポーターシステムを用いた解析から CARF と XRN2 が細胞内、特に核質において直接相互作用すると結論づけた。両タンパク質について欠失変異体を作成し、各々タンパク質内の相互作用領域を調べた。CARF では 1-175 aa を介して XRN2 と相互作用すること、XRN2 では少なくとも 1-151 aa、501-680 aa が CARF との相互作用に必要であることが明らかになった。XRN2 の生理機能の 1 つである pre-rRNA プロセッシングにおける XRN2 の働きに CARF が影響を与えるのか調べた。始めに RNA 干渉の技術を用いて XRN2 をノックダウンし、5'ETS 領域の pre-rRNA プロセッシングにおける XRN2 の働きをノザンプロット法により確認した。次に、CARF の一過的過剰発現および薬剤誘導による過剰発現細胞を用いて pre-rRNA プロセッシングへの影響を調べた。その結果、CARF の過剰発現により 5'ETS 領域の pre-rRNA プロセッシング過程において生成される pre-rRNA fragments (5'ETS-pre-rRNA fragments) の XRN2 による分解が阻害されることが示唆された。さらに、CARF の過剰発現により 5'ETS 領域の 01 site の切断における XRN2 の働きが阻害されることが示唆された。一方で、CARF は 01 site の切断が起こらないと次の pre-rRNA プロセッシングへ進ませない監視をしている XRN2 の働きに対しては関与し

ていないと推論された。明らかになった CARF による XRN2 の pre-rRNA プロセッシングにおける働きの阻害がどのような機構によって起こるのか調べた。始めに XRN2 の酵素活性に対する CARF による影響を調べたが、影響はなかった。次に XRN2 の発現量に対する CARF の影響を調べたが、影響はなかった。最後に、XRN2 の細胞内局在に対する影響を細胞免疫染色法および細胞分画法を用いて調べた。その結果、CARF は XRN2 を核質へ留め、リボソーム生合成の場である核小体の局在を減少させることで、5'ETS 領域の pre-rRNA プロセッシングにおける XRN2 の働きを阻害することが示唆された。CARF は 01 site 切断後の監視において働く XRN2 には相互作用できず、5'ETS-pre-rRNA fragments を分解する XRN2 および 01 site 切断に働く XRN2 には相互作用でき、その局在を変化させると推論される。

CARF が XRN2 を核質に留めることから、CARF が pol II の転写終結点に XRN2 を留める可能性が考えられる。本研究において CARF が XRN2 と相互作用することが明らかになったことから、XRN2 と ARF が CARF を相互作用因子として競合すると推論される。ARF は CARF を介さない経路においてもがん化抑制に働くことから、CARF から遊離した ARF もがん化抑制能を発揮でき、がん化抑制が促進すると推論される。あわせて、CARF が XRN2 の pre-rRNA プロセッシングにおける働きを阻害することによりリボソーム生合成が低下し、細胞増殖が低下する可能性も考えられ、細胞の増殖がさらに抑制されると考えられる。今後、本研究で明らかになった CARF と XRN2 の相互作用や生理機能に関して更なる研究が進み、新規抗がん剤が開発されることを待ち望みたい。

第1章 序論

第1節 日本におけるがん

厚生労働省の平成22年人口動態統計によると、日本における死因は第1位が悪性新生物、第2位が心疾患、第3位が脳血管疾患、第4位が肺炎、第5位が老衰である(厚生労働省 <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai10/kekka03.html>)。この順位から見られるように、悪性新生物つまりがんに対する新しい治療法の開発が強く望まれている。実際に、日本政府はがんが死因第1位になった1981年の3年後に「対がん10ヵ年総合戦略」を策定し、1994年にはこの戦略を引き継いだ形で「がん克服新10ヵ年戦略」を策定した。そして、これらの戦略が終わった後の2004年から2014年までがん罹患率と死亡率の激減を目指して、がん予防の推進及びがん医療の向上とそれを支える社会環境の整備を柱とする「第3次対がん10ヵ年総合戦略」が進められた。予算額をみると、「対がん10ヵ年総合戦略」が始まった1984年度は15.1億円だったのに対して、「第3次対がん10ヵ年総合戦略」の2012年度では357.0億円と当初の約23倍にも増額されている

(1)。このことから、日本政府はがんの撲滅を解決すべき重要な課題として位置づけていることがわかる。これらの対がん戦略の効果は、5年相対生存率の推移から見る事ができる。5年相対生存率は、あるがんと診断された人の5年後の生存率と、性別、生まれた年、及び年齢の分布を同じくする日本人の集団の5年後の生存率との比で表され、その値は、あるがんと診断された場合に、治療でどのくらい延命させたかを示す指標として用いられる。1993年から1996年に行われた調査では5年相対生存率が53.2%であったが、2003年から2005年に行われた調査では58.6%であり(2,3)、約10年間で5.4%の増加がみられ、対がん対策に一定の効果があったことを示している。しかし、がん治療のための医療費は、1995年に18兆637億円であったのに対して、2010年には30兆312億円までになり、全医療費の1割弱を占めるほど日本経済に大きな負担となっている。2005年の罹患・死亡データに基づく、男性、女性ともに、おおよそ2人に1人が一生のうちにがんと診断され、2009年の死亡データに基づくと男性ではおおよそ4人に1人、女性ではお

およそ 6 人に 1 人ががんで死亡する (4)。がんの撲滅は、日本の健康の維持にとってだけでなく、経済への負担軽減という意味でも解決すべき重大な課題である。

第 2 節 がんと細胞の生育調節機構について～がん抑制因子 ARF の働きを手がかりとして

人の健康を脅かすがんの原因となるがん細胞は体の中でどのようにして発生するのだろうか？がんの発症は、恐らく細胞増殖を制御するがん関連遺伝子が化学物質、紫外線などなんらかの原因により変異することからはじまる (5, 6)。通常では遺伝子変異が速やかに修復されるか、あるいは細胞周期停止やアポトーシスが起これば異常な細胞は取り除かれる (5)。しかし、これらの機構が働かず、異常な細胞がさらに変化して無限に増殖する能力を持つとがん細胞になる (7)。

がん細胞において、高頻度で変異しているがん関連遺伝子産物として、がん抑制因子がある。これらには、転写因子 p53、転写抑制因子 RB、MDM2 のアンタゴニストであるヒト p14^{ARF} あるいは マウス p19^{ARF} (以下 ARF と略す)、DNA ミスマッチ修復因子 MSH2 及び MLH1、DNA ダメージセンサー ATM などが良く知られている (6)。がん抑制因子の主な働きは、異常を感知し細胞が増殖し続けるのを抑制することである (6)。ヒトのがんにおいては、これらががん抑制因子の中でも p53 は 50%以上、ARF は約 40%と非常に高い割合で変異している (8, 9, 10)。これらの事実は、p53 と ARF は細胞のがん化抑制において極めて重要な働きを担うことを意味している。

ここでは、p53 と関わりもあることから ARF に着目し、ARF の働きと細胞のがん化との関係についてさらに述べたい。まず、ARF が関わるがん化抑制の分子機構について考えたい。ARF は核質で p53 の分解に関わるユビキチンリガーゼ MDM2 の局在を核質から核小体に変化させる働きがある。これによって、MDM2 による p53 の分解を抑制し、p53 による細胞の増殖抑制作用を維持することができる (11, 12, 13, 14)。この場合、ARF は p53 シグナル経路の上流に位置して、細胞の異常増殖をくい止めていると考えられる。

一方で、ARF は p53-MDM2 欠損細胞の成長を抑制する (15)。このことは、ARF が p53 非依存的な細胞増殖抑制能をもつことも示している。ARF はリボソーム生合成を担う NPM の分解を促進することから、p53 非依存的にリボソーム生合成を抑制して細胞増殖を抑えると考えることもできる (16, 17, 18, 19, 20, 21, 22)。増殖期にある細胞では、その細胞が消費する 70~80% のエネルギーと物質をリボソーム産生に費やす (23)。がん細胞が無限に増殖する為には、タンパク質合成を担う大量のリボソームを恒常的に生産し続けなければならない (23)。つまり、がん細胞の細胞増殖においては、リボソーム生合成の制御が重要な役割を担っているとも考えられる (24)。よって、ARF による p53 非依存的な細胞増殖の抑制に関しては、ARF のリボソーム生合成抑制能に起因する可能性も考慮しなければならない。この可能性は、p53/Mdm2/ARF ノックアウト細胞に ARF を発現させるとリボソーム RNA プロセッシング (25) 及びリボソーム生産量 (16) が抑制されることから支持される。

第 3 節 がん抑制因子 ARF と相互作用するタンパク質 CARF について

第 2 節において述べた ARF の生理機能との関わりは不明であるが、非常に多くの ARF の細胞内相互作用因子が同定されている。今までに報告された ARF 相互作用因子として、Cyclin-dependent kinase 4 (28, 29, 30, 31, 45, 46), Cyclin-dependent kinase 6 (28, 29, 30, 31, 47), MDM2 (13, 35, 36, 37), Myc proto-oncogene protein (38), CARF (43, 117), Cyclin-G1 (44), Transcription factor E2F1 (49, 50), G1/S-specific cyclin-D1 (54, 65), G1/S-specific cyclin-D2 (53, 66), NPM (18, 27, 78, 88, 89, 90, 91), 26S protease regulatory subunit 6A (40, 94), p53 (12, 13, 14, 51, 97, 104), E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12 (78, 87, 91, 106), Polyubiquitin-C (78, 87, 91, 100, 104, 106, 109, 110, 111), などがある。合計 146 種のタンパク質が ARF 相互作用因子として報告されており、その働きも多岐に渡る。全ての ARF 相互作用因子については Table1-1 に示す。本博士論文ではこれらの中の一つで、yeast two hybrid 法により見いだされた CARF について着目し研究を行ったので、以下に CARF について詳細に説明する。

CARF は、別名として collaborator of ARF あるいは CDKN2A-interacting protein と呼ばれる。CARF の Gene ID は 55602 で、公式なシンボルは CDKN2AIP であるが、本論文では簡略化のために CARF の名称をそのまま用いることとする。

ヒト CARF をコードする遺伝子は、第 4q35 染色体上の NC_000004.12 (183444635-183449064) 領域に存在する (117)。この遺伝子から転写された pre-mRNA は 2 種類のスプライシングバリエントを生じる。このうち ARF と相互作用が報告されているのは NM_017632.2 である。183,444,636-183,447,896 に 3,261 bps の領域でコードされており、イントロン: 183,445,070-183,445,534, Length: 465 と 183,445,666-183,446,087, Length: 422 がスプライシングされ 2,374 bps の mRNA になる。翻訳される領域は遺伝子上 183,444,798 から始まり 183,447,427 までコードされている領域であり、上述のようにスプライシングされるので最終的に翻訳される mRNA 配列の長さは 1,743 bps である。もう一つのスプライシングバリエントは、XM_005263118.1 である。183,444,635-183,449,064 に 4,430 bps の領域でコードされており、イントロン: 183,445,070-183,445,534, Length: 465 と 183,445,635-183,446,087, Length: 453 がスプライシングされ 3,512 bps の mRNA になる。翻訳される領域は遺伝子上 183,446,450 から始まり 183,447,427 までコードされている領域であり、最終的に翻訳される mRNA 配列の長さは 978 bps である。

NM_017632.2 から翻訳されるタンパク質は 580 aa と予測されるが (Fig. 1-1) (118)、質量分析法を用いた実験結果からは、アミノ末端のメチオニンが切断され細胞内では予測より 1 残基少ない 579aa の分子種として存在すると考えられる (119)。CARF タンパク質の模式図を Fig. 1-2 に示す。CARF の 462 番目から 537 番目までのアミノ酸配列は ds RNA-binding domain と呼ばれ、RNA が結合するドメインであると考えられている (Fig. 1-3)。また、175 番目から 425 番目までにセリンリッチ領域を持ち、この領域の 251 アミノ酸配列中に 98 個のセリンが存在する (Fig. 1-4)。一方、タンパク質翻訳後修飾の大規模解析からは、2 番目のアラニンがアセチル化され(120)、131 番目のセリンと 346 番目のスレオニンがリン酸化されることが示されている (122, 123)。

CARF は他の種においてどのくらい保存されているのだろうか？ ヒト CARF は InParanoid データベース (124) を用いて検索を行うと 38 の生物種においてオーソログが存在する (Table 1-2)。OrthoDB データベース (<http://cegg.unige.ch/orthodb/results?searchtext=Q9NXV6>) を用いて検索を行うと 62 種においてオーソログが存在するが、その中で Uniprot に登録があるタンパク質に限定すると 38 種においてオーソログが存在する (Table 1-3)。これらの内 InParanoid データベースでのみ検出された種が 6 種、OrthoDB データベースでのみ検出された種が 4 種あった。どちらのデータベースサーチ結果でも多くの種にオーソログの存在が示され、CARF は生物の生存にとって重要な機能を持つと推測される。その詳細について、以下に InParanoid データベースの結果を基に論じていきたいと思う。

InParanoid データベースによりヒト CARF のオーソログと示されたタンパク質について clustalw 及び Jalview を用いて近隣結合法により系統樹を作成した (Fig. 1-5)。CARF は哺乳類から昆虫綱に属する *Solenopsis invicta* までオーソログが存在するが、この系統樹から *Loxodonta Africana* を除くと哺乳類とそれ以外の種で進化的に大きく枝分かれしていることがわかる。また *Solenopsis invicta* は枝の長さが長く進化的形質が大きく異なることから、その機能も共通部分は少ないと推測される。ヒト CARF のオーソログタンパク質の multiple alignment を Fig. 1-6 に示す。ヒト CARF には 19 番目から 127 番目に機能未知の DUF3469 と呼ばれるドメインが存在する。Table 1-2 の模式図において緑色で示されているドメインである。DUF3469 ドメインを持たないものも 9 種存在する。Fig. 1-7 にピンク色で囲んで示した。その中には *Cricetulus griseus* や *Spermophilus tridecemlineatus* のように比較的分子系統上ヒトに近いものも含まれており、DUF3469 ドメインの有無にどのような進化上の意義があるのかはわからない。CARF はヒト、マウス及びラット以外の種においては機能が調べられていない。

CARF はヒト組織において脳、腎臓、肝臓、肺、膵臓、胎盤、大腸、卵巣で発現している (117)。その半減期は 60 分以下と短く、ストレスを受けない環境下ではプロテアソーム系を介して分解される (125)。細胞内局在としては主に核質とリボソーム生合成が行わ

れる核小体の縁に存在する (43)。それ故、CARF は ARF と相互作用し、リボソーム生合成における ARF の働きを阻害もしくは促進し、細胞増殖を制御する可能性が考えられるが、この可能性については調べられていない。一方で、CARF は ARF との相互作用に依存した p53-p21^{WAF} 経路 (ARF 依存的 p53-p21^{WAF} 経路) を介して細胞増殖を制御する (43, 126)。さらに CARF は ARF とは無関係に p53-p21^{WAF} 経路 (ARF 非依存的 p53-p21^{WAF} 経路) を介してがん細胞の増殖を調節することもできる (43, 126)。ARF 依存的 p53-p21^{WAF} 経路において、CARF は ARF と他のタンパク質を含む複合体を形成し、その中で直接 MDM2 と結合し (127, 128)、ARF と一緒に働いて p53 を活性化する (127)。これに対し、ARF 非依存的 p53-p21^{WAF} 経路において、CARF は p53 に直接結合することにより p53 を安定化し、活性化する (126)。しかし、CARF と p53 の結合量がある範囲を超えて増加すると、MDM2 の働きにより共に分解され、CARF と p53 が減少する (126)。即ち、ARF を含まない CARF-p53-p21^{WAF} 経路では CARF と p53 の結合量による負のフィードバックループでお互いの発現量を調節していると考えられる (43, 116, 126, 127, 128)。実際に、MDM2 阻害剤はこのフィードバックループを阻害する (129)。加えて、CARF は MDM2 の遺伝子 *MDM2* の転写抑制因子として働くことから (128)、このフィードバックループはより複雑な機構で制御されていると思われる。

CARF は過剰発現によって p53-p21^{WAF} 経路を活性化しがん化の抑制と早期老化の誘導を引き起こすが、逆に早期老化及び老化によってもその発現量が増加する (130)。また、その欠損によっても様々な細胞死及び生存経路を介してがん化抑制に関わっていると考えられる (131)。CARF が細胞増殖に与える影響を表にまとめた (Table 1-4)。しかし、CARF がどのように細胞増殖に関与しがん化を抑制しているかの分子機構については今までに述べた経路を介したものも含めいくつかの仮説が提唱されているが (125, 130, 131)、まだ不明な点が多い。

もし、CARF の新規生理機能を明らかにできれば、新たながん化抑制メカニズムの解明や新しい薬剤のターゲットの発見につながる可能性がある。CARF 欠損が p53 不活化細胞

や p53 欠損細胞においてもアポトーシスと異常細胞分裂を誘導する (130) ことから、CARF が関与する p53 非依存的細胞増殖調節機構が存在すると考えられた。本研究では、CARF による p53 非依存的細胞増殖調節機構の分子メカニズムを明らかにする手がかりを得ることを目的とし、最新のプロテオーム解析技術を用いて新規 CARF 相互作用因子を探索することから研究を進めることとした。新規 CARF 相互作用因子と CARF の生理的役割を調べることで、CARF が関与する p53 非依存的細胞増殖調節機構解明を試みた。

以下本論文の第 2 章以降の概要を述べる。

第 2 章 CARF 相互作用因子群構成タンパク質の同定

第 2 章では CARF 欠損が p53 非依存的にアポトーシスと異常細胞分裂を誘導することから、CARF が関与する p53 非依存的細胞増殖調節機構が存在すると考えた。p53 非依存的細胞増殖調節機構において CARF 相互作用因子が重要な役割を果たすと考えられた。新規 CARF 相互作用因子の探索を行った。作製した CARF 薬剤誘導発現細胞を用いて CARF 相互作用因子群の単離を試み、その構成タンパク質を nano-LC-MS/MS を用いたプロテオーム解析により同定した。その結果、5'-3'エキソリボヌクレアーゼ XRN2 及び 18 種類の新規 CARF 相互作用タンパク質: アポトーシスに関連するタンパク質 Protein KIAA1967、pre-mRNA プロセッシング&スプライシング関連タンパク質 RNA-binding protein 10 及び Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15、hnRNP タンパク質 4 種類、翻訳に関連するタンパク質 Eukaryotic translation initiation factor 4B、リボソームタンパク質 60S acidic ribosomal protein P0-like、シャペロンタンパク質 5 種類、rRNA 生合成関連タンパク質 Nucleolin、NPM、その他タンパク質 2 種類であった。

第 3 章 CARF と XRN2 の相互作用

第 3 章では第 2 章で同定した XRN2 と CARF の新規相互作用について詳細に解析し

た。はじめに第2章で作製した CARF 薬剤誘導細胞を用いた pull down において CARF の量依存的に CARF 相互作用因子群に含まれる XRN2 の量が増加した。また、XRN2 相互作用因子群に CARF が含まれることを明らかにした。双方向から相互作用を調べることで CARF と XRN2 が相互作用することを示した。また、CARF も XRN2 も RNA と相互作用することが報告されていることから、RNA を介して CARF と XRN2 が相互作用したものであるか検討し、これらの相互作用には RNA が関与しないことを明らかにした。さらに、mKG レポーターシステムを用いた解析から CARF と XRN2 が細胞内、特に核質において直接相互作用すると結論づけた。両タンパク質について欠失変異体を作成し、各々タンパク質内の相互作用領域を調べた。CARF は 1-175 aa を介して XRN2 と相互作用すること、XRN2 は少なくとも 1-151 aa、501-680 aa が CARF との相互作用に必要であることが明らかになった。

第4章 リボソーム生合成過程における CARF の働き

第4章では XRN2 が生体内で担う役割の1つである pre-rRNA のプロセッシングに CARF が影響を及ぼす可能性について検討した。始めに RNA 干渉の技術を用いて XRN2 をノックダウンし、pre-rRNA プロセッシングにおける既知の XRN2 の働きをノザンブロットティングにより確認した。次に、CARF の過剰発現による pre-rRNA プロセッシングへの影響を調べた。その結果、CARF の過剰発現により XRN2 が担う 5'ETS pre-rRNA のプロセッシングの働きが阻害されることが明らかになった。

第5章 XRN2 を介した CARF によるリボソーム生合成調節機構

第5章では第4章で明らかになった CARF が pre-rRNA プロセッシングにおける XRN2 の働きを阻害するメカニズムについて調べた。はじめに XRN2 の 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性に対する CARF による影響を調べたが、影響はなかった。次に XRN2 の発現量が CARF の発現により増減するのか調べたが、影響はなかった。また、XRN2 の細胞内

局在に対する影響を調べた。その結果、CARF は XRN2 を核質へ留め、さらに XRN2 をリボソーム生合成の場である核小体の局在を減少させることを明らかにした。このように細胞内分布に影響を与えることで、XRN2 の 5'ETS 領域における pre-rRNA プロセッシングにおける働きを阻害することが示された。

第 6 章 総括

第 6 章では第 2 章から第 5 章において得られた結果を総括した。本研究で明らかになった CARF の新規生理機能の意義と今後の展望について述べた。

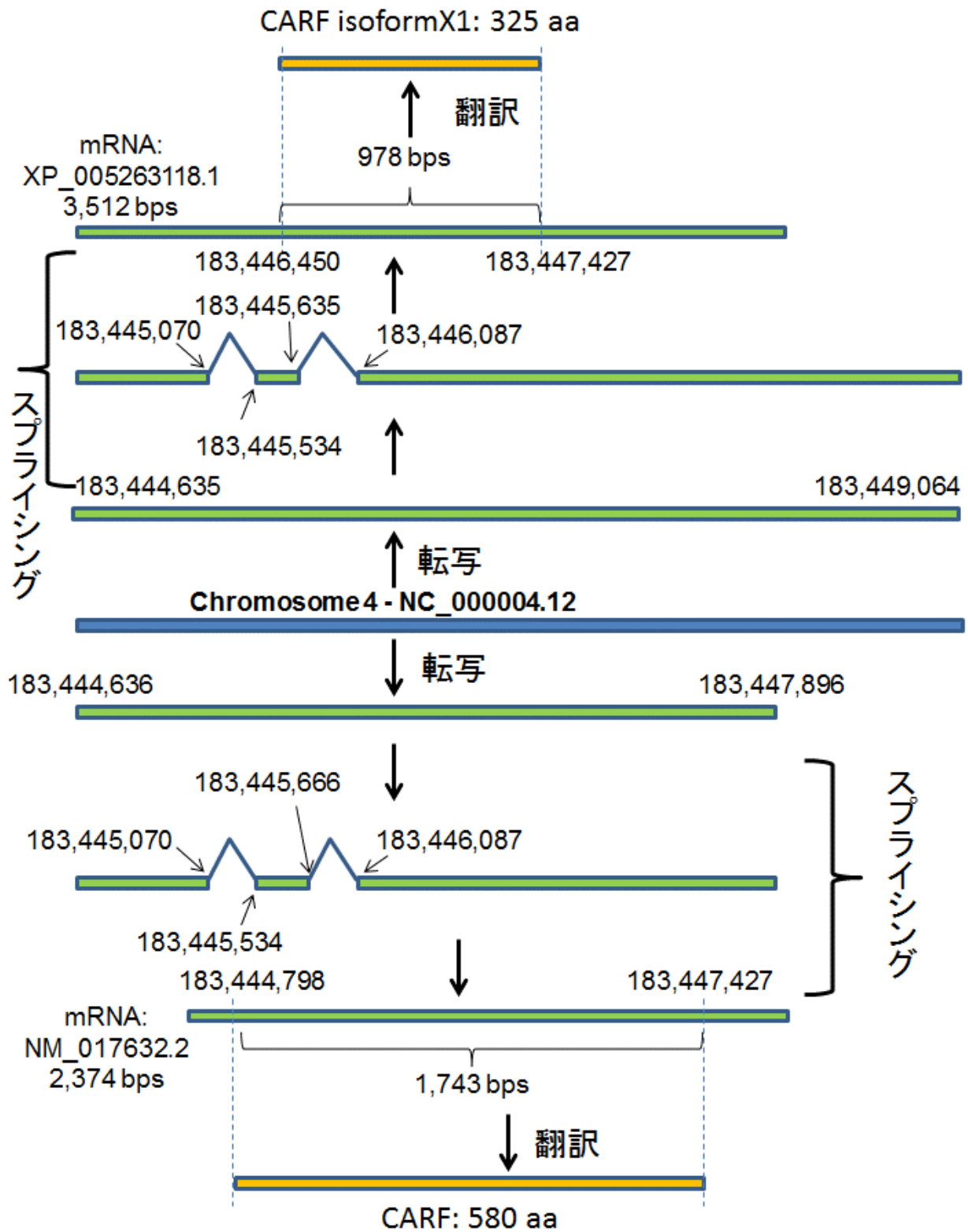


Fig. 1-1 ヒトCARFの遺伝子とスプライシングバリエント

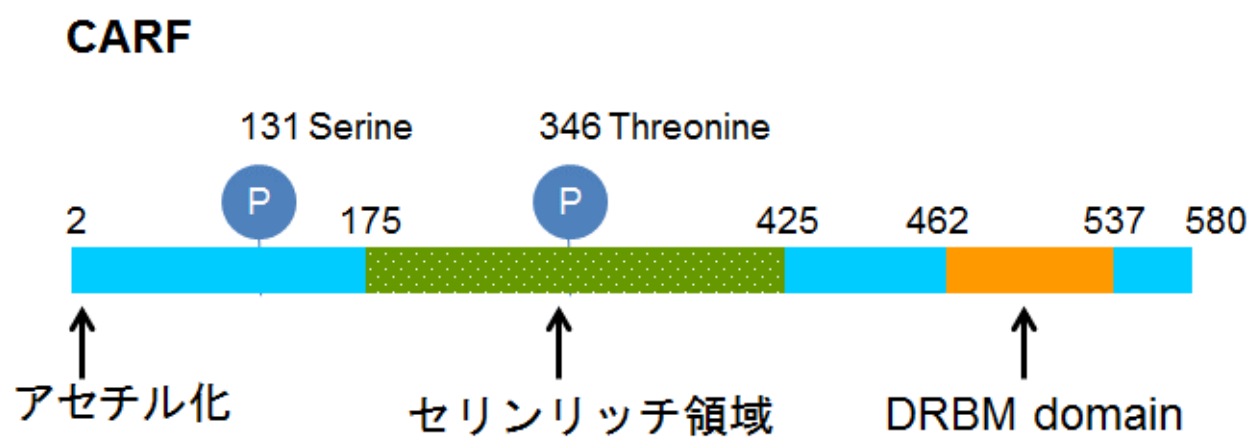


Fig. 1-2 ヒトCARFのタンパク質の模式図

470 480 490 500 510
NHGELLNAA IEALKATLDV FFVPLKELAD LPQNKSSQES IVCEL RCKSV
520 530
YLGTGCGKSK ENAKAVASRE ALKLFLK

Fig. 1-3 ヒト CARFのdsRNA-binding domain配列

180 190 200 210 220
 SSTCIG SAIKSESGNS ARSSGISSQN SSTSDGDRSV SSQSSSSVSS

 230 240 250 260 270
 QVTTAGSGKA SEAEAPDKHG SASFVSLKKS SVNSHMTQST DSRQQSGSPK

 280 290 300 310 320
 KSALEGSSAS ASQSSSEIEV PLLGSSGSSE VELPLLSSKP SSETASSGLT

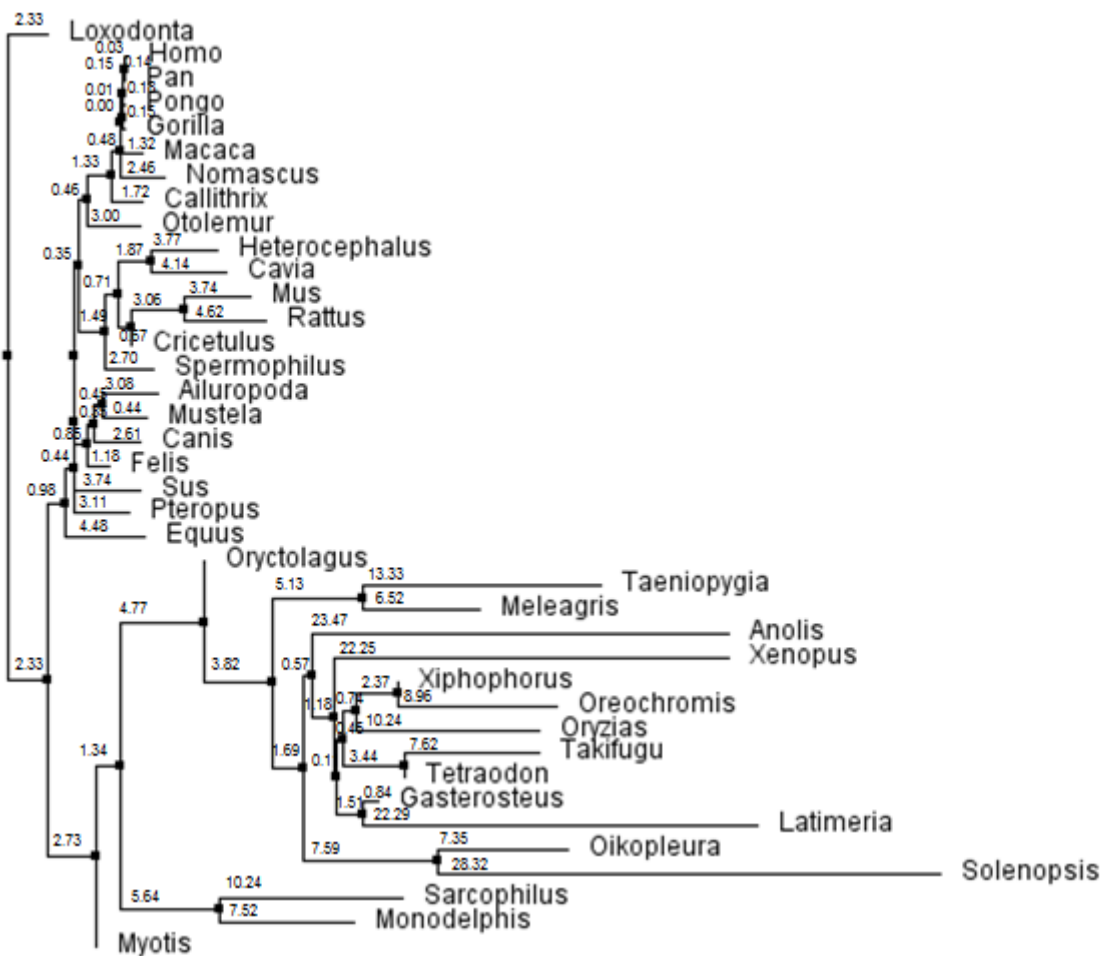
 330 340 350 360 370
 SKTSSEASVS SSVAKNSSSS GTSLLLTPKSS SSTNTSLLTS KSTSQVAASL

 380 390 400 410 420
 LASKSSSQTS GSLVSKSTSL ASVSQLASKS SSQTSTSQLP SKSTSQSSSES

 430

 SVKFS

Fig. 1-4 ヒト CARF のセリンリッチ領域配列
 セリン残基を ■ で示した。



Ailuropoda: Ailuropoda melanoleuca
 Anolis: Anolis carolinensis
 Callithrix: Callithrix jacchus
 Canis: Canis familiaris
 Cavia: Cavia porcellus
 Cricetulus: Cricetulus griseus
 Equus: Equus caballus
 Felis: Felis catus
 Gasterosteus: Gasterosteus aculeatus
 Gorilla: Gorilla gorilla gorilla
 Heterocephalus: Heterocephalus glaber
 Latimeria: Latimeria chalumnae
 Loxodonta: Loxodonta africana
 Macaca: Macaca mulatta
 Meleagris: Meleagris gallopavo
 Monodelphis: Monodelphis domestica
 Mus: Mus musculus
 Mustela: Mustela putorius furo
 Myotis: Myotis lucifugus

Nomascus: Nomascus leucogenys
 Oikopleura: Oikopleura dioica
 Oreochromis: Oreochromis niloticus
 Oryctolagus: Oryctolagus cuniculus
 Oryzias: Oryzias latipes
 Otolemur: Otolemur garnettii
 Pan: Pan troglodytes
 Pongo: Pongo abelii
 Pteropus: Pteropus alecto
 Rattus: Rattus norvegicus
 Sarcophilus: Sarcophilus harrisii
 Solenopsis: Solenopsis invicta
 Spermophilus: Spermophilus tridecemlineatus
 Sus: Sus scrofa
 Taeniopygia: Taeniopygia guttata
 Takifugu: Takifugu rubripes
 Tetraodon: Tetraodon nigroviridis
 Xenopus: Xenopus tropicalis
 Xiphophorus: Xiphophorus maculatus

Fig. 1-5 CARFの分子系統樹

Fig. 1-6 CARF \mathcal{O} multiple alignment

Homo: Homo sapiens
Equus: Equus caballus
Heteroceph: Heterocephalus glaber
Cavia: Cavia porcellus
Mus: Mus musculus
Rattus: Rattus norvegicus
Spermophil: Spermophilus tridecemlineatus
Cricetulus: Cricetulus griseus
Otolemur: Otolemur garnettii
Pongo: Pongo abelii
Pteropus: Pteropus alecto
Ailuropoda: Ailuropoda melanoleuca
Oryctolagu: Oryctolagus cuniculus
Nomascus: Nomascus leucogenys
Sus: Sus scrofa
Callithrix: Callithrix jacchus
Macaca: Macaca mulatta
Gorilla: Gorilla gorilla gorilla
Mustela: Mustela putorius furo
Felis: Felis catus
Canis: Canis familiaris
Pan: Pan troglodytes
Loxodonta: Loxodonta africana
Myotis: Myotis lucifugus
Sarcophilu: Sarcophilus harrisii
Monodelphi: Monodelphis domestica
Taeniopygi: Taeniopygia guttata
Meleagris: Meleagris gallopavo
Anolis: Anolis carolinensis
Xenopus: Xenopus tropicalis
Xiphophoru: Xiphophorus maculatus
Oreochromi: Oreochromis niloticus
Gasteroste: Gasterosteus aculeatus
Takifugu: Takifugu rubripes
Tetraodon: Tetraodon nigroviridis
Oryzias: Oryzias latipes
Latimeria: Latimeria chalumnae
Oikopleura: Oikopleura dioica
Solenopsis: Solenopsis invicta

	
	5	15	25	35	45	55	
Homo	-----MA	QEVSEYLSQN	PRVAAWVEAL	RCDGETDKHW	RHRRDFLLR-	-----NAGDL	
Equus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Heteroceph	-----MA	QEVSEYLSQN	PRVAAWVEAL	RCEGETDKHW	RHRQEFLLR-	-----NAGDL	
Cavia	-----MA	QEVSEYLSQN	PRVAAWVEAL	RCEGETDKHW	RHRREFLLR-	-----NAGDL	
Mus	-----MA	QEVSEYLSQN	PRVAAWVETL	RCEGETDKHW	RHRREFLLR-	-----NAGDL	
Rattus	-----MA	QEVSEYLSQN	PRVAAWVETL	RCEGETDKHW	RHRREFLLR-	-----NAGDL	
Spermophil	-----MA	QEVSEYLSQN	PRVAAWVEAL	RCEGETDKHW	RHRREFLLR-	-----NAGDL	
Cricetulus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Otolemur	-----MA	QEVSEYLSQN	PRVAAWVEAL	RCEGETDKHW	RHRREFLLR-	-----NAGDL	
Pongo	-----MA	QEVSEYLSQN	PRVAAWVEAL	RCDGETDKHW	RHRRDFLLR-	-----NAGDL	
Pteropus	-----MA	QEVSEYLSQN	PRVAAWVEAL	RCDGETDKHW	RHRREFLLR-	-----NAGDL	
Ailuropoda	-----MA	QEVSEYLSQN	PRVAAWVEAL	RCDGETDKHW	RHRREFLLR-	-----NAGDL	
Oryctolagu	-----MA	QEVSEYLSQN	PRVAAWVEAL	RCEGETDKHW	RHRREFLLR-	-----NAGDL	
Nomascus	-----MA	QEVSEYLSQN	PRVAAWVEAL	RCDGETDKHW	RHRRDFLLR-	-----NAGDL	
Sus	-----MA	QEVSEYLSQN	PRVAAWVEAL	RCDGETDKHW	RHRREFLLR-	-----NAGDL	
Callithrix	-----MA	QDVSEYLSQN	PRVAAWVEAL	RCDGETDKHW	RHRRDFLLR-	-----NAGDL	
Macaca	-----MA	QEVSEYLSQN	PRVAAWVEAL	RCDGETDKHW	RHRRDFLLR-	-----NAGDL	
Gorilla	-----MA	QEVSEYLSQN	PRVAAWVEAL	RCDGETDKHW	RHRRDFLLR-	-----NAGDL	
Mustela	-----MA	QEVSEYLSQN	PRVAAWVEAL	RCDGETDKHW	RHRREFLLR-	-----NAGDL	
Felis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Canis	-----MA	QEVSEYLSQN	PRAAAWVEAL	RCDGETDKHW	RHRREFLLR-	-----NAGGL	
Pan	-----MA	QEVSEYLSQN	PRVAAWVEAL	RCDGETDKHW	RHRRDFLLR-	-----NAGDL	
Loxodonta	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Myotis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Sarcophilu	-----AI	SEVSEYLSQN	PRVAAWVETL	RSDGETDKHW	RHRREFLLR-	-----NAGDL	
Monodelphi	----MARA	AI SEVSEYLSQN	PRVAAWVETL	RSDGETDKHW	RHRREFLLR-	-----NAGDL	
Taeniopygi	-----	-----	---A	AWAETL	RGACEPEHHW	RYRREFLLRN	VGELPAAG--
Meleagris	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Anolis	-----	---SE	EMGEA	GDGEAWVERL	RAECEPEHHW	KYRREFLLR-	-----
Xenopus	----MG	SE	CEVSEFLGQN	PETAAWLERV	RGECESDKWW	QHRREFILRN	-----
Xiphophoru	---MAG	VRCG	DDVSEYLSQN	PQLAQWIESF	RGYCESNKQW	SARREFILRN	-----
Oreochromi	----SG	GE	DVVAEYLGQN	PQLAQWVETF	RSYCESNKQW	VARREFILRN	-----
Gasteroste	--MAC	ETSEG	DVVSEYLDQN	PRLAQWVDTF	RTYCESNKQW	AARREFLLRN	-----
Takifugu	-----SD	K	DIVSEYLAQN	PQLAQWVDTF	RGYCETSKQW	SARREFILRN	-----
Tetraodon	--MARE	GS	DTVSEYLDQN	PNLAQWVDAF	RGYCETSKQW	GARREFILRN	-----
Oryzias	--MAA	QRGGD	DPVSEYLQQN	PHLAGWVDSL	RGFCETSKQW	SARREFILRN	-----
Latimeria	MAGAG	ATEQR	DEVSEFLKQN	RQLAEWVEAL	RGECESEKHW	AARRHFILRN	-----
Oikopleura	-----MT	SAIDALISNA	KSKDDQVDQM	RGCNEAERHW	LARKQFLLKN	-----	-----
Solenopsis	-----	-----	MDEDWDVEQH	KVEYESDEHW	ELRRKFLLAH	-----	-----

	65	75	85	95	105	115
Homo	APAGGAASAS	TDEAADAESG	TRNRQLQLI	SFSMAWANHV	FLGCR-YPQK	VMDKILSMAE
Equus	-----	-----	---SRQLQL	IFSMAWANHV	FLGCR-YSQK	VMDKILSMAE
Heteroceph	APAGGVASAN	TDEAADAESG	TRSRQLQLI	SFSMAWTNHV	FLGCR-YSQK	VMDKILSMAE
Cavia	APAGGVSSN	LDGAADAKS-	---RQLQLI	SFSMAWANHV	FLGCR-YSQK	VMDKILSMAE
Mus	VPA-----	TDETADAESG	ARTRQLQLV	SFSMAWANHV	FLGCR-YPQK	VMDKILSMAE
Rattus	VPA-----	TEETADAESG	ARSRQLQLV	SFSMAWANHV	FLGCR-YPQK	VMDKILSMAE
Spermophil	AP-----	--AAADAESG	TRSRQLQLI	SFSMAWANHV	FLGCR-YPQK	VMDKILSMAE
Cricetulus	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Otolemur	APAGGAALAN	TDEVADAESG	SRSRQLQLI	SFSMAWANHV	FLGCR-YPQK	VMDKILSMAE
Pongo	APAGGAASAS	TDEAADAESG	TRNRQLQLI	SFSMAWANHV	FLGCR-YPQK	VMDKILSMAE
Pteropus	APTGGASAN	TEEAADAESG	TRNRQLQLI	SFSMAWANHV	FLGCR-YPQK	VMDKILSMAE
Ailuropoda	APTG---GAS	TEEAADAESG	TRNRQLQLI	SFSMAWANHV	FLGCR-YPQK	VMDKILSMAE
Oryctolagu	APAG---GAH	TVEAADAESG	TRNRQLQLI	SFSMAWANHV	FLGCR-YPQK	VMDKILSMAE
Nomascus	APAGGAASAS	TDEAADAESG	TRNRQLQLI	SFSMAWANHV	FLGCR-YPQK	VMDKILSMAE
Sus	APAGGAASAR	PEEAADAESG	TRNRQLQLI	SFSMAWANHV	FLGCRRYPQK	VMDKILSMAE
Callithrix	APAG-----	TDEAADAESG	TRSRQLQLI	SFSMAWANHV	FLGCR-YPQK	VMDKILSMAE
Macaca	APAGGAASAS	TDEAADTESG	TRNRQLQLI	SFSMAWANHV	FLGCR-YPQK	VMDKILSMAE
Gorilla	APAGGAASAS	TDEAADAESG	TRNRQLQLI	SFSMAWANHV	FLGCR-YPQK	VMDKILSMAE
Mustela	APTGGAAAAN	AEEAADAESG	SRNRQLQLV	SFSMAWANHV	FLGCR-YPQK	VMDKILSMAE
Felis	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Canis	APTG---PD	AEEAADAESG	SRHRQLQLV	SFSMAWANHV	FLGCR-YPQK	VMDKILSMAE
Pan	APAGGAASAS	TDEAADAESG	TRNRQLQLI	SFSMAWANHV	FLGCR-YPQK	VMDKILSMAE
Loxodonta	----VASSH	TDEAADAESG	SRSRQLQLV	SFSMAWANHV	FLGCR-YPQK	VMDKILSMAE
Myotis	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Sarcophilu	AP-----TA	TTEAASVECG	DRRRQLQLV	SSSMAWANHI	FLGCR-YPPK	VMDKILSMAE
Monodelphi	AP-----TA	TTEAASVECG	DRRRQLQLV	SSSMAWANHI	FLGCR-YPPK	VMDKILSMAE
Taeniopygi	-----	-----	---SAQLQLV	SLSMVWANHV	FLGCR-YPPQ	VMEALEMAE
Meleagris	-----	-----	-----	-----NHV	FLGCR-YPPQ	VTEKALEMAE
Anolis	-----	--NGGEESRE	EEGAE LRRLI	SFSMVWANHV	FLGCR-YPPE	VMEKVMDMAA
Xenopus	----LRDVC	GEGEIPPLPE	TNHKELDRLL	AYSMAWANHV	FTGCR-YPLP	VMEKVLKMAE
Xiphophoru	-----ME	A--FPTVKPG	TCSSSLDRLL	SLSMVWANHV	FLGCS-YPQA	VMDKIKDMGE
Oreochromi	-----ME	A--FPTVKPG	VSSSLDRLL	SLSMVWANHV	FLGCS-YPQA	VMDKIKEMGE
Gasteroste	-----ME	A--FPAMEPG	VPSSSLDKLL	SLSMVWANHV	FLGCS-YPQA	VMDKISEMGE
Takifugu	-----ME	N--FPTVKPG	APSNLDRLL	SLSMVWTNHV	FLGCS-YPPA	VMAKIKEMGE
Tetraodon	-----ME	Q--FPAVKPG	APSAAERLL	SLSMVWANHV	FLGCS-YPPA	VMAKIKQMG
Oryzias	-----ME	GQGVPAAPG	AHSPSLDSSL	SLSMVWANHV	FLGCS-YPPS	VMDKIKEMGE
Latimeria	-----LE	G--FDIKPPG	GFPNLRLL	SLSMVWANHV	FLGCR-YPQA	VMEKVLLEAE
Oikopleura	-----	-----WDD	FTEDNREKLE	CLSQCWSGLH	FLGVG-YPPQ	TVEKVREMSF
Solenopsis	-----	-----	KDKFPEDMLV	CLAQVFVNVE	LLGCR-YPQE	TMDMVKELSQ

	125	135	145	155	165	175
Homo	GIKVTDAPTY	TTRDELVAKV	KKRGISSSN-	--EGVEEPSK	KRVIEGKNSS	AVEQDHAKTS
Equus	GIKVTDAPIH	TTRDELVAKV	KKRGISSSN-	--EGVEEPSK	KRIIEGKNNS	AVEQDHAKSS
Heteroceph	GIKVTDAPIH	TTRDELVAKV	KKRGISSSN-	--EGVEEPSK	KRIVEGKNNS	AVERDLAKIS
Cavia	GIKVTDAPIH	TTRDELVAKV	KKRGISSSN-	--EGVEEPSK	KRIIEGKSNS	AVERDLAKTS
Mus	GIKVTDAPIH	TTRDELVAKV	KKRGISSSN-	--EGVEEPSK	KRAVEGKNNS	SVERDHGKKS
Rattus	GIKVTDAPIH	TTRDELVAKV	KKRGISSSN-	--EGVEEPSK	KRSIEGKNNS	SVERDHGKKS
Spermophil	GIKVTDAPIH	TTRDELVAKV	KKRGISSSN-	--EGVEELSK	KRIIEGKNNS	AVERDLAKIS
Cricetulus	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Otolemur	GIKVTDAPIH	TTRDELVAKV	KKRGISSSN-	--EGVEEPSK	KRAIEGKNNS	AVEQDHAKIS
Pongo	GIKVTDAPTY	TTRDELVAKV	KKRGISSSN-	--EGVEEPSK	KRVIEGKNSS	AVEQDHAKTS
Pteropus	GIKVTDAPIH	TTRDELVAKV	KKRGISSSN-	--EGVEEPTK	KRVTEEKNNNS	TVEQDHAQNS
Ailuropoda	GIKVTDAPIH	TTRDELVAKV	KKRGISSSN-	--EGVEEPAK	KRILEGKNNS	AVEQDHGKIS
Oryctolagu	GIKVTDAPIH	TTRDELVAKV	KKRGISSSN-	--EGVEEPPK	KRVLEGKNNS	AVEQDHAKVS
Nomascus	GIKVTDAPTY	TTRDELVAKV	KKRGISSSN-	--EGVEEPSK	KRVIEGKNSS	AVQQDHAKTS
Sus	GIKVTDAPIH	TTRDELVAKV	KKRGISSSN-	--EGVEEPMK	KRAIEGKSNS	AVEQDHAKIL
Callithrix	GIKVTDAPTY	TTRDELVAKV	KKRGISSSN-	--EGVEEPSK	KRVLEGKNNS	AVEQDHTKTP
Macaca	GIKVTDAPTY	TTRDELVAKV	KKRGISSSN-	--EGVEEPSK	KRVIEGKNSS	AVEQDHAKTS
Gorilla	GIKVTDAPTY	TTRDELVAKV	KKRGISSSN-	--EGVE-PSK	KRVIEGKNSS	AVEQDHAKTS
Mustela	GIKVTDAPIH	TTRDELVAKV	KKRGISSSN-	--EGVEEPAK	KRIIEGKNNS	AVEQDHAKIS
Felis	-----	-----	-----	-----	---MEGKNNS	TVEQDHAKIS
Canis	GIKVTDAPIH	TTRDELVAKV	KKRGISSSN-	--EGVEEPAK	KRLLEGRNNS	AVEQEHAHLS
Pan	GIKVTDAPTY	TTRDELVAKV	KKRGISSSN-	--EGVEEPSK	KRVIEGKNSS	AVEQDHAKTS
Loxodonta	GIKVTDAPIH	TTRDELVAKV	KKRGISSSN-	--EGVEEPSK	KRGIEGKNNS	AVEQDRAKTS
Myotis	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Sarcophilu	GIKVTDAPIH	TTRDELVAKV	KKRGISSSN-	--DGVEEPCK	KRAVEGKSSS	TSIQDALKTC
Monodelphi	GIKVTDAPIH	TTRDELVAKV	KKRGISSSN-	--DGVEEPCK	KRAVEGKNSS	AGGQDALKTS
Taeniopygi	GIQVTNAPVH	TTRDELVAKV	KKRGISSSN-	--EGVEEPSK	RQAVEKSRDS	KDVGKNVKT
Meleagris	GIQVTGAPVR	TTRDELVAKV	KKRGISSSN-	--EGIEEPAK	KRAVEKCKDS	KDTGQDVKT
Anolis	GITVTNAPTH	TLRDDLVSIV	KRRISSSNGS	CTQILINNCN	RRQTTPKNSS	SHYFSCNIKT
Xenopus	NIKVTDAPTH	TTRDELVAKV	KKRGISSSNG	FIRTAYTVCN	NRVPSTHTRA	EIINMHIYTN
Xiphophoru	GIVVQDPPVH	KTTKDGITAR	GKR-----	-----	-----	-----
Oreochromi	GIVVQDPPVH	KTTKDEFTAR	GKRSASAVTS	HSEFSTGTSP	QVRFPTQKVG	AARPSLTQGS
Gasteroste	GIVVKDGPVH	KTTKDGIISR	GKRG-----	-----	-----	-----
Takifugu	GIVVKDAPDH	RTTIDGVMGK	GKRTATNGTP	LFGLYKTVAF	FLL-----NS	WFGDSHYRYI
Tetraodon	GIVVKDAPEH	RTTIDGVMAK	GKRAAASEG-	-----	-----	-----
Oryzias	GIAVQDAPTH	KTTKAKGKRS	AGTGEVQVFE	EMHDSAETIQ	RRK-----	---QKMNFSI
Latimeria	GIDVLDAPSR	TTRDDLVVKM	KKRGLSSSNV	ILEKQCINCV	ITTDQNKTP	RDSNDTRKKT
Oikopleura	GLPNMSMLK	DADQEIHCKE	VKRRRDEQAN	-----	-----	-----
Solenopsis	EVAEYREKQ	KKKLKRTFVE	ASEAASSKVK	GCTAKMSTVT	EESIPNMPNH	LPHTANLSES

	185	195	205	215	225	235
Homo	AKTERASAQQ	ENSSTCIGSA	IKSESG-NSA	RSSGISSQNS	STSDGDRSVS	SQSSSS----
Equus	AKTERASAQQ	EVSSTCMGLS	TKSESGGNSA	RSGGTSSQNS	SASDGDRSVS	RQSSSS----
Heteroceph	AKTERESAQQ	ENSSTSSGPS	NKSESSGNST	RSSGISTQNN	STSEDRSVSS	QSSSSS----
Cavia	AKAERTPAQQ	ENSSRSSGSS	TKSDSGNSAR	SSGSSIQNNS	ASEGDRSVPS	QSSSS-----
Mus	AKTDRSAAQQ	ENSSPSRGSS	TKSESGGTA	RSSSSGSHQD	SATSEGDRSV	CSQSSS----
Rattus	AKTDR-SAQQ	ENSSGSKGSS	TKSESSGTA	RSNSGVSHQN	SSTSEGDRSV	CSQSSS----
Spermophil	AKTECTSAQP	ENSSTCSGSC	TKSESSGNST	RSSGISGQNS	SMSEGDRSVS	SQSSSS----
Cricetulus	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Otolemur	AKTDRVSAQQ	ENSSACPGVT	TKSESSGNST	RSSGISSQNS	STSDGNPSVS	SQSSGS----
Pongo	AKTERASAQQ	ENSSTCTGSA	IKSES-GNSA	RSSGISSQNS	STSDGDRSVS	SQSSSS----
Pteropus	VKTDX-----	-----	-----GNST	RSTGTSSQNS	STSDGDRSVS	SQSSSS----
Ailuropoda	AKTERASAPQ	ENSSACTGAS	SKSESSGNST	RSSGTSSQNS	PTGDGDRSL	SQSRSS----
Oryctolagu	ARTERAAAQQ	ENRSACMGSS	GKSESSGNSA	RSSGVSSQNS	SSSDGDRSAS	SHSGSS----
Nomascus	AKTERASAQQ	ENSSTCTALA	IKSES-GNSA	RSSGISSQNS	STSDGDRSVS	SQSISS----
Sus	AKTERASAQQ	ENSSTCSGSA	AISESSGNST	RSSGTPSQNS	STSDGDRSVS	SQSSSS----
Callithrix	AKTERASAQQ	ENSSACTGSA	AKSES-GNSA	RSSGISSGNS	STGDGDRSVS	SQSSSSSSSS
Macaca	AKTERASAQQ	ENSSAGTGAA	IKSES-GNSA	WSAGISSQNS	STSDGDRSVS	SQSSSS----
Gorilla	AKTARASAQQ	ENSSTCTGSA	IKSES-GNSA	RSSGISSQNS	STSDGDRSVS	SQSSSS----
Mustela	AKTERALAQP	ENSSACAGAS	AKSESSGNSR	RSSGTSSQNS	STGDGDRSL	SQSSSS----
Felis	AKTERASAQQ	ENSSTCTGSS	TKSESSGNST	RSSATSSQNS	STSDGDRSL	SQSSSS----
Canis	AKTERASAQQ	ENSSTCTGSS	VKPES-GNAT	RSSGTSSQNS	STGDGDRSL	SQNSSS----
Pan	AKTERASAQQ	ENSSTCIGSA	IKSES-GNSA	RSSGISSQNS	STSDGDRSVS	SQSSSS----
Loxodonta	AKTEYASAKQ	ENSSTCTGSS	TKSENSGNSS	LSSGISLSET	ISTSDGDRPS	SSQSSS----
Myotis	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Sarcophilu	GKTEQASPQK	EVKVGAVPSI	RPVGENINRS	SSSTLERGST	LSQEGLGQNT	TSNTST----
Monodelphi	GRTEQPSPQK	EVKVGPMST	RSVSGENLC	RSSSSILERG	SALSQEVAGM	KSQNKSTIEL
Taeniopygi	KAEGAKETES	TLPKKQEKDT	ETEGKPANAE	STAEQKPPSS	EKEPGKKPCS	SPPKESK----
Meleagris	KAEPVPMETES	PLPKKQEKDT	KDSESSLSTC	SSNQE-----	-----	-----
Anolis	FKTNYNCCRD	SSTQSSVINM	SQSENGNSHL	RSSCGAVCFV	TSFVATTKGS	EEFCKKR----
Xenopus	LHHFSSPKHD	LKSECFYISH	VKLRTFRLDG	TLFVISHISV	GHPPRVTNST	CILSES----
Xiphophoru	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Oreochromi	MIAAVNANSS	KSCTNLVCLA	KKQKRSCHSD	VSTRYMNTQ	IN-----	-----
Gasteroste	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Takifugu	IITAALNDSE	ILQSRSIQKI	CDSALPGITF	TCESPYPSSD	VS-----	-----
Tetraodon	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Oryzias	SDASRRKGG	CWGGGGVGC	AFTFLLSNVY	LSPHVLTCLL	MF-----	-----
Latimeria	SIKALERERK	IIAGTIKTS	KITKLRSCR	EALHINSNLS	IVNRAENCAG	SYHSSS----
Oikopleura	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Solenopsis	QPTIAQQSRK	KRISKKKRLD	ANKLFPADTK	EPISNIVSYN	HQLCENPNTE	ENPANR----

	245	255	265	275	285	295
Homo	-----	-VSSQVTTAG	SGKASEAEAP	DKHGSASFVS	-LLKSSVNSH	MTQSTDSRQQ
Equus	-----	-LSAQVTTAG	SGKASESQAP	DKHGSASLVS	SLLKSSVNSH	VTQSTESRQR
Heteroceph	-----	-SISSQVTTAG	SGKASESEAP	DKHGSTTFVS	SLLKCNVNSH	MTQTTDCRQQ
Cavia	-----	-SISSQVTPG	SGKASESEAP	DKHGSATFVS	SLLKSSVNSH	VTQPTDSRQQ
Mus	-----	-NSSQVTTAG	SGKALESEAP	HKRGSAFVS	SLLKSSMNSH	MTQSTDNRQQ
Rattus	-----	-NSSQVTSAG	SGKASEPEAP	DKHGSASFVS	SLLKSSLNSH	VTKSTDSRQH
Spermophil	-----	-ISSQVTTAG	SGKASESEAP	DKHGSASFVS	SLLKSSVNSH	VTQSTDSRQQ
Cricetulus	-----	-----	-----	-----	-----MNSH	VTQSTDSRQQ
Otolemur	-----	-ISSQVTTAG	SGKASELEAP	DKHGSASFVS	SLLKSSVNSH	MTQSTDSRQQ
Pongo	-----	-VSSQVTTAG	SGKASEAEAP	DKHGSASFVS	-LLKSSVNSH	MTQSTDSRQQ
Pteropus	-----	-ISSQVTTAG	SGKASESEAP	DKHGSASFVS	SLLKSSVNSH	VNQSTDTRQQ
Ailuropoda	-----	-ISSQVTAAG	SGKAPESEAL	EKHGSASIVS	SLLKSSVNSH	VTQSTDSRQH
Oryctolagu	-----	-VSSQVTVGS	G--KAEEA	DKQGSASFVS	S-----	-----
Nomascus	-----	-VSSQVTTAG	SGKASEAEAP	DKQGSASFVS	LLKSSVN--SH	MTQSTDSRQQ
Sus	-----	-ISSQVTVVG	SGKASESEAP	DKHGSASLVS	SLLKSSVNSH	VTQSTDSRQQ
Callithrix	S-----	-VSSQVTTAG	SGKASEAEAP	DKHSSASFVS	-LLKSSVNSH	MIQSTDSRQQ
Macaca	-----	-VSSQVTTAG	SGKASEAEAP	DKHGSASFVS	-LLKSSVNSH	MTQSTDSRQQ
Gorilla	-----	-VSSQVTTAG	SGKASEAEAP	DKHGSASFVS	-LLKSSVNSH	MTQSTDSRQQ
Mustela	-----	-ISSQVTAAG	SGKASESEAP	EKHSSASIVS	SLLKSSVNSH	VTPSADSRQQ
Felis	-----	-VSSQVTVAG	SGKASESEAP	DKHGSASFVS	SLLKSSVNSH	VTQSADSRQQ
Canis	-----	-ISSQVTVAG	SGKALESEAP	DKHGSASIVS	SLLKSSVNSH	MTQSTDSRQQ
Pan	-----	-VSSQVTTAG	SGKASEAEAP	DKHGSASFVS	-LLKSSVNSH	MTQSTDSRQQ
Loxodonta	-----	-ISSQVTTAG	SGKVSESEAS	DKHGSALFVS	SLLKSSVNSH	VTQSTDSRQQ
Myotis	-----	-----	-----	-----	-----	VTQSSDSSQQ
Sarcophilu	-----	---SQVIASA	PEKLSDIETS	DK--PATILI	SSVTTSNMNS	VGIQLIDPKQ
Monodelphi	TTENLGSKQS	TSTSQAVAAG	PEKVSDVETS	EKHGTTLISS	VAKNSLGTQ	LTDS---KQQ
Taeniopygi	-----	-----LVVA	AQPPASKSTP	QAAAAAAAVP	STSKSTPQAA	AAAAAVPSTS
Meleagris	-----	-----	-----	-----A	STATTKAEE	KSADAHSVE
Anolis	-----	-----A	MGTDKPSEVG	GNDIKTTKVD	VPMEVDAVKS	PGKETSKTPE
Xenopus	-----	-----VKAV	LLKIVQKHQA	TFEGHLKEKE	RLXYTLACTG	HQKMRLKNTA
Xiphophoru	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Oreochromi	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Gasteroste	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Takifugu	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Tetraodon	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Oryzias	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Latimeria	-----	---FLSCIGA	KGTEKQVDSN	HFAPTMAVLA	PMVKHSLNLC	PNQKTEEAKE
Oikopleura	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Solenopsis	-----	-----	-----	-----LKTEE	NVSFKNLQDH	PYKDFVLWER

	305	315	325	335	345	355
Homo	SGSPKKSAL	GSSASASQ	-----	-SSSEIEVPL	LGSSGSSEVE	LPLLSSKPSS
Equus	SGSPKKSAL	GSSISASQ	-----	-SISEIEVPL	LGSSGSSEVE	LPLLSSKPSS
Heteroceph	SGSPKKSAL	SSSVSASQ	-----	-SSSEIEVPL	LGSSGSSEVE	LPLLSSKPSS
Cavia	SGSPKKSAL	SSSVSASQ	-----	-SSSEIEVPL	LGSSGSSEVE	LPLLSSKPSS
Mus	SGSPKKGAL	GSSGSASQ	-----	-SSSEIEVPL	LGSSGSSEVE	LPLLSSCKSSS
Rattus	SGSPRKNAL	GSSSVVSQ	-----	-SSSEIEVPL	LGSSGSSEVE	LPLLSSCKSSS
Spermophil	SGSPKKSAL	GSSVSTSQ	-----	-SSSEIEVPL	LGSSGSSEVE	LPLLSSKPSS
Cricetulus	SGSPKKSAL	GSSVSASQ	-----	-SSSEIEVPL	LGSSGSSEVE	LPLLSSKSSP
Otolemur	SGSPKKSAL	GSSVSASQ	-----	-SSSEIEVPL	LGSSGSSEVE	LPLLSSKPSS
Pongo	SGSPKKSAL	GSSASASQ	-----	-SSSEIEVPL	LGSSGSSEVE	LPLLSSKPSS
Pteropus	SGSPKKSAL	GTSVSASP	-----	-SISEIEVPL	LGSSGSSEVE	LPLLSSKPSS
Ailuropoda	SGSPNKAL	GSSVSASQ	-----	-SLSEIEVPL	LGSSGSSEGE	LPLLSSKPSS
Oryctolagu	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Nomascus	SGSPKKSAL	GSSVSASQ	-----	-SSSEIAVPL	LGSSGSSEVE	LPLLSSKPSS
Sus	SGSPKKSGL	GSSVSASQ	-----	-SISEIEVPL	LGSSGSSEVE	LPLLSSKPSS
Callithrix	SGSPKKSAL	SSSAPASQ	-----	-SSSEIEVPL	LGSSGSSEVE	LPLLSSKPSV
Macaca	GGSPKKSAL	SSSASASQ	-----	-SSSEIEVPL	LGSSGSSEVE	LPLLSSKPSS
Gorilla	SGSPKKSAL	GSSASASQ	-----	-SSSEIEVPL	LGSSGSSEVE	LPLLSSKPSS
Mustela	SGSPKKSAL	GSSVSSSQ	-----	-SISEIEVPL	LGSSGSSEGE	LPLLSSKPSS
Felis	SGSPKKSAL	GSSVSASQ	-----	-SISEIEVPL	LGSSGSSEGE	LPLLSSKPSS
Canis	SGSPKKSAL	GSSVSASQ	-----	-SISEIEVPL	LGSSGSSEGE	LPLLSSKPSS
Pan	SGSPKKSAL	GSSASASQ	-----	-SSSEIEVPL	LGSSGSSEVE	LPLLSSKPSS
Loxodonta	SGSPKKSAL	GSSVSASQ	-----	-SSSEIQVPL	LGSSGSSEVE	LPLLSSKPSS
Myotis	SGSPKKSAL	GSSVSASP	-----	-SISEVEVPL	LGSSGSSEVE	LPLLSSKPSS
Sarcophilu	NASPKKTI	STSSLCSQ	-----	-SASETELPL	LGSSGSSEVE	LPLLSSKPSS
Monodelphi	NASPKKSVL	STSSLSSQNN	SETEVPLLNS	QSRSETSVPL	LGSSGSSEVE	LPLLSSKPGS
Taeniopygi	KSTPQAATVA	AAVPSTSK	-----	---STPQAV	VLAAAAAAA	TAVPPTTKST
Meleagris	QGPAPSSSEK	EAGENPPK	-----	---EGKGEN	VPSPEKTMLS	SGSPPTAPQX
Anolis	KPLPLVVAQK	ASSSSAAS	-----	--TTQTAVPA	TSTSVSQKTA	PTVSTVVAQT
Xenopus	VLHVSSNLI	SEGVVEEP	-----	-CKKQKSTED	HGARKTSNVN	DRVENRNQPS
Xiphophoru	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Oreochromi	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Gasteroste	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Takifugu	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Tetraodon	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Oryzias	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Latimeria	TCRKKKSAFK	EDNGCSKN	-----	---VRNEI	CGEARANHTN	LQWQNPLPST
Oikopleura	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Solenopsis	PGDNAQSILE	TSAAVSGMT	-----	---LTCNYT	VIPEEGWECS	LNLVNSQVLS

	365	375	385	395	405	415
Homo	-----	--ETASSGLT	SKTSSEASVS	SSVAKNSSSS	GTSLLTPKSS	SSTNTS----
Equus	-----	--ETASSGLT	SKTSSEASVS	SSVSKNSSSS	GTSSVTPKSS	TSANTS----
Heteroceph	ETA-----	--ETPSSGLT	SKTSSEAVVS	SSVSK-NSSS	SGTSLLTSKS	SSTNTS----
Cavia	-----	--ETTSSGLT	SKTSSEAGVS	SSVSK-NSSS	-GTSLLTSKS	SSTSTS----
Mus	-----	--ETASSGLT	SKSSSEANIS	SSVSK-NSSS	SGSLLTPQS	SSTNPS----
Rattus	-----	--ETASSGLT	TKASSEANIS	SSVSK-NSSS	SGTSLLMPKS	SSTNTS----
Spermophil	-----	--ETASSGLT	SKTSSEASIS	SSVSK-NSSS	SGTSLLTPKS	SSTNTS----
Cricetulus	-----	--ETASSGLT	SKTSSEASVS	SSVPKNTSST	SGTSLLTPKG	SSTNAS----
Otolemur	-----	--ETASSGLT	SKTSSEASVS	PSVSKNSSSP	GTSLLTPKSS	SSTNTS----
Pongo	-----	--ETASSGLT	SKTSSEASVS	SSVAKNSSSS	GTSLLTPKSS	SSTNTS----
Pteropus	-----	--ETASGVL	SKTSSEASLS	-SLSKNPSPP	GTSLLTPKSS	TSANTT----
Ailuropoda	-----	--ETAAGGLT	SKTSSEASVS	ASVSKNSSSP	GTSLLTPRSS	TSTSTS----
Oryctolagu	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Nomascus	-----	--ETVSSGLT	SKTSSEASVS	SSVAKNSSSS	GTSLLTPKSS	SSTNTS----
Sus	-----	--ETASSGLT	SKTSSEASVA	SVVSKNSSSS	GTSLLTPKSS	TSTNTS----
Callithrix	-----	--ETASSGLT	SKTSSEASVS	SSVSKNSSSS	GTSLLTPKSS	SSTNTS----
Macaca	-----	--ETVSSGLT	SKTSSEASVS	SSVAKNSSSS	GTSLLTPKSS	SSTNTS----
Gorilla	-----	--ETASSGLT	SKTSSEASVS	SSVAKNSSSS	GTSLLTPKSS	SSTNTS----
Mustela	-----	--ETASGGLT	SKTSSEASVS	ASLSKNSSSS	GTSLLVPKSS	TSTSTS----
Felis	-----	--ETASGGLT	SKTSSEASVS	SSASKNSSSS	GISLLTPKSS	TSTPAS----
Canis	-----	--ETASGGLT	SKTSSEASVS	SSVSKNTSSS	GTSLLTPKSS	TSTSTS----
Pan	-----	--ETASSGLT	SKTSSEASVS	SSVAKNSSSS	GTSLLTPKSS	SSTNTS----
Loxodonta	-----	--ETASSGLA	SKTSSEASVS	SSISKNSSSS	GTSLLTPKSS	SSTNTS----
Myotis	-----	--ETASGGLT	SKTSSEANVS	SSVPKNSSSS	GTSLLTPKSS	TSVTTS----
Sarcophilu	ELLPLL---G	SKTTSDGSPS	QSTSKTNLDS	SISSKNNSST	SVQILTPKST	SSASTL----
Monodelphi	ELLPLLGSKT	TSDASTSQST	SKTNSESSIS	SSVSKNSST	SVQMLTSKST	SSSSTSSSST
Taeniopygi	-----	--PQTSALL	SSKTQVGAPA	SVSKNGAQVS	SSLLLAPKSG	TQVSSP----
Meleagris	-----	--PHCCWPLG	AAKRSS-----	LLASKSSAEV	AASLLAARSG	TQQGAS----
Anolis	-----	--TAATTSAA	VAQKPLPTAS	TAVTQNTTPT	TSTTGRSEAK	VSNIES----
Xenopus	-----	---DTMESSS	GKICDGNVPS	TSLNKREVHS	NAAQRDTNT	EfyEKSGNRR
Xiphophoru	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Oreochromi	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Gasteroste	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Takifugu	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Tetraodon	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Oryzias	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Latimeria	-----	---SSNQTV	KLvatLSGQR	TIMTSNEKAI	NSHLMPFAG	HELQKQ----
Oikopleura	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Solenopsis	-----	-----FS	INSNKKVARK	EAAIKALKKL	QKCCYTVKVK	QELGTN----

	425 435 445 455 465 475
Homo	-LLTSKSTSQ VAASLLA--- ----- SKSSSQTSQS LVSKSTSLAS VSQLASKSSS
Equus	-VLTSKSTSQ VATSLLA--- ----- SKGSSQTSQS LVSKSTSLAS VSQLASKSSS
Heteroceph	-LLTSKSTSQ VAASLFA--- ----- SKSSSQASGS LVSKSTSLAS VSQLASKISS
Cavia	-LLTSKSTSQ VAASLLA--- ----- SKSSSQASGS LVSKSTSLAS VSQLASKISS
Mus	-LLTSKSTAQ VAASLLA--- ----- TKSQ----- ----ASLGS VSQLAAKSGS
Rattus	-LLTSQVAAS LLASKSS--- ----- SQSSGSVA--- --SKSTSLGS MSQLASKSSS
Spermophil	-LLTSKSTSQ VAASLLA--- ----- SKSS----- ----SQTTS VSQLASKSSS
Cricetulus	-LLTSKSTSQ VAASLLA--- ----- SKSSSQSSGS VASKSTSLAG MSQLASKSSS
Otolemur	-LLSSKSSSQ VAASLLA--- ----- SKSSSQTSQS LVSKSTSLAS VSQLASKSSS
Pongo	-LLTSKSTSQ VAASLLA--- ----- SKSSSQTSQS LVSKSTSLAS VSQLASKSSS
Pteropus	-MLTSKSTSQ VAASLLA--- ----- SKSSSQTSQS LVSKSTSLAN VSQLASKSSS
Ailuropoda	-MLTSQSTSQ VAASLLA--- ----- SKGSSQTSQS LVPKSTSLAG VSQLASKSSS
Oryctolagu	-----
Nomascus	-LLTSKSTSQ VASSLLA--- ----- SKSSSQTSAS LVSKSTSLAS VSQLASKSSS
Sus	-MLTSKSTSQ VAASLLA--- ----- SKSSSQTGGG LISKSTSIAG VSQLASKSSS
Callithrix	-LLTSKSTSQ VAASLLA--- ----- SKSSSQTSQS LVSKSTSLAS VSQLASKSSS
Macaca	-LLTSKSTSQ VAASLLA--- ----- SKSSSQTSQS LVSKSTSLAS VSQLASKSSS
Gorilla	-LLTSKSTSQ VAASLLA--- ----- SKSSSQTSQS LVSKSTSLAS VSQLASKSSS
Mustela	-MLTSKSTSQ VAASLLA--- ----- SKSSPQTSQS LVSKSTSLAS VSQLASKSSS
Felis	-LLTSKSTSQ VAASLLA--- ----- SKSSSQTSQS LVSKSPSLAG VSQLASKISS
Canis	-LLTSKSTSQ VAASLLA--- ----- SKSSSQTSQS LVSKSTSLAS VSQLASKSSS
Pan	-LLTSKSTSQ VAASLLA--- ----- SKSSSQTSQS LVSKSTSLAS VSQLASKSSS
Loxodonta	-LLTSKSTSQ VAASLLA--- ----- SKSSPQTSQS LVSKSTSLAS VSQLASKSSS
Myotis	-MLTSKSTSQ VAASLLA--- ----- SKSSPQTSQS LVSKSTSLAG VSQLASKSSS
Sarcophilu	-LLPSKSSSQ VAATLLAPKG NS-PATSLLS SKSSSQTSVA LLATKSSLTS VNPLASKSSS
Monodelphi	LLLTSKSSSQ VAATLLASKS SSQTAASILS SKSSSQTSQS LLAPKSSLTS VSQLASKSSS
Taeniopygi	-LLASKSSAE VAASLLAAR- ----- ----SGAQPG SSVLASKSSA
Meleagris	-LLASKSSAQ AAASLLAAR- ----- ----SGAQQG P---SRSGAQ
Anolis	-LASTKHKST LASSLPG--- ----- ----SESKMN YSLTKPPESK SVNALSSEKK
Xenopus	PLPVTAKKSS LNLPEAG--- ----- ----YKHDA
Xiphophoru	-----
Oreochromi	-----
Gasteroste	-----
Takifugu	-----
Tetraodon	-----
Oryzias	-----
Latimeria	-----
Oikopleura	-----
Solenopsis	-----

	485	495	505	515	525	535
Homo	QTSTSQLPSK	STSQSSESSV	KFS-CKLTNE	DVKQKQPPFN	RLYKTVAWKL	VAVGGFSPNV
Equus	QTSTSQLPSK	STSQLESSV	RFSCCKLTNE	DVKQKQPPFN	RLYKTVAWKL	VAVGGFSSSV
Heteroceph	QSSTSQLPSK	STSQSSESSV	KFSCCKFNE	DVKQKQPPFN	RLYKTVAWKL	VAVGGFSPSV
Cavia	QSSTSQLPLK	STSQSSESSV	KFSCCKLTNE	DVKQKQPPFN	RLYKTVAWKL	VAVGGFSPNV
Mus	QSSTSQLPSK	STSQASESSV	KFACRKLNE	DIKQKQPPFN	RLYKTVAWKL	VAVGGFSPTV
Rattus	QSSTSQLPSK	STSQSSESSV	KFTCRKLNE	DIKQKQPPFN	RLYKTVAWKL	VAVGGFSPNV
Spermophil	QSSTSQLPSK	STSQSSESSI	KFSCCKLTNE	DVKQKQPPFN	RLYKTVAWKL	VAVGGFSPNV
Cricetulus	QSSTSQLPSK	STSQSSESSV	KFSCRKLNE	DVKQKQPPFN	RLYKTVAWKL	VAVGGFSPTV
Otolemur	QTSTSQLPSK	SASQSSESSV	KFSCCKLTNE	DVKQKQPPFN	RLYKTVAWKL	VAVGGFSPSV
Pongo	QTSTSQLPSK	STSQSSESSV	KFS-CKLTNE	DVKQKQPPFN	RLYKTVAWKL	VAVGGFSPNV
Pteropus	QTSTSQLPSK	STSQSSESSV	KFSCCKLTNE	DVKQKQPPFN	RLYKTVAWKL	VAVGGFSPSV
Ailuropoda	QTSTSQLPSK	STSQSSESSV	KFSCCKLTNE	DVKQKQPPFN	RLYKTVAWKL	VAVGGFSPNV
Oryctolagu	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Nomascus	QTSTSQLPSK	STSQSSESSV	KFSCCKLTN-E	DVKQKQPPFN	RLYKTVAWKL	VAVGGFSPNV
Sus	QSSMSQLPSK	STSQSSESSV	KFSCCKLTNE	DVKQKQPPFN	RLYKTVAWKL	VAVGGFSPNV
Callithrix	QTSTSQLPSK	STSQSSESSV	KFS-CKLTNE	DVKQKQPPFN	RLYKTVAWKL	VAVGGFSPNV
Macaca	QTSTSQLPSK	STSQSSESAV	KFS-CKLTNE	DVKQKQPPFN	RLYKTVAWKL	VAVGGFSPNV
Gorilla	QTSTSQLPSK	STSQSSESSV	KFS-CKLTNE	DVKQKQPPFN	RLYKTVAWKL	VAVGGFSPNV
Mustela	QTSTSQLPSK	STSQSSESSV	KFSCCKLTNE	DVKQKQPPFN	RLYKTVAWKL	VAVGGFSPNV
Felis	QTSTSQLPSK	STSQSSESSV	KFSCCKLTNE	DVKQKQPPFN	RLYKTVAWKL	VAVGGFSPNV
Canis	QTSTSQLPSK	STSQSSESSV	KFSCCKLTNE	DVKQKQPPFN	RLYKTVAWKL	VAVGGFSPNV
Pan	QTSTSQLPSK	STSQSSESSV	KFS-CKLTNE	DVKQKQPPFN	RLYKTVAWKL	VAVGGFSPNV
Loxodonta	QTSTSQLPSK	STSQSSESSV	RVSCCKLTNE	DVKQKQPPFN	RLYKTVAWKL	VAVGGFSPNV
Myotis	QTSTSQLPSK	STSQSSESSF	RFSCCKLTNE	DVKQKQPPFN	RLYKTVAWKL	VAVGGFSPNV
Sarcophilu	QTSTSQLPSK	SSLQSCCESSV	RFS-CKLTTE	DVKQKQPPFN	RLYKTVAWKL	VAVGGFSPSV
Monodelphi	QTSTSQLPSK	STSQSNESV	RFS-CKLTTE	DVKQKQPPFN	RLYKTVAWKL	VAVGGFSPNV
Taeniopygi	QAGASQLASK	SGLQAGESPA	KALCKPLTSE	DAKERQPPFN	RLYKAVAWKL	VAVGGFSPNV
Meleagris	AAKSSQLASK	SGSQASEGPA	KALCKPLTSE	DAKERQPPFN	RLYKAVAWKL	VAVGGFSPNV
Anolis	LSSESTAALK	SSLHTSAVPV	KIPCRLLTSE	DAKERQPPFN	RLYKAVAWKL	VAVGGFSPTV
Xenopus	AQERKSHSVK	GPSQSSDNAF	KPT-RRFTSE	DTKERQPPFN	RLYKTVAWKL	VSAGGFNANL
Xiphophoru	VKRSRTEADS	RPSGRAAARS	AIQKSGPPPQ	APAEQQPPFN	RLYKAVAWKL	VSAGGFGNL
Oreochromi	AKAGPNELDS	RPALRTAARP	ASQKLGPPPQ	APAEHQPPFN	RLYKAVAWKL	VSAGGFGNL
Gasteroste	NNAHNYGDGA	VKRSRCGANE	RGQKSGPRPQ	APAEHQPPFN	RLYKAVAWKL	VSAGGFGNL
Takifugu	ARSDPNEAEG	RPAGKVTPRP	TAQKWGPPPQ	APAEHQPPFN	RLYKAVAWKL	VSAGGFGNL
Tetraodon	ARGESTEAEAG	RPAGKGASRA	SAQKSGPPPQ	APAEHQPPFN	RLYKAVAWKL	VSAGGFGNL
Oryzias	NKGGTNDLEA	RSSGRTAVRP	SSQKSAPPPQ	APAEHQPPFN	RLYKAVAWKL	VSAGGFGNL
Latimeria	SLQNSQPSQ	ECASKGGETS	IIPSYKLTPE	TVKDRQTFYN	RLYKAVAWKL	VSAGGFSPNL
Oikopleura	KRPAQGPPSA	FSVAENKKQN	TGNADLPAPL	KPNAKQIGLF	LNLSSYCRKQ	GAEADLVHCV
Solenopsis	SQDSLSDDTD	WKGSNICIGNK	LMKMMGWAGG	GLGKSEGGIV	EPMSAIVKTQ	INREGLGLKT

	545	555	565	575	585	595
Homo	NHGELLNAAI	EALKATLDVF	FVPLKELADL	PQNKSSQESI	VCELRCXSVY	LGTGCGKSKE
Equus	NHGELLNAAV	EALKATLDVF	FVPLKELADL	PESKSSQENI	VCELRCXSVY	LGTGCGKSKE
Heteroceph	NHGELLNAAI	KALKATLDVF	FVPLKELADL	PQNKSSQESI	VCELRCXSVY	LGTGCGKSKE
Cavia	NHGELLNAAI	EALKATLDVF	FVPLKELADL	PQNKSSQESI	VCELRCXSVY	LGTGCGKSKE
Mus	NHGELLNAAI	EALKATLDVF	FVPLKELADL	PQNKSSQESI	VCELRCXSVY	LGTGCGKSKE
Rattus	NHGELLNAAI	EALKATLDVF	FVPLKELADL	PQNKSSQESI	VCELRCXSVY	LGTGCGKSKE
Spermophil	NHGELLNAAI	EALKATLDVF	FVPLKELADL	PQNKSSQESI	VCELRCXSVY	LGTGCGKSKE
Cricetulus	NHGELLNAAI	EALKATLDVF	FVPLKELADL	PQNKSSQESI	VCELRCXSVY	LGTGCGKSKE
Otolemur	NHGELLNAAI	EALKATLDVF	FVPLKELADL	PQNKSSQESI	VCELRCXSVY	LGTGCGKSKE
Pongo	NHGELLNAAI	EALKATLDVF	FVPLKELADL	PQNKSSQESI	VCELRCXSVY	LGTGCGKSKE
Pteropus	NHGELLNAAI	EALKATLDVF	FVPLKELADL	PQNKSSQESI	VCELRCXSVY	LGTGCGKSKE
Ailuropoda	NHGELLNAAV	EALKATLDVF	FVPLKELADL	PQNKSSQESI	VCELRCXSVY	LGTGCGKSKE
Oryctolagu	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Nomascus	NHGELLNAAI	EALKATLDVF	FVPLKELADL	PQNKSSQESI	VCELRCXSVY	LGTGCGKSKE
Sus	NHGELLNAAI	EALKATLDVF	FVPLKELADL	PQNKSSQESI	VCELRCXSVY	LGTGCGKSKE
Callithrix	NHGELLNAAI	EALKATLDVF	FVPLKELADL	PQNKSSQESI	VCELRCXSVY	LGTGCGKSKE
Macaca	NHGELLNAAI	EALKATLDVF	FVPLKELADL	PQNKSSQESI	VCELRCXSVY	LGTGCGKSKE
Gorilla	NHGELLNAAI	EALKATLDVF	FVPLKELADL	PQNKSSQESI	VCELRCXSVY	LGTGCGKSKE
Mustela	NHGELLNAAI	EALKATLDVF	FVPLKELADL	PQNKSSQESI	VCELRCXSVY	LGTGCGKSKE
Felis	NHGELLNAAI	EALKATLDVF	FVPLKELADL	PQNK-----	-----	-----
Canis	NHGELLNAAI	EALKATLDVF	FVPLKELADL	PQNKSSQESI	VCELRCXSVY	LGTGCGKSKE
Pan	NHGELLNAAI	EALKATLDVF	FVPLKELADL	PQNKSSQESI	VCELRCXSVY	LGTGCGKSKE
Loxodonta	NHGELLNAAV	EALKATLDVF	FVPLKELADL	PQNKSSQESI	VCELRCXSVY	LGTGCGKSKE
Myotis	NHGELLNAAI	EALKATLDVF	FVPLKELADL	PQSKSSQESI	VCELRCXSVY	LGTGCGKSKE
Sarcophilu	NHGELLNASV	EALKATLDVS	FVPLKELADL	PQNKSSQESI	VCELRCXSVY	LGTGCGKSKE
Monodelphi	NHGELLNASV	EALKATLDVS	FVPLKELADL	PQSKSSQESI	VCELRCXSVY	LGTGCGKSKE
Taeniopygi	NHAELLNSSI	QSVKATLDVA	FVPLKELADL	PQNKSSLENI	VCELRCXSVY	LGTGCGKNME
Meleagris	NHAELLNSSI	QSVKATLDVA	FVPLKELADL	PQNKSSLENI	VCELRCXSVY	LGTGCGKNME
Anolis	NHAELLDSSI	QSVKATLDVE	FVPLKELADL	PQNKSSQENV	VCELRCXSVY	LGTGCGKSKE
Xenopus	NHEELLNSCI	ESLKATLDIA	FVPLKDLADL	PQNKTSQENI	VCELRCXSVY	LGMGCGKTK
Xiphophoru	DHFEILRSCV	ESCKQTVTCV	FVPLKDI EGL	PAGRTQKDGH	VCEIRCQTVY	MGTGYGRDEA
Oreochromi	DHFEILRSCV	ESCKQTLTCV	FVPLKDI TGL	PAGRTQKEGH	VCEIRCQTVF	MGTGYGRDEA
Gasteroste	DHFEILRSCV	ESCKETLTSV	FVPLKDIAGL	PAARTQKEGH	VCEIRCRTVY	MGTGYGRDEA
Takifugu	DHFEILRSCV	ESCKQTLTCV	FVPLKDIAGL	PTGKTQRDGH	VCEIRCQTVY	MGTGYGWDES
Tetraodon	DHFEILRSCV	ESCKQTLTCV	FVPLKDIAGL	PTGRTQRDGH	VCEIRCQAVY	LGTGYGRDES
Oryzias	DHFEVLRSCV	ESCKQTLTCV	FVPLKDI TGL	PAVRAQKEGH	VCELRCXSVY	MGTGYGRDES
Latimeria	NHLGILNSCI	ESIKATLDSY	FLPLKDISDL	PYNKASSENI	VCELRCXSVY	LGTGCGKSEE
Oikopleura	TMQKQR----	-VSFLSEVC	PEIQDMEKF	YDRSISACDE	VVEISIINIF	IAQAVAPTRE
Solenopsis	NSKNSPAQI	NEIKAKCKKL	FKDLLQTDNY	LRN-----EIM	FLDFPKEDRM	IIHQLARSMG

	605	615	625	635	645	655
Homo	NAKAVASREA	LKLFLKKKVV	VKICKRKYR-	GSEIEDLVLL	DEESRPVN--	LPPALKHPQE
Equus	NAKAVASREA	LKLFLKKKVV	VKICKRKYR-	GSEIEDLVLL	DEESRPVN--	LPPALKHPQE
Heteroceph	NAKAVASREA	LKLFLKKKVV	VKICKRKYR-	GNEIEDLVLL	DEEARPVN--	LPPALKHPQE
Cavia	NAKAVASREA	LKLFLKKKVV	VKICKRKYR-	GSEIEDLVLL	DEESRPVN--	LPPALKHPQE
Mus	NAKAVASREA	LKLFLKKKVV	VKICKRKYR-	GSEIEDLVLL	DEEARPVN--	LPPALKHPQE
Rattus	NAKAVASREA	LKLFLKKKVV	VKICKRKYR-	GNEIEDLVLL	DEESRPVN--	LPPALKHPQE
Spermophil	NAKAVASREA	LKLFLKKKVV	VKICKRKYR-	GSEIEDLVLL	DEESRPVN--	LPPALKHPQE
Cricetulus	NAKAVASREA	LKLFLKKKVV	VKICKRKYR-	GSEVEDLVLL	DEESRPLN--	LPPALKHPQE
Otolemur	NAKAVASREA	LKLFLKKKVV	VKICKRKYR-	GSEIEDLVLL	DEESRPVN--	LPPALKHPQE
Pongo	NAKAVASREA	LKLFLKKKVV	VKICKRKYR-	GSEIEDLVLL	DEESRPVN--	LPPALKHPQE
Pteropus	NAKAVASREA	LKLFLKKKVV	VKICKRKYR-	GSEIEDLVLL	DEESRPVN--	LPPALKHPQE
Ailuropoda	NAKAVASREA	LKLFLKKKVV	VKICKRKYR-	GSEIEDLVLL	DEESRPVN--	LPPALKHPQE
Oryctolagu	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Nomascus	NAKAVASREA	LKLFLKKKVV	VKICKRKYR-	GSEIEDLVLL	DEESRPVN--	LPPALKHPQE
Sus	NAKAVASREA	LKLFLKKKVV	VKICKRKYR-	GSEIEDLVLL	DEESRPVN--	LPPALKHPQE
Callithrix	NAKAVASREA	LKLFLKKKVV	VKICKRKYR-	GSEIEDLVLL	DEESRPVN--	LPPALKHPQE
Macaca	NAKAVASREA	LKLFLKKKVV	VKICKRKYR-	GSEIEDLVLL	DEESRPVN--	LPPALKHPQE
Gorilla	NAKAVASREA	LKLFLKKKVV	VKICKRKYR-	GSEIEDLVLL	DEESRPVN--	LPPALKHPQE
Mustela	NAKAVASREA	LKLFLKKKVV	VKICKRKYR-	GSEIEDLVLL	DEESRPVN--	LPPALKHPQE
Felis	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Canis	NAKAVASREA	LKLFLKKKVV	VKICKRKYR-	GSEIEDLVLL	DEESRPVN--	LPPALKHPQE
Pan	NAKAVASREA	LKLFLKKKVV	VKICKRKYR-	GSEIEDLVLL	DEESRPVN--	LPPALKHPQE
Loxodonta	NAKAVASREA	LKLFLKKKVV	VKICKRKYR-	GGEIEDLVLL	DEESRPVN--	LPPALKHPQE
Myotis	NAKAVASREA	LKVFLKKKVV	VKICKRKYR-	GSEIEDLVLL	DEESRPVN--	LPPALKHPQE
Sarcophilu	NAKAVASREA	LKLFLKKKVV	VKICKRKYR-	GSEIEDLVLL	DEESRPTN--	LPPALKHPQE
Monodelphi	NAKAVASREA	LKLFLKKKVV	VKICKRKYR-	GTEIEDLVLL	DEESRPTN--	LPPALKHPQE
Taeniopygi	NAKAVASREA	LKLFLKKKVI	VKICKRKYK-	GSEIEDLVLL	DEESKPSN--	LPPALRNPRE
Meleagris	NAKAVASREA	LKLFLKKKVI	VKICKRKYK-	GSEIEDLVLL	DEESKPSN--	LPPALLNPRE
Anolis	NAKAVASREA	LKLFLKKKVV	VKLCKRKYK-	GREMEDLVLL	DEESKPLN--	LPPALRNPRE
Xenopus	TAKAVASREA	VKLFLKKKVV	VRICRRKYN-	GRDVEDLVLY	DEESRPVN--	LPPAIRNPQE
Xiphophoru	AAKAMASKEA	LKVFQGRKVT	VKICRRRYR-	GREVEDLVLL	DELPRYQG--	FPPALSYPFQ
Oreochromi	AARAMASKEA	LKVFQGRKVT	VKICRRRYK-	GKDVEDLMLL	DEQPRSQG--	FPPALSYPFQ
Gasteroste	AARAMASKEA	LKVFQGRKVT	VKICRRRYK-	GKDVEDLMLL	DEQPRNQG--	FPPALSFPFE
Takifugu	AAKAMASKEA	LKVFQGRKVT	VKICRRRYR-	GRDVEDLMLL	DEQPRSQG--	FPPAISYPFQ
Tetraodon	AAKAMASKEA	LKVFQGRKVT	VKICRRRYR-	GRDVEDLMLL	DEQPRSQG--	FPPAISYPFQ
Oryzias	AARAMASKEA	LKVFQGRKVT	VKICRRRFR-	GRDVDDLMLL	DEQPRSQG--	FPPALSYPFQ
Latimeria	NAKVASREA	LKLFLKKKVI	VKIMKRKYK-	GRDIEDLVLL	DEESKPLN--	LPPALRNPRE
Oikopleura	EAKKLALQEA	IKILQNMPVV	VVSCHRKKAN	GKIVSELGLV	NSRGAKVLGI	IPPKLKTPFI
Solenopsis	LKSRSYGKQD	RKLIVSRKVN	IWNLVRELN-	--SLGGVTDK	YELVKPID--	-KKFISLPSI

.... |.... |

665

Homo	LL-----
Equus	LL-----
Heteroceph	LL-----
Cavia	LL-----
Mus	LL-----
Rattus	LL-----
Spermophil	LL-----
Cricetulus	LL-----
Otolemur	LL-----
Pongo	LL-----
Pteropus	LL-----
Ailuropoda	LL-----
Oryctolagu	-----
Nomascus	LL-----
Sus	LL-----
Callithrix	LL-----
Macaca	LL-----
Gorilla	LL-----
Mustela	LL-----
Felis	-----
Canis	LL-----
Pan	LL-----
Loxodonta	L-----
Myotis	LL-----
Sarcophilu	LP-----
Monodelphi	LP-----
Taeniopygi	IL-----
Meleagris	II-----
Anolis	LL-----
Xenopus	LV-----
Xiphophoru	DEPQDEGPDC
Oreochromi	DE-----
Gasteroste	AER-----
Takifugu	DE-----
Tetraodon	GEQ-----
Oryzias	EE-----
Latimeria	IY-----
Oikopleura	MVEPR-----
Solenopsis	DI-----

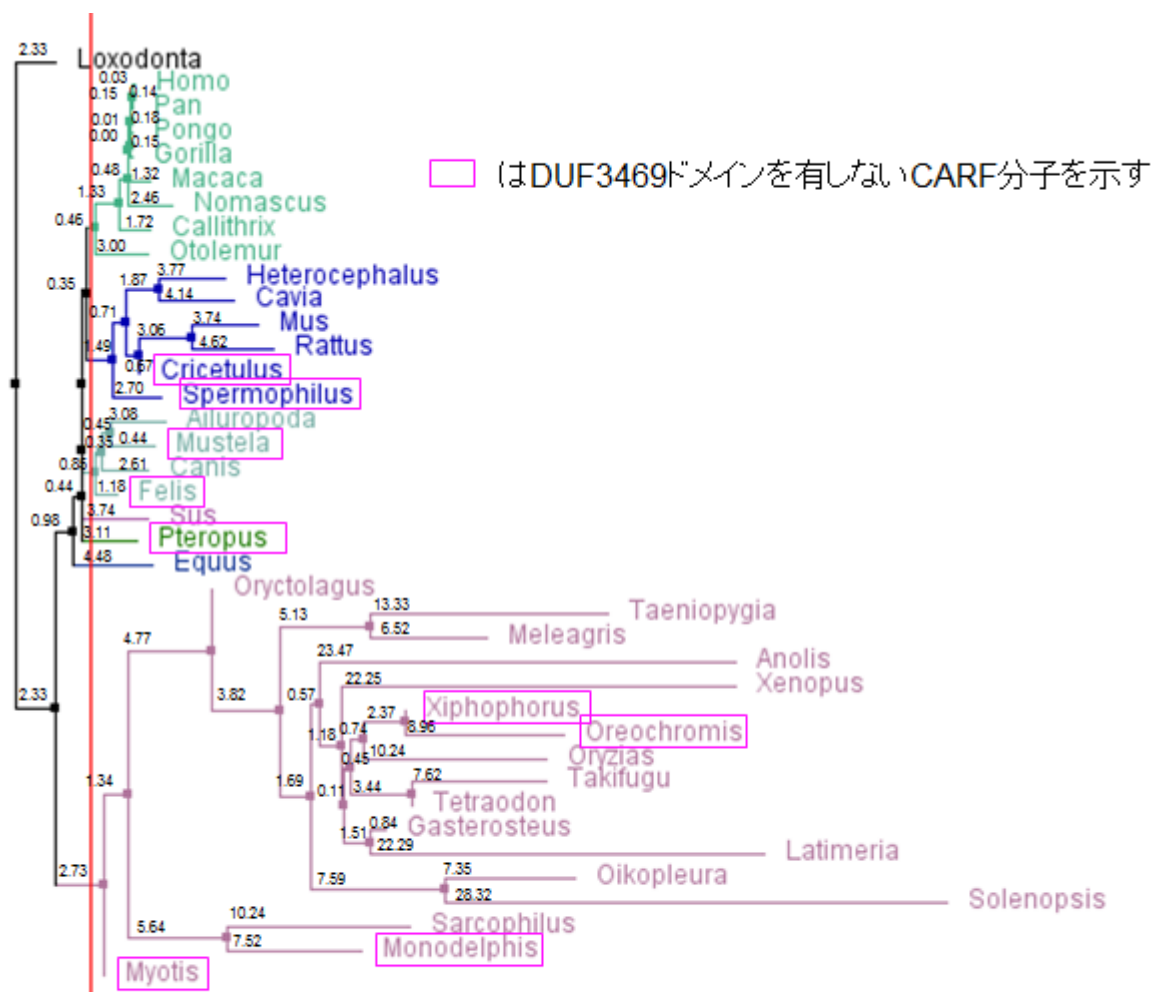


Fig. 1-7 CARFの分子系統樹

Table 1-1 報告のあるARF相互作用タンパク質

Uniprot KB accession, protein name, Gene symbol: Swiss Protデータベースに登録されているaccession、protein name、Gene symbolを記載

Uniprot KB accession	protein name	Gene Symbol	species	参考文献
P53396	ATP-citrate synthase	ACLY	Homo Sapiens	59
P68133	Actin, alpha skeletal muscle	ACTA1	Homo Sapiens	60
P60709	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	Homo Sapiens	59
Q562R1	Beta-actin-like protein 2	ACTBL2	Homo Sapiens	60
P63261	Actin, cytoplasmic 2	ACTG1	Homo Sapiens	59, 60
O43707	Alpha-actinin-4	ACTN4	Homo Sapiens	59
Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	AHNAK	Homo Sapiens	42
Q6UB98	Ankyrin repeat domain-containing protein 12	ANKRD12	Homo Sapiens	42
Q13535	Serine/threonine-protein kinase ATR	ATR	Homo Sapiens	61
O14965	Aurora kinase A	AURKA	Homo Sapiens	62
P41183	B-cell lymphoma 6 protein homolog	Bcl6	Mus musculus	64
P38398	Breast cancer type 1 susceptibility protein	BRCA1	Homo Sapiens	63
Q8WUW1	Protein BRICK1	BRK1	Homo Sapiens	60
Q5T5S1	Coiled-coil domain-containing protein 183	CCDC183	Homo Sapiens	42
P24385	G1/S-specific cyclin-D1	CCND1	Homo Sapiens	54, 65
P30279	G1/S-specific cyclin-D2	CCND2	Homo Sapiens	53, 66
P51959	Cyclin-G1	CCNG1	Homo Sapiens	44
O75419	Cell division control protein 45 homolog	CDC45	Homo Sapiens	45
Q99459	Cell division cycle 5-like protein	CDC5L	Homo Sapiens	45
Q99741	Cell division control protein 6 homolog	CDC6	Homo Sapiens	45
O00311	Cell division cycle 7-related protein kinase	CDC7	Homo Sapiens	45
Q9UQ88	Cyclin-dependent kinase 11A	CDK11A	Homo Sapiens	67
P11802	Cyclin-dependent kinase 4	CDK4	Homo Sapiens	28, 29, 30, 31, 45, 46
Q96JB5	CDK5 regulatory subunit-associated protein 3	CDK5RAP3	Homo Sapiens	68, 69
Q00534	Cyclin-dependent kinase 6	CDK6	Homo Sapiens	28, 29, 30, 31, 47
Q9NXV6	CDKN2A-interacting protein (CARF)	CDKN2AIP	Homo Sapiens	43, 117
P42773	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor C	CDKN2C	Homo Sapiens	48
P49760	Dual specificity protein kinase CLK2	CLK2	Homo Sapiens	67
Q8N668	COMM domain-containing protein 1	COMM1	Homo Sapiens	70
Q92905	COP9 signalosome complex subunit 5	COPS5	Homo Sapiens	71
Q6UXH1	Cysteine-rich with EGF-like domain protein 2	CRELD2	Homo Sapiens	72
P33240	Cleavage stimulation factor subunit 2	CSTF2	Homo Sapiens	60
P56545	C-terminal-binding protein 2	CTBP2	Homo Sapiens	73
Q13617	Cullin-2	CUL2	Homo Sapiens	71
Q9UER7	Death domain-associated protein 6	DAXX	Homo Sapiens	74
O75398	Deformed epidermal autoregulatory factor 1 homolog	DEAF1	Homo Sapiens	72
Q8WYQ5	Microprocessor complex subunit DGCR8	DGCR8	Homo Sapiens	75
Q9Y463	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1B	DYRK1B	Homo Sapiens	67
Q01094	Transcription factor E2F1	E2F1	Homo Sapiens	49, 50
Q66K89	Transcription factor E4F1	E4F1	Homo Sapiens	51
P0C732	Epstein-Barr nuclear antigen leader protein	EBNA-LP	Epstein-Barr virus (strain GD1)	76
Q8AZK7	Epstein-Barr nuclear antigen leader protein	EBNA-LP	Epstein-Barr virus (strain B95-8)	76
P13639	Elongation factor 2	EEF2	Homo Sapiens	59
P18146	Early growth response protein 1	EGR1	Homo Sapiens	52
Q14152	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	EIF3A	Homo Sapiens	42
P29320	Ephrin type-A receptor 3	EPHA3	Homo Sapiens	59
P26885	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2	FKBP2	Homo Sapiens	77
P02751	Fibronectin	FN1	Homo Sapiens	72
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	Homo Sapiens	59
O75496	Geminin	GMNN	Homo Sapiens	45
Q9BVP2	Guanine nucleotide-binding protein-like 3	GNL3	Homo Sapiens	78

Table 1-1 報告のあるARF相互作用タンパク質の続き

Uniprot KB accession	protein name	Gene Symbol	species	参考文献
P15170	Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A	GSPT1	Homo Sapiens	42
Q13547	Histone deacetylase 1	HDAC1	Homo Sapiens	79
Q16665	Hypoxia-inducible factor 1-alpha	HIF1A	Homo Sapiens	34
Q8NE63	Homeodomain-interacting protein kinase 4	HIPK4	Homo Sapiens	67
Q8N257	Histone H2B type 3-B	HIST3H2BB	Homo Sapiens	79
P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	HNRNPA2B1	Homo Sapiens	59
P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	HNRNPC	Homo Sapiens	59
Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	HNRNPU	Homo Sapiens	72
P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	Homo Sapiens	59
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1	Homo Sapiens	42
P34932	Heat shock 70 kDa protein 4	HSPA4	Homo Sapiens	59
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8	Homo Sapiens	59
P38646	Stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9	Homo Sapiens	59
Q7Z6Z7	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	HUWE1	Homo Sapiens	27
O14920	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta	IKKB	Homo Sapiens	80
Q9UK53	Inhibitor of growth protein 1	ING1	Homo Sapiens	81
Q9UNL4	Inhibitor of growth protein 4	ING4	Homo Sapiens	82
Q92993	Histone acetyltransferase KAT5	KAT5	Homo Sapiens	83
Q9UHA4	Ragulator complex protein LAMTOR3	LAMTOR3	Homo Sapiens	84
O95777	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM8	LSM8	Homo Sapiens	60
P53779	Mitogen-activated protein kinase 10	MAPK10	Homo Sapiens	33
P45983	Mitogen-activated protein kinase 8	MAPK8	Homo Sapiens	33
Q7L590	Protein MCM10 homolog	MCM10	Homo Sapiens	45
P49736	DNA replication licensing factor MCM2	MCM2	Homo Sapiens	45
P33992	DNA replication licensing factor MCM5	MCM5	Homo Sapiens	45
Q14566	DNA replication licensing factor MCM6	MCM6	Homo Sapiens	59
Q00987	E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2 (HDM2)	MDM2	Homo Sapiens	13, 35, 36, 37
O15151	Protein Mdm4	MDM4	Homo Sapiens	85
Q13201	Multimerin-1	MMRN1	Homo Sapiens	59
Q99707	Methionine synthase	MTR	Homo Sapiens	59
P01106	Myc proto-oncogene protein	MYC	Homo Sapiens	38
P04198	N-myc proto-oncogene protein	MYCN	Homo Sapiens	86
P19105	Myosin regulatory light chain 12A	MYL12A	Homo Sapiens	59
Q9Y2A7	Nck-associated protein 1	NCKAP1	Homo Sapiens	60
P19338	Nucleolin	NCL	Homo Sapiens	42
O75376	Nuclear receptor corepressor 1	NCOR1	Homo Sapiens	32
Q9Y618	Nuclear receptor corepressor 2	NCOR2	Homo Sapiens	32
Q13287	N-myc-interactor	NMI	Homo Sapiens	87
P06748	Nucleophosmin	NPM1	Homo Sapiens	18, 27, 78, 88, 89, 90, 91
O43929	Origin recognition complex subunit 4	ORC4	Homo Sapiens	45
P12004	Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	Homo Sapiens	59
O75340	Programmed cell death protein 6	PDCD6	Homo Sapiens	59
P40855	Peroxisomal biogenesis factor 19	PEX19	Homo Sapiens	42
O75928	E3 SUMO-protein ligase PIAS2	PIAS2	Homo Sapiens	90, 92
P62140	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	PPP1CB	Homo Sapiens	93
P36873	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	PPP1CC	Homo Sapiens	93
Q96SB3	Neurabin-2	PPP1R9B	Homo Sapiens	39
P17252	Protein kinase C alpha type	PRKCA	Homo Sapiens	72
P17980	26S protease regulatory subunit 6A	PSMC3	Homo Sapiens	40, 94
P61289	Proteasome activator complex subunit 3	PSME3	Homo Sapiens	95
Q8WYP3	Ras and Rab interactor 2	RIN2	Homo Sapiens	59
Q99496	E3 ubiquitin-protein ligase RING2	RNF2	Homo Sapiens	96
P62913	60S ribosomal protein L11	RPL11	Homo Sapiens	97

Table 1-1 報告のあるARF相互作用タンパク質の続き

Uniprot KB accession	protein name	Gene Symbol	species	参考文献
P78345	Ribonuclease P protein subunit p38	RPP38	Homo Sapiens	60
P62081	40S ribosomal protein S7	RPS7	Homo Sapiens	42
Q9Y230	RuvB-like 2	RUVBL2	Homo Sapiens	59
Q8TEE9	Histone deacetylase complex subunit SAP25	SAP25	Homo Sapiens	98
Q9H4L4	Sentrin-specific protease 3	SEN3	Homo Sapiens	99
Q9UHV2	SERTA domain-containing protein 1	SERTAD1	Homo Sapiens	53, 54
O15304	Apoptosis regulatory protein Siva	SMA1	Homo Sapiens	100
P02730	Band 3 anion transport protein	SLC4A1	Homo Sapiens	55
P51532	Transcription activator BRG1	SMARCA4	Homo Sapiens	101
P09012	U1 small nuclear ribonucleoprotein A	SNRPA	Homo Sapiens	59
P14678	Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B and B	SNRPB	Homo Sapiens	59
P08047	Transcription factor Sp1	SP1	Homo Sapiens	102
Q3YBR2	Transforming growth factor beta regulator 1	TBRG1	Homo Sapiens	42
Q8NHU6	Tudor domain-containing protein 7	TDRD7	Homo Sapiens	72
P11387	DNA topoisomerase 1	TOP1	Homo Sapiens	103
P04637	Cellular tumor antigen p53	TP53	Homo Sapiens	12, 13, 14, 51, 97, 104
Q9H3D4	Tumor protein 63	TP63	Homo Sapiens	105
P60174	Triosephosphate isomerase	TP1	Homo Sapiens	42
Q15628	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein	TRADD	Homo Sapiens	91
Q14669	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12	TRIP12	Homo Sapiens	78, 87, 91, 106
Q15361	Transcription termination factor 1	TTF1	Homo Sapiens	107
Q71U36	Tubulin alpha-1A chain	TUBA1A	Homo Sapiens	59
Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain	TUBA1C	Homo Sapiens	59
P07437	Tubulin beta chain	TUBB	Homo Sapiens	59
P68371	Tubulin beta-4B chain	TUBB4B	Homo Sapiens	59
P99024	Tubulin beta-5 chain	Tubb5	Mus musculus	108
P0CG48	Polyubiquitin-C	UBC	Homo Sapiens	78, 87, 91, 100, 104, 106, 109, 110, 111
P49459	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 A	UBE2A	Homo Sapiens	56
P63279	SUMO-conjugating enzyme UBC9	UBE2I	Homo Sapiens	112
O95155	Ubiquitin conjugation factor E4B	UBE4B	Homo Sapiens	59
P09936	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	UCHL1	Homo Sapiens	104
Q9BXU7	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 26	USP26	Homo Sapiens	59
P40337	Von Hippel-Lindau disease tumor suppressor	VHL	Homo Sapiens	113, 114
Q64259	Von Hippel-Lindau disease tumor suppressor	Vhl	Rattus norvegicus	113, 114
Q14191	Werner syndrome ATP-dependent helicase	WRN	Homo Sapiens	36
P25490	Transcriptional repressor protein YY1	YY1	Homo Sapiens	41
Q96JP5	E3 ubiquitin-protein ligase ZFP91	ZFP91	Homo Sapiens	42
Q86WZ6	Zinc finger protein 227	ZNF227	Homo Sapiens	42
Q86VK4	Zinc finger protein 410	ZNF410	Homo Sapiens	57
Q8TAQ5	Zinc finger protein 420	ZNF420	Homo Sapiens	58
P04578	Envelope glycoprotein gp160	env	Human immunodeficiency virus type 1 group M subtype B (isolate	26
P04601	Protein Nef	nef	Human immunodeficiency virus type 1 group M subtype B (isolate	115
P04608	Protein Tat	tat	Human immunodeficiency virus type 1 group M subtype B (isolate	116

Table 1-2 InPalanoidデータベースサーチによるヒトCARFのオーソログ

Species	Common Name	Protein ID (UniProt)	Gene name	Gene ID (UniProt)	AA Length
<i>Cricetulus griseus</i>	Chinese hamster	G3GST5	I79_000706	G3GST5_CRIGR	330
<i>Heterocephalus glaber</i>	naked mole-rat	G5B768	GW7_10675	G5B768_HETGA	587
<i>Solenopsis invicta</i>	red fire ant	E9J4R2	SINV_00901	E9J4R2_SOLIN	476
<i>Oikopleura dioica</i>	-	E4XEV6	GSOID_T00008638001	E4XEV6_OIKDI	304
<i>Xiphophorus maculatus</i>	Southern platyfish	M4AUX8	CDKN2AIP	M4AUX8_XIPMA	317
<i>Pteropus alecto</i>	black flying fox	L5KDF9	PAL_GLEAN10021644	L5KDF9_PTEAL	561
<i>Mustela putorius furo</i>	Ferret	M3YHZ5	CDKN2AIP	M3YHZ5_MUSPF	583
<i>Felis catus</i>	Cat	M3WU69	CDKN2AIP	M3WU69_FELCA	353
<i>Mus musculus</i>	Mouse	Q8BI72	Cdkn2aip	CARF_MOUSE	563
<i>Rattus norvegicus</i>	Rat	Q5U2X0	Cdkn2aip	CARF_RAT	570
<i>Cavia porcellus</i>	Guinea pig	H0VKP4	CDKN2AIP	H0VKP4_CAVPO	576
<i>Monodelphis domestica</i>	Gray short-tailed opossum	K7E4U6	CDKN2AIP	K7E4U6_MONDO	635
<i>Anolis carolinensis</i>	Green anole lizard	G1KFY8	CDKN2AIP	G1KFY8_ANOCA	552
<i>Otolemur garnettii</i>	Small-eared galago	H0XKQ5	CDKN2AIP	H0XKQ5_OTOGA	583

Table 1-2 InPalanoidデータベースサーチによるヒトCARFのオーソログの続き

Takifugu rubripes	Japanese pufferfish	H2UD53	CDKN2AIP	H2UD53_TAKRU	388
<p>0.1 Expected Substitutions per Site</p>					
Spermophilus tridecemlineatus	thirteen-lined ground squirrel	I3NBD9	CDKN2AIP	I3NBD9_SPETR	561
<p>0.01 Expected Substitutions per Site</p>					
Myotis lucifugus	Little brown bat	G1PEW4	uncharacterized_G1PEW4	G1PEW4_MYOLU	326
<p>0.01 Expected Substitutions per Site</p>					
Taeniopygia guttata	Zebra finch	H0Z846	CDKN2AIP	H0Z846_TAEGU	531
<p>0.1 Expected Substitutions per Site</p>					
Nomascus leucogenys	Northern white-cheeked gibbon	G1RIG6	CDKN2AIP	G1RIG6_NOMLE	580
<p>0.005 Expected Substitutions per Site</p>					
Gasterosteus aculeatus	Three-spined stickleback	G3PZL1	CDKN2AIP	G3PZL1_GASAC	313
<p>0.1 Expected Substitutions per Site</p>					
Latimeria chalumnae	West Indian ocean coelacanth	H3AYU3	CDKN2AIP	H3AYU3_LATCH	550
<p>0.1 Expected Substitutions per Site</p>					
Oryzias latipes	Medaka fish	H2L348	CDKN2AIP	H2L348_ORYLA	390
<p>0.1 Expected Substitutions per Site</p>					
Oreochromis niloticus	Nile tilapia	I3JIZ4	LOC100711153	I3JIZ4_ORENI	394
<p>0.1 Expected Substitutions per Site</p>					
Xenopus tropicalis	Western clawed frog	F6UJR2	cdkn2aip	F6UJR2_XENTR	553
<p>0.1 Expected Substitutions per Site</p>					
Meleagris gallopavo	Common turkey	G1N411	LOC100547567	G1N411_MELGA	429
<p>0.1 Expected Substitutions per Site</p>					
Sarcophilus harrisii	Tasmanian devil	G3WJ04	CDKN2AIP	G3WJ04_SARHA	593
<p>0.1 Expected Substitutions per Site</p>					
Callithrix jacchus	White-tufted-ear marmoset	F6VA21	CDKN2AIP	F6VA21_CALJA	579
<p>0.01 Expected Substitutions per Site</p>					
Macaca mulatta	Rhesus macaque	F6V1G3	CDKN2AIP	F6V1G3_MACMU	580
<p>0.005 Expected Substitutions per Site</p>					

Table 1-2 InPalanoidデータベースサーチによるヒトCARFのオーソログの続き

Gorilla gorilla gorilla	Lowland gorilla	G3S5R6	CDKN2AIP	G3S5R6_GORGO	579
Pan troglodytes	Chimpanzee	H2QQH5	ENSG00000168564	H2QQH5_PANTR	580
Pongo abelii	Sumatran orangutan	H2PEU0	CDKN2AIP	H2PEU0_PONAB	580
Canis familiaris	Dog	F1PWX8	CDKN2AIP	F1PWX8_CANFA	578
Ailuropoda melanoleuca	Giant panda	G1LNP1	LOC100467544	G1LNP1_AILME	580
Loxodonta africana	African elephant	G3T3C8	LOC100671110	G3T3C8_LOXAF	532
Equus caballus	Horse	F6VR43	CDKN2AIP	F6VR43_HORSE	514
Sus scrofa	Pig	F1RT10	CDKN2AIP	F1RT10_PIG	584
Oryctolagus cuniculus	Rabbit	G1SP12	LOC100340987	G1SP12_RABIT	243
Tetraodon nigroviridis	Spotted green pufferfish	H3CE86	CDKN2AIP	H3CE86_TETNG	312

*水色: InPalanoidデータベースサーチのみ検出

Table 1-3 OrthoDBデータベースサーチによるヒトCARFのオーソログ

Species	Common Name	Protein ID (UniProt)	AA Length
Danio rerio	Zebrafish	F1QZX8	312
Oreochromis niloticus	Nile tilapia	I3JIZ3	320
Oryzias latipes	Medaka fish	H2L348	390
Xiphophorus maculatus	Southern platyfish	M4AUX8	317
Gasterosteus aculeatus	Three-spined stickleback	G3PZL1	313
Tetraodon nigroviridis	Spotted green pufferfish	H3CE86	312
Takifugu rubripes	Japanese pufferfish	H2UD52	314
Latimeria chalumnae	West Indian ocean coelacanth	H3AYU3	550
Xenopus tropicalis	Western clawed frog	F6UJR2	553
Pelodiscus sinensis	Chinese softshell turtle	K7FTX3	501
Anolis carolinensis	Green anole lizard	G1KFY8	552
Taeniopygia guttata	Zebra finch	H0Z846	531
Meleagris gallopavo	Common turkey	G1N411	429
Gallus gallus	Chicken	E1C4G6	585
Monodelphis domestica	Gray short-tailed opossum	K7E4U6	635
Sarcophilus harrisii	Tasmanian devil	G3WJ04	593
Loxodonta africana	African elephant	G3T3C8	532
Myotis lucifugus	Little brown bat	G1PEW4	326
Equus caballus	Horse	F6VR43	514
Felis catus	Cat	M3WU69	353
Felis catus	Cat	M3WSE4	123
Canis familiaris	Dog	F1PWX8	578
Ailuropoda melanoleuca	Giant panda	G1LNP1	580
Mustela putorius furo	Ferret	M3YHZ5	583
Sus scrofa	Pig	F1RT10	584
Bos taurus	Bovine	F1MTI2	126
Oryctolagus cuniculus	Rabbit	G1U8Q6	561
Ictidomys tridecemlineatus	Thirteen-lined ground squirrel	I3NBD9	561
Cavia porcellus	Guinea pig	H0VKP4	576
Rattus norvegicus	Rat	Q5U2X0	570
Mus musculus	Mouse	Q8BI72	563
Otolemur garnettii	Small-eared galago	H0XKQ5	583
Callithrix jacchus	White-tufted-ear marmoset	F6V9Z9	570
Macaca mulatta	Rhesus macaque	F6V1G3	580
Nomascus leucogenys	Northern white-cheeked gibbon	G1RIG6	580
Pongo abelii	Sumatran orangutan	H2PEU0	580
Gorilla gorilla	Lowland gorilla	G3S5R6	579
Pan troglodytes	Chimpanzee	H2QQH5	580

*UniProtに登録があるタンパク質のみ抽出

**OrthoDBデータベースサーチのみに検出

Table 1-4 CARFが細胞増殖に与える影響

原因	影響	細胞、組織、動物	機構	文献
CARFの過剰発現	colony forming efficiencyの低下	ヒト骨肉腫細胞 (U2OS細胞)	p53-p21 ^{WAF} 経路	126
	colony forming efficiencyの低下	ヒト結腸腺がん細胞(HCT116細胞)	p53-p21 ^{WAF} 経路	126
	影響なし	ヒト骨肉腫細胞 (Saos-2細胞)	-	126
	早期老化の誘導	ヒト正常線維芽細胞 (MRC細胞)	p53-p21 ^{WAF} 経路	130
	早期老化の誘導	ヒト正常線維芽細胞 (TIG-1細胞)	p53-p21 ^{WAF} 経路	130
CARFの過剰発現 (中程度)	colony forming efficiencyの低下	ヒト子宮頸部がん細胞 (HeLa細胞)	p53-p21 ^{WAF} 経路、ATM/CHK1経路	132
	細胞増殖の低下	ヒト子宮頸部がん細胞 (HeLa細胞)	p53-p21 ^{WAF} 経路、ATM/CHK1経路	132
	細胞運動性の低下	ヒト子宮頸部がん細胞 (HeLa細胞)	p53-p21 ^{WAF} 経路、ATM/CHK1経路	132
CARFの過剰発現 (高程度)	colony forming efficiencyの亢進	ヒト子宮頸部がん細胞 (HeLa細胞)	ERK1/2経路	132
	細胞増殖の亢進	ヒト子宮頸部がん細胞 (HeLa細胞)	ERK1/2経路	132
	細胞運動性の亢進	ヒト子宮頸部がん細胞 (HeLa細胞)	ERK1/2経路	132
複製	CARFの増加	ヒト正常線維芽細胞 (TIG-1細胞)	p53-p21 ^{WAF} 経路	130
	CARFの増加	ヒト皮膚線維芽細胞 (Fre 102s-3細胞)	p53-p21 ^{WAF} 経路	125
	CARFの増加	ヒト皮膚線維芽細胞 (Fre 92s-2細胞)	p53-p21 ^{WAF} 経路	125
	CARFの増加	ヒト正常肺線維芽細胞 (MRC5細胞)	p53-p21 ^{WAF} 経路	125
酸化ストレス	CARFの増加、ストレス誘導早期老化	ヒト正常線維芽細胞 (TIG-1細胞)	p53-p21 ^{WAF} 経路	130
	CARFの増加、ストレス誘導早期老化	ヒト骨肉腫細胞 (U2OS細胞)	p53-p21 ^{WAF} 経路	130
RASの過剰発現	CARFの増加	ヒト骨肉腫細胞 (U2OS細胞)	-	125
TRF2のノックダウンによるテロメアの脱保護	CARFの増加	ヒト骨肉腫細胞 (U2OS細胞)	-	125
CARFのノックダウン	アポトーシス	ヒト正常肺線維芽細胞 (MRC5細胞)	カスパーゼを介したアポトーシス	130
	アポトーシス	ヒト正常線維芽細胞 (TIG-1細胞)	カスパーゼを介したアポトーシス	130
	アポトーシス、細胞分裂異常	ヒト骨肉腫細胞 (U2OS細胞)	カスパーゼを介したアポトーシス、ATR/CHK1経路	130, 131
	アポトーシス、細胞分裂異常	ヒト子宮頸部がん細胞 (HeLa細胞)	カスパーゼを介したアポトーシス、ATR/CHK1経路	130, 131
	アポトーシス	ヒト骨肉腫細胞 (Saos-2細胞)	カスパーゼを介したアポトーシス、ATR/CHK1経路	131
	アポトーシス	ヒト乳がん細胞 (MCF7細胞)	-	130
	アポトーシス	ヒト結腸腺がん細胞(HCT116細胞)	-	130
	アポトーシス、細胞分裂異常 腫瘍成長の抑制	ヒト悪性黒色腫由来細胞 (MDA-MB435細胞) ヒト腫瘍異種移植モデルマウス	- -	130 131
細胞周期停止後CARFのノックダウン	colony forming efficiencyの低下	-	CARFによる細胞周期進行の制御	125
staurosporine	CARFの減少、アポトーシス	ヒト骨肉腫細胞 (U2OS細胞)	カスパーゼを介したアポトーシス	130
doxorubicine (低濃度 0.25-0.5 µg/ml)	CARFの増加、早期老化	ヒト子宮頸部がん細胞 (HeLa細胞)	p53-p21 ^{WAF} 経路	130
	CARFの増加、早期老化	ヒト骨肉腫細胞 (U2OS細胞)	p53-p21 ^{WAF} 経路	130
doxorubicine (高濃度 1-3 µg/ml)	CARFの減少、アポトーシス	ヒト子宮頸部がん細胞 (HeLa細胞)	カスパーゼを介したアポトーシス	130
	CARFの減少、アポトーシス	ヒト骨肉腫細胞 (U2OS細胞)	カスパーゼを介したアポトーシス	130
adriamycine	CARFの増加、G1 arrest	ヒト正常線維芽細胞 (TIG-1細胞)	CARFによる細胞周期進行の制御	125
	CARFの増加、G1 arrest	ヒト骨肉腫細胞 (U2OS細胞)	CARFによる細胞周期進行の制御	125
taxol	CARFの増加、G1 arrest	ヒト正常線維芽細胞 (TIG-1細胞)	CARFによる細胞周期進行の制御	125
	CARFの増加、G1 arrest	ヒト骨肉腫細胞 (U2OS細胞)	CARFによる細胞周期進行の制御	125
EGC	CARFの増加、G1 arrest	ヒト正常線維芽細胞 (TIG-1細胞)	CARFによる細胞周期進行の制御	125
	CARFの増加、G1 arrest	ヒト骨肉腫細胞 (U2OS細胞)	CARFによる細胞周期進行の制御	125
EGCG	CARFの増加、G1 arrest	ヒト正常線維芽細胞 (TIG-1細胞)	CARFによる細胞周期進行の制御	125
	CARFの増加、G1 arrest	ヒト骨肉腫細胞 (U2OS細胞)	CARFによる細胞周期進行の制御	125
camptothecin	CARFの増加、G1 arrest	ヒト正常線維芽細胞 (TIG-1細胞)	CARFによる細胞周期進行の制御	125
	CARFの増加、G1 arrest	ヒト骨肉腫細胞 (U2OS細胞)	CARFによる細胞周期進行の制御	125

Table1-4の続き

nocodazole	CARFの増加、G1 arrest	ヒト正常線維芽細胞 (TIG-1細胞)	CARFによる細胞周期進行の制御	125
curcumin	CARFの増加、G1 arrest	ヒト正常線維芽細胞 (TIG-1細胞)	CARFによる細胞周期進行の制御	125
gallium nitrate	CARFの増加、G1 arrest	ヒト正常線維芽細胞 (TIG-1細胞)	CARFによる細胞周期進行の制御	125
mitoxantrone	CARFの増加、G1 arrest	ヒト正常線維芽細胞 (TIG-1細胞)	CARFによる細胞周期進行の制御	125

第2章 CARF 相互作用因子群構成タンパク質の同定

第1節 緒言

細胞内において CARF と相互作用し CARF と共に機能する際の作用機序が既に解析されている因子には、p53, MDM2, ARF (43, 117, 127, 128, 126), CHK2 (132), ERK1 (132) がある。本研究では、既報通り CARF の欠損によって p53 非依存的に異常な細胞分裂とアポトーシスを誘導する (130, 131) ならば、p53, MDM2, ARF を介さずに CARF が関与する新規細胞増殖制御機構が存在するという仮説をたてた。上述の5種の相互作用因子に加え、網羅的解析を含めるとこれまで22種類の CARF 相互作用因子 (タンパク質21種、RNA1種) (Table 2-1, 2-2) が報告されているが、これら網羅的解析で見つかった因子群と CARF がどのように細胞内で共同して働くのかは不明である。また、これらのタンパク質の機能は多岐に渡ることから、相互作用タンパク質群の既知機能のみから CARF の新規生理機能を推測することは困難である。さらに、報告されている網羅的解析では、他のタンパク質の相互作用因子として CARF が同定されていることから、CARF 相互作用因子群の単離により新規 CARF 相互作用因子が同定できると考えた。本研究では、遺伝子を特定の位置に導入できる Flp-In システムを用いて作製した CARF 薬剤誘導発現細胞を用いて CARF が関与する p53 非依存的細胞増殖調節機構解明の手がかりを得ることを目的とし、第二章ではプロテオミクス的手法を用いて CARF の相互作用タンパク質を網羅的に同定した。

はじめに、N末端に FLAG エピトープタグを融合した CARF タンパク質 (FLAG-CARF) の発現を薬剤により誘導する細胞株を樹立した。作製した CARF 薬剤誘導発現細胞において exogenous に発現している FLAG-CARF が本来の細胞内局在を示すか、FLAG-CARF について蛍光抗体法により解析した。CARF 薬剤誘導発現細胞の抽出液から FLAG タグに対する抗体による免疫沈降法で FLAG-CARF 相互作用因子群を回収した。得られた CARF 相互作用因子群を nanoLC-MS/MS を用いたプロテオミクス的手法で解析し、新規 CARF 相互作用因子を同定した。

第2節 実験方法

装置及び器具

- Program Temp Control System (ASTECC)
- SOFT INCUBATOR SLI-450ND (EYELA)
- WATER BATH SHAKER PERSONAL-11 (TAITEC)
- 3UVTM Transilluminator (UVP)
- LAS-4000
- Nano Drop (Thermo SCIENTIFIC)
- Applied Biosystems 3130 ジェネティックアナライザー (Applied Biosystems)
- CO₂ インキュベーター (NAPCO)
- クリーンベンチ (SHOWA SCIENCE)
- 90 mm カルチャーディッシュ (NUNC)
- オートピペッター (FALCON)
- 遠心分離機 TOMY LX-120 (TOMY)
- 遠心分離機 KUBOTA 3700 (KUBOTA)
- 遠心分離機 HIMAC (HITACHI)
- VORTEX-GENIE 2 (Scientific Industries)
- Mini Disk Rotor BL-710I (BIOCRAFT)
- Bio-Rad MODEL 550 microplate Reader (Bio-Rad)
- Dry Thermo Unit (TAITEC)
- ミニゲルスラブ泳動装置 (日本エイドー)
- パワーサプライ NEP-200/NEP-300 (NICHIRYO)
- Trans Blot SD (BioRad)
- Bioruptor (COSMO BIO)
- 96Y サブマリンゲル電気泳動装置 NB-9605 (130 mm×235 mm) (日本エイドー)

- ・真空エバポレーター (ULVAC)
- ・MICRO MIXER EM-33 (TAITEC)
- ・HPLC (SHIMADZU)
- ・インターナルユニオン 1/16”-I.D. 0.50 mm (GL Sciences)
- ・シリカキャピラリーチューブ I.D. 0.150 mm×O.D. 0.375 mm (GL Sciences)
- ・Nano-LC (LC アシスト)
- ・HPLC コンポーネント: 送液ユニット LC-20AD (SHIMADZU)
- ・HPLC コンポーネント: オートサンプラ SIL-20A (SHIMADZU)
- ・HPLC コンポーネント: システムコントローラ SCL-10Avp (SHIMADZU)
- ・Q-Tof2 (MICROMASS)
- ・ソフトウェア MassLynx (version 3.5) (MICROMASS)
- ・ソフトウェア ProteinLynx (MICROMASS)
- ・ソフトウェア MASCOT daemon (version 2.2.1/2.2.07) (Matrix Science)

試薬及び実験材料

- ・KOD plus DNA polymerase (TOYOBO)
- ・Agarose LO2 (TaKaRa)
- ・λDNA (TaKaRa)
- ・Ethidium bromide (WAKO)
- ・制限酵素 (TaKaRa)
- ・QIAEX[®]II Gel Extraction Kit (QIAGEN)
- ・T4 DNA Ligase (TaKaRa)
- ・Flp-In T-REx 293 細胞 (Invitrogen)
- ・コンピテントセル DH5α: F⁻, φ80*dlacZ*ΔM15, Δ (*lacZYA - argF*) U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (r_k⁻m_k⁺), *phoA*, *supE44*, λ-*thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

- BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
- Bacto Yeast Extract (DIFCO)
- Bacto Tryptone (DIFCO)
- DMEM (SIGMA D0422)
- FBS (JRH)
- Penicillin G (SIGMA)
- Streptomycin Sulfate (WAKO)
- DMSO (WAKO)
- Tris (WAKO)
- Acetic Acid (WAKO)
- EDTA·2Na (DOJINDO)
- フェノール (WAKO)
- クロロホルム (WAKO)
- イソアミルアルコール (WAKO)
- 8-Quinolinol (WAKO)
- Sodium Acetate trihydrous (WAKO)
- Ethanol (WAKO)
- NaCl (WAKO)
- KCl (WAKO)
- MgSO₄ (WAKO)
- MgCl₂ (WAKO)
- Ampicillin·2Na (SIGMA)
- PIPES (DOJINDO)
- CaCl₂·2H₂O (WAKO)
- KOH (WAKO)

- $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (WAKO)
- D (+)-Glucose (WAKO)
- NaOH (WAKO)
- SDS (Nacalai tesque)
- PEG8000 (WAKO)
- Genopure Maxi Prep Kit (Roche)
- Na_2HPO_4 (WAKO)
- KH_2PO_4 (WAKO)
- HEPES (DOJINDO)
- Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (WAKO)
- IGEPAL CA-630 (SIGMA)
- SUPERase-In RNase Inhibitor (Ambion)
- Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad)
- Anti-FLAG M2 Agarose affinity gel (SIGMA)
- FLAG peptide (SIGMA)
- 2-mercaptoethanol (WAKO)
- XL-ladder プレステイン分子量マーカーBroad Range (APRO)
- 分子量マーカーBroad Range (Bio-Rad)
- Glycerin (WAKO)
- Glycine (WAKO)
- N, N'-Methylenebisacrylamide (WAKO)
- TEMED (WAKO)
- APS (WAKO)
- BPB (WAKO)
- Sodium Thiosulfate $\cdot 5\text{H}_2\text{O}$

- Silver Nitrate (WAKO)
- Formaldehyde (WAKO)
- Sodium Carbonate (WAKO)
- Sodium Hydrogen Citrate (WAKO ・ 一般)
- Methanol (WAKO)
- Distilled Water (WAKO ・ HPLC 用)
- Urea (WAKO)
- Urea (Nacalai tesque)
- β -D-Octylglycoside (SIGMA)
- *Achromobacter* protease I (WAKO)
- Acetonitrile (WAKO ・ HPLC 用)
- Formic Acid (Nacalai tesque)
- Formic Acid (WAKO)
- Chloroform (WAKO ・ HPLC 用)
- Hexyl Alcohol (WAKO)
- Mightysil RP-18 (3 μ m) (Kanto Reagents)
- Ammonium Hydrogencarbonate (WAKO ・ 一般)
- DTT (Nacalai tesque)
- Iodoacetamide (WAKO)
- Trypsin (sequence grade) (Promega)
- Triton X-100 (WAKO)
- Skim Milk (WAKO)
- NBT/BCIP stock solution (Roche)
- DEPC (Nacalai tesque)
- MOPS (DOJINDO)

- Formamide (WAKO)
- Agarose NA (GE healthcare bioscience)
- Sodium Citrate (WAKO)
- Methyleneblue·2H₂O (WAKO)
- RNase A (SIGMA)
- 90 mm カルチャーディッシュ (NUNC)
- セルスクレーパー (NUNC)
- Ultrafree-MC 0.22 μm (MILLIPORE)
- PVDF 膜 Immobilon™-P (MILLIPORE)
- 3 MM (WHATMAN) ・ 50 ml ポリプロピレンチューブ (NUNC)
- 15 ml ポリプロピレンチューブ (NUNC)
- 1.5 ml チューブ (WATSON)
- 500 μl ローリテンションチューブ (Assist)

発現プラスミドベクター

- pcDNA™5/FRT/TO vector (Invitrogen)
- pOG44 (Invitrogen)
- pcDNA™5/FRT/TO-FLAG-CARF (本研究室、石川英明博士より供与)
- pcDNA3.1(+)/FLAG (N 末端側に付加)
- pcDNA3.1(+)/TEV-FLAG (C 末端側に付加) (本研究室、石川英明博士より供与)
- pcDNA3.1(+)/HA-TEV-FLAG (本研究室、石川英明博士より供与)
- pcDNA3.1(+)/HA-ARF
- pcDNA3.1(+)/HA-CARF-TEV-FLAG (本研究室、石川英明博士より供与)
- pcDNA3.1(+)/CARF-FLAG
- pcDNA3.1(+)-XRN2(C 末端タグ付加用) (本研究室、石川英明博士より供与)

- pcDNA3.1(+)/HA-XRN2
- pcDNA3.1(+)/HA-Rev (本研究室、上原氏より供与)

抗体と IB 使用時の希釈倍率 (IB, イムノブロット; IF, 蛍光抗体法)

- Mouse monoclonal anti-FLAG M2 antibody (SIGMA; 1: 600 for IF, 1: 10,000 for IB)
- Mouse monoclonal anti-GAPDH antibody (Ambion; 1: 10,000 for IB)
- Mouse monoclonal anti-HA antibody (clone HA-7) (SIGMA; 1: 10,000 for IB)
- Mouse monoclonal anti- NPM antibody (Zymed; 1: 10,000 for IB)
- Mouse monoclonal anti-p14ARF/p16 β antibody (clone 14P02 same as DCS-240) (1:200 for IB)
- Rabbit polyclonal anti-XRN2 antibody (A301-103A) (Bethyl Laboratories; 1:5,000 for IB)
- Alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse IgG antibody (Cell Signaling; 1: 10,000)
- Alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG antibody (Cell Signaling; 1: 10,000)
- Cy3-conjugated anti-mouse IgG antibody (SIGMA; 1: 200 for IF)

操作手順

2-2-1 細胞の培養

Flp-In T-REx 293 細胞をノーマル培地 (DMEM, 10 % 非働化 FBS, streptomycin (0.1 mg/ml), penicillin G (100 U/ml)) を用い、5 % CO₂ 存在下で接着培養を行った。細胞の継代培養は 0.5 mM EDTA を含む PBS を用いて細胞を剥離し、まき直すことで行った。

- PBS: 137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄ (オートクレーブ滅菌)

2-2-2 FLAG タグ融合ヒト CARF タンパク質薬剤誘導発現細胞株の作製

Doxycycline誘導発現FLAGタグ融合ヒトCARFタンパク質細胞株を作成するためにFlp-In

T-REx Expression Systemを用いた (Fig. 2-1)。Flp-In T-REx 293細胞にFlp recombinase発現プラスミド (pOG44) とFLAGタグ融合ヒトCARFタンパク質薬剤誘導発現プラスミド (pcDNA™5/FRT/TO-FLAG-CARF) をコトランスフェクションすると、Flp-In T-REx 293細胞が持つFRT siteとFLAGタグ融合ヒトCARFタンパク質薬剤誘導発現プラスミドが持つFRT siteがFlp recombinaseにより組換えをおこし目的の遺伝子が特定のゲノム位置に組み込まれることを利用して、CARF遺伝子をゲノムの特定位置に導入した。具体的には、1) Lipofectamin 2000 2 µlとOpti-MEMI 50 µl、2) FLAGタグ融合ヒトCARFタンパク質薬剤誘導発現プラスミド250 ng及びpOG44 250 ngとOpti-MEMI 50 µlをそれぞれ混合し、室温で5分間インキュベートした。1) 及び2) を混合し、20 分間インキュベート後、24-well plateにて50%密度になるように培養したFlp-In T-REx 293細胞に添加しトランスフェクションを行った。pcDNA™5/FRT/TO vectorはHygromycin耐性遺伝子をもつ (145) ので、100 µg/ml hygromycin Bを含む培地で培養し、FLAGタグ融合ヒトCARFタンパク質薬剤誘導発現プラスミドが導入された細胞の選択を行い、得られた細胞株をTOCARF細胞と名付けた。FLAGタグ融合ヒトCARFタンパク質薬剤誘導発現プラスミドはhybrid human CMV/TetO₂プロモーターをもつので、doxycycline添加によりCARFの発現を調節できる (146, 147, 148, 149, 150) (Fig. 2-1)。

2-2-3 免疫染色

蛍光抗体法を用いた。0.02 N 酢酸を用いて希釈した 50 µg/ml Rat tail collagen type I を 8 穴カルチャースライドに 100 µl ずつ添加し、コラーゲンコート 8 穴カルチャースライドを作製した。PBS を用いて洗浄後、細胞をコラーゲンコート 8 穴カルチャースライドに培養した。培地を取り除きカルチャースライドを PBS で洗浄後、細胞を 3.7 % ホルムアルデヒド/PBS を用いて 10 分間、室温条件で固定した。PBST で 2 回洗浄後、PBST を用いて 10 分間、室温条件で細胞をインキュベートした。さらに、細胞を 0.5 % (w/v) Triton X-100/PBS を用いて 5 分間、室温条件で細胞をパーミアライズした。次に、細胞をブロッキ

ング液 (3 % (w/v) スキムミルク, PBS)を用いて 1 時間ブロッキング反応を行った。1 次抗体の Maus 抗 FLAG 抗体 M2 はブロッキング液を用いて示した濃度に希釈し、室温で 1 時間 1 次抗体反応を行った。その後、PBST を用いて 10 分間、3 回室温で振盪による洗浄を行った。蛍光標識 2 次抗体の Cy3 標識抗 Maus IgG 抗体はブロッキング液を用いてそれぞれ 200 倍希釈し、室温で 1 時間、遮光条件下 2 次抗体反応を行った。その後、PBST を用いて 10 分間、3 回室温で振盪による洗浄後、VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI を用いて標本にした。Axiovert 200 M microscope により適した条件で蛍光を観察した。

2-2-4 CARF相互作用因子群の分離

2-2-4-1 可溶性画分からの CARF 相互作用因子群の分離

細胞回収時に約 80 %の細胞密度になるような TOCARF 細胞を 1 ng/ml doxycycline 添加した培地で 48 時間培養し、CARF タンパク質の発現を誘導した。発現誘導した TOCARF 細胞 150-mm カルチャーディッシュ 4 枚分を PBS で洗浄後回収した。非誘導のコントロールとして doxycycline 非添加の細胞も同時に回収した。それらの細胞を buffer A (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5 % IGEPAL CA-630, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF) に懸濁後、氷上で 30 分間インキュベートし溶解した。その細胞溶解物を 22,180 g、4 °C 条件で 30 分間遠心分離後、上清を回収し細胞抽出液を得た。得られた細胞抽出液を用いて、detergent 存在下で検量線を作成し、タンパク質定量を行い、細胞抽出液 15 mg に anti-FLAG M2 agarose beads 15 µl を添加し、4 °C における天地返し条件で攪拌しながら、4 時間インキュベートした。anti-FLAG M2 agarose beads は buffer A を用いて 5 回洗浄後、buffer B (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF)を用いて 1 回洗浄し、非特異的に結合したタンパク質を取り除いた。洗浄後の anti-FLAG M2 agarose beads に 0.5 mg/ml FLAG peptide: 40 µl を添加し、氷上で 30 分間インキュベートすることにより CARF 相互作用因子群を溶出した。この溶出を 2 回繰り返す、得られた溶出液を 1

つにまとめ CARF 相互作用因子群とした。

2-2-4-2 不溶性画分からの CARF 相互作用因子群の分離

2-2-4-1 と同様に細胞を回収し、細胞を buffer A に懸濁後、氷上で 30 分間インキュベートし溶解した。その細胞溶解物を 22,180 g、4 °C 条件で 30 分間遠心分離後、上清を取り除き沈殿を buffer A 0.5 ml に懸濁した。1 セット: オンタイムを 10 秒間、インターバルタイムを 20 秒間とし、Bioruptor を用い、ハイレベル設定で 12 回ソニケーションを行い、沈殿を破碎した。そのソニケートを 22,180 g、4 °C 条件で 30 分間遠心分離後、上清を回収し不溶性細胞抽出液を得た。得られた不溶性細胞抽出液から 2-2-4-1 に述べた免疫沈降法により CARF 相互作用因子群を回収した。

2-2-5 SDS-PAGE と銀染色

タンパク質試料に SDS sample buffer を添加し、100°C で 3 分間加熱後、20,000 g、4°C、3 分間遠心分離を行った。遠心分離後のタンパク質を含む上清を以下に示すアクリルアミド濃度のポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動により分離を行った。

- 5 x SDS sample buffer: SDS を 1 g、2-mercaptoethanol を 500 μ l、0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) を 5 ml 加え混合し、Glycerol で 10 ml に調整後、BPB を適量添加した。使用時にはタンパク質試料に対して終濃度が 1 x となるように加えた。

- Stacking gel: 4.75% Acrylamide, 0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% SDS, 0.1% TEMED, 0.1 % APS

- Running gel: 7.5% Acrylamide, 0.375 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% SDS, 0.05% TEMED, 0.1 % APS

- Running buffer: 0.1% SDS, 25 mM Tris, 130 mM Glycine

泳動後は以下に示す銀染色法によりタンパク質を可視化した。ゲルを 40 % (v/v) エタノー

ル、10% (v/v) 酢酸溶液中で、室温 30 分振盪することにより固定した後、30% エタノール、0.5 M 酢酸ナトリウム、8 mM チオ硫酸ナトリウム溶液中で室温にて 30 分間増感を行った。蒸留水により 5 分間ゲルの洗浄を 4 回行った後、0.1% (w/v) 硝酸銀、0.02% ホルムアルデヒド溶液で 40 分間振盪し染色を行った。2.5% 炭酸ナトリウム、0.01% (v/v) ホルムアルデヒド溶液を用いて目的のバンドが適当な濃さになるまで液を交換しながら現像した。1% クエン酸ナトリウム溶液で 5 分間の振盪を 2 回行うことで現像反応を停止した後、蒸留水で 5 分間の洗浄を 3 回行い、1% 酢酸溶液中で 4 °C にて保存した。

2-2-6 イムノブロット

SDS-PAGE後のゲルは、セミドライ式プロッターとブロッキング液 (48 mM Tris, 39 mM グリシン, 20% (v/v) メタノール) を用いてPVDF膜 (pore size 0.45 μ m, 85 mm \times 55 mm) へタンパク質を転写した。転写後のPVDF膜はブロッキング液 (5% スキムミルク/TBS) を用いて、室温で30分間ブロッキング反応を行った。1次抗体はブロッキング液を用いて抗体ごとに示した濃度に希釈し、室温で1時間、または4 °Cで1晩1次抗体反応を行った。その後、0.1% (v/v) Tween 20/TBS (TBS-T) を用いて10 分間、3 回室温で振盪による洗浄を行った。2次抗体: アルカリフォスファターゼ標識ウマ抗マウスIgG (H & L) 抗体及びアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ラビットIgG (H & L) 抗体はブロッキング液を用いてそれぞれ10,000倍希釈し、室温で1時間2次抗体反応を行った。その後、TBS-Tを用いて10 分間、3 回、TBSを用いて5 分間、1 回室温で振盪による洗浄を行った。発色反応は NBT/BCIP stock solutionを0.1 M Tris-HCl (pH9.5), 50 mM MgCl₂, 0.1 M NaClで50倍希釈したアルカリフォスファターゼ発色基質溶液を加えて適当なシグナル強度が得られるまで発色を行った。

2-2-7 SDS-PAGE により分離したタンパク質のゲル内プロテアーゼ消化

銀染色後のゲルからタンパク質を同定するためにゲル内プロテアーゼ消化 (151) と極

微流逆相液体クロマトグラフィー/タンデムマススペクトロメトリー (nanoLC-MS/MS) による解析を行った。2-2-4 に述べた方法で回収した CARF 相互作用因子群及びコントロールを 2-2-5 により解析した電気泳動ゲルのレーンをメスにより 4 つの領域に分け、切り出し、1-2 mm 四方に切断した。ゲル片は 500 μ l ローリテンションチューブに入れた。ゲル片にアセトニトリルを添加して脱水反応を行った後、アセトニトリルを除き、遠心エバポレーターを使用してゲルを乾燥させた。10 mM DTT、100 mM 炭酸水素アンモニウム溶液中で 56 °C、1 時間インキュベートしてタンパク質内のシステイン残基の SH 基を還元させた後、55 mM ヨードアセトアミド、100 mM 炭酸水素アンモニウム溶液を添加し、室温で遮光条件下 45 分間 SH 基のブロッキング反応を行った。100 mM 炭酸水素アンモニウム溶液とアセトニトリルで交互に 2 回ゲル片を洗浄後、遠心エバポレーターで乾燥させた。0.5 μ g トリプシン (sequence grade)、5 mM CaCl₂、50 mM 炭酸水素アンモニウム溶液 (pH8.0) を添加し、45 分間氷上でインキュベートした後、37 °C において 1 晩トリプシン消化反応を行った。20 mM 炭酸水素アンモニウム溶液 100 μ l で 1 回、5 % (v/v) ギ酸、50 % (v/v) アセトニトリル溶液 100 μ l で 3 回、マイクロミキサーを用いて 20 分間振盪し、抽出操作を行い、全ての抽出液をまとめ、遠心エバポレーターを使用して乾固した。乾固したサンプルに 6 M Urea、100 mM Tris-HCl (pH8.8) を 15 μ l 添加後、1 % オクチルグルコシドを 0.5 μ l 添加し、室温で 60 分間マイクロミキサーを用いた振盪により溶解した。

2-2-8 極微流逆相液体クロマトグラフィー/タンデムマススペクトロメトリー (nano-LC MS/MS) によるタンパク質の同定解析

MS/MS 分析は直接 C18 逆相液体クロマトグラフィーで分離しながらタンデム四重極飛行時間型質量分析計 (Q-TOF2) 測定を行う nanoLC-MS/MS システムにより行った (152)。逆相クロマトグラフィーで分析する前にトリプシン消化物に 10 %ギ酸を 1/10 量添加した。C18 逆相液体クロマトグラフィーに用いたカラム管は、レーザーキャピラリープレー

によって内径 150 μm 、外径 375 μm の溶解シリカキャピラリーを先端内径が 10 μm となるように引き伸ばすことで作製した。ESI カラムは、このカラム管に 1-hexanol/chloroform (1:1) 溶媒に分散させた C18 逆相カラム充填剤 Mightysil-PR-18 (3 μm particle) を HPLC 装置で充填圧 24.5 MPa で 30 分間メタノールを送液しながら充填することで作製した。充填に用いた ESI カラム内の 1-hexanol/chloroform (1:1) 溶媒は、メタノールを流速 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ で約 10 時間送液することにより置換した。作製した ESI カラムは使用時にカラム部分が 50 mm となるように切断し、これにステンレスフィルターをあててユニオンに固定し、0.1%ギ酸により平衡化してから nano-LC システムに装着した。

nano-LC システムは毎分サブナノリットルスケールの送液が可能なナノフローポンプと濃度勾配作成用ユニットである ReNCon システム装置から成る。ReNCon システム装置は 10 本のループとバルブから構成され、それぞれのループには 0% (0.1%ギ酸)、5%、10%、15%、20%、25%、30%、45%、70%の濃度の異なるアセトニトリル/0.1%ギ酸溶媒を充填する。一定の時間間隔でループをバルブで回転させながら送液すると 0%から順に濃度の異なるアセトニトリル溶液がループからステンレス配管を通過して ESI カラムに流れる。ループから送液された直後は異なる濃度の溶液が混合していない状態だが、細いステンレス配管中を低流速で通っていくことで、異なる濃度の溶液はお互いに拡散し連続的な濃度勾配が形成される。この ReNCon システムを用いると、送液する流速とループを回転させるバルブの時間間隔を変えることで任意の濃度勾配を形成することができる。今回の測定では、送液を 50 nl/min 、バルブの回転時間間隔を 5 分に設定した。この条件により 35 分かけて 0-40 % アセトニトリルグラジェントを作製した。

2-2-7 においてトリプシン処理により調製したペプチド試料 5 μl をサンプルループ (5 μl) に導入後、インジェクターバルブを介してナノフローポンプにより流速 500 nl/min で 12 分間かけて、0.1%ギ酸で平衡化した ESI カラムに導入し吸着させた。カラム内の試料に含まれる塩や尿素を 0.1%ギ酸、流速 500 nl/min にて 13 分間洗浄した。その後流速を 50 nl/min に下げ、アセトニトリル濃度勾配溶出法によりペプチドをカラムから溶出した。

ESI カラムの先端には 1300 V の高電圧をかけているので、溶出したペプチドはイオン化し、そのまま直接 Q-TOF2 のカウンター電極のイオン導入部から質量分析内に入る。導入されたペプチドは一段階目として四重極質量分析部ではペプチド自体の m/z (質量/電荷) 値が測定され、その結果、主に 2 価と 3 価の陽イオンをもつペプチドが衝突チャンバーに送られる。そこでペプチドはアルゴンガスによる衝突誘起解離作用により断片化される。断片化されたイオンは、イオン強度が高い上位 4 個のペプチドについて、4 秒ごとに二段階目の TOF 質量測定部に導入される。その断片セットの m/z 値が測定され、MS/MS スペクトルとして出力される。こうして得られた Raw Data 形式の MS/MS スペクトルを、ソフトウェア MassLynx version 3.5 と ProteinLynx software を用いてデータベース検索に供するためのテキストファイル (pk1 形式) に変換した。この変換によって、一回の分析で生じた膨大なスペクトルの集団である Raw Data を各ペプチド断片のスペクトルごとに分割して一つのファイルとして保存可能になった。これにより検索終了後も同定結果を MS/MS スペクトルデータごとに管理できるようになった。Pk1 形式に変換した複数のスペクトルについてデータベース検索プログラム MASCOT version 2.2.1 を用いて検索した。その際あらかじめ設定した条件で連続して検索処理を行う MASCOT Daemon を用いて大量のデータを一括して処理した。Raw Data を pk1 形式に変換する際の ProteinLynx software の設定条件、MASCOT の検索条件及び検索結果についてタンパク質の同定基準は以下に記載する。

2-2-8-1 ProteinLynx の設定条件

Instrument: Q-TOF

Processing Parameters

Combine:

Combine sequential scans with same precursor

Process all combined scans

Mass Measure:

Background subtract:

Polynomial: 10

Below curve: 10.00

Smooth:

Smooth window (channels): 3.00

Number of smooth: 2

Smooth mode: Savitzky Golay

Centroid:

Min. peak width at half height: 4

Centroid mode: Centroid top: 80.00%

2-2-8-2 MASCOT (version 2.2.1) の検索条件

Data base: SWISS PROT (Sprot version 57.5; 471472 sequences)

Species: HUMAN

Fixed modifications; carbamidomethyl (Cysteine)

Variable modifications: oxidation (Methionine)、N-acetylation、pyroglutamine

Maximum missed cleavages: 1

Peptide mass tolerance: 200 ppm

MS/MS tolerance: 0.3 Da

2-2-8-3 MASCOT 検索により得られたタンパク質の同定基準

同定は Mascot 検索を行った際に計算されるプロテインスコアが閾値以上のタンパク質を同定基準とした (153)。更に、厳しい基準として以下の項目を定めた: (i) MS/MS シグナルにより候補となった同一タンパク質由来のペプチドが 2 つ以上検出されていること、

(ii) ペプチドのイオンスコアが 30 ($p < 0.05$) 以上であること。コントロールの溶出サンプルにおいて同定されたタンパク質は CARF 相互作用タンパク質から除外した。ただし、doxycycline 非添加条件においても極微量の CARF が検出されたので、CARF は同定タンパク質に含めた。

2-2-9 発現プラスミドベクターの作製

下記に示す 4 種の発現プラスミドベクターを構築した。

- pcDNA3.1(+)/FLAG (N 末端側に FLAG タグを付加)
- pcDNA3.1(+)-HA-XRN2
- pcDNA3.1(+)/HA-ARF
- pcDNA3.1(+)/CARF-FLAG

発現プラスミドベクターの構築の概略をはじめに記し、詳細な実験操作については本項の終わりに実験操作ごとにまとめた。

- pcDNA3.1(+)/FLAG の構築

5'-AGCTTGCCACCATGGACTACAAGGACGACGACGACAAGGGTACC-3'

5'-CCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCCATGGTGGCA-3'

上記の DNA Oligo をアニーリングさせ FLAG タグをコードした DNA の両端に *HindIII/KpnI* により切断された形を持つ DNA 断片を得た。pcDNA3.1 (+) を *HindIII/KpnI* を用いて 37°C、1 時間制限酵素処理し、アガロース電気泳動により分離し、バンドを切り出して、QIAEX II Gel Extraction Kit を用いてゲルから抽出、精製した。アニーリングした DNA Oligo と制限酵素処理した pcDNA3.1 (+) を混合し、T4 DNA Ligase を用いて 4°C、一晩ライゲーション反応を行った。反応生成物を大腸菌 DH5 α のコンピテントセルに添加し、氷上で 30 分間形質転換した後、ampicillin を添加した LB (LB^{amp⁺}) 寒天培地に塗布し、37°C でコロニーを形成するまで約 15 時間培養した。LB^{amp⁺} 寒天培地で生育した大腸菌のシングルコロニーを滅菌した爪楊枝を用いて 2 x YT^{amp⁺} 液体培地に植菌した。37°C で

18時間培養し集菌後、ミニプレップによりプラスミドを精製した。得られた発現プラスミドベクターが目的のDNAの大きさであることをアガロース電気泳動により確認した後、PEG沈殿を行いさらに精製し、目的のDNA断片の塩基配列が挿入されていることをDNAシーケンシングにより確認した。

- ・ pcDNA3.1(+)-HA-XRN2 の構築

pcDNA3.1(+)-XRN2 (C末端タグ付加用にXRN2のstop codon: TAAをGGCへ置換したプラスミド) (本研究室、石川英明博士より供与) をテンプレートとして下記のプライマーセットとKODplus DNA polymeraseを用いてPCRにより増幅した。

5'-GCCGCGGGATCCATGGGAGTCCCGGCGT-3'

5'-GCGGCCCTCGAGTTAATTCCAATTGTATCTTCCTGAGGGT-3'

増幅したDNA断片の一部をアガロース電気泳動により分離し、ゲル上の目的のバンドを切り出し、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈殿することにより精製した。この沈殿を滅菌したDWに溶解し、制限酵素 *Bam*HI と *Xho*I を用いて37°C条件下で2時間制限酵素処理を行った。得られた *Bam*HI/*Xho*I 断片をpcDNA3.1(+)/HAの *Bam*HI/*Xho*I サイトに導入した。目的のDNA断片の塩基配列が挿入されていることをDNAシーケンシングにより確認した。

- ・ pcDNA3.1(+)/HA-ARF の構築

Flp-In T-REx 293細胞からRNAgent Total RNA Isolation System及び酸性フェノール・クロロホルム抽出によりトータルRNAを回収した。得られたRNAからSuper Script II kitを用いてcDNAライブラリーを作製した。そのcDNAライブラリーをテンプレートとして下記のプライマーセットとKODplus DNA polymeraseを用いてPCRにより増幅した。

5'-AGGCGGCGGATCCATGGTGCGCAGGTT-3'

5'-GCGGCCCTCGAGTCAGCCAGGTCCACGGGCA-3'

増幅した DNA の *Bam*HI/*Xho*I 断片を pcDNA3.1(+)*Bam*HI/*Xho*I サイトに組み込んだ。目的の DNA 断片の塩基配列が挿入されていることを DNA シークエンシングにより確認した。

- pcDNA3.1(+)/CARF-FLAG の構築

pcDNA3.1(+)/HA-CARF-TEV-FLAG (本研究室、石川英明博士より供与) と発現プラスミドベクターpcDNA3.1(+) を用いて CARF-FLAG 断片を *Bam*HI/*Xho*I サイトに挿入した。目的の DNA 断片の塩基配列が挿入されていることを DNA シークエンシングにより確認した。

2-2-9-1 PCR

PCR は 10 pg のテンプレートと 15 pmol のプライマーに対して、10 x KOD plus buffer 5 μ l、2 mM NTPs 5 μ l、25 mM MgSO₄ 2 μ l、KOD plus DNA polymerase 1 μ l を混ぜ、終容量 50 μ l に調整した。KOD plus DNA polymerase は 1,000 bp 増幅するのに対して最低 1 分間必要とすることから、下記の条件で PCR を行った。

- ARF: 1) 94°C、2 分
- 2) 94°C、15 秒→57.3 °C、30 秒→68°C、40 秒を 50 サイクル
- 3) 72°C、7 分

2-2-9-2 アガロースゲル電気泳動

アガロースゲルは 1 % Agarose LO3/0.5 x TAE buffer を電子レンジにて溶解し、終濃度 0.5 μ g/ml となるようにエチジウムブロマイドを添加し、ゲルを作製した。電気泳動は 0.5 x TAE buffer を用いて DNA 断片に合わせた時間で行った。泳動にて分離した DNA は UV イルミネーターにより検出し、必要と考える場合は LAS 4000 を用いて撮影した。

- 50 x TAE: 242 g Tris, 57.1 ml CH₃COOH, 7.43 g EDTA • 2Na を蒸留水に溶解し、1 l にし

た。使用する際には蒸留水を用いて 0.5 x となるように調製した。

2-2-9-3 フェノール・クロロホルム抽出

フェノール: クロロホルム: イソアミルアルコールをそれぞれ 25: 24: 1 の比率になるように混ぜ、1 M Tris-HCl (pH 8.0)を用いて中性に平衡化した。上層に 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0)を重層し、さらに 8-quinolinol を少量加えフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール溶液の酸化を防止した。サンプルと等量のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール溶液を加えて、ボルテックスミキサーで 30 秒間混合することで、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール抽出を行った。その後、20,000 g、4°C、5 分間遠心分離し、DNA を含む上層のみを新しい 1.5 ml チューブに回収した。

2-2-9-4 エタノール沈殿

DNA を含む溶液に対し 1/10 量 (v/v)の 3 M CH₃COONa (pH 5.2) を加えボルテックスミキサーで混合後、3 倍量 (v/v)のエタノールを添加した。ボルテックスミキサーで 30 秒間混合後、室温で 10 分間インキュベートした。その後、20,000 g、4°C、5 分間遠心分離し、上清を取り除いた。沈殿に 70 % エタノールを 400 μ l 添加し、ボルテックスミキサーで混合後、20,000 g、4°C、5 分間遠心分離し、上清を取り除いた。沈殿を風乾後、滅菌水に懸濁し、以後の実験に用いた。

2-2-9-5 制限酵素処理

TaKaRa の Universal Buffer System を用いて制限酵素制限酵素処理を行った。制限酵素活性 1U は、至適条件のもと 1 時間に 1 μ g の基質 DNA を完全に分解する酵素量とされている。そこで、1 μ g の DNA あたり少なくとも制限酵素 1 U を添加した。制限酵素処理は、至適条件のもと 2 時間行った。

2-2-9-6 ライゲーション反応

DNA 断片とプラスミドベクターを TaKaRa T4 DNA Ligase (87.5 U) を用いて、16°C、1 時間もしくは 4°C、1 晩ライゲーション反応を行った。

2-2-9-7 大腸菌生育用液体培地及び寒天培地

下記の方法で作製した。滅菌後は 4°C にて保存した。

- LB 培地: 0.5 g bacto yeast extract、1.0 g bacto trypton、1.0 g NaCl を 100 ml の蒸留水に溶解し、121°C、15 分間オートクレーブ滅菌した。
- 2 x YT 培地: 1.0 g bacto yeast extract、1.6 g bacto trypton、0.5 g NaCl を 100 ml の蒸留水に溶解し、121°C、15 分間オートクレーブ滅菌した。
- SOB 培地: 0.5 g bacto yeast extract、2.0 g bacto trypton、0.058 g NaCl、0.0186 g KCl を 99 ml の蒸留水に溶解し、121°C、15 分間オートクレーブ滅菌した。室温にまで温度が下がった後、1 M MgSO₄、1 M MgCl₂ を 0.5 ml ずつ添加し、よく混合した。
- SOC 培地: SOB 培地 100 ml に滅菌した 2 M Glucose を 1 ml 添加し、よく混合した。
- Ampicillin: ampicillin-Na を 50 mg/ml となるように調製し、培地が 50°C 以下になったら、50 µg/ml となるように添加し、よく混合した。

2-2-9-8 コンピテントセルの作製

抗生物質を含まない LB 寒天培地に大腸菌 DH5α 株を滅菌した爪楊枝を用いてストリークし、37°C で約 15 時間培養した。生育した大腸菌を再度別の LB 寒天培地に滅菌した爪楊枝を用いてストリークし、37°C で約 15 時間培養した。単一コロニーを 50 ml の SOB 培地に植菌し、OD₆₀₀ が 0.4 から 0.8 の間になるまで 25°C で振盪培養した。その培養液を滅菌した 50 ml チューブに移し、1,000 g、4°C、5 分間遠心分離を行い、集菌した。培地を取り除き、培養容積の氷冷した Transformation buffer に懸濁し、再度 1,000 g、4°C、5 分間遠心分離を行い、集菌した。上清を取り除き、培養容積の 4 ml の氷冷した Transformation

buffer に懸濁し、凍結保護剤として DMSO 300 μ l (終濃度 7%) を添加し、150 μ l ずつ 1.5 ml チューブに分注し、液体窒素を用いて凍結後、 -80°C で保存した。

・Transformation buffer: 3.0 g PIPES、2.2 g $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、18.6 g KCl を 950 ml の蒸留水に溶解し、KOH を用いて pH 6.7 に調製した。 $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10.9 g を加え、蒸留水で 1 l に調製し、0.22 μm フィルターを用いて濾過滅菌した。使用するまで 4°C に保存した。

2-2-9-9 大腸菌の形質転換

大腸菌の形質転換には DH5 α コンピテントセルを用いた。DH5 α コンピテントセルを氷上で解凍後、DNA と大腸菌を混和し、氷上で 30 分間インキュベートした。その後、 42°C 、45 秒間ヒートショックを加え、速やかに氷上で 2 分間冷やした。室温の SOC 培地を 0.5 ml 加え、1 時間振盪培養後、抗生物質を含む LB 寒天培地上にスプレッダーを用いて広げ、 37°C でコロニーを形成するまで約 15 時間培養した。

2-2-9-10 ミニプレップ

生育した大腸菌のシングルコロニーを 1.5 ml の抗生物質を含む 2 x YT 液体培地に植菌した。 37°C で約 18 時間培養後、その培養液を 1.5 ml チューブに移し、20,000 g、 4°C 、1 分間遠心分離し集菌した。上清を取り除き、沈殿した菌体に 100 μ l の Solution I を添加し、よく懸濁した後、200 μ l の Solution II を添加し、8 回転倒混和することで溶菌した。その後、150 μ l の Solution III を添加し、8 回転倒混和することで中和し、プラスミドベクター以外的高分子物質を変性した。20,000 g、 4°C 、5 分間遠心分離し、プラスミドベクターを含む上清を別の 1.5 ml チューブに移した。その後、フェノール・クロロホルム抽出を行い、上層を別の 1.5 ml チューブに移した後、その液量に対して 0.7 倍量の isopropanol を添加し、ボルテックスミキサーで 15 秒間攪拌した。20,000 g、 4°C 、5 分間遠心分離することで、プラスミドベクターを沈殿させた。上清を取り除き、あらかじめ -20°C で冷却した 70% エタノールを 500 μ l 加え洗浄し、20,000 g、 4°C 、5 分間遠心分離した。上清を除

去し、得られた沈殿物を風乾後、10 µg/ml の RNase A を含む 30 µl の TE buffer に溶解し、37°C、30 分間インキュベートし、プラスミドベクターとともに沈殿された RNA を分解した。制限酵素処理を用いて、得られたプラスミドベクター中に目的の DNA 断片が含まれていることを確認した。

- Solution I: 50 mM D (+)-glucose, 25 mM Tris-HCl (pH8.0), 10 mM EDTA (pH8.0) (オートクレーブ滅菌)
- Solution II: 0.2 N NaOH, 1 % SDS
- Solution III: 3 M CH₃COOK, 11.5 % CH₃COOH (オートクレーブ滅菌)
- TE buffer: 10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA

2-2-9-11 PEG 沈殿

DNA サンプルと等量の PEG8000 溶液を加え、ボルテックスミキサーで 30 秒間攪拌し、4°C で 1 時間インキュベート後、20,000 g、4°C、20 分間遠心分離した。上清を取り除いた。あらかじめ-20°C で冷却した 70 % エタノールを 500 µl 加え洗浄し、20,000 g、4°C、5 分間遠心分離した。上清を除去し、得られた沈殿物を風乾した。

2-2-9-12 DNA シークエンシング

PEG 沈殿後の DNA サンプルを 200 ng 用いて、BigDye® Termination v3.1 Cycle Sequencing Kit で付属のプロトコールに従って適切なシークエンシングプライマーを用いて DNA シークエンシング PCR 反応を行った。PCR 後のサンプルをエタノール沈殿法により精製し、Kit 付属の HiDi formamide 20 µl に溶解し、95°C、2 分間加熱することにより変性後、氷上で急冷した。そのサンプルを Applied Biosystems 3130 ジェネティックアナライザーにて分析し、塩基配列の決定を行った。

2-2-9-13 マキシプレップ

構築した発現プラスミドベクターを培養細胞にトランスフェクションする際に大量の発現プラスミドベクターが必要であった場合、Genopure Plasmid Maxi Kit を用いて、付属のプロトコールに従い、発現プラスミドベクターの大量調製を行った。

2-2-10 HA タグ融合 ARF タンパク質発現プラスミドベクター、FLAG タグ融合ヒト CARF タンパク質発現プラスミドベクター及び FLAG タグ発現プラスミドベクターのリン酸カルシウム法によるトランスフェクション

HAタグ融合ARFタンパク質、FLAGタグ融合ヒトCARFタンパク質及びFLAGタグを発現させるために発現プラスミドベクターのトランスフェクション法としてリン酸カルシウム共沈法を用いた。以下に90 mm ディッシュに必要な溶液の調製法を示す。トランスフェクション溶液を調製する前に90 mm ディッシュ: 50-60 %細胞密度のFlp-In T-REx 293 細胞に対してノーマル培地をもちいて培地交換を行った。36 μ lの2 M CaCl_2 (終濃度240 mM)とそれぞれ5 μ g、合計10 μ gの発現プラスミドベクターを滅菌した蒸留水で終量300 μ lになるように調製し、発現プラスミドベクター溶液を作製した。1 ml ディスポーザブルピペットとオートピペッターを用いて2 x HBS 300 μ lを攪拌しながら、発現プラスミドベクター溶液を1滴ずつ1 ml/分の速度でゆっくりと滴下した。混合後、室温に30分間静置し、DNAとリン酸カルシウム沈殿を形成させた。このトランスフェクション溶液を先に培地交換した細胞にゆっくりと滴下し、軽くディッシュをゆすることで混合した。その後、37°C、5% CO_2 存在下で24時間培養し、ノーマル培地を用いて培地交換を行った。その後さらに24時間培養し各種実験に用いた。

・ 2 x HBS (pH7.1): 50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 12 mM D (+) -glucose (0.22 μ mフィルターを用いてフィルター滅菌)

2-2-11 細胞分画

80 % 密度の細胞を PBS で洗浄後回収し、 1.2×10^7 cells を buffer C (16.7 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM NaCl, 1.67 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 0.1% TritonX-100): 1 ml に懸濁後、氷上で 3 分間インキュベートし溶解した。その細胞溶解物を 1,000 g、4 °C 条件で 5 分間遠心分離後、上清を回収し cytosol fraction を得た。沈殿を buffer C: 1ml で洗浄後、buffer D (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 0.5 % IGEPAL-CA630): 0.5 ml に懸濁した。オンタイム 20 秒間、インターバルタイム 90 秒間を 1 セットとし、Bioruptor を用い、ハイレベル設定で 10 回ソニケーションを行い、沈殿を破碎した。細胞破碎物を 16,000 g、4 °C 条件で 30 分間遠心分離後、上清を回収し nuclear extract fraction 1 (NE1) を得た。沈殿を buffer E (50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM DTT, 1 mM PMSF): 0.5 ml に懸濁後、前述した条件でソニケーションを行い、沈殿を破碎した。そのソニケートを 16,000 g、4 °C 条件で 30 分間遠心分離後、上清を回収し nuclear extract fraction 2 (NE2) を得た。

第3節 結果

2-3-1 FLAG タグ融合ヒト CARF タンパク質薬剤誘導発現細胞株の樹立

FLAG タグ融合ヒト CARF タンパク質 (FLAG-CARF) 薬剤誘導発現細胞株 (TOCARF 細胞) は Flp-In T-REx 293 細胞を親細胞として Flp-In T-REx Expression System を用い樹立した。FLAG-CARF 薬剤誘導発現プラスミドは hybrid human CMV/TetO₂ プロモーターをもち、doxycycline の添加により CARF の発現を誘導することができる (Fig. 2-2) ので、doxycycline による CARF 発現誘導条件を検討した。Doxycycline をそれぞれ 0、0.1、1、10、100 ng/ml の濃度で細胞に添加して 48 時間後に回収し、各細胞から細胞抽出液を調製後、抗 FLAG 抗体を用いたイムノブロットにより FLAG-CARF の発現量を解析した。得られた結果を ImageJ software (Downloaded from <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) により GAPDH のシグナル強度を用いて標準化し、相対的な FLAG-CARF 量を解析した (Fig. 2-3)。樹立した細胞株 TOCARF 細胞は doxycycline の濃度依存的に CARF タンパク質の発現量が増加し、doxycycline 1 ng/ml 以上の濃度では FLAG-CARF の発現量が大きく増加することはなかった。そこで、doxycycline 1 ng/ml の条件を用いて次項の CARF 相互作用因子群の単離実験を遂行した。また、TOCARF 細胞において発現誘導された FLAG-CARF が内在性 CARF と同様の細胞内分布を示すかを確認するため、蛍光免疫染色法により細胞内局在を調べた。その結果、既報の CARF の局在と同様に FLAG-CARF は主に核質に局在し、部分的にリボソーム生合成の場である核小体の縁にも存在した (Fig. 2-4)。

2-3-2 CARF 相互作用因子群の単離

樹立した TOCARF 細胞を用いて FLAG-CARF を bait とした抗 FLAG 抗体による pull down 法により CARF 相互作用因子群の単離を試みた (Fig. 2-5)。1 ng/ml doxycycline を 48 時間添加する条件下で CARF の発現を誘導した TOCARF 細胞抽出液に対して FLAG タグ抗体を用いて pull down 操作を行った後、FLAG ペプチドにより溶出し、非誘導コントロールとして、doxycycline 非添加条件で培養した TOCARF 細胞抽出液を用いた。溶出した

CARF 相互作用因子群は 7.5 %ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE による分離後、銀染色法により可視化した (Fig. 2-6)。その結果、doxycycline を添加した細胞抽出液からの pull down サンプルでは目視で約 40 本のバンドを確認した。一方、doxycycline 非添加条件で培養した TOCARF 細胞抽出液に対する抗 FLAG 抗体による pull down サンプルも目視で約 27 本のバンドを確認した。溶出サンプルについて抗 FLAG 抗体を用いたイムノブロットで解析した結果、pull down により FLAG-CARF を濃縮したことにより doxycycline 非添加条件でも低量の FLAG-CARF を検出した (Fig. 2-7)。このことから、TetO₂ プロモーターによる制御が完全ではなく、doxycycline 非添加条件でも CARF が少量発現することが明らかとなった。前述したコントロールの溶出サンプルにおいて検出されたタンパク質群は少量発現した FLAG-CARF に相互作用しているタンパク質である可能性が考えられた。

2-3-3 nanoLC-MS/MS による CARF 相互作用因子群の同定

CARF 相互作用因子群を同定するために銀染色により可視化したゲルを用いてゲル内トリプシン消化と極微流逆相液体クロマトグラフィー/タンデムマススペクトロメトリーによる解析を行った。その結果、新規 CARF 相互作用因子として 19 種のタンパク質を同定した (Table 2-3)。リボソーム生合成に関与するタンパク質が 3 種 (XRN2、Nucleolin、NPM)、pre-mRNA splicing に関与するタンパク質が 7 種 (ATP-dependent RNA helicase DHX15、hnRNP A1、hnRNP H、hnRNP K、hnRNP L、hnRNP U、RNA-binding protein 10)、シャペロンタンパク質が 4 種 (HSP70-1、GRP-78、HSPA8、HSPA9)、p53 関連アポトーシスに関与するタンパク質 KIAA1967、翻訳に関与するタンパク質 eIF-4B、機能未知タンパク質 60S acidic ribosomal protein P0-like、その他 2 種のタンパク質 (Serine/threonine-protein kinase RIO1、Influenza virus NS1A-binding protein) を同定した。Endogenous CARF の細胞内局在は主に核、部分的に核小体であり、同定したタンパク質はシャペロンタンパク質及び eIF-4B を除き全てのタンパク質が核、もしくは核及び細胞質に局在することから、

endogenous CARF と同様の細胞内相互作用因子を単離、同定できたと考えた。その中でも、XRN2 が mascot protein score 1,168 であり、高いスコアで同定された。mascot protein score が高いほどそのタンパク質が測定したサンプルに存在する可能性が高いことを示している (153)。XRN2 の mascot protein score は bait である CARF の mascot protein score 1,663 の次に高い数値であり、XRN2 の次に同定されたタンパク質 GRP-78 の mascot protein score 440 よりも著しく高かった。あわせて、XRN2 の同定されたペプチドは 35 ペプチドであり、XRN2 の全アミノ酸配列中の 36.5 % をカバーしていた。このことから、XRN2 が CARF と細胞内で相互作用することが示唆された。

次に、nanoLC-MS/MS により同定した XRN2 と CARF の相互作用がイムノブロットで検出できるか調べた (Fig. 2-7)。doxycycline 非添加条件の細胞抽出液においても FLAG-CARF が僅かに発現しているため、XRN2 のシグナルが検出されたが、doxycycline 添加条件の細胞抽出液を用いて pull down したサンプルの方でより高いシグナルを検出した。XRN2 のシグナルはダブルバンドが検出されるときとシングルバンドで検出されるときがあった。ダブルバンドの低分子量の XRN2 は修飾を受けているもしくは分解されている可能性が考えられる。しかし、pull down したサンプルで低分子量の XRN2 が検出されないときもあるので CARF との相互作用に特異的現象ではないと判断した。第 3 章において CARF 恒常発現細胞を用いた解析において同様の低分子量の XRN2 が検出した (Fig. 3-4)。また、CARF の相互作用因子として nanoLC-MS/MS により同定されなかった GAPDH はイムノブロットを用いても pull down フラクシオンから検出されなかった。このように nanoLC-MS/MS によるタンパク質同定の信頼性を、免疫学的手法により確認した。

第4節 小括

本章では、CARF による p53 を介さない新規細胞増殖調節機構解明の手がかりを得るために、プロテオミクス的手法を用いて CARF の相互作用タンパク質を単離・同定した。そのために、FLAG-CARF 薬剤発現誘導細胞株を樹立し、その細胞抽出液から免疫沈降法で FLAG-CARF 相互作用因子群を回収した。得られた CARF 相互作用因子群をゲル内トリプシン消化と極微流逆相液体クロマトグラフィー/タンデムマスペクトロメトリーによる解析を行った。CARF 相互作用タンパク質としてリボソーム生合成に関与するタンパク質を 3 種 (XRN2、Nucleolin、NPM)、pre-mRNA splicing に関与するタンパク質を 7 種 (ATP-dependent RNA helicase DHX15、hnRNP A1、hnRNP H、hnRNP K、hnRNP L、hnRNP U、RNA-binding protein 10)、シャペロンタンパク質を 4 種 (HSP70-1、GRP-78、HSPA8、HSPA9) など計 19 種のタンパク質を同定した (Table 2-3)。今回同定された因子群はこれまでに報告された CARF 相互作用タンパク質を含んでいなかった。この一因として SDS PAGE の条件が低分子量のタンパク質分離には適さない条件であったことが推測される。これまで CARF の相互作用因子として報告のあるタンパク質 21 種類の中で分子量が 30 kDa 以下の 3 種タンパク質: ARF (16.5 kDa)、RP-A p14 (13.6 kD)、RP-A p32 (29.2 kDa) は、解析条件では検出できない。単離した CARF 相互作用因子群を SDS-PAGE 分離限界が 15 kDa 程度の条件で分離後、イムノブロットを行った際にも既知の CARF 相互作用タンパク質を検出しなかった。ARF が SDS-PAGE により分離されるグラジエントゲルを用いるなど更なる検討が必要である。

ARF が CARF 相互作用因子群に検出されなかったことに関して他の 2 つの要因を考えた。1 つは、発現させた CARF のタグの付加位置の問題である。Hasan らによる免疫沈降法を用いた CARF と ARF が相互作用するとの報告 (43, 127) では、CARF の C 末端側にタグタンパク質が付加されていた。同じ論文で免疫染色法により GFP タグが付加された CARF と ARF の共局在を検出した実験においても C 末端側に GFP タグが付加されていた。CARF 相互作用因子群の単離に用いた TOCARF 細胞は CARF の N 末端側に FLAG タ

グが付加されるコンストラクトである。このことから、CARF の N 末端側のタグが ARF と CARF との相互作用を阻害したために、ARF が CARF 相互作用因子群に含まれなかったと推測した。2 つめの原因は ARF の発現量である。ARF は正常細胞においてユビキチン化修飾され、プロテアソーム系により速やかに分解されることで発現量が低く保たれている (106)。一方で、培養がん細胞株では HeLa 細胞のように ARF の発現量が高い細胞や HepG2 細胞のように ARF の発現量が低く検出できない細胞がある (154)。実際に今回用いた TOCARF 細胞抽出液に含まれる ARF はごく微量であり (Fig. 2-8)、CARF の相互作用因子として ARF を同定できなかった可能性がある。そこで、上記 2 つの要因を考慮して ARF 遺伝子を過剰発現させ、C 末端に FLAG タグを付加した CARF (CARF-FLAG) との相互作用を検討した。CARF-FLAG と HA-ARF をコトランスフェクションした細胞の分画を行い CARF と ARF が同じ分画に存在するか調べた。細胞抽出液を Cytosol fraction、NE1、NE2 に分画し、イムノブロットにより解析した。その結果、CARF と ARF は同じフラクション NE1 に存在した (Fig. 2-9)。そして、NE1 を用いて抗 FLAG 抗体による pull down 法を行った。得られたサンプルをイムノブロットにより解析した。その結果、CARF と ARF がこのサンプル中にあることが示された (Fig. 2-9)。以上の結果より、CARF の相互作用因子群に ARF が同定されなかった原因は前述した CARF の N 末端側に FLAG タグが付加されていたこと及び TOCARF 細胞における ARF の低発現量の両方あるいはいずれかの可能性が考えられる。

また、免疫沈降法後イムノブロットにより CARF との相互作用が解析された報告は、下記の 5 種のタンパク質: ARF (43, 117, 127)、p53 (126)、MDM2 (127, 128)、CHK2 (132)、ERK1 (132) である。そのうち ARF 以外のタンパク質は前述の解析条件で理論上検出される。CARF と CHK2 (132)、ERK1 (132) の相互作用を検証した免疫沈降法の実験方法については報告論文中に記載がないが、発現させた FLAG-CARF の N 末端側のタグが相互作用を阻害する可能性が考えられる。Hasan らによる免疫沈降法を用いた CARF と MDM2 の相互作用についての報告 (127, 128) 及び p53 との相互作用についての報告 (126) では、

CARF の C 末端側にタグが付加されていた。しかし、同じ論文において *in vitro* で精製タンパク質を用いたタンパク質の相互作用を検証した実験では CARF の N 末端側に His タグが付加されていたのでタグを N 末端側に付加したことによる影響ではないと考えられた。

pull down 法に用いた細胞可溶化条件では p53 が可溶化できていない可能性が考えられる。実際、pull down 法に用いた細胞抽出液をイムノブロットにより抗 p53 抗体を用いて解析した結果、細胞全抽出液に含まれる p53 よりも pull down 法に用いた細胞抽出液 (cytosol 可溶性画分) に含まれる p53 が減少していた (Fig. 2-10)。そこで、不溶性画分をソニケーションにより可溶化し、不溶性画分の細胞抽出液を用いて CARF 相互作用因子群の回収を試みた。イムノブロットによる解析で、可溶化により p53 は増加したが、回収した CARF 相互作用因子群に p53 は含まれなかった。この原因としてソニケーションにより CARF と p53 の結合が離れた可能性が考えられた。

既知の CARF 相互作用タンパク質の中にリボソーム生合成で働くタンパク質は報告されていなかった。本研究において CARF の相互作用因子として新たにリボソーム生合成において機能をもつタンパク質 XRN2 (155, 156, 157, 158)、Nucleolin (159, 160, 161) 及び NPM (17, 18, 19, 20) が同定されたことは CARF がリボソーム生合成に関与している可能性を示しており、CARF の新規の機能の存在を示唆している。Nucleolin (42) 及び NPM (18, 27, 78, 88, 89, 90, 91) はともに ARF とも相互作用することが既に報告されており、CARF-ARF-Nucleolin もしくは NPM 複合体を形成している可能性が考えられた。しかし、本研究において同定した CARF 相互作用因子群には ARF が含まれていなかったことから、3 つのタンパク質が複合体を形成している可能性よりも、a) CARF-Nucleolin もしくは NPM、b) ARF-Nucleolin もしくは NPM、c) CARF-ARF で複合体を形成し、機能していることが考えられた。さらに、お互いに競合することにより機能を制御している可能性も考えられる。

本研究において CARF 相互作用因子として同定されたタンパク質で ARF との相互作用が報告されている他のタンパク質は、hnRNPU (72)、HSPA8 (59)、HSPA9 (59) である。これ

らのタンパク質がARF-CARFと複合体を形成している可能性も考えられるがNucleolinと同様に、CARF相互作用因子群にはARFが含まれていなかったことから、3つのタンパク質が複合体を形成している可能性よりも、各々タンパク質が1対1で複合体を形成し、機能していることが考えられた。

また、pre-mRNA splicingに関与するタンパク質7種がCARFの相互作用因子として同定されたが、pre-mRNA splicingのある特定の段階に関わるタンパク質群ではなく様々な段階に関与するタンパク質群であった。このことから、CARFがpre-mRNA splicing経路においてどのような機能をもつかについてはさらなる研究が必要である。本研究でCARF相互作用因子として同定したpre-mRNA splicing関連因子の一つであるhnRNP Kは、pre-mRNA splicingだけでなくchromatin remodeling、転写、翻訳、mRNA安定性等、幅広い機能をもつタンパク質である (162)。また、DNA damageを受けた時にスモ化やリン酸化を受けて、p53を介してアポトーシスを誘導することが知られている (163, 164, 165)。このことから、CARF-p53-hnRNP K複合体を形成している可能性が考えられるが、本研究において同定したCARF相互作用因子群にはp53が含まれていなかったことから、前述の既知ARF相互作用因子のように3つのタンパク質が複合体を形成している可能性は低いと考えられる。

シャペロンタンパク質はタンパク質のフォールディングをアシストするタンパク質であるので、多種のタンパク質に結合することができる (166, 167)。HSP70の基質選択性はロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、チロシンを多く含む4~5アミノ酸からなる疎水性領域及び塩基性アミノ酸に富んだ領域をもつことである (167)。実際、CARFのアミノ酸配列を調べると244-248番目のアミノ酸がフェニルアラニン-バリン-セリン-ロイシン-ロイシンであり、前述のHSP70の基質の条件にあてはまる。この為に、CARFにシャペロンタンパク質が結合した可能性が考えられた。CARFの相互作用因子として同定されたシャペロンタンパク質の局在を考えると、HSP70-1及びHSPA8は細胞質と核、GRP-78は小胞体、HSPA9はミトコンドリアである (166)。このことからGRP-78及びHSPA9は細胞小器官を破壊し細胞抽出液にした後にFLAG-CARFに結合したタンパ

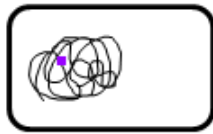
ク質である可能性が高い。つまり、実際に細胞内で相互作用している可能性は低いと考えられた。

eIF-4B も局在が細胞質である (168) ので、前述した GRP-78 及び HSPA9 と同様に、実際に細胞内で相互作用している可能性は低いと考えられた。本研究で同定した CARF 相互作用因子群は細胞内でシャペロンタンパク質及び eIF-4B を除き全てのタンパク質が核、もしくは核及び細胞質に局在する (18, 155, 159, 162, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176)。このことから、核に存在する endogenous CARF の細胞内相互作用因子を単離、同定することができたと考えられる。Protein KIAA1967 は、p53 に結合、安定化しその機能を促進する (169) ことから、まだ明らかになっていない CARF が関与する p53 を介した細胞増殖機構が存在するのかもしれないが、本研究の目的は CARF による p53 を介さない新たな細胞増殖調節機構を明らかにすることであるので、p53 関連因子ではない CARF 相互作用因子に注目した。その中でも、顕著に高いスコアで同定された XRN2 について考察する。

XRN2 は 950 アミノ酸残基からなり (177)、RNA や一本鎖 DNA が結合する Zinc finger domain をもつ (177) (Fig. 2-11)。CARF は主に核質に、部分的にリボソーム生合成が行われている核小体の縁に存在する (43) ので、リボソーム生合成に働く XRN2 と CARF の相互作用がリボソーム生合成における XRN2 の働きを阻害もしくは促進し、細胞増殖を制御する可能性も考えられる。転写反応においてプロモーター近傍で pol II が留まる promoter-proximal pausing という現象が知られているが、近年これら pausing した pol II が DNA から解離して 5'末端近辺で転写が終結する premature termination という現象が報告され、この反応に XRN2 が関与することが明らかになっている (178, 179)。torpedo model とよばれる XRN2 の関与する poly(A)シグナル配列下流の pol II による転写の終結 (180, 181, 182, 183, 184) は、poly(A)シグナル配列の下流に CoTC 配列および pause 配列をもつ遺伝子にのみ限定されていると考えられていた (181, 182) が、poly(A)シグナル配列を持たない転写でも起こり、XRN2 の 5'-3'エキソヌクレアーゼ活性が pol II の転写終結を促進すること

が報告された (183)。このことから、XRN2 と CARF が相互作用することにより、pol II による RNA の転写終結における XRN2 の働きを阻害もしくは促進し、細胞増殖を制御している可能性も考えられた。

真核細胞は周りの環境ストレスに対して、DNA ダメージの修復、細胞周期の停止やタンパク質の翻訳抑制などの反応を介してストレスの影響を軽減する (186, 187)。ストレスの1つとして、ヒートショックを与えられたときに XRN2 は核内において initiator tRNA^{Met} を分解し、タンパク質の翻訳を抑制する (188, 189) ことから、CARF は XRN2 のこの機能を促進もしくは抑制して細胞増殖を制御している可能性も考えられた。これら XRN2 の機能についての報告は XRN2 と RNA の相互作用を示唆している。一方で、第1章で述べたように CARF はそのアミノ酸配列から 2 本鎖 RNA に結合すると推測される ds RNA-binding domain を持ち (Fig. 1-3)、RNA と相互作用することが報告されている (143)。これら 2 つのタンパク質の性質から CARF と XRN2 が RNA を介して相互作用する可能性が考えられた。前述した XRN2 の機能には p53 が関与しないことから、CARF が p53 を介さずに細胞増殖を調節する可能性が期待された。以上の理由から CARF と XRN2 の相互作用に着目し、次の章では新規に見出された XRN2 と CARF の相互作用の生体内における機能について検証を進める。



Flp-In T-REx 293 cell line contains a single integrated FRT site and stably expresses the Tet repressor.

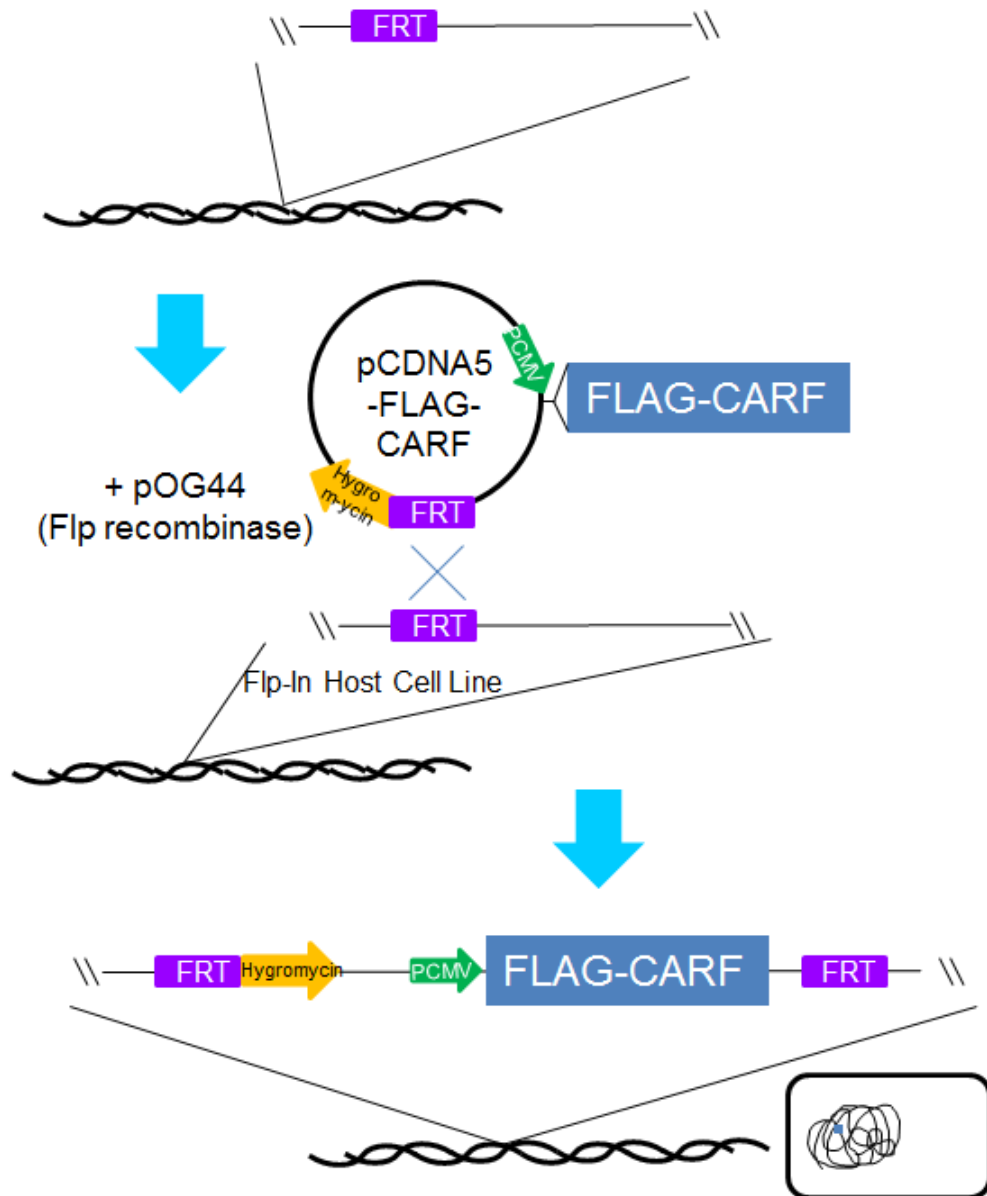


Fig. 2-1 Flp-In T-REx Expression Systemを用いてCARF遺伝子が特定のゲノム位置に組み込まれる模式図

FRT: Flp Recombination Target

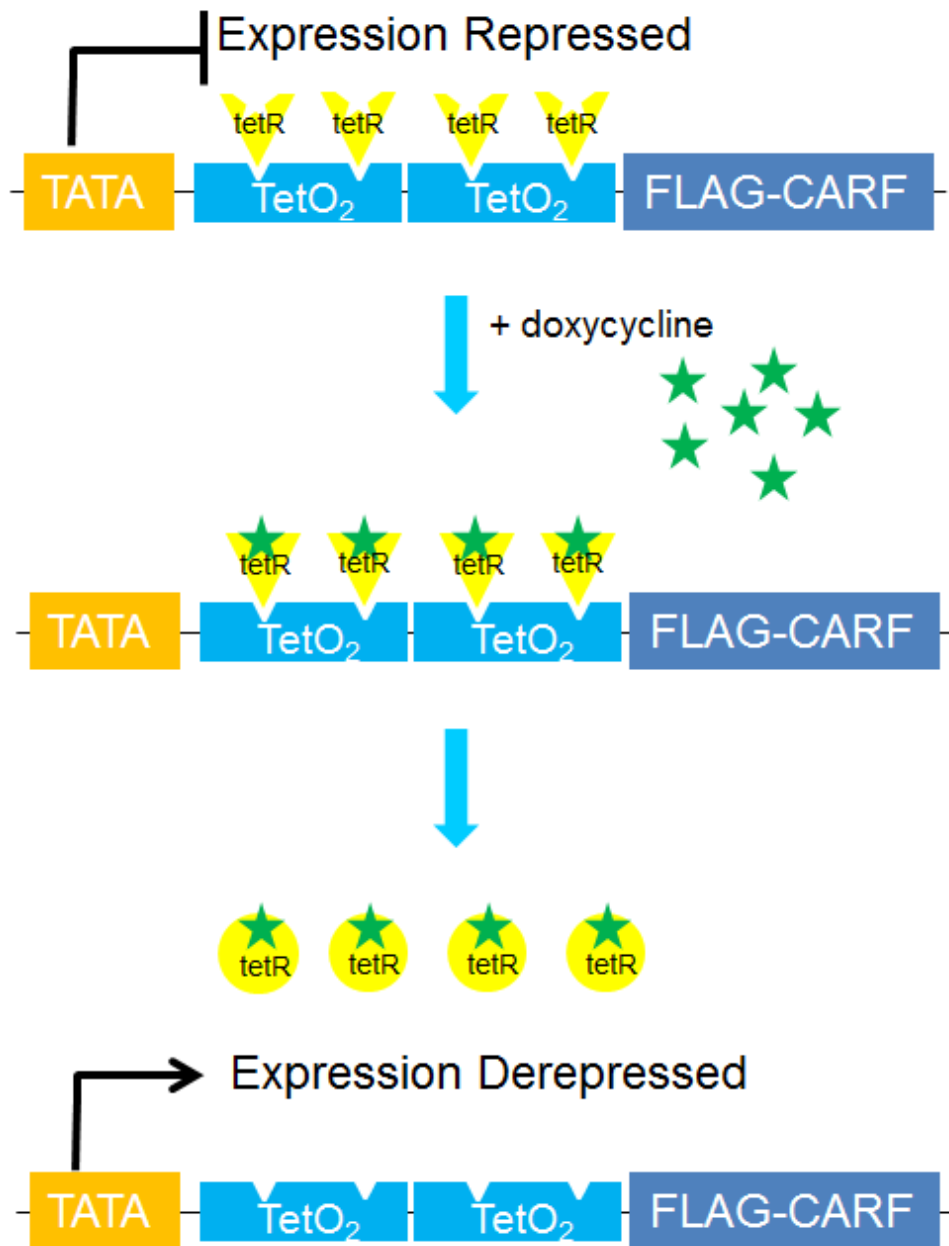


Fig. 2-2 doxycyclineによるFLAG-CARFの発現誘導模式図

tetR: Tet repressor
TetO₂: Tet operator 2

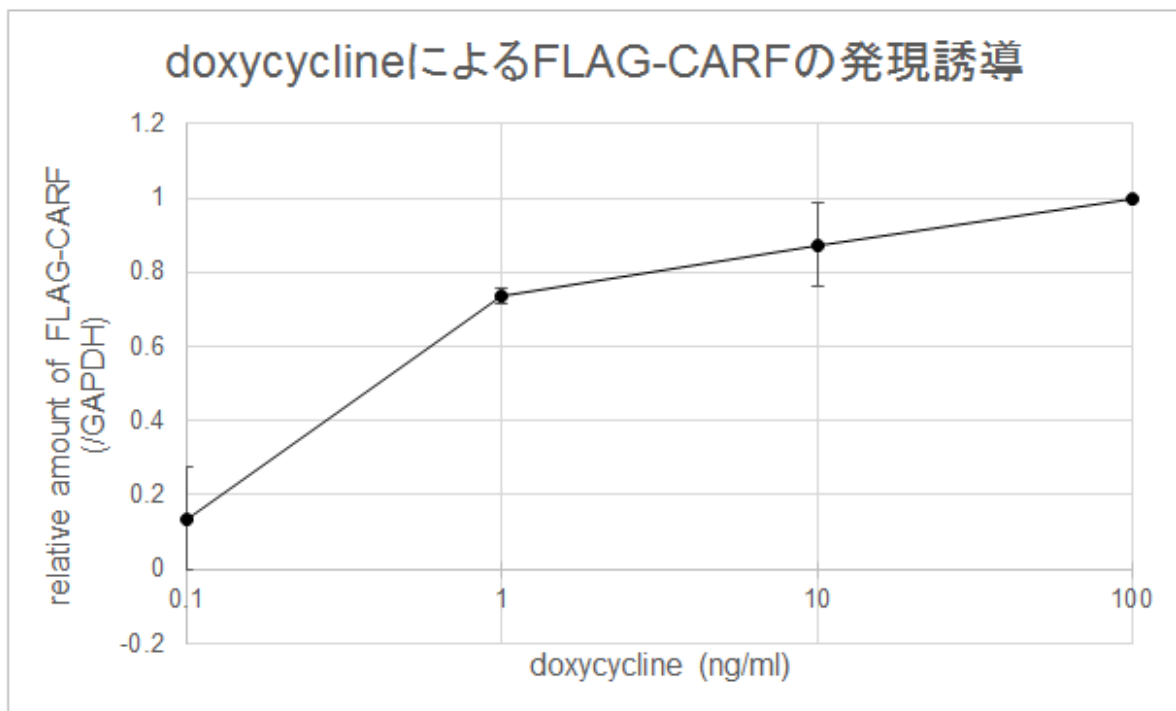
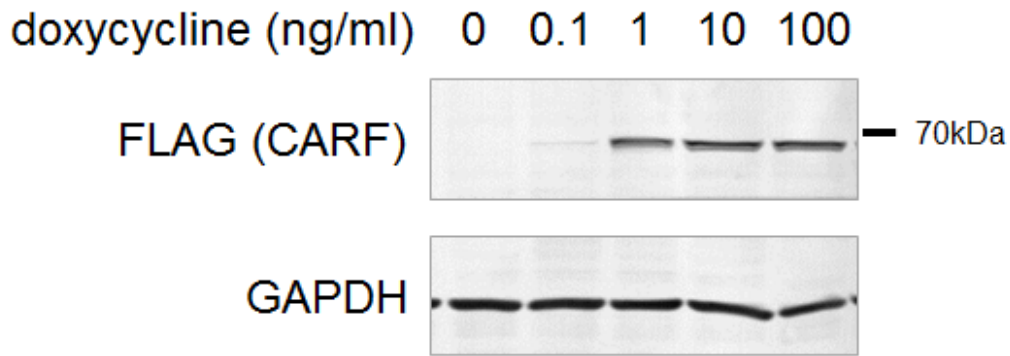


Fig. 2-3 doxycyclineによるFLAG-CARFの発現誘導

doxycycline濃度0~100 ng/ml存在下で48時間培養したCARF薬剤誘導発現細胞抽出液中のFLAG-CARFを解析した。ローディングコントロールとして抗GAPDH抗体を用いた。用いた抗体を左側に示した。免疫プロットの結果をGAPDHを用いて標準化し、doxycycline濃度100 ng/mlで培養した細胞の発現量を1として相対的な値を示した。(n=3) Error bar: standard deviation

FLAG (CARF) DAPI

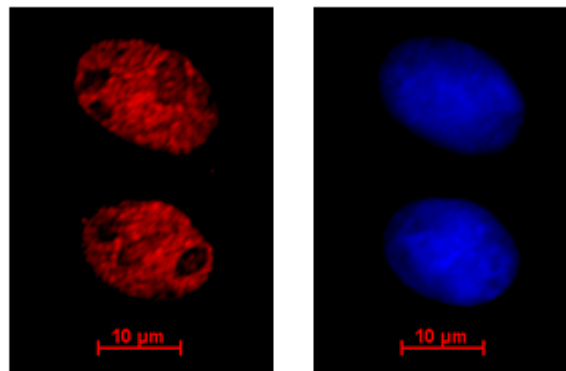


Fig. 2-4 doxycyclineにより誘導発現したFLAG-CARFの細胞内局在

10 ng/ml doxycyclineによりCARF発現誘導したTOCARF細胞のFLAG-CARFの細胞内局在を抗FLAG抗体を用いた免疫染色法により調べた。使用した抗体は上部に示した。核をDAPI染色を用いて示した。スケールバーは10 μm。

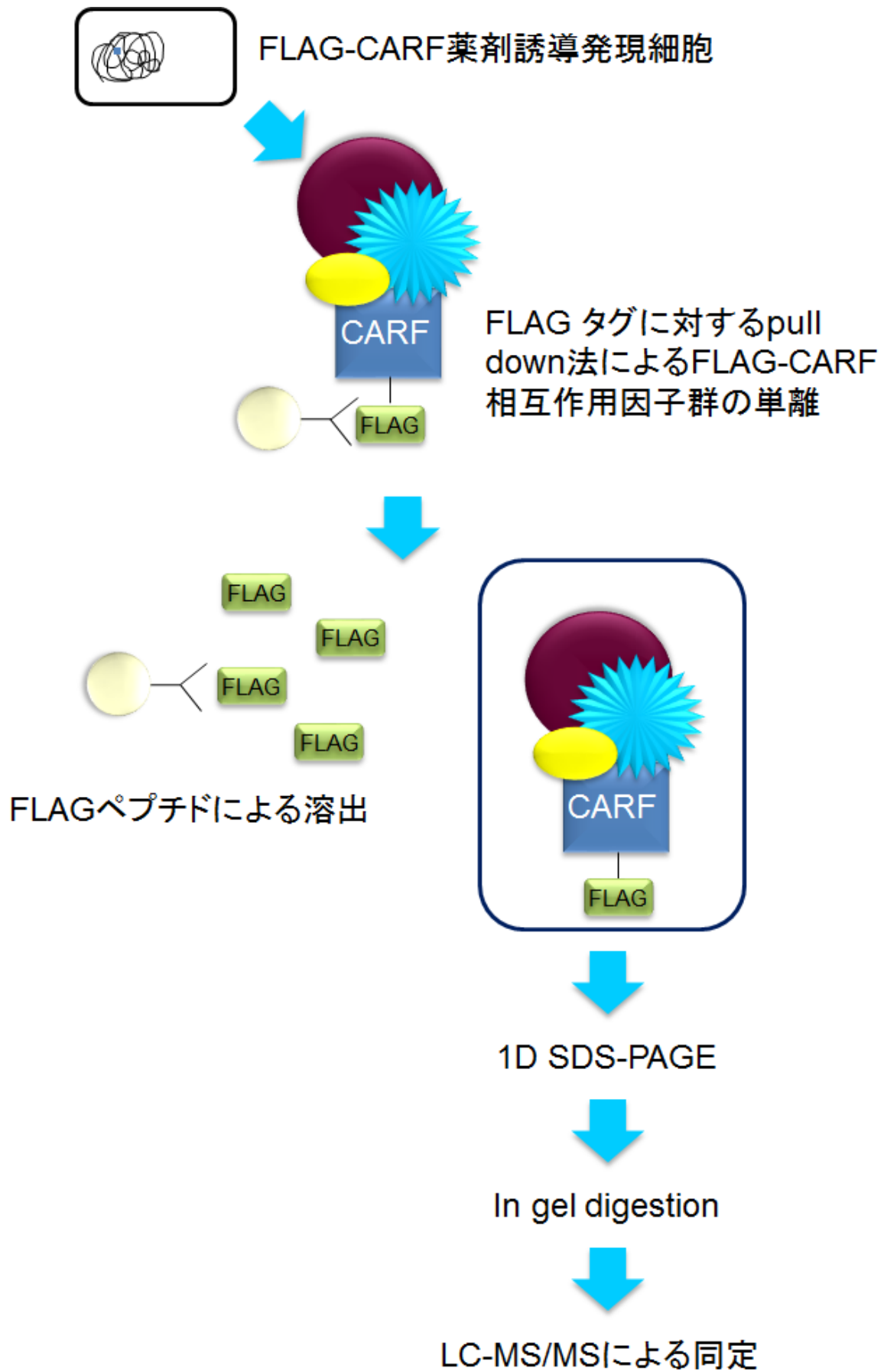


Fig. 2-5 CARFと相互作用するタンパク質の探索の模式図

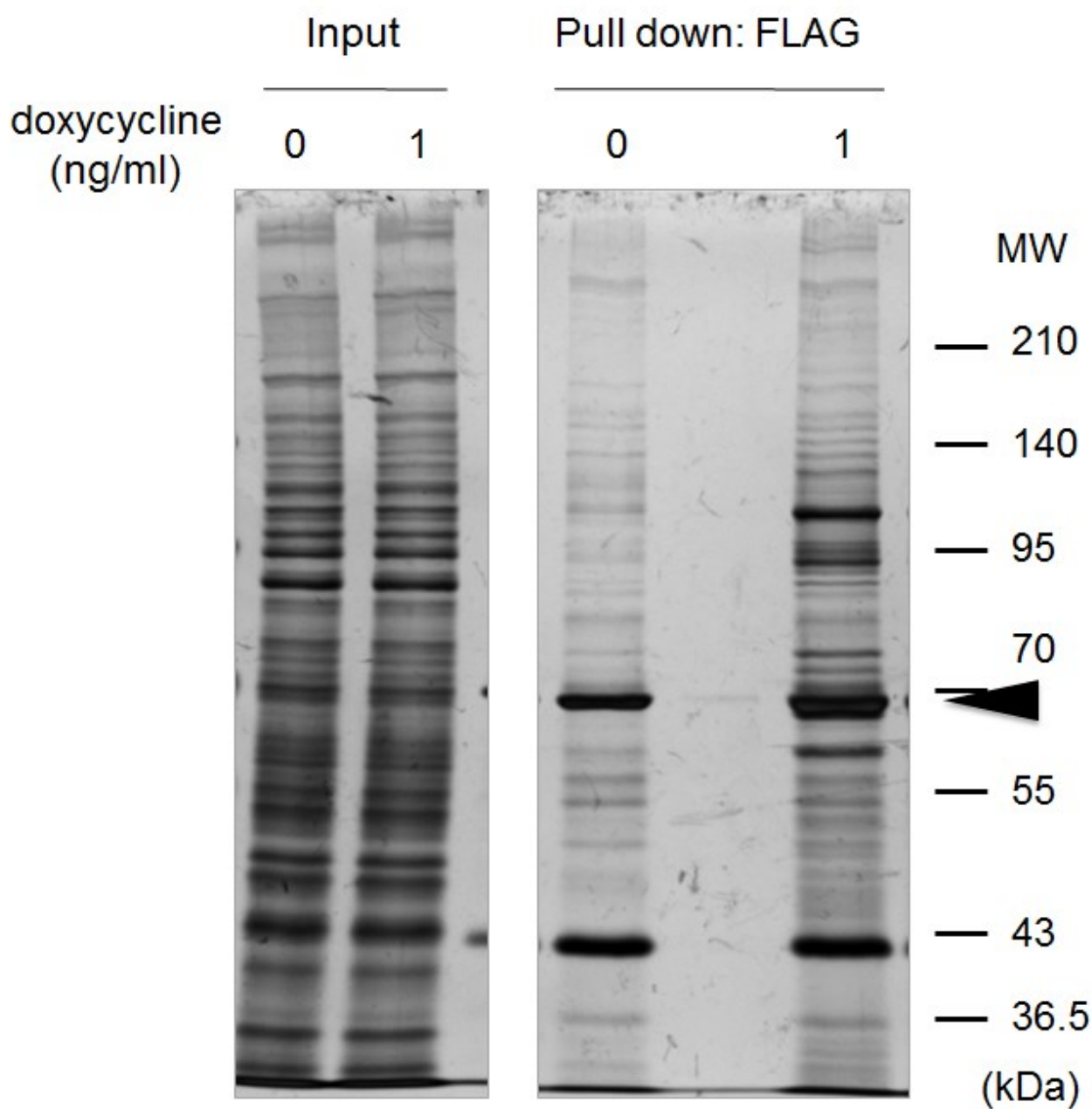


Fig. 2-6 SDS-PAGEによるFLAG-CARF相互作用因子群の解析

回収したFLAG-CARF相互作用因子群をSDS-PAGEにより分離後、銀染色によりタンパク質を可視化した。Input: 細胞抽出液1 μ g, Pull down: 細胞抽出液3 mgを用いたFLAGタグによるpull down法で得られたFLAG-CARF相互作用因子群を解析した。baitとして用いたFLAG-CARFのバンドを▲で示した。

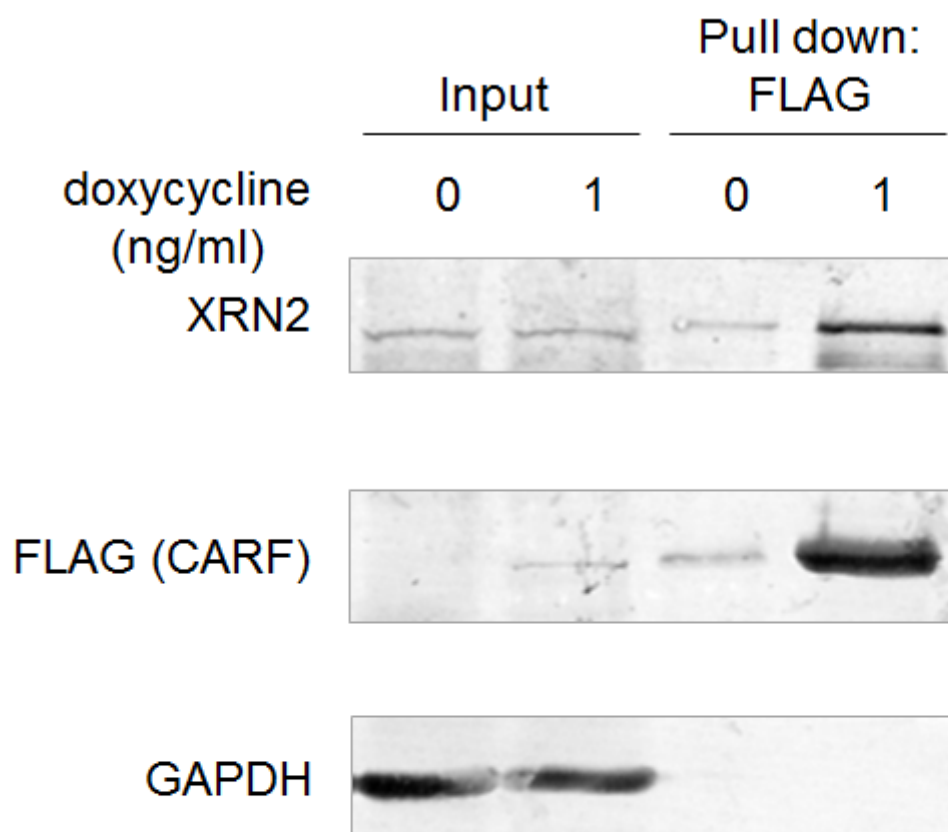


Fig. 2-7 イムノプロットによるFLAG-CARF相互作用因子群の解析

回収したFLAG-CARF相互作用因子群を抗FLAG抗体、抗XRN2抗体を用いたイムノプロットにより解析した。ローディングコントロールとして抗GAPDH抗体を用いた。用いた抗体を左側に示した。

Input: 不溶性成分を除いた細胞抽出液20 μ g, Pull down: 細胞抽出液2 mgに対するFLAGタグによるpull down法から得られたFLAG-CARF相互作用因子群を用いて解析した。

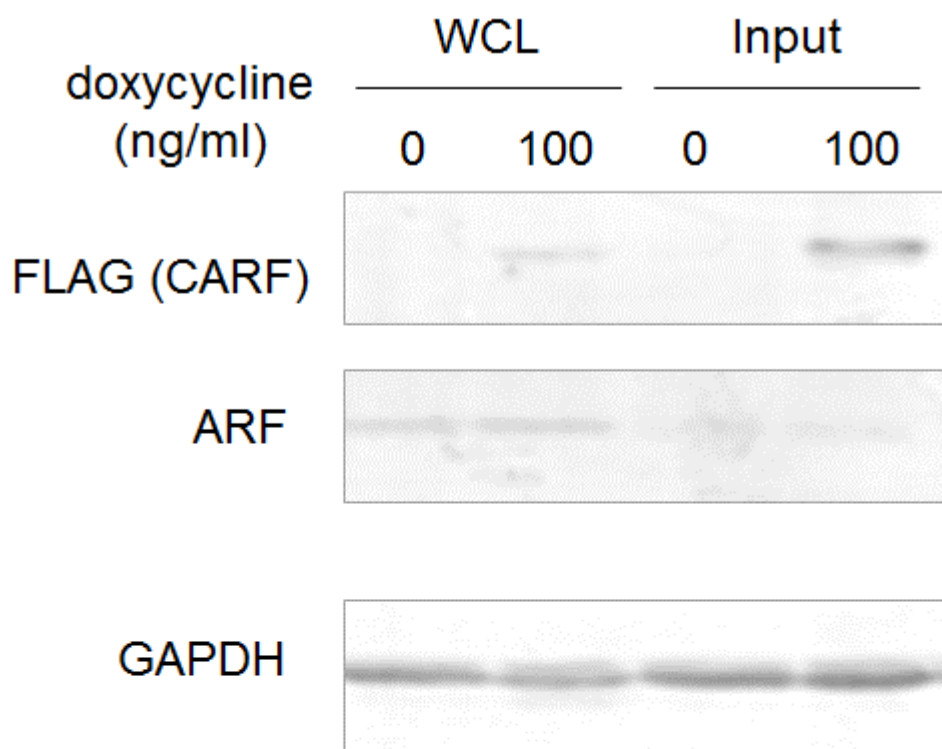


Fig. 2-8 イムノプロットによるARFタンパク質の検出

細胞全抽出液およびpull down法に用いるInput フラクシオンに含まれるARFタンパク質を抗ARF抗体を用いたイムノプロットにより検出した。ローディングコントロールとして抗GAPDH抗体を用いた。用いた抗体を左側に示した。

WCL: 細胞全抽出液20 μ g, Input: 不溶性成分を除いた細胞抽出液20 μ gを用いて解析した。

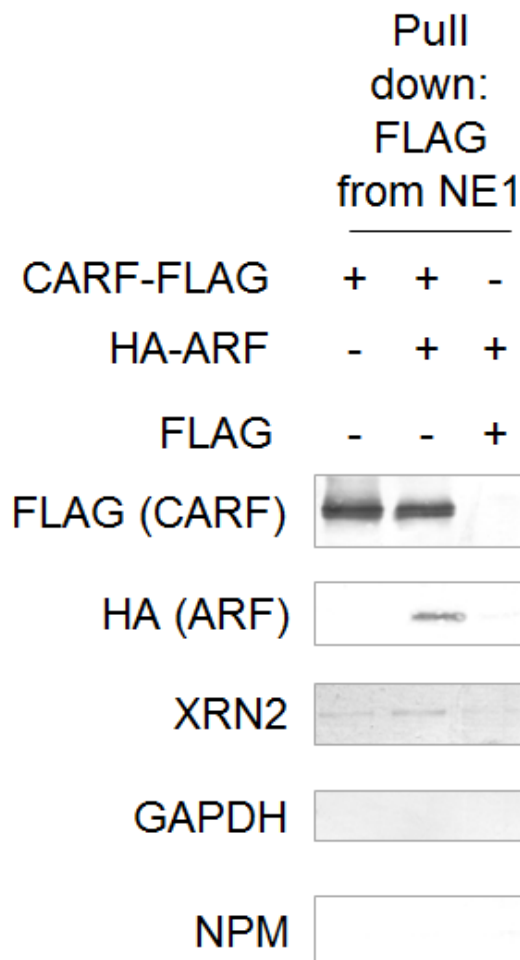
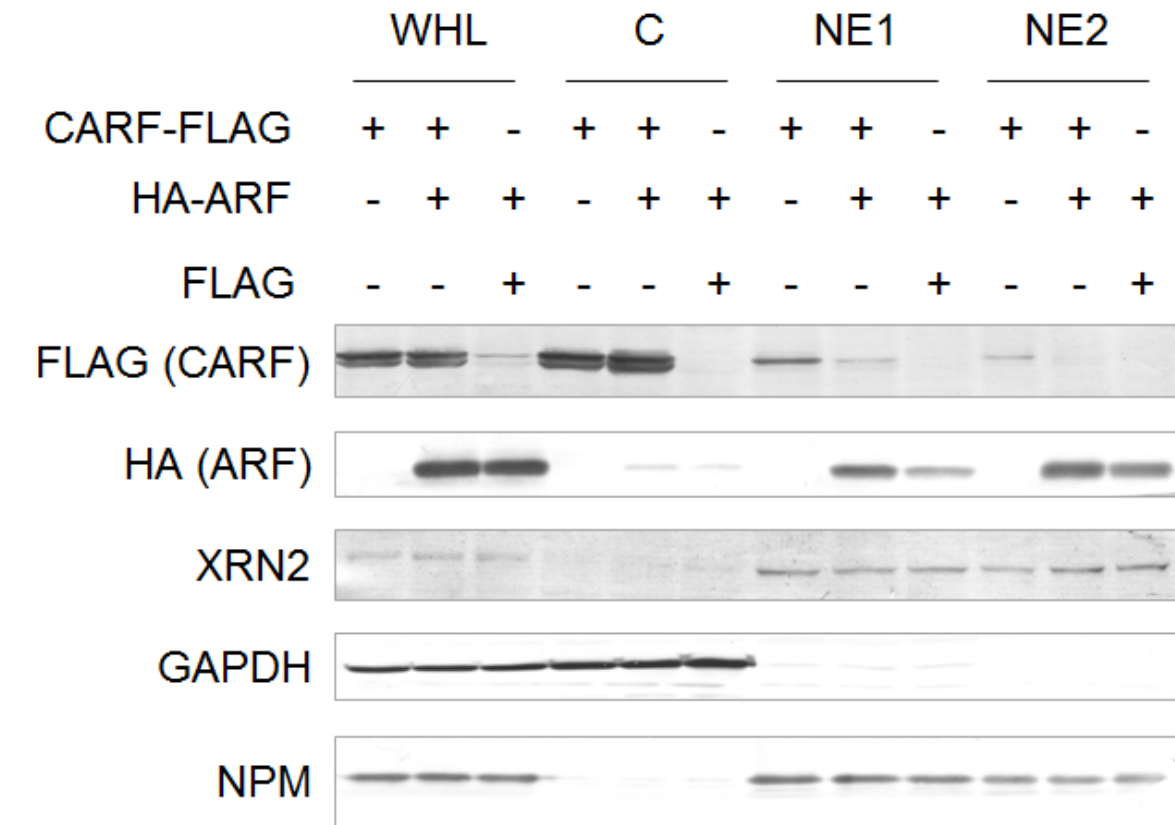


Fig. 2-9 イムノプロットによるHA-ARFおよびCARF-FLAGの細胞内局在の解析

HA-ARFおよびCARF-FLAGを過剰発現した細胞を分画し、NE1フラクションを用いてCARF-FLAGをbaitとしてpull down法を行った。各フラクションを抗FLAG抗体、抗HA抗体を用いたイムノプロットによりそれぞれの細胞内局在およびCARF-FLAG相互作用タンパク質を検出した。分画マーカーはCytosolのマーカーとして抗GAPDH抗体、核のマーカーとして抗NPM抗体を用いた。用いた抗体を左側に示した。WCL: 細胞全抽出液, C: Cytosol, NE1: Nuclear extract fraction 1, NE2: Nuclear extract fraction 2 についてそれぞれ20 μ gを解析した。Pull down: 6×10^6 cellから得られたNE1フラクションを用いてFLAGタグによるpull down法から得られたCARF-FLAG相互作用因子群を用いて解析した。

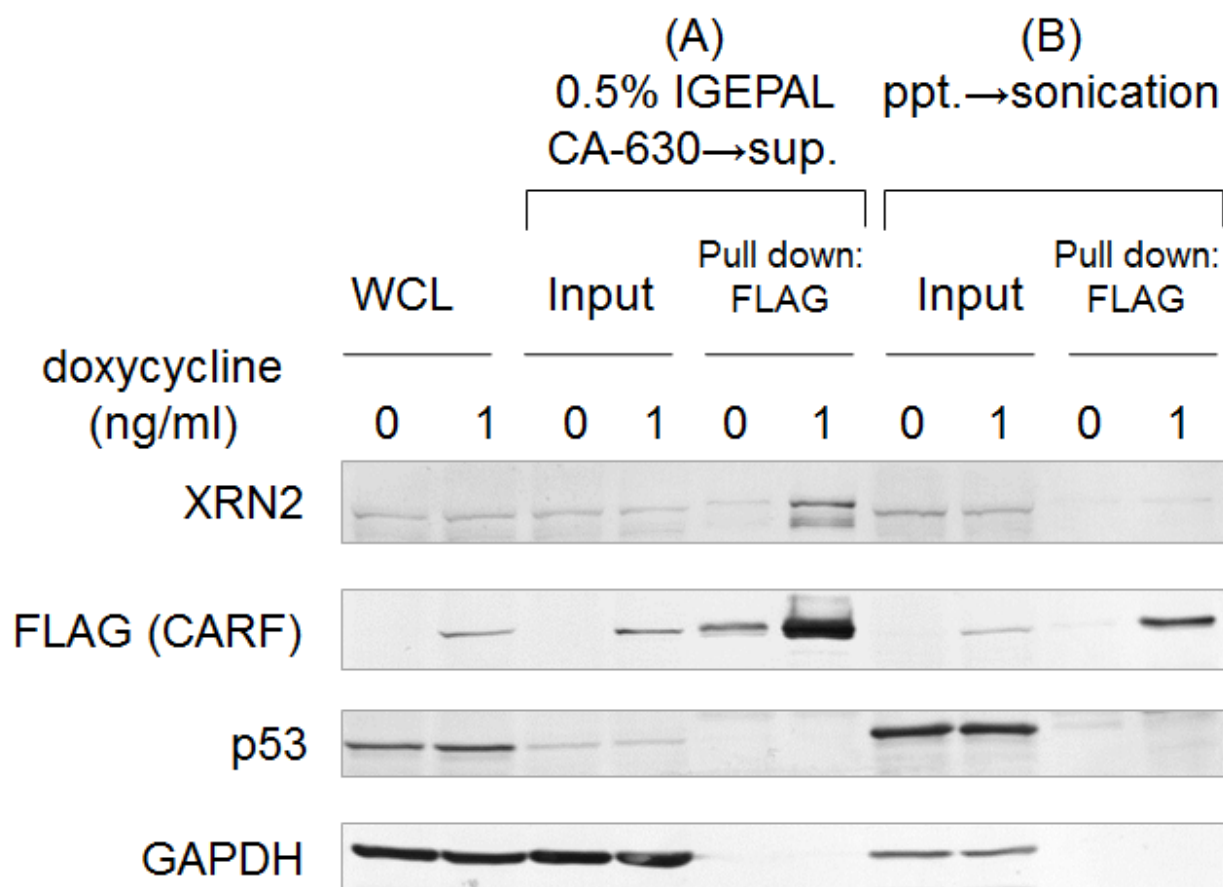


Fig. 2-10 イムノブロットによる不溶性画分からのFLAG-CARF相互作用因子群の解析

不溶性成分を除いた細胞抽出液 (A)、不溶性画分をソニケーションにより可溶化した細胞抽出液 (B) を用いてFLAGタグによるpull down法を行った。抗p53抗体を用いたイムノブロットによりFLAG-CARFとp53の相互作用について検証した。ローディングコントロールとして抗GAPDH抗体を用いた。Pull down法のポジティブコントロールとして抗XRN2抗体を用いたイムノブロットも行った。用いた抗体を左側に示した。

WCL: 細胞全抽出液20 μ g, Input: pull down法に用いた細胞抽出液20 μ g, Pull down: FLAGタグによるpull down法から得られたFLAG-CARF相互作用因子群を用いて解析した。

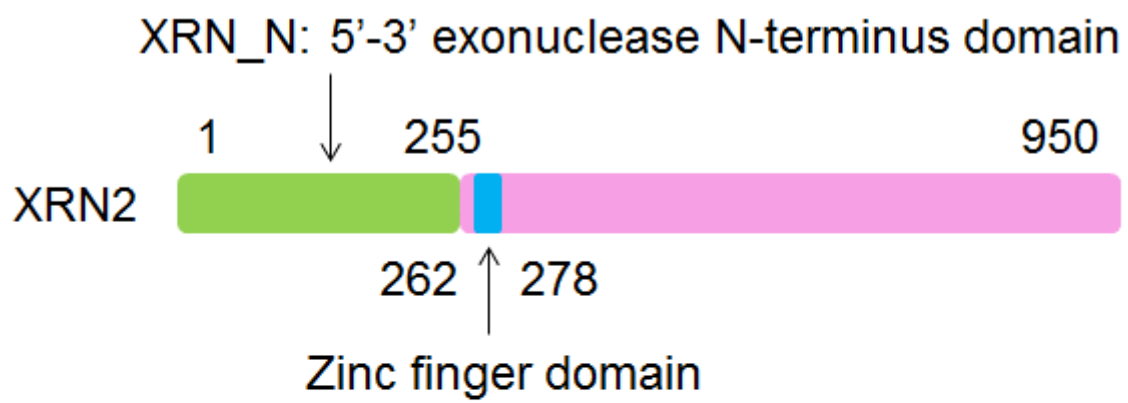


Fig. 2-11 XRN2のタンパク質のドメイン構造模式図

Table 2-1 報告のあるCARF相互作用タンパク質

Uniprot KB accession, protein name, Gene symbol:

Swiss Protデータベースに登録されているaccession, Entry name, protein name, Gene symbol, Cellular localization:

PML: PML body, Chromo: 染色体, Nu: 核, Cy: 細胞質, Mito: ミトコンドリア, ER: 小胞体, P-b: P-body, Golgi: Golgi apparatus, Mm: 膜、

Lyso: Lysosome, Mela: Melanosome

Uniprot KB acc	protein name	Gene Symbo	Cellular localization	species	参考文献	MW (Da)
Related TP53						
P04637	Cellular tumor antigen p53 (p53)	TP53	Nu, PML, Cy, ER, Mito	Homo sapiens	126	43,653
P42771	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (ARF)	CDKN2A	Nu, Cy	Homo sapiens	43, 117, 127	16,533
P51480	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (ARF)	Cdkn2a	Nu, Cy	Mus musculus	117	17,941
O96017	checkpoint kinase 2 (CHK2)	CHEK2	Nu, No, PML	Homo sapiens	132	60,915
Q14676	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 (MDC1)	MDC1	Nu	Homo sapiens	135	226,666
Ubl conjugation pathway						
Q99728	BRCA1-associated RING domain protein 1 (BARD1)	BARD1	Nu	Homo sapiens	135	86,648
P38398	Breast cancer type 1 susceptibility protein (BRCA1)	BRCA1	Nu, Cy	Homo sapiens	135	207,721
Q13618	Cullin-3 (CUL3)	CUL3	Nu, Golgi	Homo sapiens	71	88,930
Q00987	MDM2 oncogene, E3 ubiquitin protein ligase (MDM2)	MDM2	No, Nu, Cy	Homo sapiens	127, 128	55,233
P0CG48	Polyubiquitin-C (UBC)	UBC	Nu, Cy	Homo sapiens	128, 140, 141	77,039
P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase (VCP)	VCP	ER, Nu	Homo sapiens	142	89,322
Others						
Q92820	Gamma-glutamyl hydrolase (GGH)	GGH	Lyso, Mela	Homo sapiens	137	35,964
P07099	Epoxide hydrolase 1 (EPHX1)	EPHX1	Mm	Homo sapiens	137	52,949
Q99L19	Polyribonucleotide 5'-hydroxyl-kinase Clp1 (CLP1)	Clp1	Nu	Mus musculus	108	47,738
O75175	CCR4-NOT transcription complex, subunit 3 (CNOT3)	CNOT3	Nu, Cy, P-b	Homo sapiens	144	81,872
Q96C10	Probable ATP-dependent RNA helicase DHX58 (LGP2)	DHX58	Cy	Homo sapiens	136	76,613
P27361	Mitogen-activated protein kinase 3 (MAPK3) (ERK1)	MAPK3	Cy, Nu	Homo sapiens	132	43,136
O60216	Double-strand-break repair protein rad21 homolog (RAD21)	RAD21	Nu, Chromo	Homo sapiens	138	71,690
P27694	Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit (RP-A p70)	RPA1	Nu	Homo sapiens	139	68,138
P15927	Replication protein A 32 kDa subunit (RP-A p32)	RPA2	Nu, PML	Homo sapiens	139	29,247
P35244	Replication protein A 14 kDa subunit (RP-A p14)	RPA3	Nu	Homo sapiens	139	13,569

Table 2-2 報告のあるCARF相互作用核酸

RNA name		参考文献
ACA11 (SCARNA22)	a 125-bp noncoding RNA (ncRNA) located within intron 18–19 of WHSC1	143

Table 2-3 Identification of proteins associated with CARF

Summary of the CARF-associated proteins identified by LC-MS/MS analysis. a. Positions of amino- (Start) and carboxyl- (End) termini of the identified peptides within the amino acid sequence are shown. b. The significance threshold ($p = 0.05$) and probability-based MOWSE scores obtained from database search by MASCOT are shown. Scores that exceed their threshold are statistically confident with more than 95% certainty. c. The charge state and observed precursor mass are indicated.

Uniprot KB accession	Uniprot KB Entry name	protein name	Gene Symbol	Mascot Score ^b	Start ^a	Sequence ^a	End ^a	Charge State ^c	Mascot Score ^b	Observed Precursor mass ^c	pep_var_mod
exoribonuclease											
Q9H0D6	XRN2_HUMAN	5'-3' exoribonuclease 2	XRN2	1168	73	NEDEMMVAIFEYIDR	87	2+	38.98	937.77	
					88	LFSIVRPR	95	2+	36.36	494.35	
					97	LLYMAIDGVAPR	108	2+	73.94	659.73	
					97	LLYMAIDGVAPR	108	2+	87.29	667.77	Oxidation (M)
					124	EGMEAAVEK	132	2+	52.82	482.17	
					135	VREEILAK	142	2+	34.22	479.23	
					155	FDSNCITPGTEFMDNLAK	172	2+	57.69	1030.37	
					182	LNNDPGWK	189	2+	40.26	472.14	
					190	NLTWILSDASAPGEGEHK	207	2+	67.51	919.36	
					190	NLTWILSDASAPGEGEHK	207	3+	65.31	613.26	
					287	HDELADSLPCAEGEFIFLR	305	3+	34.32	740.29	
					316	ELTMASLPFTFDVER	330	2+	36.35	886.26	Oxidation (M)
					374	TGGYLTESGYVNLQR	388	2+	73.25	829.34	
					389	VQMIMLAVGEVEDSIFK	405	2+	39.65	954.85	
					428	DQPAFTPSGILTPHALGSR	446	2+	37.22	982.82	
					428	DQPAFTPSGILTPHALGSR	446	3+	46.1	655.59	
					447	NSPGSQVASNPR	458	2+	56.95	607.2	
					466	MQNNSSPSISPNSTFTSDGSPSPL	493	3+	54.81	936.36	
						GGIK					
					466	MQNNSSPSISPNSTFTSDGSPSPL	493	3+	38.78	941.69	Oxidation (M)
						GGIK					
					523	NKFDVDADEK	533	2+	34.7	626.37	
					523	NKFDVDADEKFR	535	3+	59.89	518.82	
					523	NKFDVDADEKFR	535	2+	48.8	777.79	
					525	FDVDADEK	533	2+	36.86	505.16	
					525	FDVDADEKFR	535	2+	41.2	656.75	
					538	VVQSYVEGLCWVLR	551	2+	57.19	854.59	
					552	YYYQGCAASWK	561	2+	48.82	663.16	
					660	AALEEVYPDLTPEETR	675	2+	53.53	916.87	
					660	AALEEVYPDLTPEETR	676	3+	36.65	663.57	
					677	NSLGGDVLVVGK	688	2+	55.99	603.26	
					744	DLTQNTVVSINFKDPQFAEDYIFK	767	3+	37.86	944.62	
					744	DLTQNTVVSINFK	756	2+	55.34	739.83	
					776	KPAAVLKPSDWEK	788	3+	38.01	490.22	
					776	KPAAVLKPSDWEK	788	2+	36.96	734.83	
					884	GVGAEP LLPWNR	895	2+	40.68	654.8	
					806	RPVHLDQAAFR	816	2+	46.85	655.28	
Apoptosis											
Q8N163	K1967_HUMAN	Protein KIAA1967	KIAA1967	264	98	AAYNPGQAVPWNAVK	112	2+	30.76	793.26	
					113	VQTLSNQPLLK	123	2+	35.51	620.74	
					139	QGILGAQPQLIFQPHR	154	2+	40.8	893.29	Gln->pyro-Glu (N-term)
					310	VLLLSPPGLEELYR	323	2+	39.43	794.8	
					353	KEEEAVLVGGEWSPSLDGLDPQA	382	3+	30.46	1078.47	
						DPQVLVR					
					405	FAEFQYLQPGPPR	417	2+	48.9	775.24	
					559	MLLSLPEK	566	2+	42.77	465.68	
					748	VVTQNICQYR	757	2+	32.31	640.75	
					847	FSATEVTNK	855	2+	60.16	498.66	
					856	TAAEMQELR	865	2+	37.76	581.25	
					910	ADSWVEKEEPAPSN	923	2+	41.62	779.7	
mRNA processing&splicing											
P98175	RBM10_HUMAN	RNA-binding protein 10	RBM10	399	135	MLPQAATEDDIR	146	2+	48.92	680.26	
					147	GQLQSHGVQAR	157	2+	49.37	590.71	
					172	GFAFVEFSLQDATR	186	2+	63	862.75	
					213	INEDWLCNK	221	2+	70.21	596.22	
					253	LDQQTLPLGGR	263	2+	54.85	599.27	
					686	ESATADAGYAILEK	699	2+	79.69	719.79	
					759	LACLLCR	765	2+	41.98	453.19	
					786	QNLEIHR	792	2+	31.58	455.18	
					838	YGGISTASVDFEQPTR	853	2+	49.02	864.25	
					854	DGLGSDNIGSR	864	2+	40.92	545.69	
					865	MLQAMGWK	872	2+	41.16	482.7	
O43143	DHX15_HUMAN	Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA	DHX15	41	244	EAMNDPLLR	253	2+	31.92	594.2	
					254	YGVILDEAHER	265	2+	30.9	707.78	
hnRNPs											
P61978	HNRPK_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRPK	293	22	RPAEDMEEEQAFKR	35	3+	38.77	579.14	
					38	NTDEMVELR	46	2+	63.93	553.7	
					70	TDYNASVSPDSSGPER	86	2+	46.52	890.81	
					149	LLIHQSLAGGIIVK	163	3+	33.39	507.06	
					149	LLIHQSLAGGIIVK	163	2+	63.07	760.1	
					172	ENTQTTIK	179	2+	37.03	467.64	
					192	VVLIGGKPDPR	201	2+	38.29	527.41	
					208	IILDISESPIK	219	2+	62.59	670.77	
					306	NLPLPPPPPPR	316	2+	64.51	671.02	
					317	GGDLMAYDRR	326	2+	10.5	577.21	
					378	GSYDGLGGPIITQVTIPK	396	2+	56.98	959.18	
					423	IDEPLGSEDR	433	2+	66.85	630.22	

Table 2-3 Identification of proteins associated with CARFの続き

Uniprot KB accession	Uniprot KB Entry name	protein name	Gene Symbol	Mascot Score ^b	Start ^a	Sequence ^a	End ^a	Charge State ^c	Mascot Score ^b	Observed Precursor mass ^c	pep_var_mod
P14866	HNRPL_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	HNRNPL	281	98 TPASPVVHIR	107	2+	35.11	538.9		
					179 ISRPGDSDSDSR	189	2+	30.65	602.69		
					230 NGVQAMVEFDSVQSAQR	246	2+	45.06	933.34		
					265 IEYAKPTR	272	2+	45.86	489.15		
					278 NDQDQTDYTNPNLSGGDPSGNPNKR	303	3+	32.27	963.94		
					399 VFNVFLYGNVEK	411	2+	52.86	794.7		
					485 FSTPEQAAK	493	2+	37.07	489.64		
					542 SSSGLLEWESK	552	2+	62.43	611.72		
					569 NPNGPYPYTLK	579	2+	34.86	632.26		
					580 LCFSTAQHAS	589	2+	35.53	561.2		
					187 SSGPTSLFAVTVAPPGAR	204	2+	85.3	857.78		
					353 DIDIEHVR	360	2+	30.14	498.71		
					576 NFILDQTNVSAQAQR	590	2+	110.78	824.35		
					317 VHIEIGPDGR	316	2+	56.56	999.06		
P31943	HNRH1_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	HNRNPH1	57	300 ATENDIYNFFSPLNPVR	316	2+	56.56	999.06		
					317 VHIEIGPDGR	326	2+	32.69	546.84		
P09651	ROA1_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	HNRNPA1	66	16 LFIGLGFETTESLR	31	2+	51.49	892.83		
					114 EDTEEHLR	122	2+	38.85	583.12		
Translation											
P23588	IF4B_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 4B	EIF4B	201	357 AASIFGGAKPVDTAAR	372	3+	45.28	511.23		
					357 AASIFGGAKPVDTAAR	372	2+	36.59	766.28		
					420 TGSESSQTGTSTSSR	435	2+	81.96	787.13		
					495 SQSSDTEQQSPTSGGGK	511	2+	31.13	840.72		
					512 VAPAQPSEEGPGR	524	2+	51.38	647.91		
					525 KDENKVDGMNAPK	537	2+	36.04	723.25		
Chaperon											
P08107	HS71A_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 1	HSPA1A	333	37 TTPSYVAFTDTER	49	2+	61.41	744.25		
					57 NQVALNPQNTVFDKAK	71	2+	59.23	829.83		
					113 AFYPEEISSMVLTK	126	2+	35.02	807.81		
					160 DAGVIAGLNVLR	171	2+	47.53	599.26		
					172 IINEPTAAAIAYGLDR	187	2+	54.94	844.35		
					237 LVNHFVEEFK	246	2+	34.15	631.26		
					237 LVNHFVEEFK	247	3+	31.18	473.21		
					237 LVNHFVEEFK	247	2+	36.09	709.31		
					349 LLQDFFNGR	357	2+	38.88	555.17		
					525 YKADEVQR	533	2+	30.11	569.11		
					540 NALESYAFNMK	550	2+	38.12	644.22		
					551 SAVEDEGLK	559	2+	46.68	474.16		
					61 TTPSYVAFTPEGER	74	2+	47.46	784.02		
					102 TWNDPSVQQDIK	113	2+	44.73	715.96		
P11021	GRP78_HUMAN	78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5	440	124 TKPYIQVDIGGGQTK	138	2+	52.1	803.06		
					139 TFAPEEISSMVLTK	152	2+	34.16	769.03		
					165 VTHAVVTVPAYFNDAQR	181	3+	43.39	629.92		
					186 DAGTIAGLNVMR	197	2+	62.67	609.25		
					198 IINEPTAAAIAYGLDKR	214	3+	60.04	605.93		
					198 IINEPTAAAIAYGLDK	213	2+	65.53	830.35		
					345 VLEDSLKK	353	2+	30.66	523.87		
					448 SQIFSTASDNQPTVTIK	464	2+	65.93	918.84		
					465 VYEGERPLTK	474	2+	33.84	596.24		
					524 ITITNDQNR	532	2+	53.23	537.64		
					563 NELESYAYSILK	573	2+	32.23	658.69		
					622 ELEEVQPIISK	633	2+	54.79	699.31		
					37 TTPSYVAFTDTER	49	2+	61.41	744.25		
					160 DAGTIAGLNVLR	171	2+	49.28	600.27		
P11142	HSP7C_HUMAN	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8	296	172 IINEPTAAAIAYGLDKK	188	3+	64.96	596.6		
					172 IINEPTAAAIAYGLDK	187	2+	65.53	830.35		
					302 FEELNADLFR	311	2+	30.93	627.23		
					329 SQIHDIVLVGGSTR	342	2+	50.15	741.33		
					86 TTPSYVAFTADGER	99	2+	41.6	725.75		
					207 DAGQISGLNVLR	218	2+	64.72	621.69		
P38646	GRP75_HUMAN	Stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9	151	349 AQFEGIVTDLIR	360	2+	43.26	681.22		
					395 VQQTVDLDFGR	405	2+	49.69	645.76		
					635 QAASSLQQASLK	646	2+	48.84	616.43		
ribosome biogenesis											
P19338	NUCL_HUMAN	Nucleolin	NCL	63	411 EVFEDAIEIR	420	2+	43.78	589.67		
					524 GYAFIEFASFEDEAK	537	2+	36.63	797.81		
					611 GFGVDFNSEEDEAK	624	2+	32.46	781.19		
P06748	NPM_HUMAN	Nucleophosmin	NPM1	42	25 ADKDYHFK	32	2+	35.83	512.13		
					240 GPSSVEDIK	248	2+	42.26	466.3		
Others											
Q9BRS2	RIOK1_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase RIO1	RIOK1	284	120 INLDKLNVTDSVINK	134	3+	34.23	562.58		
					125 LNVTDVINK	134	2+	92.46	551.75		
					156 ATVEQVLDPR	165	2+	57.19	564.19		
					177 GIITEINGCISTGK	190	2+	50.89	732		
					221 DKYVSGEFR	229	2+	33.51	550.62		
					302 ELYLQVIQYMR	312	2+	41.54	728.3		
					371 HSAVAVMTVR	379	2+	50.98	500.22		
					482 VPALLENQVEER	493	2+	73.58	698.79		
Q9Y6Y0	NS1BP_HUMAN	Influenza virus NS1A-binding protein	IVNS1ABP	61	119 QVC GDYLLSR	128	2+	41.29	605.74		
					491 LWTSACAPLNIR	501	2+	43.18	665.77		
Q8NHW5	RLA0L_HUMAN	60S acidic ribosomal protein P0-like	RPLP0P6	54	67 GHLENNPALEK	77	2+	40.14	611.39		
					135 TSFFQALGITTK	146	2+	54.33	657.41		

Table 2-3 Identification of proteins associated with CARFの続き

Uniprot KB accession	Uniprot KB Entry name	protein name	Gene Symbol	Mascot Score ^b	Start ^a	Sequence ^a	End ^a	Charge State ^c	Mascot Score ^b	Observed Precursor mass ^c	pep_var_mod
Bait											
Q9NXV6	CARF_HUMAN	CDKN2A-interacting protein	CDKN2AIP	1663	1	MAQEVSEYLSQNPR	14	2+	89.71	826.21	
					15	VAAWVEALR	23	2+	53.13	507.67	
					24	CDGETDKHWR	33	2+	49.76	652.1	
					37	DFLLR	41	1+	32.46	663.46	
					42	NAGDLAPAGGAASASTDEAADAESG	68	2+	69.73	1216.76	
					42	NAGDLAPAGGAASASTDEAADAESG	68	3+	46.4	811.61	
					100	ILSMAEGIK	108	2+	72.78	481.21	
					100	ILSMAEGIK	108	2+	41.39	489.16	Oxidation (M)
					109	VTDAPTYTTR	118	2+	57.96	562.84	
					129	GISSNEGVEEPSK	142	2+	119.43	710.23	
					129	GISSNEGVEEPSKK	143	2+	36.95	774.26	
					150	NSSAVEQDHAK	160	2+	32.02	593.15	
					168	ASAQENSSTCIGSAIK	184	2+	75.78	876.27	
					193	SSGSSQNSSTSDGDR	208	2+	82.16	792.68	
					209	SVSSQSSSVSSQVTTAGSGK	229	3+	51.85	653.15	
					209	SVSSQSSSVSSQVTTAGSGK	229	2+	108.11	979.29	
					230	ASEAEAPDK	238	2+	51.65	459.12	
					249	SSVNSHMTQSTDSR	262	3+	86.64	512.81	
					249	SSVNSHMTQSTDSR	262	2+	52.95	768.65	
					249	SSVNSHMTQSTDSR	262	3+	46.99	518.11	Oxidation (M)
					309	PSSETASSGLTSK	321	2+	107.55	626.22	
					322	TSSEASVSSVAK	334	2+	73.21	620.14	
					335	NSSSSGTSLLTPK	347	2+	91.93	639.68	
					348	SSSNTSLLTSK	360	2+	92.8	656.72	
					361	STSQVAASLLASK	373	2+	71.35	631.9	
					374	SSSQTSGLVSK	385	2+	66.76	584.21	
					386	STLASVSQLASK	398	2+	56.21	639.7	
					399	SSSQTSVQLPSK	411	2+	89.36	669.16	
					434	QKQPFNRR	441	2+	30.84	532.72	
					434	QKQPFNRR	441	2+	44.53	524.22	Gln->pyro-Glu (N-term Q)
					450	LVAVGGFSPNVNHGELLNAAIEALK	474	3+	38.27	845.01	
					475	ATLDVFFVPLK	485	2+	51	625.32	
					486	ELADLPQNK	494	2+	36.72	514.15	
					495	SSQESIVCELR	505	2+	72.66	654.24	
					550	GSEIEDLVLLDEESR	564	2+	54.13	852.25	
					550	GSEIEDLVLLDEESRPVNLPPALK	573	3+	46.87	878.36	

第3章 CARF と XRN2 の相互作用

第1節 緒言

前章においてプロテオーム解析により 19 種の CARF の新規相互作用因子を同定した。その中でも XRN2 は 1) リボソーム生合成において働くこと(155, 156, 157, 158)、2) pol II による pre-mRNA 転写の終結を促進すること (178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185)、3) ヒートショック時に tRNA^{Met} を分解し、タンパク質の翻訳を抑制すること (188, 189) が明らかになっている。いずれの機能も細胞増殖に影響があることが推測される。一方、p53 が関与する XRN2 機能の制御の報告はない。従って、上記の XRN2 の機能を CARF が制御することで、p53 を介さずに細胞増殖を調節する可能性が考えられる。本章においてはこの 2 つのタンパク質の相互作用についてさらなる解析を行うこととした。

第1に、CARF と XRN2 の相互作用を確定するために、CARF 発現量の XRN2 共沈降量への影響について調べた。前章において見出された CARF と XRN2 の相互作用が非特異的な結合の結果ではないならば、CARF の量依存的に共沈降する XRN2 が増加すると推測された。そこで誘導発現系に添加する薬剤の量を変え、様々な発現量の CARF に対する XRN2 の共沈降量を解析した。

第2に、XRN2 相互作用因子群に CARF が存在するか解析した。その際に 2 つの方法を用いて調べた。1 つめの方法は HA タグ融合 XRN2 タンパク質 (HA-XRN2) を細胞に一過的に発現させ、HA タグに対する pull down 法により回収した HA-XRN2 相互作用因子群に CARF が存在するか調べた。2 つめの方法として、抗 XRN2 抗体を用いて endogenous XRN2 に対する免疫沈降法を行い、endogenous XRN2 相互作用因子群に CARF が含まれるか調べた。

第3に CARF と XRN2 との相互作用が直接の結合によるものかについて検討した。はじめに、CARF と XRN2 の結合が RNA を介しているのか調べた。このような検討を行った理由は第2章の小括で述べたように 2 つのタンパク質の性質から相互作用に RNA を介する可能性が考えられたからである (Fig. 1-3, 155, 156, 157, 158, 178, 179, 180, 181, 182,

183, 184, 185)。CARF 相互作用因子群に含まれる RNA を RNase A により分解し、回収される CARF 相互作用因子群に含まれる XRN2 の量に変化があるか調べた。

次に、CARF と XRN2 が他のタンパク質を介して相互作用しているのかを調べるため、タンパク質断片コンプリメンテーション法 (190) を基にした *CoralHue*[®] monomeric Kusabira-Green (mKG) レポーターシステムを用いて解析した。2 つのタンパク質が相互作用した場合は mKG_N と mKG_C が結合することにより mKG が再構築され、緑色の蛍光を発するので、mKG_N 融合 CARF 及び mKG_C 融合 XRN2 を Flp-In T-REx 293 細胞にトランスフェクションし、蛍光の有無を調べた。逆の組み合わせも検討した。

最後に CARF と XRN2 の欠失変異体をそれぞれ作成し、FLAG タグタンパク質に対する pull down 法により相互作用に必要な領域を特定した。どの領域に相互作用しているのか知ることで、その相互作用の生理機能を知る知見が得られると考えた。

第2節 実験方法

装置及び器具

- Program Temp Control System (ASTECC)
- SOFT INCUBATOR SLI-450ND (EYELA)
- WATER BATH SHAKER PERSONAL-11 (TAITEC)
- 3UVTM Transilluminator (UVP)
- LAS-4000
- Nano Drop (Thermo SCIENTIFIC)
- Applied Biosystems 3130 ジェネティックアナライザー (Applied Biosystems)
- CO₂ インキュベーター (NAPCO)
- クリーンベンチ (SHOWA SCIENCE)
- オートピペッター (FALCON)
- 遠心分離機 TOMY LX-120 (TOMY)
- 遠心分離機 KUBOTA 3700 (KUBOTA)
- 遠心分離機 HIMAC (HITACHI)
- VORTEX-GENIE 2 (Scientific Industries)
- Mini Disk Rotor BL-710I (BIOCRAFT)
- MODEL 550 microplate Reader (Bio-Rad)
- Dry Thermo Unit (TAITEC)
- ミニゲルスラブ泳動装置 (日本エイドー)
- パワーサプライ NEP-200/NEP-300 (NICHIRYO)
- Trans Blot SD (Bio-Rad)
- Bioruptor (COSMO BIO)
- 蛍光顕微鏡 Carl Zeiss Axiovert 200M (Carl Zeiss)

試薬及び実験材料

- Flp-In T-REx 293 細胞 (Invitrogen)
- TOCARF 細胞 (2-2-2)
- FLAG-Fibrillarin/ Flp-In T-REx 293 細胞 (本研究室泉川博士より供与)
- KOD plus DNA polymerase (TOYOBO)
- Agarose LO2 (TaKaRa)
- λ DNA (TaKaRa)
- Ethidium bromide (WAKO)
- 制限酵素 (TaKaRa)
- QIAEX[®] II Gel Extraction Kit (QIAGEN)
- T4 DNA Ligase (TaKaRa)
- コンピテントセル DH5 α : F⁻, ϕ 80*dlacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA - argF*) U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (*r_k⁻m_k⁺*), *phoA*, *supE44*, *λ -thi-1*, *gyrA96*, *relA1*
- BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
- Bacto Yeast Extract (DIFCO)
- Bacto Tryptone (DIFCO)
- DMEM (SIGMA D0422)
- FBS (JRH)
- Lipofectamine 2000 (Invitrogen)
- Penicillin G (SIGMA)
- Streptomycin Sulfate (WAKO)
- DMSO (WAKO)
- Tris (WAKO)
- Acetic Acid (WAKO)

- EDTA·2Na (DOJINDO)
- フェノール (WAKO)
- クロロホルム (WAKO)
- イソアミルアルコール(WAKO)
- 8-Quinolinol (WAKO)
- Sodium Acetate trihydrous (WAKO)
- Ethanol (WAKO)
- NaCl (WAKO)
- KCl (WAKO)
- MgSO₄ (WAKO)
- MgCl₂ (WAKO)
- Ampicillin·2Na (SIGMA)
- PIPES (DOJINDO)
- CaCl₂·2H₂O (WAKO)
- KOH (WAKO)
- MnCl₂·2H₂O (WAKO)
- D (+)·Glucose (WAKO)
- NaOH (WAKO)
- SDS (Nacalai tesque)
- PEG8000 (WAKO)
- Genopure Maxi Prep Kit (Roche)
- Na₂HPO₄ (WAKO)
- KH₂PO₄ (WAKO)
- HEPES (DOJINDO)
- PMSF (WAKO)

- IGEPAL CA-630 (SIGMA)
- Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad)
- Anti-FLAG M2 Agarose affinity gel (SIGMA)
- FLAG peptide (SIGMA)
- Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE healthcare bioscience)
- 2-mercaptoethanol (WAKO)
- XL-ladder プロテイン分子量マーカーBroad Range (APRO)
- 分子量マーカーBroad Range (Bio-Rad)
- N, N'-Methylenebisacrylamide (WAKO)
- TEMED (WAKO)
- APS (WAKO)
- Glycine (WAKO)
- BPB (WAKO)
- Formaldehyde (WAKO)
- Methanol (WAKO)
- Triton X-100 (WAKO)
- Skim Milk (WAKO)
- NBT/BCIP stock solution (Roche)
- RNase A (SIGMA)
- VectaShield mounting Medium (Vector Laboratories)
- VectaShield mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories)
- 90 mm カルチャーディッシュ (NUNC)
- 35 mm カルチャーディッシュ (FALCON)
- 12 ウェルカルチャープレート (NUNC)
- 24 ウェルカルチャープレート (NUNC)

- 96 ウェルカルチャープレート (NUNC)
- 8 ウェルカルチャーライド (BECKMAN)
- カバーガラス 24 mm×24 mm (MATSUNAMI)
- Burker-Turk 血球計算盤 (HIRSCHMANN EM TECHCOLOR)
- セルスクレーパー (NUNC)
- Ultrafree-MC 0.22 μm (MILLIPORE)
- PVDF 膜 ImmobilonTM-P (MILLIPORE)
- 3 MM (WHATMAN)
- 50 ml ポリプロピレンチューブ (NUNC)
- 15 ml ポリプロピレンチューブ (NUNC)
- 1.5 ml チューブ (WATSON)

発現プラスミドベクター

- pOG44 (Invitrogen)
- pcDNA5/FRT/HA-CARF-TEV-FLAG (本研究室、石川英明博士より供与)
- pcDNA3.1(+)/HA-XRN2 (wt)
- pcDNA3.1(+)/HA-XRN2 (N1) (1-680aa)
- pcDNA3.1(+)/HA-XRN2 (N2) (1-501aa)
- pcDNA3.1(+)/HA-XRN2 (C) (152-950aa)
- pcDNA5/FRT/FLAG
- pcDNA5/FRT/HA-CARF-TEV-FLAG (wt) (本研究室、石川英明博士より供与)
- pcDNA5/FRT/HA-CARF-TEV-FLAG (N1) (本研究室、石川英明博士より供与)
- pcDNA5/FRT/HA-CARF-TEV-FLAG (N2) (本研究室、石川英明博士より供与)
- pcDNA5/FRT/HA-CARF-TEV-FLAG (C1) (本研究室、石川英明博士より供与)
- pcDNA5/FRT/HA-CARF-TEV-FLAG (C2) (本研究室、石川英明博士より供与)

- pcDNA5/FRT/HA-CARF-TEV-FLAG (NC) (本研究室、石川英明博士より供与)
- pGEX4T2/FLAG-CARF (本研究室、石川英明博士より供与)
- pCONT-1 (MBL)
- pCONT-2 (MBL)
- phmKGN-MC (MBL)
- phmKGC-MC (MBL)
- phmKGN-MC-XRN2
- phmKGC-MC-FLAG-CARF
- phmKGN-MC-FLAG-CARF
- phmKGC-MC-XRN2

抗体使用時の希釈倍率 (IB, イムノブロット; IF, 蛍光抗体法; IP, 免疫沈降法)

- Mouse monoclonal anti-FLAG M2 antibody (SIGMA; 1: 10,000 for IB, 1:600 for IF)
- Mouse monoclonal anti-GAPDH antibody (Ambion; 1: 10,000 for IB)
- rabbit polyclonal anti-XRN2 (Bethyl Laboratories, Inc.; A301-103A; 1:5,000 for IB, 1 µg for immunoprecipitation [IP], and 1:50 for immunofluorescence [IF])
- Mouse monoclonal anti-HA antibody (clone HA-7) (SIGMA; 1: 10,000 for IB, 1 µg for immunoprecipitation [IP])
- Mouse monoclonal anti-β-tubulin antibody (SAP4G5) (SIGMA; 1: 10,000 for IB)
- Mouse monoclonal anti-RPS7 antibody (3G4) (Abnova, Taipei City, Taiwan)
- Alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse IgG antibody (Cell Signaling; 1: 10,000)
- Alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG antibody (Cell Signaling; 1: 10,000)
- Cy3-conjugated anti-mouse IgG antibody (SIGMA; 1: 200 for IF)
- FITC-conjugated anti-rabbit IgG antibody (American Qualex; 1: 200 for IF)

操作手順

3-2-1 細胞の培養

2-2-1 に記載した方法に従って行った。

3-2-2 イムノブロット

「2-16 イムノブロット」に記載した。

3-2-3 FLAG タグタンパク質融合ヒト CARF 恒常発現細胞株の作製

FLAGタグタンパク質融合ヒトCARF恒常発現プラスミドベクターを用いて2-2-2の方法でFLAGタグタンパク質融合ヒトCARF恒常発現細胞株を作製した。得られた細胞株をCARF細胞と名付けた。

3-2-4 発現プラスミドベクターの作製

- pcDNA3.1(+)/HA-XRN2 (N1) (1-680aa)
- pcDNA3.1(+)/HA-XRN2 (N2) (1-501aa)
- pcDNA3.1(+)/HA-XRN2 (C) (152-950aa)
- pcDNA5/FRT/FLAG
- phmKGN-MC-FLAG-CARF
- phmKGC-MC-FLAG-CARF
- phmKGN-MC-XRN2
- phmKGC-MC-XRN2

上記に示す発現プラスミドベクターを構築した。発現プラスミドベクターの構築の概略をはじめに記し、詳細な実験操作については 2-2-9 の終わりに実験操作ごとに記載した。

- pcDNA5/FRT/FLAG (N 末端側に付加)の構築

5'-AGCTTGCCACCATGGACTACAAGGACGACGACGACAAGGGTACC-3'

5'-CCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCCATGGTGGCA-3'

上記の DNA Oligo をアニーリングさせ FLAG タグタンパク質をコードした DNA の両端に *HindIII/KpnI* により切断された形を持つ DNA 断片を得た。2-2-9 に従い、pcDNA5/FRT の *HindIII* と *KpnI* サイトに前述のアニーリングさせた DNA を挿入した。

- pcDNA3.1(+)/HA-XRN2 (N1) (1-680aa)の構築

pcDNA3.1(+)/HA-XRN2 (wt)をテンプレートとして下記のプライマーセットと KODplus DNA polymerase を用いて PCR により増幅した。

5' -GCATAGGATCCGAGCTCATGGGAGTCC-3'

5' -CCCCGCTCGAGTTATCCAAGGCTGTTTC-3'

増幅した DNA 断片を 2-2-9 に従って、制限酵素 *BamHI* 及び *XhoI* 処理して pcDNA3.1(+)/HA の *BamHI/XhoI* サイトに挿入した。

- pcDNA3.1(+)/HA-XRN2 (N2) (1-501aa)の構築

前項で作製した pcDNA3.1(+)/HA-XRN2 (N1) (1-680aa)をテンプレートとして下記のプライマーセットと KODplus DNA polymerase を用いて PCR により増幅した。

5' -GCATAGGATCCGAGCTCATGGGAGTCC-3'

5' -CGGCGCTCGAGTTAACTGTCACTGTCTT-3'

増幅した DNA 断片を 2-2-9 に従って、制限酵素 *BamHI* 及び *XhoI* 処理し、pcDNA3.1(+)/HA の *BamHI/XhoI* サイトに挿入した。

- pcDNA3.1(+)/HA-XRN2 (C) (152-950aa) の構築

pcDNA3.1(+)/HA-XRN2 (wt)をテンプレートとして下記のプライマーセットと KODplus DNA polymerase を用いて PCR により増幅した。

5' -GACCCGGATCCGAGCTCAAAGAAAGATTTG-3'

5' -GCGGCCCTCGAGTTAATTCCAATTGTATCTTCCTGAGGGT-3'

増幅した DNA 断片を 2-2-9 に従って、制限酵素 *Bam*HI 及び *Xho*I 処理し、
pcDNA3.1(+)/HA の *Bam*HI/*Xho*I サイトに挿入した。

- ・ phmKGN-MC-FLAG-CARF の構築

2-2-9 に従って、制限酵素 *Bam*HI と *Eco*RI を用いて pGEX4T2/FLAG-CARF から切り出した FLAG-CARF を phmKGN-MC の *Bam*HI/*Eco*RI サイトに挿入した。抗生物質は Kanamycin を使用した。

- ・ phmKGC-MC-FLAG-CARF の構築

2-2-9 に従って、制限酵素 *Bam*HI と *Eco*RI を用いて pGEX4T2/FLAG-CARF から切り出した FLAG-CARF を phmKGC-MC の *Bam*HI/*Eco*RI サイトに挿入した。抗生物質は Kanamycin を使用した。

- ・ phmKGN-MC-XRN2 の構築

2-2-9 に従って、制限酵素 *Bam*HI と *Xho*I を用いて pcDNA3.1(+)/HA-XRN2 から切り出した XRN2 を phmKGN-MC の *Bam*HI/*Xho*I サイトに挿入した。抗生物質は Kanamycin を使用した。

- ・ phmKGC-MC-XRN2 の構築

2-2-9 に従って、制限酵素 *Bam*HI と *Xho*I を用いて pcDNA3.1(+)/HA-XRN2 から切り出した XRN2 を phmKGC-MC の *Bam*HI/*Xho*I サイトに挿入した。抗生物質は Kanamycin を使用した。

3-2-5 CARF 相互作用因子群の分離

2-2-4 に記載した方法と同様に行った。ただし、添加する doxycycline 濃度を 0, 0.1, 10 ng/ml 条件下で行った。それぞれの条件下培養細胞は 90 mm カルチャーディッシュ 2 枚を用いた。コントロールとして Flp-In T-REx 293 細胞も同時に培養し実験に用いた。PBS で洗浄後細胞を buffer A に溶解する前に Burker-Turk 血球計算盤を用いて細胞数を測定し、 6.0×10^6 cells 相当の細胞抽出液を用いて pull down 法を行った。

3-2-6 HA-XRN2 相互作用因子群の分離

2-2-10 に記載した方法に従い、TOCARF 細胞に 100 ng/ml doxycycline 添加し CARF の発現を誘導した細胞を用いて HA-XRN2 発現プラスミドベクター pcDNA3.1(+)/HA-XRN2 のトランスフェクションを行った。doxycycline 添加条件でトータル 48 時間培養し、CARF の発現を誘導した。コントロールとして doxycycline 非添加条件下 pcDNA3.1(+)/HA-XRN2 をトランスフェクションした細胞、doxycycline 添加条件下 XRN2 を含まない pcDNA3.1 (+) をトランスフェクションした細胞を用いた。細胞密度 80 % に培養した 90-mm カルチャーディッシュ 2 枚を PBS で洗浄後回収し、Burker-Turk 血球計算盤を用いて細胞数を数えた。細胞 (1.0×10^7 cells) を buffer A に懸濁後、氷上で 30 分間インキュベートし溶解した。その細胞溶解物を 22,180 g、4 °C 条件で 30 分間遠心分離後、上清を回収し細胞抽出液を得た。anti-HA antibody 1 μ g と Protein G Sepharose 4 Fast Flow: 15 μ l を混ぜ、細胞抽出液を添加し、天地返し条件で攪拌しながら、4 °C、3 時間 30 分インキュベートした。その beads を buffer A で 5 回洗浄し、非特異的に結合したタンパク質を取り除いた。洗浄後の beads に SDS sample buffer 50 μ l を添加し、以後の解析に用いた。得られたサンプルを HA-XRN2 相互作用因子群とした。

3-2-7 endogenous XRN2 相互作用因子群の分離

細胞密度 80 % に培養した CARF 細胞 90-mm カルチャーディッシュ 4 枚を PBS で洗浄

後回収し、buffer A 2 ml に懸濁後、氷上で 30 分間インキュベートし溶解した。その細胞溶解物を 22,180 g、4 °C 条件で 30 分間遠心分離後、上清を回収し細胞抽出液を得た。得られた細胞抽出液を用いて、希釈したサンプルと同じ濃度の detergent 存在下で検量線を作成し、タンパク質定量を行い、細胞抽出液 6 mg に抗 XRN2 抗体 1 µg を添加し、天地返し条件で攪拌しながら、4 °C、1 晩インキュベートした。その後、Protein G Sepharose 4 Fast Flow 30 µl を添加し、天地返し条件で攪拌しながら、4 °C、1 時間インキュベートした。その beads を buffer A を用いて 10 回洗浄し、非特異的に結合したタンパク質を取り除いた。洗浄後の beads に 2 x SDS sample buffer 20 µl を添加し、以後の解析に用いた。得られたサンプルを endogenous XRN2 相互作用因子群とした。コントロールとして 抗 XRN2 抗体を非添加で同様の実験を行った。

3-2-8 CARF 変異体を用いた CARF 相互作用因子群の分離

2-2-10 に記載した方法に従い、Flp-In T-REx 293 細胞に FLAG-CARF 変異体発現プラスミドベクター pcDNA5/FRT/HA-CARF-TEV-FLAG (wt)、pcDNA5/FRT/HA-CARF-TEV-FLAG (N1)、pcDNA5/FRT/HA-CARF-TEV-FLAG (N2)、pcDNA5/FRT/HA-CARF-TEV-FLAG (C1)、pcDNA5/FRT/HA-CARF-TEV-FLAG (C2)、pcDNA5/FRT/HA-CARF-TEV-FLAG (NC) のトランスフェクションを行った。コントロールとして FLAG タグタンパク質発現プラスミドベクター pcDNA5/FRT/FLAG をトランスフェクションした。トランスフェクション 48 時間後細胞密度 80 % に培養した 90-mm カルチャーディッシュ各 2 枚を PBS で洗浄後回収した。それらの細胞を buffer A 1 ml に懸濁後、氷上で 30 分間インキュベートし溶解した。その細胞溶解物を 22,180 g、4 °C 条件で 30 分間遠心分離後、上清を回収し細胞抽出液を得た。得られた細胞抽出液を用いて希釈後、同じ濃度の detergent 存在下で検量線を作製し、タンパク質定量を行った。細胞抽出液 2.4 mg に anti-FLAG M2 agarose beads 10 µl を添加し、天地返し条件で攪拌しながら、4 °C、1 時間 30 分インキュベートした。その anti-FLAG M2 agarose beads を用いて 5 回洗浄後、buffer B で 1 回洗浄し、非特異的に結合

したタンパク質を取り除いた。洗浄後の anti-FLAG M2 agarose beads に 0.5 mg/ml FLAG peptide 20 μ l を添加し、氷上で 30 分間インキュベートすることにより CARF 相互作用因子群を溶出した。この溶出を 2 回繰り返す、得られた溶出液を 1 つにまとめ CARF 変異体相互作用因子群とした。

3-2-9 XRN2 変異体発現細胞を用いた CARF 相互作用因子群の回収

2-2-10 に記載した方法に従い、10 ng/ml 濃度の doxycycline により 24 時間 FLAG-CARF の発現誘導を行った TOCARF 細胞に HA-XRN2 変異体発現プラスミドベクター pcDNA3.1(+)/HA-XRN2 (wt)、pcDNA3.1(+)/HA-XRN2 (N1) (1-680aa)、pcDNA3.1(+)/HA-XRN2 (N2) (1-501aa)、pcDNA3.1(+)/HA-XRN2 (C) (152-950aa) のトランスフェクションを行った。コントロールとして XRN2 を導入していない pcDNA3.1 をトランスフェクションした。トランスフェクション 24 時間後 90-mm カルチャーディッシュ各 2 枚に継代し、10 ng/ml 濃度の doxycycline により FLAG-CARF の発現誘導を行った。トランスフェクション 48 時間後 80 % 密度の細胞 90-mm カルチャーディッシュ各 2 枚を PBS で洗浄後回収した。それらの細胞を buffer A 1 ml に懸濁後、氷上で 30 分間インキュベートし溶解した。その細胞溶解物を 22,180 g、4 °C 条件で 30 分間遠心分離後、上清を回収し細胞抽出液を得た。得られた細胞抽出液を用いて希釈後、同じ濃度の detergent 存在下で検量線を作製し、タンパク質定量を行った。細胞抽出液 1.5 mg に anti-FLAG M2 agarose beads 30 μ l を添加し、天地返し条件で攪拌しながら、4 °C、1 時間 30 分インキュベートした。その anti-FLAG M2 agarose beads を用いて 5 回洗浄後、buffer B を用いて 1 回洗浄して、非特異的に結合したタンパク質を取り除いた。洗浄後の anti-FLAG M2 agarose beads に 0.5 mg/ml FLAG peptide 30 μ l を添加し、氷上で 30 分間インキュベートすることにより CARF 相互作用因子群を溶出した。この溶出を 2 回繰り返す、得られた溶出液を 1 つにまとめ XRN2 変異体発現細胞を用いた CARF 相互作用因子群とした。

3-2-10 CARF 相互作用因子群への RNaseA 処理

細胞密度 80% の CARF 細胞 90-mm カルチャーディッシュ 4 枚を PBS で洗浄後回収した。ネガティブコントロールとして Flp-In T-REx 293 細胞も同時に回収した。Fibrillarin が RPS7 と RNA を介して相互作用している (137) ので RNase A 処理が有効に機能しているコントロールとして FLAG-Fibrillarin/ Flp-In T-REx 293 細胞も同時に回収した。それらの細胞を buffer A 2ml に懸濁後、氷上で 30 分間インキュベートし溶解した。その細胞溶解物を 22,180 g、4 °C 条件で 30 分間遠心分離後、上清を回収し細胞抽出液を得た。得られた細胞抽出液を用いて希釈後、同じ濃度の detergent 存在下で検量線を作製し、タンパク質定量を行った。細胞抽出液 8 mg に anti-FLAG M2 agarose beads 30 μ l を添加し、天地返し条件で攪拌しながら、4 °C、4 時間インキュベートした。その anti-FLAG M2 agarose beads を buffer A を用いて 5 回洗浄し、非特異的に結合したタンパク質を取り除いた。その beads に buffer B を添加して 2 つに分けた。1,000 g、4 °C 条件で 30 秒間遠心分離後、上清を取り除いた。得られた CARF 相互作用因子群に 1 ng/ μ l RNase A を含む buffer B を 50 μ l を添加し、37°C で 1 分おきにタッピングにより攪拌しながら 10 分間インキュベート後、さらに氷上で 30 分間インキュベートし、RNase A を反応させた。コントロールとして、2 つに分けた残りに RNase A を含まない buffer B を 50 μ l を添加し同様に反応を行った。RNase 反応後、buffer A を用いて 3 回洗浄し、RNA を介して CARF に結合していたタンパク質を取り除いた。洗浄後の anti-FLAG M2 agarose beads に 0.5 mg/ml FLAG peptide 20 μ l を添加し、氷上で 30 分間インキュベートすることにより CARF 相互作用因子群を溶出した。この溶出を 2 回繰り返す、得られた溶出液を 1 つにまとめ RNase A 処理 CARF 相互作用因子群とした。

3-2-11 mKG レポーターシステムによる CARF-XRN2 相互作用の検討

2-2-3 に記載した方法と同様にコラーゲンコート 8 穴カルチャースライドを作成した。

PBS を用いて洗浄後、Flp-In T-REx 293 細胞をコラーゲンコート 8 穴カルチャースライド

に培養した。Lipofectamine 2000 1.5 μ l と Opti-MEMI 30 μ l、mKG レポータープラスミド: 1) ネガティブコントロールとして plasmid 無し、2) phmKGN-MC-XRN2 及び phmKGC-MC-FLAG-CARF、3) phmKGC-MC-XRN2 及び phmKGN-MC-FLAG-CARF、4) ポジティブコントロールとして相互作用が報告されている p65、p50 を mKGN、mKGC に組み込んだ pCONT-1 及び pCONT-2、各プラスミド 756 ng と Opti-MEMI 30 μ l を混合し、室温で 5 分間インキュベート後、1 つにまとめ混合した。さらに 20 分間インキュベート後、コラーゲンコート 8 穴カルチャースライドに細胞密度 50 % になるように培養した Flp-In T-REx 293 細胞に添加しトランスフェクションを行った。6 時間後に新しい培地に交換し、トランスフェクション 48 時間後に 2-2-4 に記載した方法で固定を行った。mKG を検出した細胞はスキムミルクによりブロッキング後 PBST で洗浄し、VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI を用いて標本にした。トランスフェクション効率を調べるため 1 次抗体として抗 FLAG 抗体及び抗 XRN2 抗体、2 次抗体として Cy3 標識抗マウス抗体、FITC 標識抗ラビット抗体を用いて免疫染色を行った。Axiovert 200 M microscope により蛍光画像を取得した。

3-2-12 mKG レポーターシステムにおけるトランスフェクション効率の算出

mKG レポーターシステムにおいて蛍光顕微鏡下で観察された細胞を数え、FLAG-CARF-positive cells/DAPI-positive cells によりトランスフェクション効率を算出した。同様に mKG fluorescence-positive cells/DAPI-positive cells から mKG fluorescence-positive の割合を算出した。

第3節 結果

3-3-1 CARF 発現量による XRN2 共沈降量への影響

前章で見出した CARF と XRN2 の相互作用をさらに解析するために CARF 発現量による XRN2 共沈降量への影響を調べた。CARF と XRN2 が相互作用するならば、CARF の量依存的に共沈降する XRN2 が増加すると考えられる。前章 2-3-1 で作製した TOCARF 細胞を用いて doxycycline の量を変え、発現誘導される CARF の量を変化させた。それらの細胞から得た FLAG-CARF 相互作用因子群について、イムノブロットにより CARF 及び XRN2 の量を解析した。前章 Fig. 2-7 で示したように doxycycline 非添加条件でも pull down で濃縮することにより極微量の FLAG-CARF が検出されるので、今回はネガティブコントロールとして Flp-In T-REx 293 細胞を用いた実験を同時に行った。その結果、FLAG-CARF の量依存的に CARF 相互作用因子群に含まれる XRN2 の量も増加した (Fig. 3-1)。この結果から、細胞内で CARF と XRN2 が相互作用することが示唆された。

3-3-2 XRN2 相互作用因子群における CARF の検出

XRN2 相互作用因子群に CARF が含まれるか調べた。まず、はじめに HA-XRN2 を細胞に一過的に過剰発現させ、HA タグに対する pull down 法により得られた HA-XRN2 相互作用因子群をイムノブロットにより解析した。ネガティブコントロールとして doxycycline 添加条件で XRN2 発現プラスミドベクターの代わりに pcDNA3.1(+)をトランスフェクションした細胞を用いて実験を行った。その結果、HA-XRN2 を過剰発現させた細胞から回収した HA-XRN2 相互作用因子群においてのみ CARF が観察された (Fig. 3-2)。このことから、HA-XRN2 相互作用因子群に CARF が含まれることが明らかになった。

次に、CARF 恒常発現細胞である CARF 細胞を用いて抗 XRN2 抗体による免疫沈降を行い、得られた XRN2 相互作用因子群をイムノブロットにより解析した。FLAG-CARF が Protein G Sepharose に非特異的に結合するか調べるコントロールとして XRN2 抗体非添加条件で実験を行った。その結果、抗 XRN2 抗体を加えた免疫沈降物においてのみ CARF

が観察された (Fig. 3-3)。このことから、endogenous XRN2 相互作用因子群に CARF が含まれることが示された。つまり、CARF 相互作用因子群の解析に加えて、XRN2 相互作用因子群の解析からも CARF と XRN2 の相互作用が示された。

3-3-3 CARF と XRN2 の直接相互作用の証明

CARF と XRN2 が直接相互作用であるか間接相互作用であるか調べた。はじめに、第 2 章の小括で述べたように 2 つのタンパク質の性質から相互作用に RNA を介する可能性が考えられたことから、その可能性について調べた。FLAG-CARF 恒常発現細胞を用いて FLAG タグタンパク質に対する pull down 法により FLAG-CARF 相互作用因子群を回収した。得られた FLAG-CARF 相互作用因子群に RNase A 処理した。RNase A 処理後の FLAG-CARF 相互作用因子群をイムノブロットにより解析し、CARF と XRN2 の相互作用に RNA が必要か検討した。Fibrillarin が RPS7 と RNA を介して相互作用している (137) ことから、RNase A 反応のポジティブコントロールとして FLAG-Fibrillarin 恒常発現細胞 FLAG-Fibrillarin/ Flp-In T-REx 293 細胞を用いた解析も同様に行った。同時にネガティブコントロールとして Flp-In T-REx 293 細胞を用いた解析も同様に行った。その結果、RNase A 処理した CARF 相互作用因子群においても XRN2 が観察された (Fig. 3-4)。この実験から CARF-XRN2 間の相互作用は RNA を介さないことが示唆された。一方、Fibrillarin と RPS7 の相互作用は RNase A 処理により消失していることから、本実験での RNase A 反応により RNA が分解されたことを確認した。

次に、CARF と XRN2 の相互作用に他の因子を介するのかタンパク質断片コンプリメンテーション法 (190) を基にしたタンパク質間相互作用を検出する mKG レポーターシステムを用いて調べた。レポータータンパク質として mKG (GenBank No. AB359194) を使用した。mKG タンパク質は最大励起波長: 494 nm、最大蛍光波長: 507 nm の蛍光タンパク質である (191)。mKG レポーターシステムにおいては mKG タンパク質を 2 つの領域に分け、N 末端側の 168 アミノ酸からなる mKG_N と C 末端側の 51 アミノ酸からなる mKG_C を

用いた (191)。この2つのタンパク質のC末端側に24アミノ酸からなるリンカー配列を挟んで相互作用を調べたいタンパク質を融合させた。2つのタンパク質が相互作用した場合はmKG_NとmKG_Cが結合することによりmKGが再構築され、緑色蛍光が観察される (191, Fig. 3-5)。このことを利用して、以下に示す組み合わせでトランスフェクションし、一過的に過剰発現させた。目的タンパク質の遺伝子配列を融合したプラスミドの組み合わせは、a) mKG_NのC末端にXRN2を融合したプラスミド: phmKGN-MC-XRN2及びmKG_CのC末端にCARFを融合したプラスミド: phmKGC-MC-FLAG-CARF、b) mKG_NのC末端にCARFを融合したプラスミド: phmKGN-MC-FLAG-CARF及びmKG_CのC末端にXRN2を融合したプラスミド: phmKGC-MC-XRN2である。同時に、ネガティブコントロールとして plasmid 無し、ポジティブコントロールとして相互作用が報告されている p65、p50 を mKG N、mKG C に組み込んだ pCONT-1 及び pCONT-2 を用いた。その結果、b) の組み合わせのときに緑色蛍光が観察された (Fig. 3-6)。このことは、XRN2 と CARF が直接結合し、mKG タンパク質が再構築されたことを示唆している。一方、a) の組み合わせでは、mKG 再構築が起こらず、緑色蛍光は観察されなかった (Fig. 3-6)。ネガティブコントロールでは緑色蛍光は観察されず、ポジティブコントロールとして pCONT-1 及び pCONT-2 を用いたときは緑色蛍光が観察された (Fig. 3-6)。トランスフェクション効率を調べるため FLAG-CARF、XRN2 に対する免疫染色を行った。FLAG-CARF ポジティブ細胞数を数え、DAPI 染色ポジティブ細胞数で割った。その結果、トランスフェクション効率は 30.9%であった (Fig. 3-7)。同様に、mKG ポジティブ細胞数を数え、DAPI 染色ポジティブ細胞数で割った。その結果、ポジティブコントロールである pCONT-1/pCONT-2 細胞の DAPI 染色ポジティブ細胞に対する mKG 蛍光ポジティブ細胞の割合は 35.0%、phmKGC-MC-XRN2/phmKGN-MC-FLAG-CARF 細胞の DAPI 染色ポジティブ細胞に対する mKG 蛍光ポジティブ細胞の割合は 33.5%であった (Fig. 3-7, 3-8)。このことから、細胞に発現プラスミドベクターがトランスフェクションされ目的タンパク質が発現した細胞においてタンパク質間相互作用及び mKG タンパク質の再構築が検出されたと考え

られた。mKG レポーターシステムは実際の細胞内の相互作用を可視化できるので、CARF と XRN2 が細胞内で相互作用することが明らかになった。mKG の緑色蛍光が観察された細胞内局在は核であった (Fig. 3-6)。核でも核小体が抜けた蛍光画像であった (Fig. 3-6) ので、CARF と XRN2 は核質で相互作用することが示唆された。

3-3-4 CARF の XRN2 相互作用領域の決定

CARF タンパク質中の XRN2 相互作用領域の特定を試みた。前章で述べたように CARF は機能ドメインとして dsRNA-binding domain とセリンリッチ領域を有する (Fig. 3-9)。CARF 中の XRN2 相互作用領域を特定することで、その機能解析につながる情報が得られると考え、CARF の欠失変異体を用いた pull down 法により検証を行った。具体的には、C 末端側の dsRNA-binding domain を含む領域を欠失した変異体 N1、さらに N 末端側のセリンリッチ領域までを欠失させた変異体 N2、セリンリッチ領域より N 末端領域のみを欠失した変異体 C1、セリンリッチ領域を含む N 末端領域を欠失した変異体 C2、セリンリッチ領域のみの変異体 NC を用いた (Fig. 3-9)。構築した各種 FLAG-CARF 変異体発現プラスミドをトランスフェクションし、各 FLAG-CARF 変異体を発現させ、FLAG タグ抗体を用いた pull down 法により得られた FLAG-CARF 変異体相互作用因子群をイムノブロットにより解析し、CARF 変異体と XRN2 の相互作用領域を調べた。コントロールとして FLAG タグ配列のみの発現プラスミドベクター pcDNA5/FRT/FLAG をトランスフェクションした。その結果、全長の CARF と dsRNA-binding domain を含む C 末端領域を欠失した変異体 N1 では XRN2 との強い相互作用が検出された。dsRNA-binding domain に加えセリンリッチ領域を含む C 末端領域を欠失した変異体 N2 では XRN2 と弱い相互作用が検出され、N 末端領域を欠失した変異体 C1 及び C2 では XRN2 と相互作用が全く検出されなかった。また、セリンリッチ領域のみの変異体 NC はタンパク質の発現が確認できなかった (Fig. 3-10)。これらの結果から、XRN2 は CARF の N 末端領域: 1-175 aa を介して相互作用することが明らかになった。

3-3-5 XRN2 の CARF 相互作用領域の決定

XRN2 タンパク質において CARF と相互作用する領域について検証した。XRN2 は 2 つの特徴的なドメイン: 5'-3' exonuclease N-terminus domain と Zinc finger domain を有する (Fig. 3-11)。XRN2 のどの領域に CARF が相互作用しているのか知ることで、その機能解析につながる情報が得られると考えた。XRN2 欠失変異体を過剰発現させた細胞を用いた pull down 法により検証を行った。具体的には、5'-3' exonuclease N-terminus domain の途中まで N 末端領域 151 アミノ酸欠失した XRN2 変異体 C、C 末端領域を 270 アミノ酸欠失した XRN2 変異体 xN1 と C 末端領域を 449 アミノ酸欠失した XRN2 変異体 xN2 の 3 種類を用いた (Fig. 3-11)。それぞれの変異体は酵母 *S. pombe* 及び *S. cerevisiae* の XRN2 のオーソログである Rat1 の立体構造 (192) を参考に推察される α -ヘリックスや β シートなどの立体構造を壊さないように構築した。HA-XRN2 各種欠失変異体発現プラスミドを doxycycline により FLAG-CARF の発現を誘導した TOCARF 細胞にトランスフェクションし、各 HA-XRN2 変異体を発現させ、FLAG タグに対する pull down 法により得られた FLAG-CARF 相互作用因子群をイムノブロットにより解析し、CARF と XRN2 変異体の相互作用領域を調べた。コントロールとして XRN2 を含まない pcDNA5/FRT をトランスフェクションした。その結果、C 末端領域の 270 アミノ酸を欠失した XRN2 変異体 xN1 では全長の XRN2 と比較して共沈する量は少ないが、CARF との相互作用が検出された。一方 N 末端領域を欠失した XRN2 変異体 C、C 末端領域の 449 アミノ酸を欠失した XRN2 変異体 xN2 では、CARF と相互作用が全く検出されなかった (Fig. 3-12)。これらの結果から、CARF は XRN2 の 1-680 aa を介して相互作用することが明らかになった。さらに、CARF と XRN2 の相互作用には XRN2 の 1-151 aa 及び 501-680 aa の 2 領域が必要であった。

第4節 小括

本章では、前章でプロテオーム解析により同定された XRN2 と CARF の相互作用についてより詳細に解析した。CARF 量依存的に XRN2 の共沈降量が変化した (Fig. 3-1)。この結果から、CARF と XRN2 が相互作用することが示唆された。更に、CARF の増加に合わせて XRN2 の共沈降量が増加したということは、細胞内では CARF に対して XRN2 が過剰に存在していることも示唆していた。

exogenous XRN2 相互作用因子群及び endogenous XRN2 相互作用因子群について CARF が含まれていた (Fig. 3-2, 3-3)。これらの結果から、CARF と XRN2 が相互作用する可能性が相互作用因子双方向から示された。endogenous XRN2 相互作用因子群においても CARF が含まれていたため、生体内で CARF と XRN2 は相互作用すると考えられる。

第2章第4節小括で述べたように2つのタンパク質の性質から相互作用に RNA を介する可能性が考えられた。XRN2 が基質とする RNA の種類は pol II による RNA 転写の終結を促進する (178, 179, 180, 181, 182, 183) ことから pre-mRNAs、ITS1 の E site 切断後の成熟及び 5'ETS 領域のエンドヌクレアーゼによる切断後に生成される 5'-01、ITS1 領域のエンドヌクレアーゼによる切断後に生成される E-2 の分解に働くことから pre-rRNAs (155, 156, 157)、5'ETS 領域にある 01 site (A' site) の切断に働く (155, 157, 158) ことから snoRNAs、ヒートショック時に tRNA^{Met} を分解し、タンパク質の翻訳を抑制する (188, 189) ことから tRNA である。前章において CARF 相互作用因子群として同定したタンパク質群の中にリボソーム生合成に関与するタンパク質が2種 (Nucleolin、NPM)、pre-mRNA splicing に関与するタンパク質が7種 (ATP-dependent RNA helicase DHX15、hnRNP A1、hnRNP H、hnRNP K、hnRNP L、hnRNP U、RNA-binding protein 10) 含まれていたことから、RNA (pre-mRNAs、pre-rRNAs、snoRNAs)-CARF-XRN2 複合体を形成する可能性が考えられた。CARF 相互作用因子群に RNase A を反応させ RNA 分解による XRN2 との相互作用への影響を調べた。その結果、RNase A による RNA 分解の影響は見られず (Fig. 3-4)、CARF と XRN2 は RNA を介さず相互作用することが示唆された。このことから、XRN2 と CARF

の相互作用は直接相互作用か、もしくは他のタンパク質を介した間接相互作用である可能性が考えられる。

タンパク質間相互作用を検出する mKG レポーターシステムを用いて細胞内、特に核質で CARF と XRN2 の相互作用を観察した (Fig. 3-6)。このことから、CARF と XRN2 は核質で相互作用し、何かの生理機能を果たすと推論された。mKG の再構築は非常に近い距離でないと起こらないので、mKG 再構築が起こった場合、タンパク質間に他のタンパク質が存在する可能性は低い。CARF と XRN2 に融合するレポータータンパク質 mKG_N と mKG_C の組み合わせを変えると mKG タンパク質 (219 aa) と比較して XRN2 (950aa) と CARF (580 aa) は分子量サイズが大きいため、目的タンパク質との結合領域によって mKG N と mKG C の距離が離れてしまい、再構築が起らなかった可能性が考えられる (Fig. 3-6)。以上のことから、CARF と XRN2 は極めて近い距離で相互作用することが明らかになった。

前章において CARF 相互作用因子群として同定した nucleolin は pre-rRNA の 5' ETS 領域のプロセッシングに U3 snoRNP と相互作用して働く (160, 161) こと、XRN2 も pre-rRNA の 5' ETS 領域のプロセッシングの U3 snoRNP が重要な働きをする 01 site の切断に働く (158) ことから XRN2 と nucleolin が複合体を形成して 01 site の切断に関与している可能性も考えられる。その複合体の nucleolin を介して CARF が結合する可能性も考えられるが、CARF と XRN2 は直接相互作用することからこの可能性は低い。もし、XRN2、CARF、nucleolin が複合体を形成するならば、XRN2 もしくは CARF を介して nucleolin が結合する可能性が考えられる。CARF と XRN2 が直接相互作用の生理機能は様々な可能性が考えられる;

- 1) 酵母の XRN2 オーソログである Rat1 は相互作用因子 Rai1 と直接結合することにより、基質の親和性が上がり酵素活性が促進される (192) ことから、同じように CARF が XRN2 基質の親和性を高めることにより酵素活性を促進する。
- 2) CARF が XRN2 の活性部位に結合して基質との結合を阻害し、酵素活性を阻害する。

- 3) 他の相互作用因子との結合部位に結合して相互作用を阻害する。
- 4) 他の相互作用因子と結合して複合体形成を促進する。
- 5) p54nrb/PSF は XRN2 に相互作用をして pre-mRNA の 3'切断部位へ XRN2 を輸送し、pol II による転写の終結を促進する (180) ように、CARF が XRN2 の細胞内局在を変えている。

次に、CARF の XRN2 相互作用領域について CARF 変異体を用いた pull down 法により調べた。その結果、CARF の N 末端領域: 1-175 aa を介して CARF と XRN2 が相互作用することが明らかになった。セリンリッチ領域を欠失した CARF 変異体では共沈する XRN2 の量が減少したことから、CARF と XRN2 は N 末端領域で始めに相互作用を形成し、その後セリンリッチ領域とも相互作用することにより安定な相互作用を形成する可能性が考えられる。共通したアミノ配列から機能が推測されるドメインとは異なり、セリンリッチ領域とはセリンを多く含む領域を意味する。VZV の IE62 を構成する多くのセリンからなるドメインは SRT と呼ばれ、核小体のリボソームタンパク質 EAP と相互作用する (193) ことから、CARF-XRN2 複合体中の CARF のセリンリッチ領域にリボソームタンパク質が結合し、CARF-XRN2 の相互作用を安定化する可能性も考えられる。前章の CARF 相互作用因子群の解析においてリボソームタンパク質 60S acidic ribosomal protein P0-like を CARF 相互作用因子として同定しており、CARF-XRN2-60S acidic ribosomal protein P0-like 複合体を形成する可能性も考えられる。XRN2 の相互作用領域に含まれなかった C 末端領域にある dsRNA-binding domain は、65-68 aa からなる dsRNA が結合するドメインである (194)。dsRNA-binding domain を持つタンパク質は翻訳開始因子 eIF2 をリン酸化することにより不活性化する DAI (195)、dsRNA 中のアデノシンをイノシンに変える脱アミノ化酵素 dsRAD (196) など多岐に渡り、認識する RNA 配列も共通点がない (194, 195, 196)。dsRNA が結合するドメインであることから、CARF 中の dsRNA-binding domain に dsRNA が結合し、XRN2 が核酸に結合する zinc finger domain を介して結合する可能性が考えられるが、CARF の XRN2 相互作用領域には dsRNA-binding domain が含まれなかった。この結

果は、前述の検討により CARF と XRN2 の相互作用に RNA が必要ないことと一致する。最近、*C. elegans* の PAXT-1 が *C. elegans* のヒト XRN2 のオーソログと結合すること、PAXT-1 の XRN2 結合領域である機能未知ドメイン DUF3469 がヒト CARF の N 末端側 1-128aa と高いホモロジーを持つことからヒト XRN2 と CARF の相互作用が調べられた。CARF の N 末端側 1-128 aa と XRN2 が相互作用することが報告された (133)。この結果は本章において特定した CARF の XRN2 との相互作用領域とほぼ一致していた。

XRN2 の CARF 相互作用領域について XRN2 変異体を用いた pull down 法により調べた。その結果、CARF は XRN2 の 1-680 aa を介して相互作用していることが明らかになった。CARF との相互作用領域の中で少なくとも XRN2 の 1-151 aa と 501-680 aa が必要であると推論される。ヒト XRN2 は 399-514 番目のリンカー部分を挟んで 1-399 番目のアミノ酸と 514-678 番目のアミノ酸が酵母 *S. pombe* 及び *S. cerevisiae* のオーソログ Rat1 と高い相同性を持つ (192)。酵母 *S. pombe* 及び *S. cerevisiae* のオーソログである Rat1 の立体構造を参考にすると、Rat1 のこの領域は触媒作用の活性部位を形成している (192)。このことから、CARF は XRN2 の 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性部位に相互作用すると推測され、XRN2 の 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性や基質 RNA の認識等に関与する可能性が考えられる。

本章において CARF と XRN2 の相互作用について調べたが、その細胞内における生理機能については様々な可能性が考えられる。次章では、CARF と XRN2 が相互作用することによりどのような生理機能を果たすのか調べる。

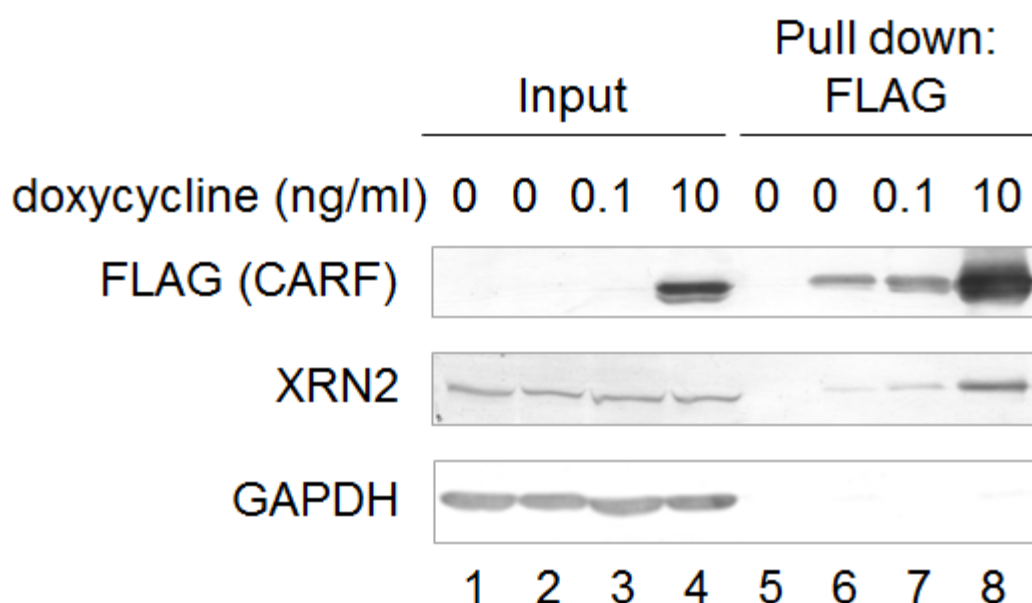


Fig. 3-1 pull down法によるCARF量依存的XRN2相互作用増加の検出

CARF薬剤誘導発現細胞を用いてCARFの発現量を変えた細胞からCARF相互作用因子群を回収し、イムノブロット法により解析した。pull downにより濃縮したときにFLAG-CARFの発現がDoxycycline非添加時にも検出されるので、コントロールとしてFlp-In T-Rex 293細胞を用いた (Lane1および5)。ローディングコントロールとして抗GAPDH抗体を用いた。用いた抗体を左側に示した。

Input: 不溶性成分を除いた細胞抽出液 2.0×10^5 cells, Pull down: FLAG: 細胞抽出液(6.0×10^6 cells) に対してFLAGタグによるpull down法から得られたCARF相互作用因子群を解析した。

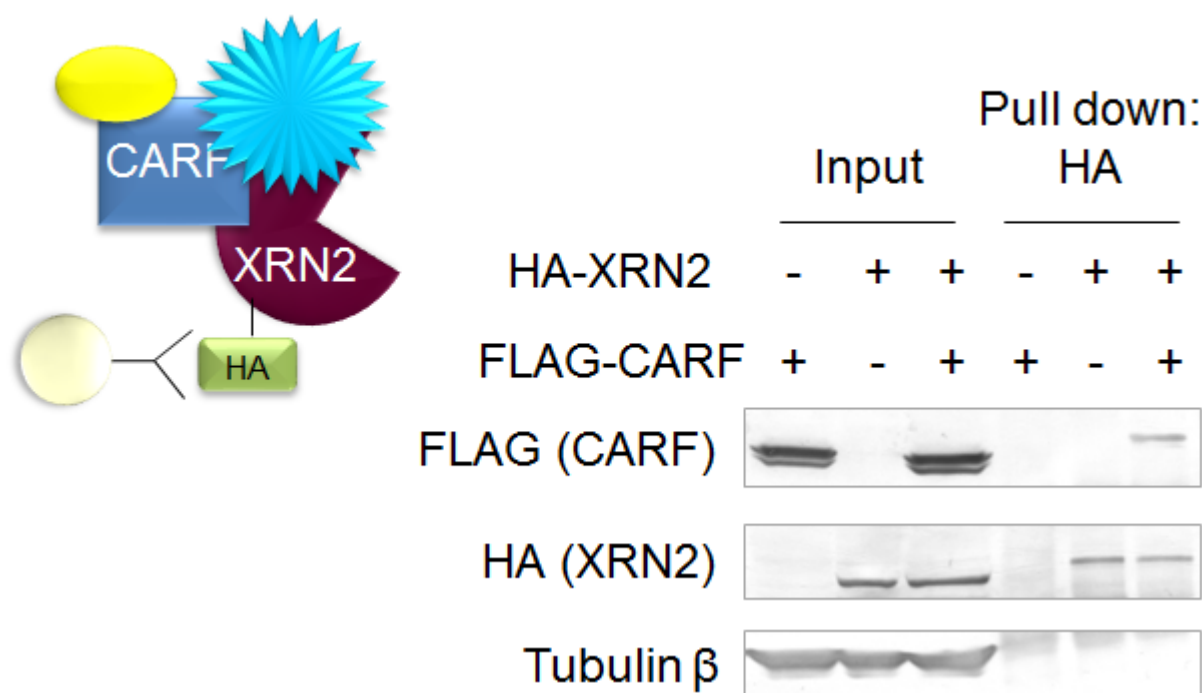


Fig. 3-2 HA-XRN2をbaitとした場合のpull down法によるCARFとXRN2の相互作用の検出

doxycycline添加/非添加CARF薬剤誘導発現細胞にHA-XRN2発現プラスミドをトランスフェクションした。HAタグに対するpull down法により回収したHA-XRN2相互作用因子群をイムノプロットにより解析した。ローディングコントロールとして抗Tubulin β抗体を用いた。用いた抗体を左側に示した。

Input: 不溶性成分を除いた細胞抽出液 2.0×10^5 cells, Pull down: HA: 細胞抽出液 (1.0×10^7 cells) に対してHAタグに対するpull down法から得られたHA-XRN2相互作用因子群を解析した。

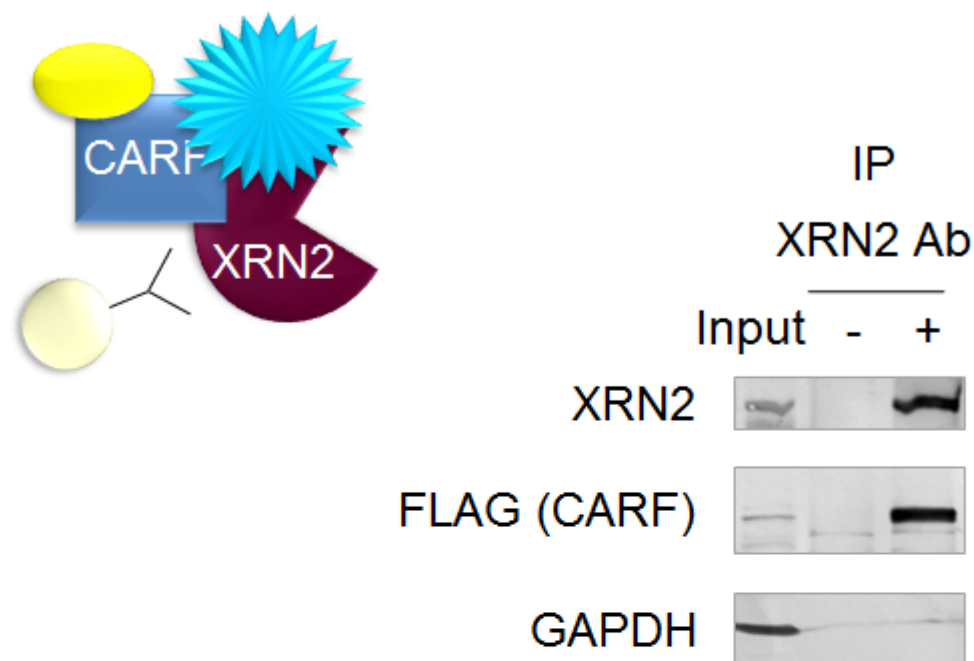


Fig. 3-3 endogenous XRN2に対する免疫沈降法によるCARFとXRN2の相互作用の検出

FLAG-CARF恒常発現細胞を用いて抗XRN2抗体による免疫沈降法で回収した endogenous XRN2相互作用因子群をイムノプロットにより解析した。ローディングコントロールとして抗GAPDH抗体を用いた。用いた抗体を左側に示した。

Input: 不溶性成分を除いた細胞抽出液20 μ g, IP: XRN2 Ab: 細胞抽出液6 mgに対して抗XRN2抗体を用いた免疫沈降法から得られたXRN2相互作用因子群を解析した。

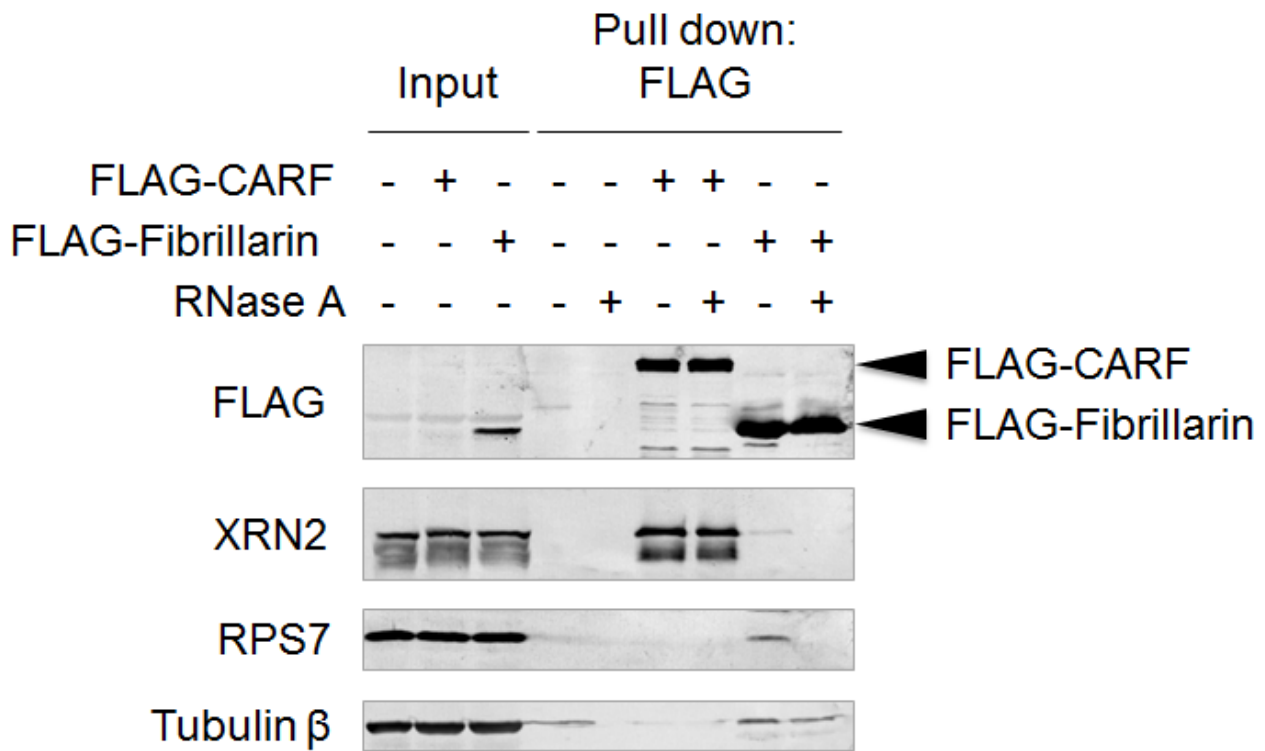


Fig. 3-4 RNase A処理によるCARFとXRN2の相互作用への影響

CARF恒常発現細胞を用いて回収したCARF相互作用因子群にRNase Aを反応させ、免疫プロット法により解析した。コントロールとしてFlp-In T-Rex 293細胞を用いた。RNase A反応のコントロールとしてFLAG-Fibrillarin恒常発現細胞を用いた。ローディングコントロールとして抗Tubulin β 抗体を用いた。用いた抗体を左側に示した。

Input: 不溶性成分を除いた細胞抽出液10 μ g, Pull down: FLAG: 細胞抽出液4 mgに対してFLAGタグによるpull down法で得られたFLAG-CARF相互作用因子群の1/4相当量を解析した。FLAG-CARFおよびFLAG-Fibrillarinのバンドを \blacktriangleleft で示した。

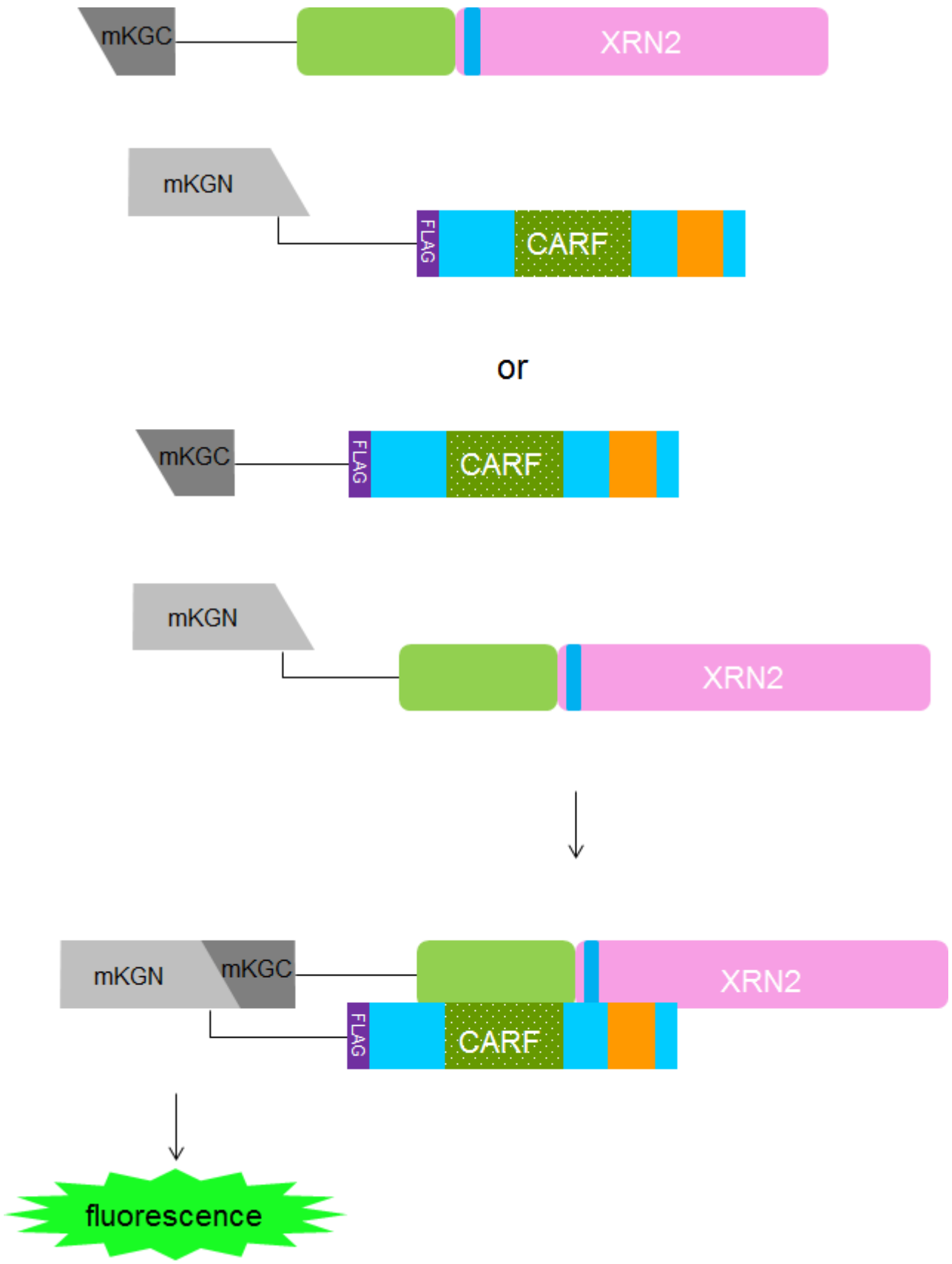


Fig. 3-5 mKGLレポーターシステムの模式図

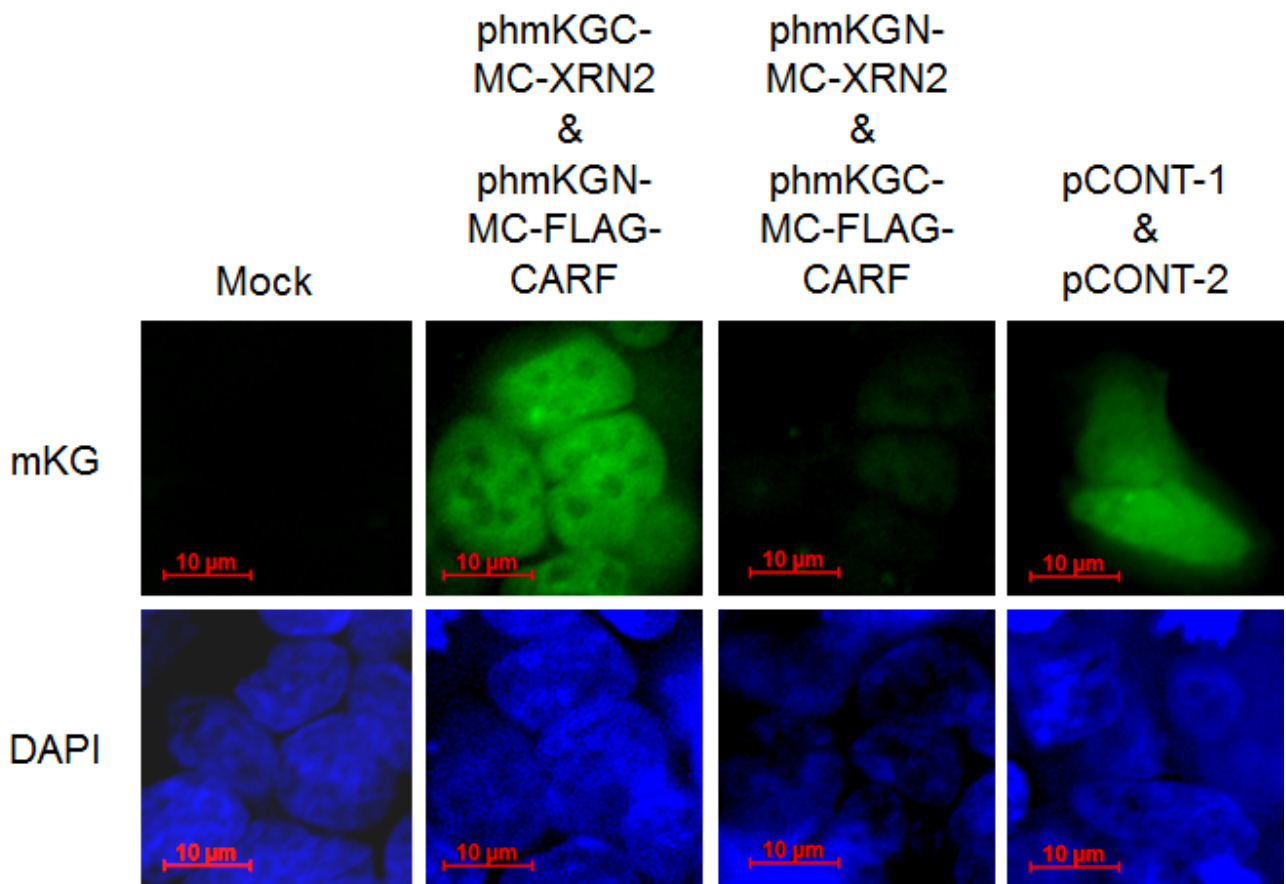


Fig. 3-6 mKGLレポーターシステムによるCARF-XRN2相互作用の蛍光顕微鏡による検出

Flp-In T-REx 293細胞にmKGLレポーターシステムのプラスミドベクターにCARFもしくはXRN2を組み込んだプラスミドベクターをコトランスフェクションし、蛍光顕微鏡により観察した。ポジティブコントロールとして相互作用が報告されているp65、p50をmKGN、mKGCに組み込んだpCONT-1、pCONT-2をコトランスフェクションした。Mockはトランスフェクション試薬のみ細胞に添加した。トランスフェクションしたプラスミドベクターを上部に示した。核はDAPIにより染色した。スケールバーは10 μ m。

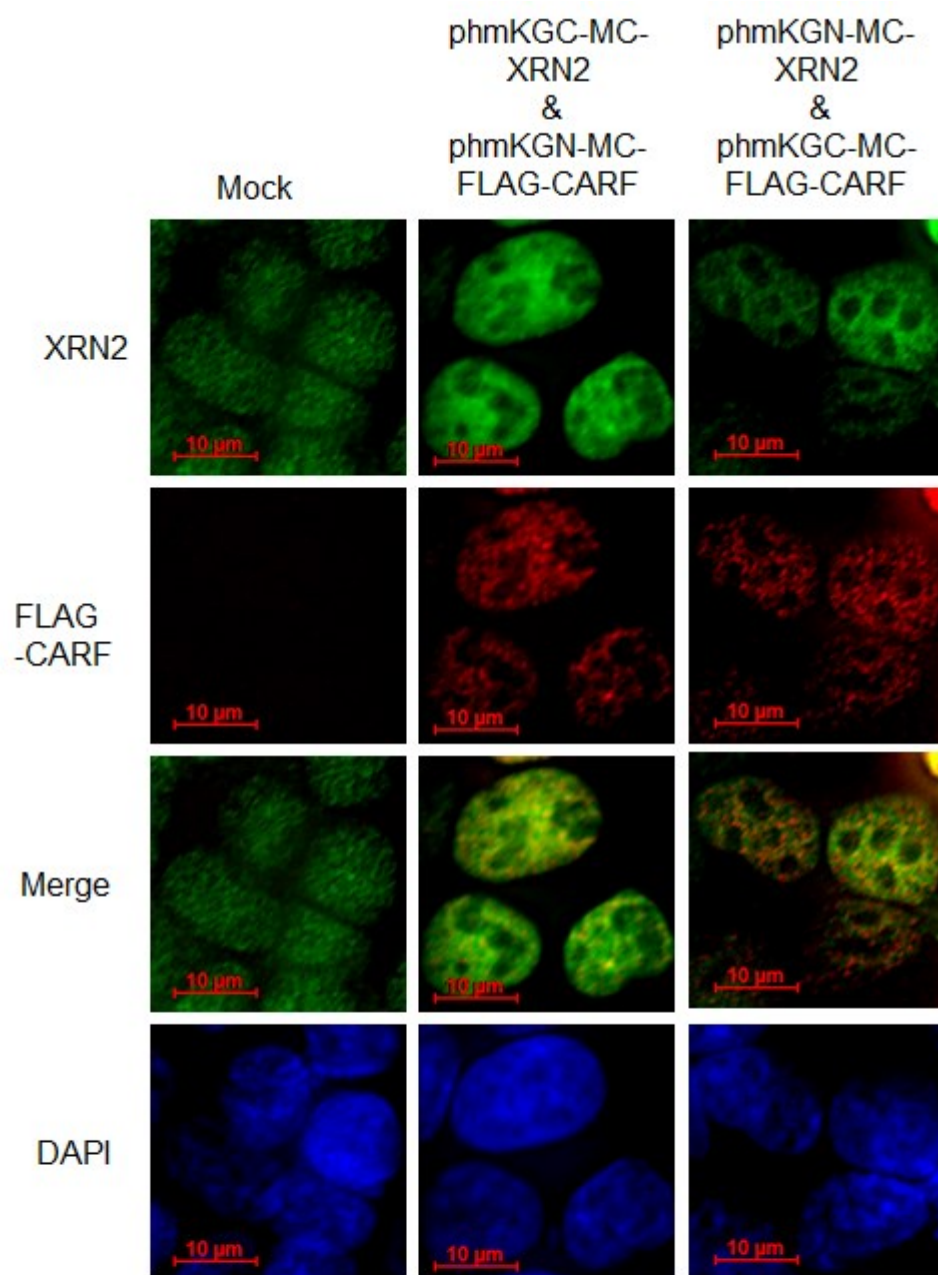


Fig. 3-7 mKGLレポーターシステムで導入した遺伝子の細胞内発現の解析

Flp-In T-Rex 293細胞にmKGLレポーターシステムのプラスミドベクターにCARFもしくはXRN2を組み込んだプラスミドベクターをコトランスフェクションし、XRN2、FLAG-CARFの細胞内局在を免疫染色法により観察した。Mockはトランスフェクション試薬のみ細胞に添加した。トランスフェクションしたプラスミドベクターを上部に示した。核はDAPIにより染色した。スケールバー: 10 μm。

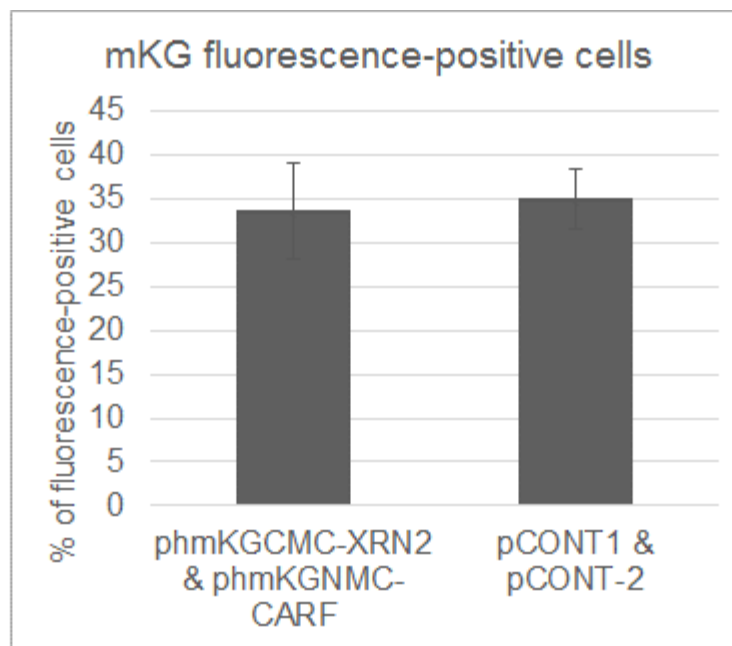


Fig. 3-8 mKGレポーターシステムにおけるトランスフェクション効率

Fig. 3-7の条件で観察されたFLAG-CARFポジティブ細胞/DAPIポジティブ細胞によりトランスフェクション効率を算出した。同様にFig. 3-6の条件で観察されたmKG 蛍光ポジティブ細胞/DAPIポジティブ細胞からmKG蛍光ポジティブの割合を算出した。それぞれ2回実験の平均値を示した。Error bar: standard deviation

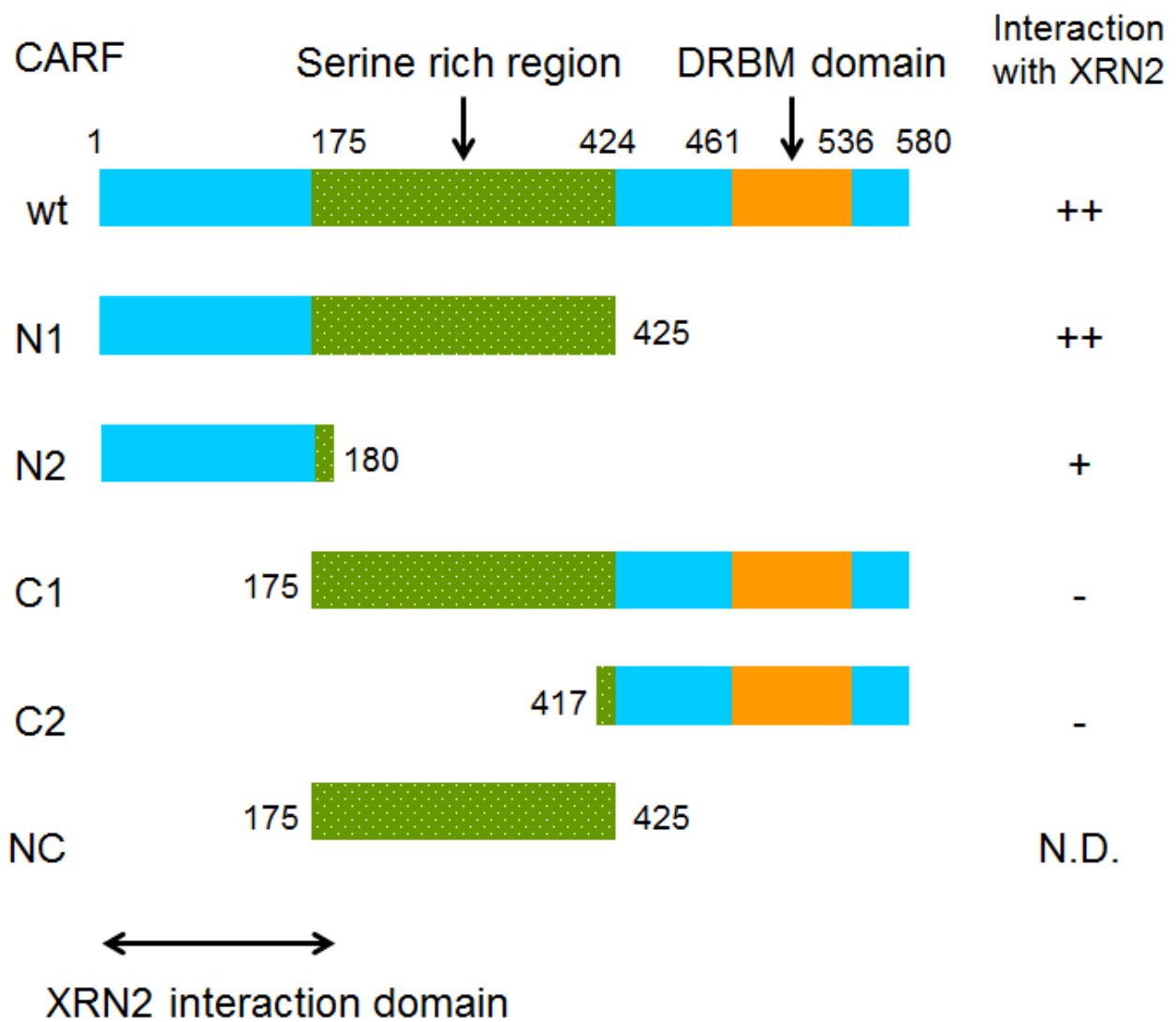


Fig. 3-9 CARF変異体のタンパク質の模式図

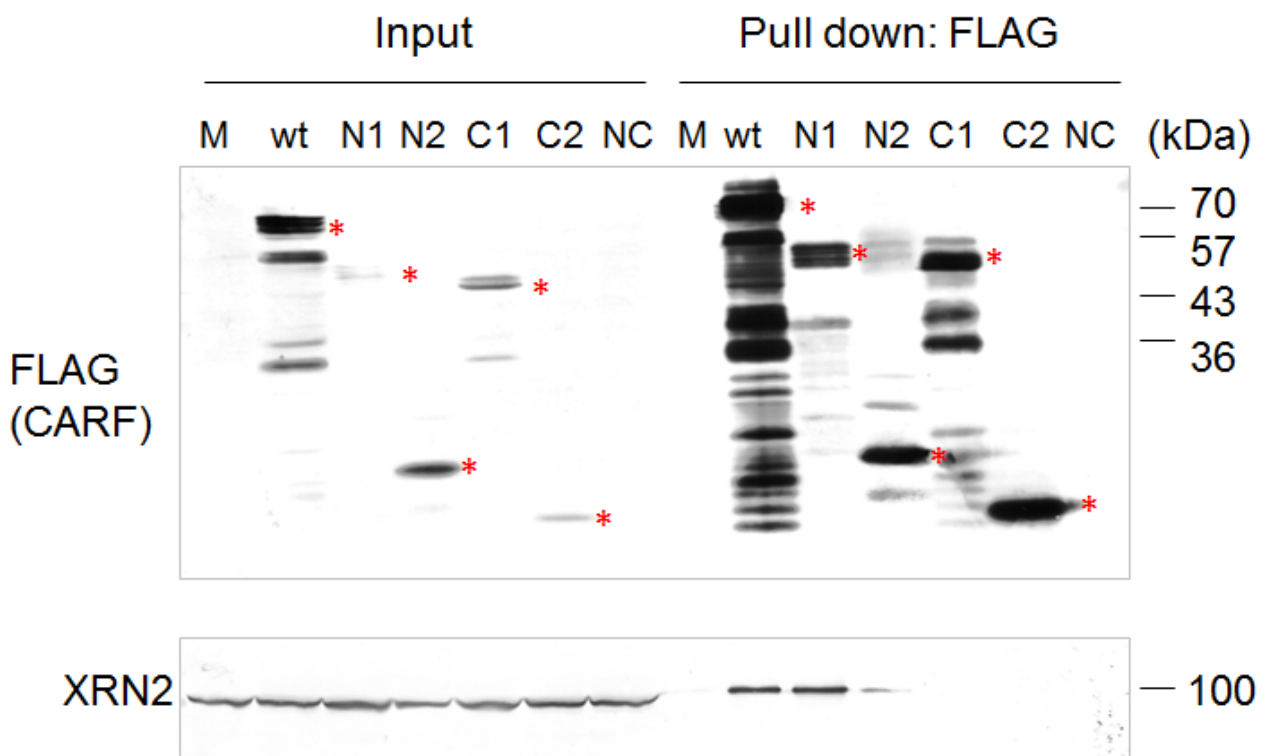


Fig. 3-10 変異体を用いたCARFにおけるXRN2相互作用領域の同定

Fig. 3-9 に示したCARF変異体を過剰発現した細胞から回収したCARF相互作用因子群をイムノプロットにより解析した。用いた抗体を左側に示した。MockはFLAGタグのみ発現するプラスミドベクターをトランスフェクションした。
 Input: 不溶性成分を除いた細胞抽出液30 μ gを解析した。Pull down: 細胞抽出液2.4 mgに対するFLAGタグによるpull down法から得られたFLAG-CARF相互作用因子群1/2相当量を解析した。CARF変異体を*で示した。

XRN2

XRN_N: 5'-3' exonuclease N-terminus domain

Interaction with CARF

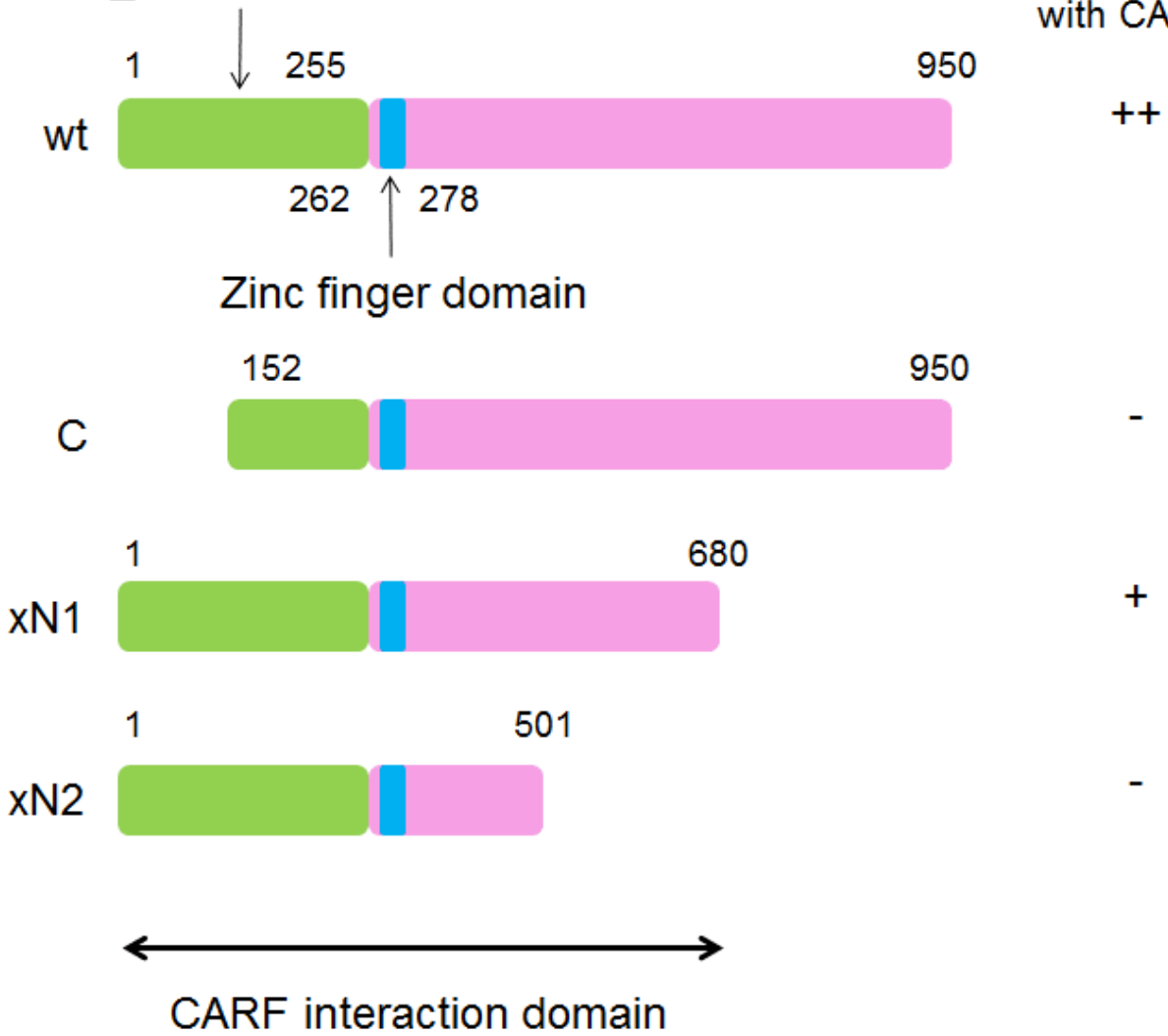


Fig. 3-11 XRN2変異体のタンパク質の模式図

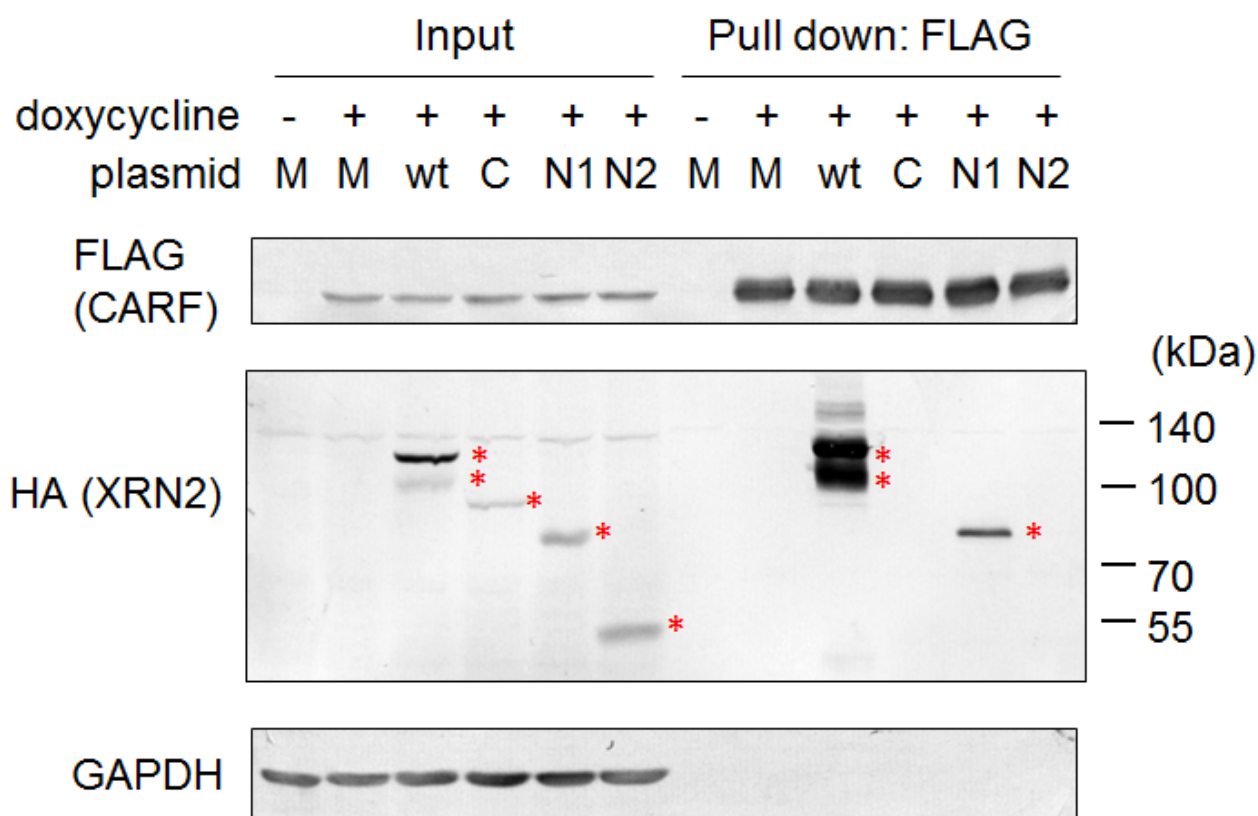


Fig. 3-12 変異体を用いたXRN2におけるCARF相互作用領域の同定

Fig. 3-11 に示したHA-XRN2変異体を過剰発現した細胞からFLAGタグに対するpull down法を用いてdoxycyclineにより発現誘導したFLAG-CARF相互作用因子群を回収した。免疫ブロット法により解析した。ローディングコントロールとして抗GAPDH抗体を用いた。用いた抗体を左側に示した。MockはXRN2を含まないベクターをトランスフェクションした。

Input: 不溶性成分を除いた細胞抽出液20 μ gを解析した。Pull down: 細胞抽出液1.5 mgに対するFLAGタグによるpull down法から得られたFLAG-CARF相互作用因子群1/3相当量を解析した。XRN2変異体を*で示した。

第4章 リボソーム生合成過程における CARF の働き

第1節 緒言

前章において CARF と XRN2 の相互作用について調べ、CARF と XRN2 が細胞内で直接相互作用していること及びその相互作用が CARF: 1-175 aa、XRN2: 1-680 aa を介していることを示した。本章では、CARF と XRN2 との相互作用がどのような生理機能を果たすのかを検討した。第2章小括において述べたように XRN2 の生理機能は主に3つの働きが報告されている。これらの XRN2 の働きに CARF が関与する可能性について第2章及び第3章の結果を踏まえて考えたい。

はじめにリボソーム生合成に CARF が関与する可能性について考えると、第2章において CARF 相互作用因子群として XRN2 に加えてリボソーム生合成経路に関与する因子群: Nucleolin、NPM を同定したことから、XRN2 のリボソーム生合成における働きに CARF が関与する可能性が考えられる。また第3章小括で述べたように nucleolin も XRN2 も pre-rRNA の 5' ETS 領域のプロセッシングに働く(160, 161, 158) ことから、XRN2 と nucleolin が複合体を形成して 01 site の切断に働く可能性も考えられる。この複合体に CARF が XRN2 を介して結合し、01 site の切断を促進もしくは阻害する可能性も考えられる。

次に、poII による RNA 転写の終結を XRN2 が促進する働きに CARF が関与する可能性について考えると、第2章において CARF 相互作用因子群として同定された hnRNPK は XRN2 を poly(A)配列下流の poII による RNA 転写の終結が起こる場所に留める報告(184)があることから、CARF がこの転写終結点に XRN2 を留める働きを促進もしくは阻害する可能性が考えられる。

最後に、細胞がヒートショックを与えられたときに XRN2 による核内における initiator tRNA^{Met} を分解する(188, 189) 働きに CARF が関与する可能性について考える。細胞がヒートショックを与えられたときに XRN2 は mTOR により核小体から核質へ移行することが報告されている(188)が、第2章において同定された CARF 相互作用因子群に mTOR

は含まれていなかった。XRN2 の核質への移行は細胞がヒートショックを与えられたときに起こるので、本研究において XRN2 と CARF の相互作用条件とは異なり、CARF がこの XRN2 の働きに関与する可能性は低いと考えられる。以上のことから、はじめに述べたリボソーム生合成における XRN2 の働きに CARF が関与する可能性が高いと考え、本章ではその可能性について調べた。

ヒトのリボソーム生合成は、5つの常染色体 13、14、15、21、22 上に約 400 コピーがコードされている rDNA が RNA pol I により 1つの大きな前駆体 47S pre-rRNA として転写されることから始まる (197, 198, 199)。様々なタンパク質や snoRNA を含むタンパク質複合体 snoRNP が働く endonucleotic cleavage 及び exonucleolytic processing の多くの過程を経て 18S、5.8S、28S と 3種の rRNA が生合成される (155, 156, 157, 158, 197, 198, Fig. 4-1)。その後、pol III により転写された 5S RNA と会合し、細胞質にて 28 S、5.8 S、5 S の rRNA を含む 60 S サブユニット、18S rRNA を含む 40 S サブユニットになり、リボソーム生合成が完成する (197, 198, 200)。Pre-rRNA プロセッシングの際に生成される不要なスペーサー領域の pre-rRNA fragment は速やかに分解され、再利用されなければならない。XRN2 は、a) 5'ETS 領域の pre-rRNA プロセッシング過程において生成される pre-rRNA fragment (5'ETS-pre-rRNA fragment): 5'-01、A0-1 を分解する (155, 156, 157, 158)、b) 初期転写産物である 47S pre-rRNA の 5'ETS 領域における 01 site の切断に働く (155, 157, 158)、c) 5'ETS 領域における 01 site の切断が起こらないと次の pre-rRNA プロセッシング過程へ進ませないという品質管理の役割を果たす (158)、d) ITS1 領域の pre-rRNA プロセッシング過程において 36S pre-rRNA を 36S-C pre-rRNA に 5'末端をトリミングする (156)、e) ITS1 領域の pre-rRNA プロセッシング過程において生成される pre-rRNA fragment: E-2 を分解する (156, 157)、f) ITS1 領域の pre-rRNA プロセッシング過程において E site よりも 2 site で切断が起こるように働く (157)、ことが報告されている (Fig. 4-1)。本章ではノザンプロット法を用いて、前述した XRN2 の働き a)及び b)について CARF が関与するか調べた。はじめに、siRNA により XRN2 をノックダウンし、前述した XRN2 の働き a)及び b)への影響

が再現できるか確認した。次に、CARF の一過的過剰発現細胞及び薬剤誘導発現細胞を用いて、CARF が XRN2 の働き a) 、 b) 及び c) に与える影響を調べた。

第2節 実験方法

装置及び器具

- ・ SOFT INCUBATOR SLI-450ND (EYELA)
- ・ WATER BATH SHAKER PERSONAL-11 (TAITEC)
- ・ LAS-4000
- ・ Nano Drop (Thermo SCIENTIFIC)
- ・ CO₂ インキュベーター (NAPCO)
- ・ クリーンベンチ (SHOWA SCIENCE)
- ・ オートピペッター (FALCON)
- ・ 遠心分離機 TOMY LX-120 (TOMY)
- ・ 遠心分離機 KUBOTA 3700 (KUBOTA)
- ・ 遠心分離機 HIMAC (HITACHI)
- ・ VORTEX-GENIE 2 (Scientific Industries)
- ・ Mini Disk Rotor BL-710I (BIOCRAFT)
- ・ Bio-Rad MODEL 550 microplate Reader (Bio-Rad)
- ・ Dry Thermo Unit (TAITEC)
- ・ 大型多検体サブマリンゲル電気泳動装置 NB-1013 (260 mm×360 mm) (日本エイドー)
- ・ ミニゲルスラブ泳動装置 (日本エイドー)
- ・ パワーサプライ NEP-200/NEP-300 (NICHIRYO)
- ・ Bio-Rad Trans Blot SD (BioRad)
- ・ HL-2000 HybridLinker (UVP)
- ・ Bioruptor (COSMO BIO)
- ・ ソフトウェア Image J (NIH)
- ・ アドインソフトウェア Statcel4*改訂版 (オーエムエス出版)

試薬及び実験材料

- Flp-In T-REx 293 細胞 (Invitrogen)
- HeLa cell (東京大学先端研油谷先生より供与)
- TOCARF 細胞 (2-2-2)
- scRNA (Invitrogen)
- XRN2 siRNA (Invitrogen)
- DMEM (SIGMA D0422)
- FBS (JRH)
- Lipofectamine 2000 (Invitrogen)
- Opti-MEMI (Invitrogen)
- Penicillin G (SIGMA)
- Streptomycin Sulfate (WAKO)
- DMSO (WAKO)
- Tris (WAKO)
- Acetic Acid (WAKO)
- EDTA·2Na (DOJINDO)
- フェノール (WAKO)
- クロロホルム (WAKO)
- NaCl (WAKO)
- KCl (WAKO)
- MgSO₄ (WAKO)
- MgCl₂ (WAKO)
- SDS (Nacalai tesque)
- Na₂HPO₄ (WAKO)
- KH₂PO₄ (WAKO)

- HEPES (DOJINDO)
- Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad)
- TEMED (WAKO)
- APS (WAKO)
- Glycine (WAKO)
- BPB (WAKO)
- Formaldehyde (WAKO)
- Methanol (WAKO)
- Triton X-100 (WAKO)
- Skim Milk (WAKO)
- NBT/BCIP stock solution (Roche)
- Salmon Sperm DNA (SIGMA)
- Terminal Transferase (NEB)
- Biotin-16-dUTP (Roche)
- Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module Kit (Thermo SCIENTIFIC)
- RNAgents® Total RNA Isolation System (Promega)
- 90 mm カルチャーディッシュ (NUNC)
- 60 mm カルチャーディッシュ (NUNC)
- 35 mm カルチャーディッシュ (FALCON)
- Burker-Turk 血球計算盤 (HIRSCHMANN EM TECHCOLOR)
- セルスクレーパー (NUNC)
- Ultrafree-MC 0.22 μm (MILLIPORE)
- PVDF 膜 ImmobilonTM-P (MILLIPORE)
- 3 MM (WHATMAN)
- 50 ml ポリプロピレンチューブ (NUNC)

- 15 ml ポリプロピレンチューブ (NUNC)
- 1.5 ml チューブ (WATSON)

発現プラスミドベクター

- pcDNA3.1 (+)-FLAG (第 2 章で作製)
- pcDNA3.1 (+)-CARF-FLAG (第 2 章で作製)

抗体と使用時の希釈倍率 (IB: イムノブロット)

- Mouse monoclonal anti-FLAG M2 antibody (SIGMA; 1: 10,000 for IB)
- Mouse monoclonal anti-GAPDH antibody (Ambion; 1: 10,000 for IB)
- rabbit polyclonal anti-XRN2 (Bethyl Laboratories, Inc.; A301-103A; 1:5,000 for IB)
- Alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse IgG antibody (Cell Signaling; 1: 10,000 for IB)
- Alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG antibody (Cell Signaling; 1: 10,000 for IB)

操作手順

4-2-1 細胞の培養

2-2-1 に記載した方法に従って行った。

4-2-2 イムノブロット

「2-2-6 イムノブロット」に記載した。

4-2-3 siRNA による XRN2 のノックダウン

35 mm ディッシュにて細胞密度 80%に培養した HeLa 細胞をトランスフェクション前に 1 ml の Opti-MEMI へ培地交換した。35 mm ディッシュ 1 枚に対して 1) Lipofectamin 2000 2.5 μ l と Opti-MEMI 250 μ l、2) 100 pmol の siRNA (コントロールとして scRNA を使用) と

Opti-MEMI 250 μ l をそれぞれ混合し、室温で 5 分間インキュベートした。1) 及び 2) を混合し、20 分間インキュベート後、Opti-MEMI に培地交換した HeLa 細胞から Opti-MEMI を除き添加しトランスフェクションを行った。37°C、5% CO₂ 条件下 5 時間培養し、ノーマル培地 DMEM に培地交換した。その後必要にあわせて適宜継代を行い実験に用いた。

• Stealth siRNA for XRN2 (siRNA):

5' -GAGAGGAGCAUUGAUGACUGGGUUU-3'

5' -AAACCCAGUCAUCA AUGCUCCUCUC-3'

• Stealth siRNA for control (scRNA):

5' -AAAUAGUGUAGACCAAUGCUUGUCU-3'

5' -AGACAAGCAUUGGUCUACACUAUUU-3'

4-2-4 RNA の抽出

RNAagents® Total RNA Isolation System を用いて RNA を抽出した。具体的には、PBS で 2 回洗った細胞に Denaturing Solution 300 μ l を添加し、氷上で 5 分間インキュベート後 1.5 ml チューブに細胞を回収した。2 M CH₃COONa (pH4.0)を 1/10 量添加し、天地返し 4-5 回により反応液を混合後、酸性フェノール・クロロホルム溶液を等量加え、10 秒間 vortex mixer により攪拌した。その後氷上で 15 分間インキュベートし、10,000 g、4°C、20 分間遠心分離した。上層を回収し、等量の isopropanol を添加後、10 秒間 vortex mixer により攪拌した。-20°C で 30 分間~1 晩静置した後、20,000 g、4°C、20 分間遠心分離し、RNA を沈殿させた。上清を取り除いた後、もう 1 度 isopropanol 0.2 ml 添加し、-20°C で 30 分間静置した。20,000 g、4°C、10 分間遠心分離し、上清を取り除き洗浄した。氷冷した 75% エタノール 1 ml を添加し、数秒間 vortex mixer により攪拌後、20,000 g、4°C、10 分間遠心分離し、上清を取り除き洗浄した。沈殿を 5 分間風乾し、脱イオン化した formamide に懸濁後、氷上で 30 分間静置した。Nano Drop により濃度を測定後、-20°C で保存した。

- ・ 75% エタノール: 75% エタノール/DEPC 処理 Milli-Q 水
- ・ DEPC 処理 Milli-Q 水: Milli-Q 水 1 l に対して終濃度 0.05%となるように DEPC を添加し、60°Cで 1 晩インキュベート後、121°C、20 分間オートクレーブ処理した。

4-2-5 タンパク質の抽出

4-2-4 において、酸性フェノール・クロロホルム抽出後の溶液に氷冷したエタノール 1 ml を添加し、10 秒間 vortex mixer により攪拌した。-20°Cで 30 分間静置した。20,000 g、4°C、20 分間遠心分離によりタンパク質を沈殿させ、上清を取り除いた。氷冷した 75% エタノール 1 ml を添加し、数秒間 vortex mixer により攪拌後、-20°Cで 30 分間静置し、20,000 g、4°C、10 分間遠心分離し、上清を取り除き洗浄した。沈殿を 5 分間風乾し、1 x SDS sample buffer を添加、数秒間 vortex mixer により攪拌後、mixer で 20 分間攪拌し溶解した。溶解後は-20°Cに保存した。

4-2-6 CARF 一過的過剰発現細胞からの RNA 抽出及びタンパク質抽出

2-2-10 に従って、pcDNA3.1 (+)-CARF-FLAG 4 µg を 35 mm ディッシュに培養した HeLa cell にトランスフェクションを行った。コントロールとして pcDNA3.1 (+)-FLAG をトランスフェクションした。トランスフェクション 48 時間後に 3-2-4、3-2-5 に従い RNA 及びタンパク質を回収した。

4-2-7 CARF 薬剤誘導発現細胞 TOCARF cell からの RNA 抽出及びタンパク質抽出

Doxycycline 濃度 0、1、10 ng/ml で CARF の発現を 72 時間誘導した細胞密度おおよそ 80%の TOCARF 細胞を用いて「3-2-4 RNA の抽出」、「3-2-5 タンパク質の抽出」に従い RNA 及びタンパク質を回収した。

4-2-8 ノザンブロット法による pre-rRNAs の検出

Formamide により 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるように調製した RNA サンプル 5 μl に対して 2 x sample buffer 5 μl を加え、数秒間 vortex mixer により攪拌した。65°C、10 分間熱変性後、氷水で急冷した。10 x loading buffer 1 μl を加え、数秒間 vortex mixer により懸濁した後、1 x MOPS buffer に浸した 0.8% 変性アガロースゲル (幅 130 mm、長さ 235 mm) で、100 V、150 分間電気泳動した。電気泳動開始 5 分後、RNA サンプルがゲルに入ったのを確認してからペリスタポンプにて陰極側と陽極側の泳動 buffer を循環させた。電気泳動後のアガロースゲルは DW に 5 分間、50 mM NaOH に 15 分間浸し、ゲル内の RNA をアルカリ加水分解した。DW で 5 分間洗浄後、20 x SSC に 40 分間浸した。同時に、ゲルと同じ大きさに切ったナイロンメンブレンを DW に 5 分間、20 x SSC に 40 分間浸した。その後、ゲル内の RNA をキャピラリーブロット法により 1 晩かけてナイロンメンブレンに転写した。ナイロンメンブレンは 2 x SSC で軽く洗浄後、37°C で数時間置き完全に乾燥させた。乾燥後、HL-2000 HybridLinker を用いて UV 照射 (1,200 x 100 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$) し、転写された RNA をナイロンメンブレン上に固定した。ナイロンメンブレンを 10% 酢酸に 10 分間浸した後、methylene-blue 溶液に 10 分間浸し、染色した。染色バンドが明瞭になるまで DW で数回すすぎ、風乾させた。風乾後、スキャナーを用いて染色像を取り込んだ。その後、ナイロンメンブレンを pre-hybridization buffer 中、50°C、30 分間以上ブロッキング反応を行った。ブロッキング反応中にノザンブロット法で用いるオリゴヌクレオチドプローブのビオチン化を行った。ビオチン化したオリゴヌクレオチドプローブを pre-hybridization buffer に対して 1/400 になるように加え (最終濃度 0.467 nM)、50°C、1 晩インキュベートした。ナイロンメンブレンを 50°C の Non-Stringent wash solution に浸し、50°C で振盪しながら 10 分間を 1 回、30 分間を 2 回の合計 3 回の洗浄を行った。その後、Stringent wash solution を用いて 50°C で振盪しながら 15 分間洗浄した。RNA の検出には Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module Kit を用いて付属のプロトコールに従い行った。具体的には、ナイロンメンブレンを Blocking Buffer 中で室温、15 分間振盪した。Streptavidin-HRP conjugated を Blocking Buffer に対して 1/400 になるように加え、室温で 15 分間振盪した。ナイロンメン

ブレンを TBST で室温にて 10 分間振盪を 2 回繰り返して洗浄した。その後、ナイロンメンブレンをハイブリバックに入れ、Substrate Equilibration Buffer を加え、室温で 5 分間振盪し、Luminal/Enhancer Solution と Stable Peroxide Solution を等量混合した溶液を入れ 5 分間静置した。その後、LAS4000 の Chemiluminescence mode で目的の RNA を可視化した。多重比較検定にはアドインソフトウェア Statcel4*改訂版の Williams 法を用いた。

- 2 x sample buffer: 10 x MOPS 20 μ l、Formaldehyde 35 μ l、DEPC 処理 DW 45 μ l を混合
- 10 x MOPS buffer: MOPS 41.85g、CH₃COONa 4.1015 g、EDTA \cdot 2Na 3.725 g を 1 l の DW で溶解後、121°C、20 分間オートクレーブ処理した。

- 10 x loading buffer: 1% SDS、50% Glycerol、0.05% BPB

- 0.8% 変性アガロースゲル: 0.8% (w/v) Agarose、1 x MOPS、3.3% Formaldehyde

調製法: 1.2 g の Agarose NA に 130 ml の DW を加え、電子レンジにて溶解した。スターラーで攪拌しながら 50°C 程度まで冷ました後、10 x MOPS 15 ml、formaldehyde 5 ml を添加し、軽くスターラーで攪拌しゲル作成機に静かに流し入れ固化させた。

- 50 mM NaOH: NaOH 1g、DW 500ml

- 20 x SSC: NaCl 384 g、Sodium Citrate 176.4 g、DW 2 l

- Methylene-blue 溶液: 0.02% (w/v) Methylene-blue、50 mM CH₃COONa

- pre-hybridization buffer:

調製法: 20 x SSC 100 ml、1 M Na₂HPO₄ 8 ml、10% SDS 280 ml、100 x Denhardt's Solution 12 ml を混合し、その溶液 50 ml に対して 10 mg/ml の salmon sperm DNA 溶液 (ソニケーションにより DNA を 300-700 bp に断片化したもの) を 200 μ l 添加した。

- 100 x Denhardt's Solution: 2% Ficoll 400、2% Polyvinylpyrrolidone、2% BSA

- ビオチン化オリゴヌクレオチドプローブ:

調製法: オリゴヌクレオチドのビオチン化は Terminal transferase を用いて付属のプロトコールに従って行った。具体的には、滅菌水によって 1 μ M に希釈した 5 μ l のオリゴヌクレ

オチドに対して滅菌水を 29.5 μ l、10 x Terminal transferase buffer、2.5 mM CoCl₂、5 μ M Biotin-16-dUTP を 5 μ l ずつ添加し混合後、Terminal transferase (20,000 U/ml) を 0.5 μ l 加え緩やかに混合し、37°C、30 分間インキュベートした。0.1 M EDTA (pH8.0) 5 μ l を加えて反応を停止し、50 μ l のフェノール・クロロホルム溶液を加えて緩やかな速度で vortex mixer で 10 秒間攪拌し、20,000 g、4°C、5 分間遠心分離した。上層 30 μ l を別のチューブに移し、使用するまで-20°Cに保存した。pre-rRNAs を検出するために使用したオリゴヌクレオチドの配列と pre-rRNA 内の領域は以下の通りである。

*5'ETS-1: 5' ETS 内の 132 から 155 の領域

5' -TCGGACGCGAGAGAACAGCAGG-3'

*5'ETS-2: 5' ETS 内の297から324の領域

5' -AGACGAGAACGCCTGACACGCACGGCAC-3'

*5'ETS-3: 5' ETS 内の 1468 から 1487 の領域

5' -ACAGCGACGGAGGCAATACC-3'

*5'ETS-4: 5' ETS 内の 1731 から 1747 の領域

5' -TCACGCGCCGGACAGAG-3'

• Non-Stringent wash solution: 20 x SSC 150 ml、10% SDS 500 ml、1 M NaHPO₄ (pH7.5)、DW 325 ml (50°Cにて保存)

• Stringent wash solution: 20 x SSC 25 ml、10% SDS 50 ml、425 ml DW (50°Cにて保存)

第3節 結果

4-3-1 XRN2 が関与するリボソーム生合成過程の確認

本章緒言において述べた 5' ETS 領域の pre-rRNA プロセッシングにおける XRN2 の働きを検出できるプローブ: 5'ETS-2、5'ETS-3、5'ETS-4 (Fig. 4-2) を用いたノザンブロット法により siRNA 法を用いた XRN2 のノックダウンによる影響を解析した。5' ETS 領域の pre-rRNA プロセッシングにおける XRN2 の働きについてノザンブロット法を用いた解析は Wang ら (155)、Preti ら (156)、Sloan ら (158) により報告されている。Wang らによる報告はマウス細胞 NIH 3T3-derived LAP3 細胞を用いており (155)、本研究においてはヒト HeLa 細胞を用いて解析を行った。ヒトとマウスの種の違いが検出される可能性も考えられた。Preti ら (156)、Sloan ら (158) による報告はヒト HeLa 細胞を用いているが、Preti らによる解析は 5' ETS 領域に対して本研究の 5'ETS-2 と同じプローブ 1 種類のみを用いて解析しており、5'ETS-pre-rRNA fragment: 01-A0、A0-1 の影響を検出することはできない(156)。Sloan らによる解析は 5'ETS 領域に対応する 3 種のプローブで検出しており、5'ETS-pre-rRNA fragment: 5'-01、01-A0、A0-1 全てが検出できる。しかし、A0-1 領域に対するプローブは 18 S rRNA の配列にも反応してしまう欠点があった。これはプローブの作成法がランダムプライマー-DNA ラベリング法を用いているために 18 S に反応するプローブが含まれてしまった可能性が考えられた (158)。本研究では、ヒト HeLa 細胞を用いて、5'ETS 領域に対するビオチン化標識したオリゴヌクレオチドプローブ 3 種を用いて解析を行い、それらの問題点の改善を試みた。

はじめに、HeLa 細胞を用いて siRNA による XRN2 のノックダウンを行った。ノックダウンに適した条件を調べるためにトランスフェクション後、48、72、96 時間経過後にそれぞれ細胞を回収し、全細胞抽出液を調製後、XRN2 の発現量をイムノブロットにより解析した。コントロールとして scRNA を使い、ローディングコントロールとして抗 GAPDH 抗体を用いたイムノブロットを行った。その結果、scRNA を導入した場合と比較して 48 時間後に 8.5%、72 時間後に 2.5%、96 時間後に 15.1%まで XRN2 の発現量がノッ

クダウンされていた (Fig. 4-3)。一回の siRNA の導入でも十分なノックダウン効果が得られた。トランスフェクション後 96 時間の条件で以下の実験を行うこととした。

次に上述の条件で XRN2 をノックダウンした細胞を用いてノザンブロット法により pre-rRNA プロセッシングへの影響を調べた。タンパク質抽出には 60 mm ディッシュの 1/5 量の細胞を用い、抗 XRN2 抗体、ローディングコントロールとして抗 GAPDH 抗体を用いたイムノブロットによりノックダウン効率を確認した。コントロールとして scRNA をトランスフェクションした細胞を用いた。XRN2 の発現量が 7.7%まで減少しており、ノックダウンされたことを確かめた (Fig. 4-4)。同じノックダウン細胞から抽出した RNA を 1 レーンあたり 2.5 μ g を解析に供し、Fig. 4-2 に示すプローブ: 5'-ETS-2、5'-ETS-3、5'-ETS-4 を用いたノザンブロット法により pre-rRNA の 5'ETS 領域におけるプロセッシングへの影響について解析した。ローディングコントロールとしてプローブを反応させる前にメチレンブルーにより RNA を染色した染色像を用いた。プローブ 5'ETS-2 を用いた結果、XRN2 のノックダウンにより 47S pre-rRNA が増加した (Fig. 4-2, 4-5, 4-6)。プローブ 5'ETS-3 を用いた結果でも、45S-47S が増加し、プローブ 5'ETS-4 を用いた結果でも、XRN2 のノックダウンにより 43S-47S が増加した (Fig. 4-5, 4-6)。また、プローブ 5'ETS-2 を用いた結果、01site での切断が阻害されたと推測される 30 LS5' が XRN2 のノックダウンにより増加していた (Fig. 4-2, 4-5, 4-6)。プローブ 5'ETS-3 及び 5'ETS-4 を用いた結果では、30 S 及び 30 LS5'が XRN2 のノックダウンにより増加していた (Fig. 4-5, 4-6)。いずれのプローブを用いた結果も XRN2 のノックダウンにより 5'ETS 領域における 01 site の切断が阻害されたことを示めた。プローブ 5'ETS-2 を用いた解析により XRN2 のノックダウンによる 47 S の増加、プローブ 5'ETS-2、5'ETS-3、5'ETS-4 を用いた解析により XRN2 のノックダウンによる 30 SL5'の増加は Wang ら (155)、Preti ら (156)、Sloan ら (158) による報告と以下に述べる以外一致した。Wang ら (155) の報告では 5'ETS 領域の 01-A0、A0-1 に対するプローブを用いた解析の結果、XRN2 のノックダウンにより 30 SL5'は増加せず、45-47 S、43-47 S も増加しなかった。本研究との相違については本章

小括において考察する。プローブ 5'ETS-2 を用いた結果、XRN2 のノックダウンにより 5'ETS-pre-rRNA fragment: 5'-01 が増加した (Fig. 4-2, 4-5, 4-6) 。これらの結果は Wang ら (155)、Preti ら(156)、Sloan ら(158) による報告と一致した。プローブ 5'ETS-3 を用いた結果、XRN2 のノックダウンにより 5'ETS-pre-rRNA fragment: 01-A0 は検出されず、プローブ 5'ETS-4 を用いた結果、XRN2 のノックダウンにより 5'ETS-pre-rRNA fragment: A01-1 が増加した (Fig. 4-2, 4-5, 4-6)。これらの結果は Wang ら (155)、Sloan ら (158) による報告と一致した。

4-3-2 CARF 一過的過剰発現細胞を用いた CARF によるリボソーム生合成過程の阻害

前項において確認した 5' ETS 領域の pre-rRNA プロセッシングにおける XRN2 の働きに CARF が関与するか調べた。HeLa 細胞に CARF-FLAG 発現プラスミドベクターをリン酸カルシウム法によりトランスフェクションすることにより一過的に CARF を過剰発現させ、5' ETS 領域の pre-rRNA プロセッシングへの影響を解析した。トランスフェクション後 48 時間で細胞を回収し、タンパク質及び RNA を抽出し、前項と同様に解析した。コントロールとして FLAG タグのみを発現するプラスミドベクターをトランスフェクションした細胞を用いた。抗 FLAG 抗体、ローディングコントロールとして抗 GAPDH 抗体を用いたイムノブロットを行い、CARF-FLAG の発現を確認した (Fig. 4-7)。プローブ 5'ETS-2 を用いた解析の結果、XRN2 のノックダウンを行ったときと同様に CARF の過剰発現により 47 S が増加した (Fig. 4-7, 4-8)。この結果から 01 site の切断における XRN2 の働きを CARF が阻害することが示唆された。一方、プローブ 5'ETS-3 及び 5'ETS-4 を用いた解析の結果、CARF の過剰発現による 45S-47S 及び 43S-47S の増加は認められず、この結果は XRN2 のノックダウンを行った結果と異なった (Fig. 4-7, 4-8)。また、どのプローブを用いた場合でも、30S 及び 30 LS5'の量に対して CARF の過剰発現による変動はみられなかった。この結果も XRN2 のノックダウンによる影響とは異なった (Fig. 4-7, 4-8)。これらの相違については本章小括において考察する。一方で、XRN2 のノックダウンの結果と同様

に、5'ETS-pre-rRNA fragments: 5'-01、A0-1 が増加しており、5'ETS-pre-rRNA fragment: 01-A0 は増加しなかった (Fig. 4-7, 4-8)。このことから、XRN2 による pre-rRNA fragments の分解を CARF が阻害することが示唆された。

4-3-3 CARF 薬剤誘導発現細胞を用いた CARF によるリボソーム生合成過程の阻害

前項において 01 site の切断における XRN2 の働き及び 5'ETS-pre-rRNA fragments の XRN2 による分解を CARF が阻害することが示唆されたが、更に CARF 薬剤誘導発現細胞 TOCARF 細胞を用いて同様の手法により解析した。TOCARF 細胞を用いて解析することにより、1) CARF 発現量の増加に伴って前述した XRN2 の働きを阻害したことにより増加する pre-rRNA 及び 5'ETS-pre-rRNA fragments も増加するか、2) HeLa 細胞ではなく他の細胞株 Flp-In T-REx 293 細胞でも CARF が同様に働くか、知見を得ようと考えた。具体的には TOCARF 細胞を doxycycline 濃度: 0、1、10 ng/ml の条件下 72 時間培養後、前項と同様に解析した。プローブは 5'ETS-1 及び 5'ETS-2 を用いた。イムノブロットにより FLAG-CARF の発現を確認した (Fig. 4-9)。CARF を一過的に過剰発現した結果と同様に CARF により 47 S は増加する傾向にあり、その増加量は CARF の発現量の増加に従って増加する傾向にあった (Fig. 4-9, 4-10)。プローブ 5'ETS-1 を用いたときに doxycycline 非添加に対して doxycycline 10 ng/ml 濃度条件で 47 S が増加すると Williams 法を用いて判定された。2つのプローブを用いた解析において 5'ETS-pre-rRNA fragment: 5'-01 は、doxycycline 濃度に伴って増加すると Williams 法により判定された。また、前項の CARF の一過的過剰発現と同様に 30 LS5'は観察されなかった (Fig. 4-9, 4-10)。これらの結果から、HeLa 細胞だけではなく Flp-In T-REx 293 細胞でも CARF が同様に働くことが明らかになった。このことから、5'ETS 領域の pre-rRNA プロセッシング過程における XRN2 の働きの CARF による阻害は HeLa 細胞特異的な現象ではないことが示唆された。本項の結果から、01 site の切断における XRN2 の働き及び 5'ETS-pre-rRNA fragments の XRN2 による分解を CARF が阻害することが明らかになった。

第4節 小括

本章において、5' ETS 領域の pre-rRNA プロセッシングにおける XRN2 の働きに CARF が関与するのか調べた。5' ETS 領域の pre-rRNA プロセッシングにおける XRN2 の働きについてノザンロット法を用いた解析が報告されていた (155、156、158) が、第3節結果 4-3-1 で述べたような問題点があった。本研究では、第2章、第3章で用いた細胞と種が同じであるヒト HeLa 細胞を用いて、5'ETS 領域に対するビオチン化標識したオリゴヌクレオチドプローブ3種を用いて解析を行い、それらの改善を試みた。5'ETS 領域に対するビオチン化標識したオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより Sloan ら (158) による報告で検出された 18 S を認識するシグナルが検出されず、改善がみられた。既報と同様に XRN2 のノックダウンにより 01 site の切断が阻害された。3種のプローブを用いた解析の結果、XRN2 のノックダウンにより 47 S 及び 30 SL5'が増加した。Wang ら (155) の報告では 5'ETS 領域の 01-A0、A0-1 に対するプローブを用いた解析の結果、XRN2 のノックダウンにより 45-47 S、43-47 S、30 SL5'は増加しなかった。しかし、5'ETS 領域の 5'-01 に対するプローブを用いた時にのみ 45.5 S、47 S の増加及び 30 LS5' に相当する 34.5S を検出した。これらはヒトとマウスの種の違いもしくは細胞種の違いによる可能性が考えられる。01 site の切断が起こらないと次の pre-rRNA プロセッシング過程へ進ませない XRN2 の働きについても、数種類の細胞の中で MCF7 細胞のみ XRN2 をノックダウン無しで 30SL5'が観察され、細胞種により異なる報告がある (158)。XRN2 のノックダウンによる 5'ETS-rRNA fragments の増加は細胞種に関わらず観察されたので、01 site の切断において働く XRN2 が rRNA fragment: 5'-01 を分解するのではない可能性が考えられる。

前述した 5' ETS 領域の pre-rRNA プロセッシングにおける XRN2 の働きへの CARF の関与について、CARF を細胞に過剰発現させて解析した。プローブ 5'ETS-2 を用いた解析の結果、01 site の切断における XRN2 の働きを CARF が阻害することが示唆された。しかし、プローブ 5'ETS-3 及び 5'ETS-4 を用いた解析の結果、CARF の過剰発現による 45 S、47 S 及び 43S-47S の増加は認められなかった (Fig. 4-7, 4-8)。この原因として2つの可能

性が考えられる。1) 01 site の切断における XRN2 の働きを CARF が完全に阻害していないため 45S 及び 43S が生成され、45S 及び 43S の存在量の方が 47S よりも多いためコントロールに対してシグナルが増加しない可能性が考えられる。2) 01 site の切断が起こらないと次の pre-rRNA プロセッシング過程へ進ませない XRN2 の働きを CARF が著しく阻害し、43-47 S がすぐに 30S、30SL5'や 36S へプロセッシングされるため 45 S、47 S 及び 43S-47S が増加しない可能性が考えられる。しかし、全てのプローブを用いた解析の結果で 30S 及び 30 LS5'の量への CARF の過剰発現による増加はみられなかった (Fig. 4-7, 4-8) ことからこの可能性は排除できる。前述のように 30 LS5'の量は CARF の過剰発現により変動しなかった (Fig. 4-7, 4-8) ことから、01 site の切断が起こらないと次の pre-rRNA プロセッシング過程へ進ませないという品質管理の役割を果たす XRN2 の作用を CARF は阻害しないことが明らかになった。一方で、どのプローブを用いた解析の結果も 5'ETS-pre-rRNA fragments: 5'-01、A0-1 が増加しており、5'ETS-pre-rRNA fragment: 01-A0 は増加しなかった (Fig. 4-7, 4-8, 4-9, 4-10) ことから、CARF は XRN2 による pre-rRNA fragments の分解を阻害することが明らかになった。

以上、得られた結果を基にして次章では、CARF による pre-rRNA プロセッシングにおける XRN2 の働きを阻害する機序について解析する。

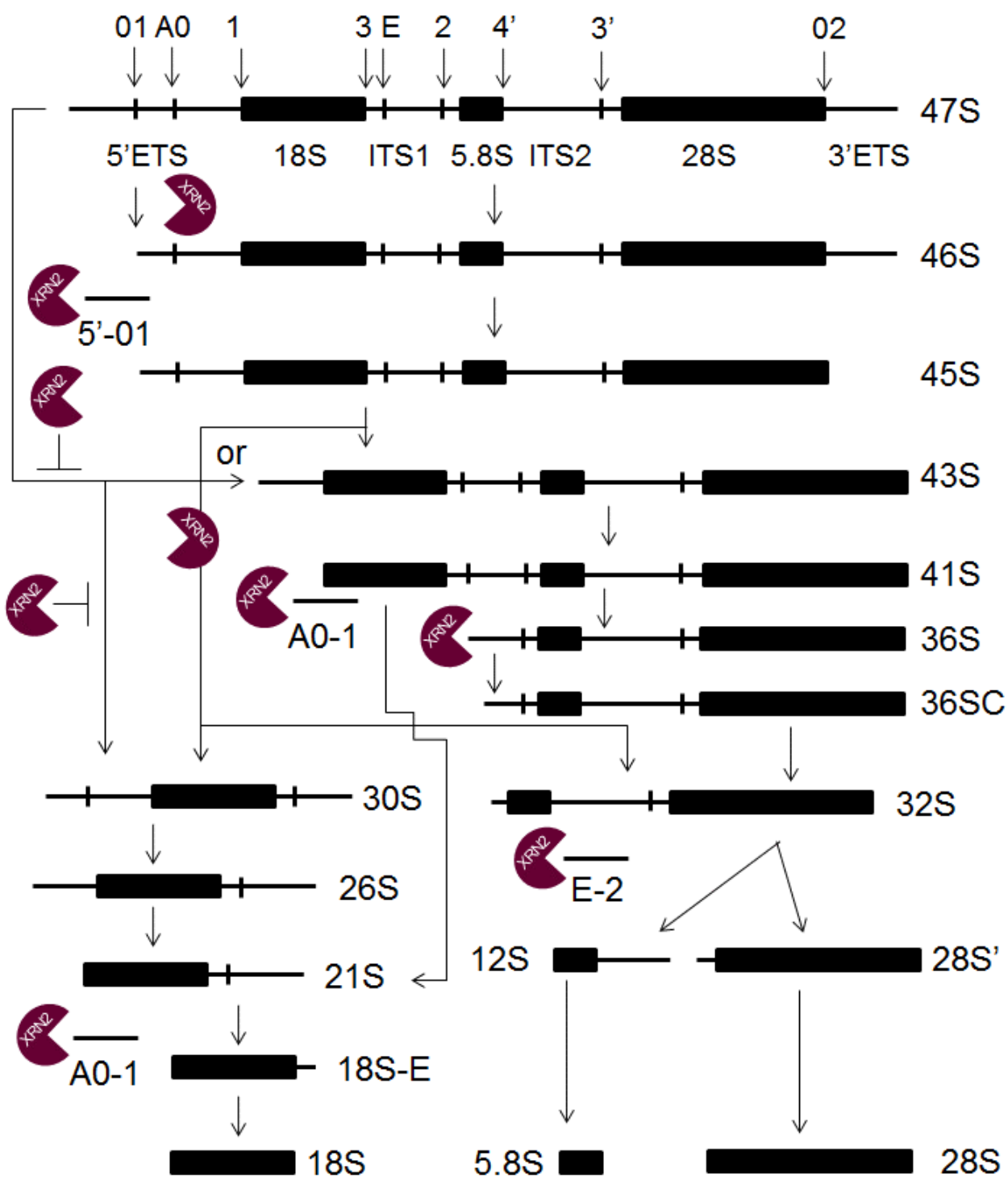


Fig. 4-1 ヒトにおける47S pre-rRNAの代表的なプロセッシング経路と生成するpre-rRNAsの沈降係数 (S) の模式図

初期転写産物47S pre-rRNAから最終産物18S、5.8S、28S rRNAsまでのプロセッシングの一例を示す。5'ETSとITS1の切断パターンは複数存在するため代表的なものを示した。(参考文献156, 157, 158)

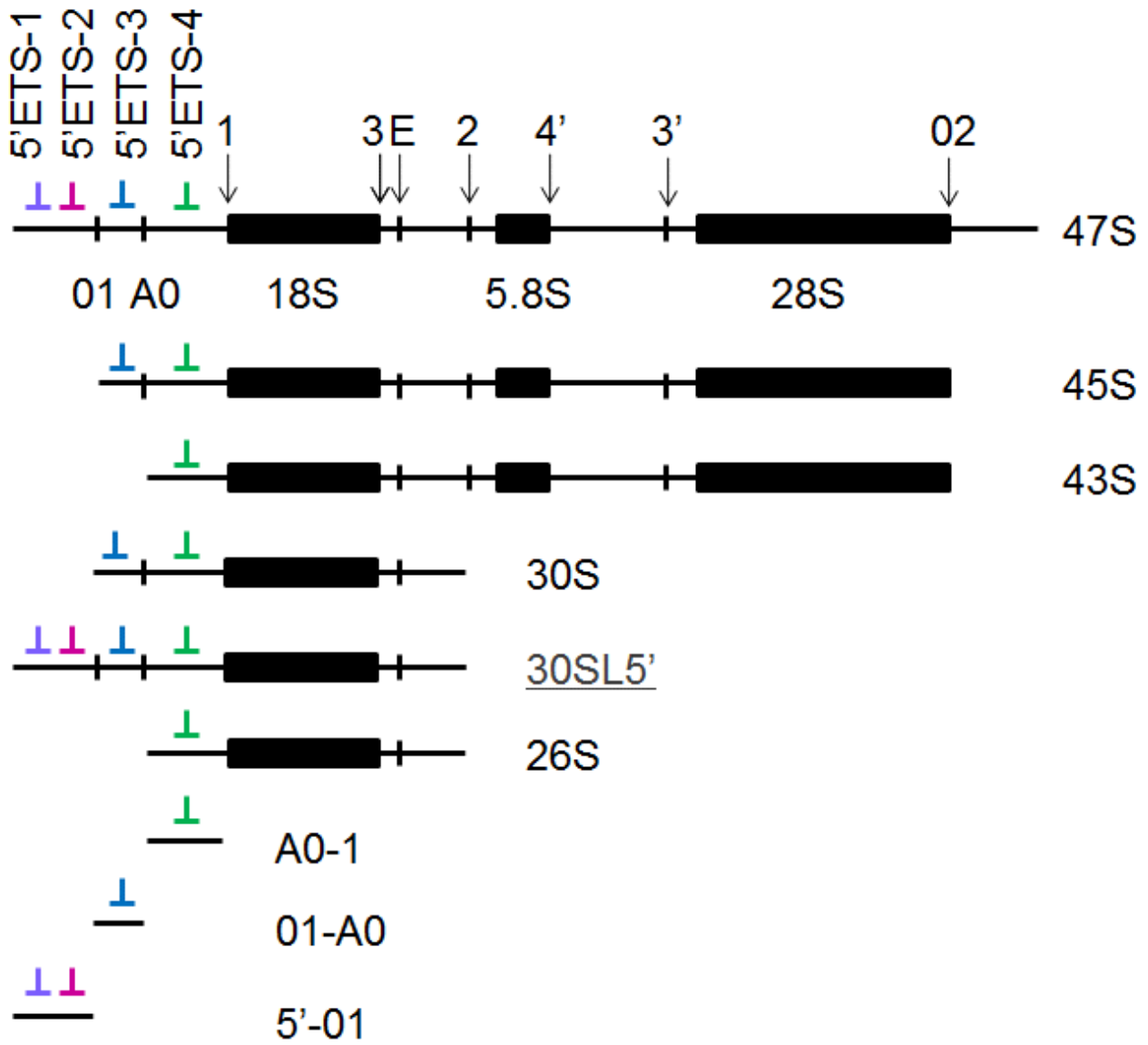


Fig. 4-2 pre-rRNAsおよび検出用プローブの模式図

トランスフェクション後の時間	48 h		72 h		96 h	
siRNA: XRN2	-	+	-	+	-	+

scRNA	+	-	+	-	+	-
-------	---	---	---	---	---	---

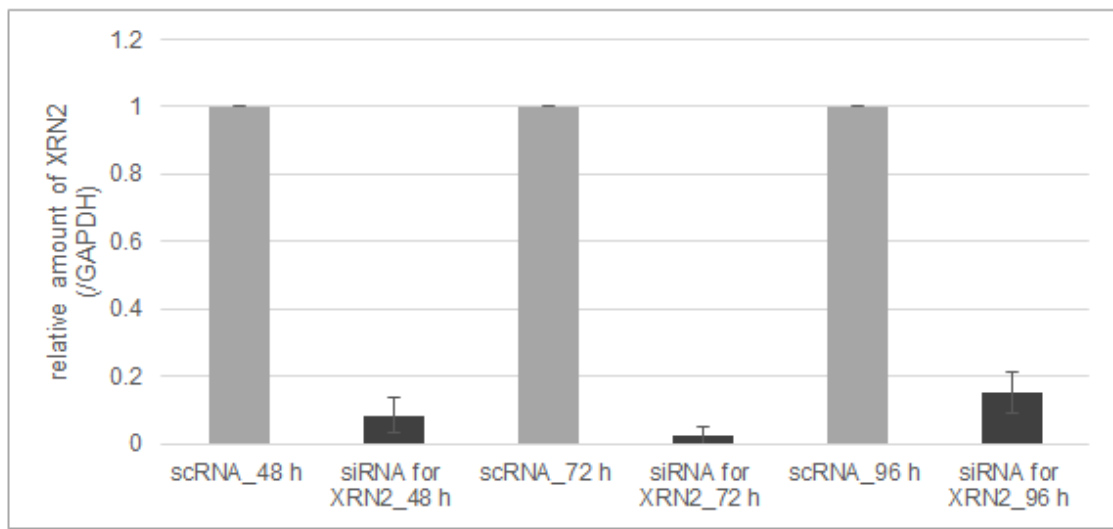


Fig. 4-3 siRNAによるXRN2のノックダウンの検討

HeLa細胞にsiRNAを用いてXRN2のノックダウンを行った。図上部に示した時間経過後、細胞を回収し、イムノプロット法により解析した。コントロールとしてscRNAを用いた。ローディングコントロールとして抗GAPDH抗体を用いた。用いた抗体を左側に示した。35 mm ディッシュの1/5量を解析した。scRNAのみをトランスフェクションした時のXRN2発現量を1として相対的な発現量を示した。(n=2) Error bar: standard deviation

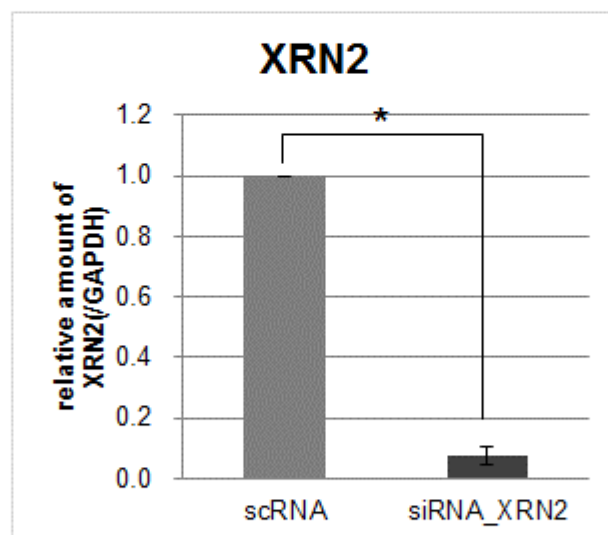
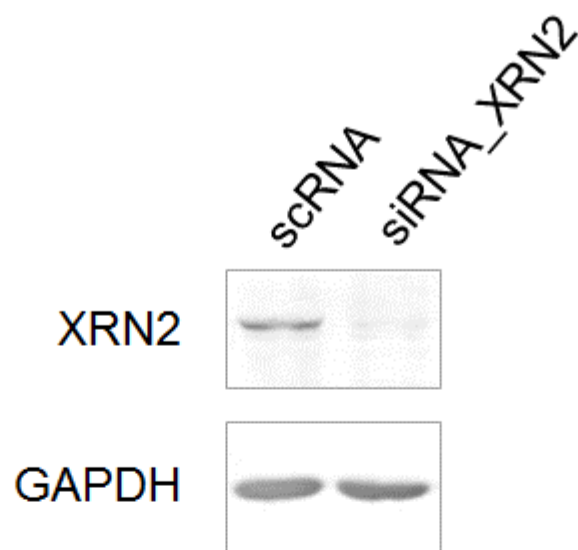


Fig. 4-4 siRNAによるXRN2のノックダウンの確認

HeLa細胞にsiRNAを用いてXRN2のノックダウンを行った。抽出したタンパク質を免疫ブロットにより解析した。コントロールとしてscRNAを用いた。ローディングコントロールとして抗GAPDH抗体を用いた。用いた抗体を左側に示した。60 mm ディッシュの1/5量を解析した。免疫ブロットの結果をscRNAのみをトランスフェクションした時のXRN2量を1として相対的な発現量を示した(n=3)。*student's t-test: $p < 0.05$. Error bar: standard deviation

Methylen Blue

Northern Blotting

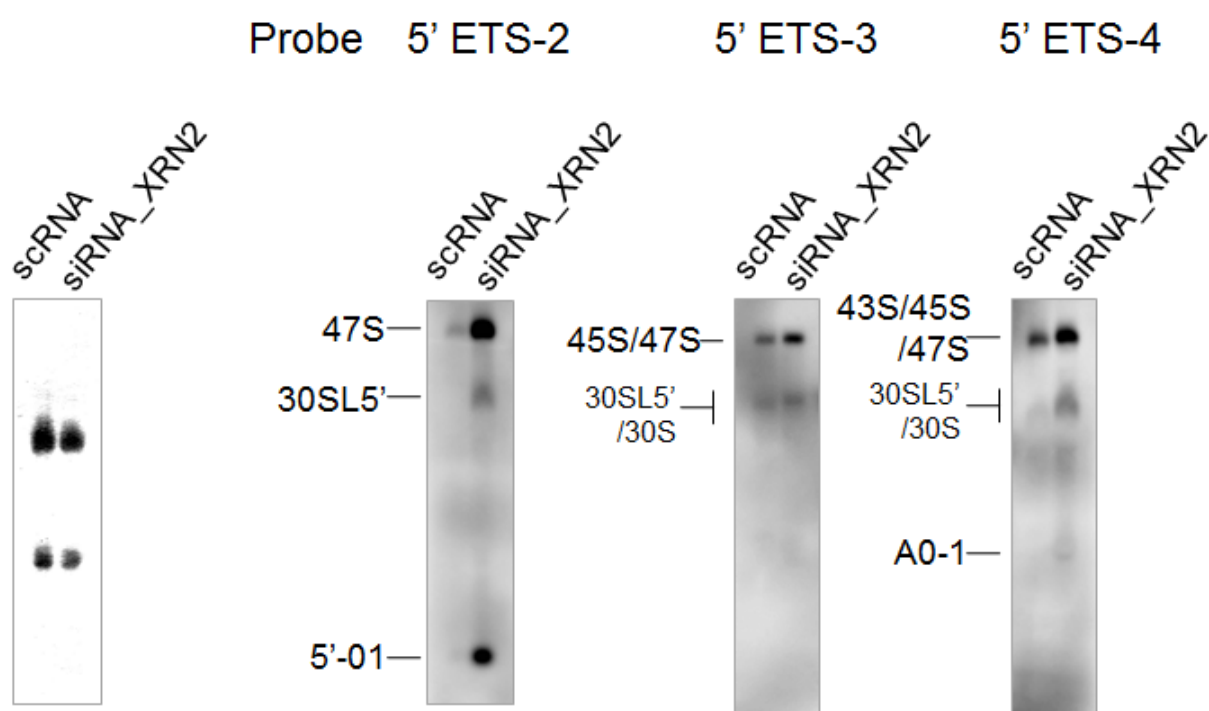


Fig. 4-5 XRN2をノックダウンした細胞内におけるpre-rRNAsのノザンプロット法による解析

HeLa細胞にsiRNAを用いてXRN2のノックダウンを行い、RNAを抽出した。Fig. 4-2に示すプローブを用いたノザンプロット法によりpre-rRNAsについて解析した。コントロールとしてscrRNAを用いた。ローディングコントロールとして28Sと18S rRNAのメチレンブルー染色を行った。用いたプローブを上部に、pre-rRNAを左側に示した。抽出したRNA 2.5 µgを用いて解析した。

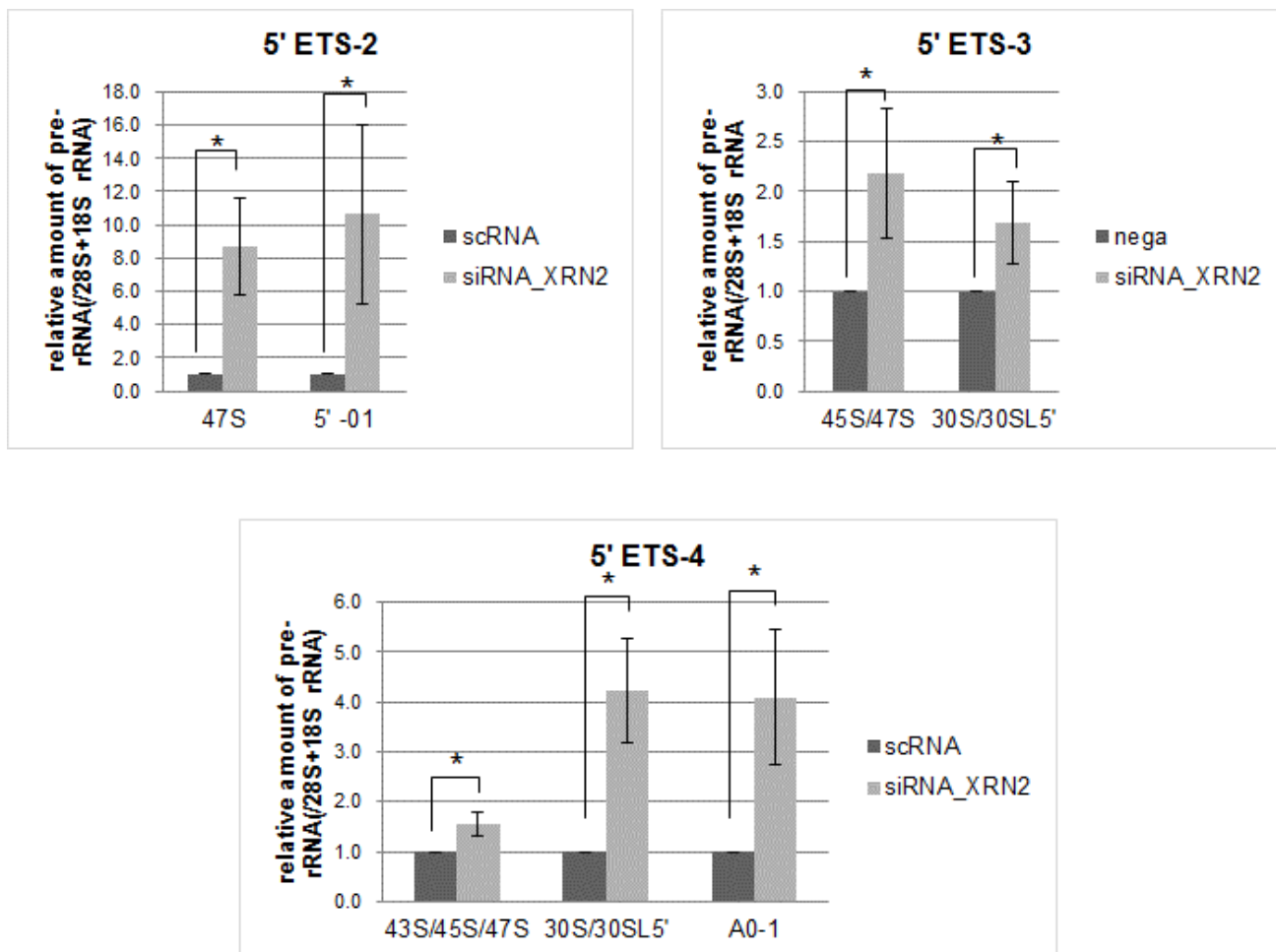


Fig. 4-6 XRN2をノックダウンした細胞内におけるpre-rRNAsのノザンプロット法による解析の定量化

Fig. 4-5の結果を定量化し、グラフに示した。ローディングコントロールとしてメチレンブルー染色の結果から28Sと18S rRNAの合計値を用いてノーマライズした。scRNAをトランスフェクションした細胞のpre-rRNA量を1として相対的な値を示した(n=3) 。*student's t-test. p<0.05. Error bar: standard deviation

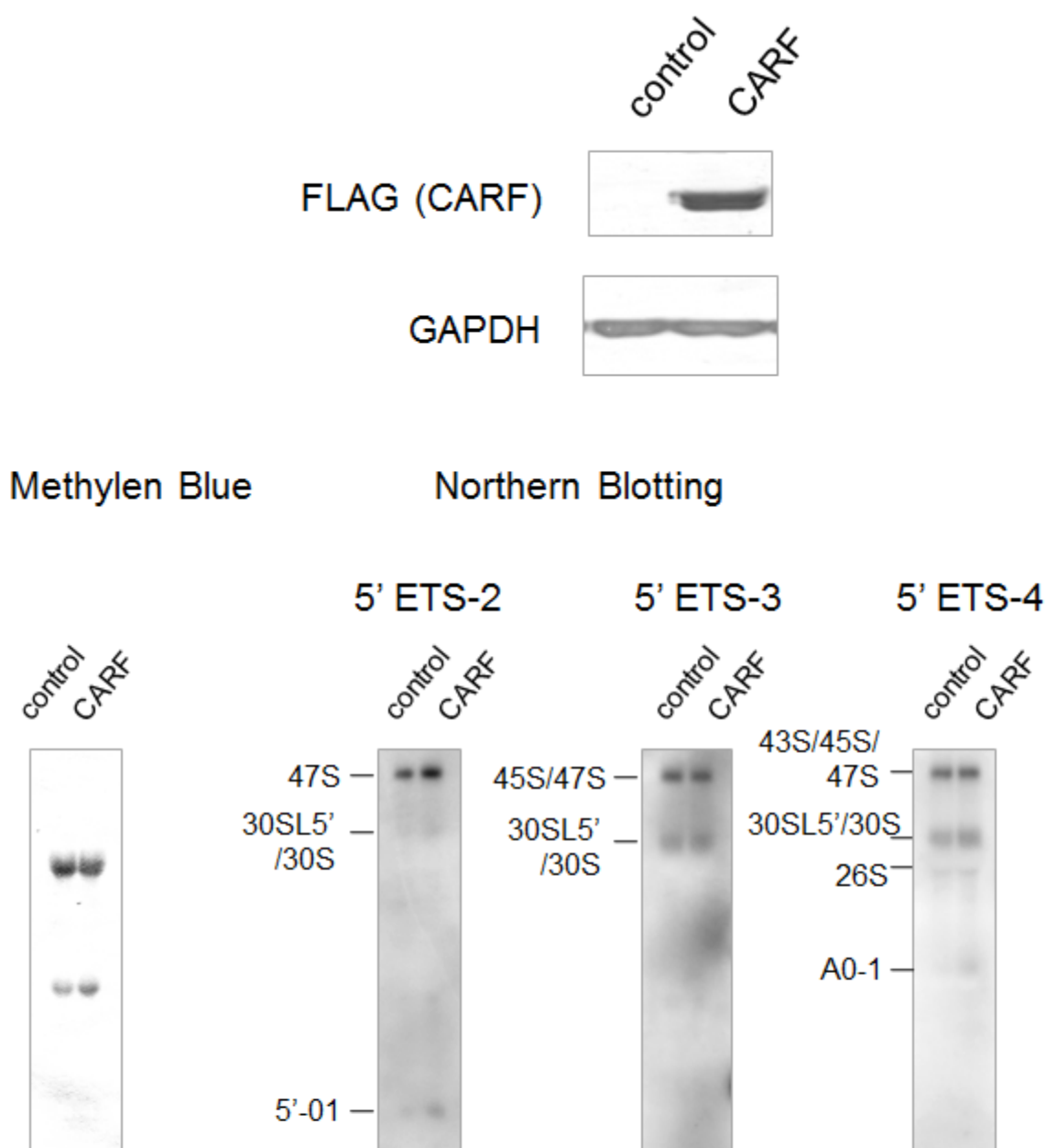


Fig. 4-7 CARFを過剰発現した細胞内におけるpre-rRNAsのノザンプロット法による解析

HeLa細胞にCARF-FLAG発現プラスミドベクターをトランスフェクションし、一過的に過剰発現させた細胞からRNAを抽出した。Fig. 4-2に示すプローブを用いたノザンプロット法によりpre-rRNAsについて解析した。コントロールとしてFLAGタグタンパク質発現ベクターをトランスフェクションした。ローディングコントロールとして28Sと18S rRNAのメチレンブルー染色を行った。用いたプローブを上部に、pre-rRNAを左側に示した。抽出したRNA 2.5 μ gを用いて解析した。

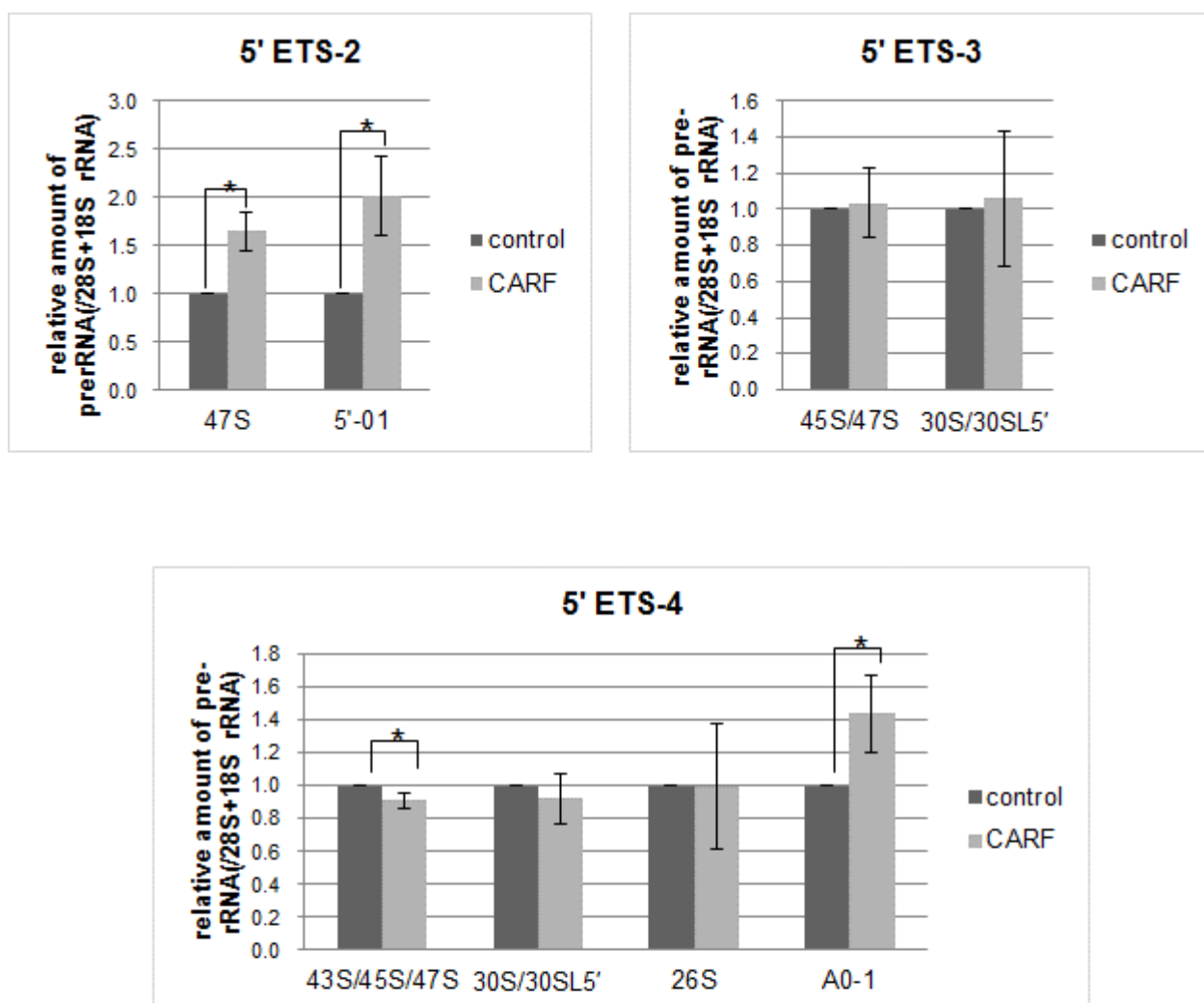


Fig. 4-8 CARFを過剰発現した細胞内におけるpre-rRNAsのノザンプロット法による解析の定量化

Fig. 4-7の結果を定量化し、グラフに示した。ローディングコントロールとしてメチレンブルー染色の結果から28Sと18S rRNAの合計値を用いてノーマライズした。Mockのpre-rRNA量を1として相対的な値を示した (n=3)。*student's t-test: p<0.05. Error bar: standard deviation

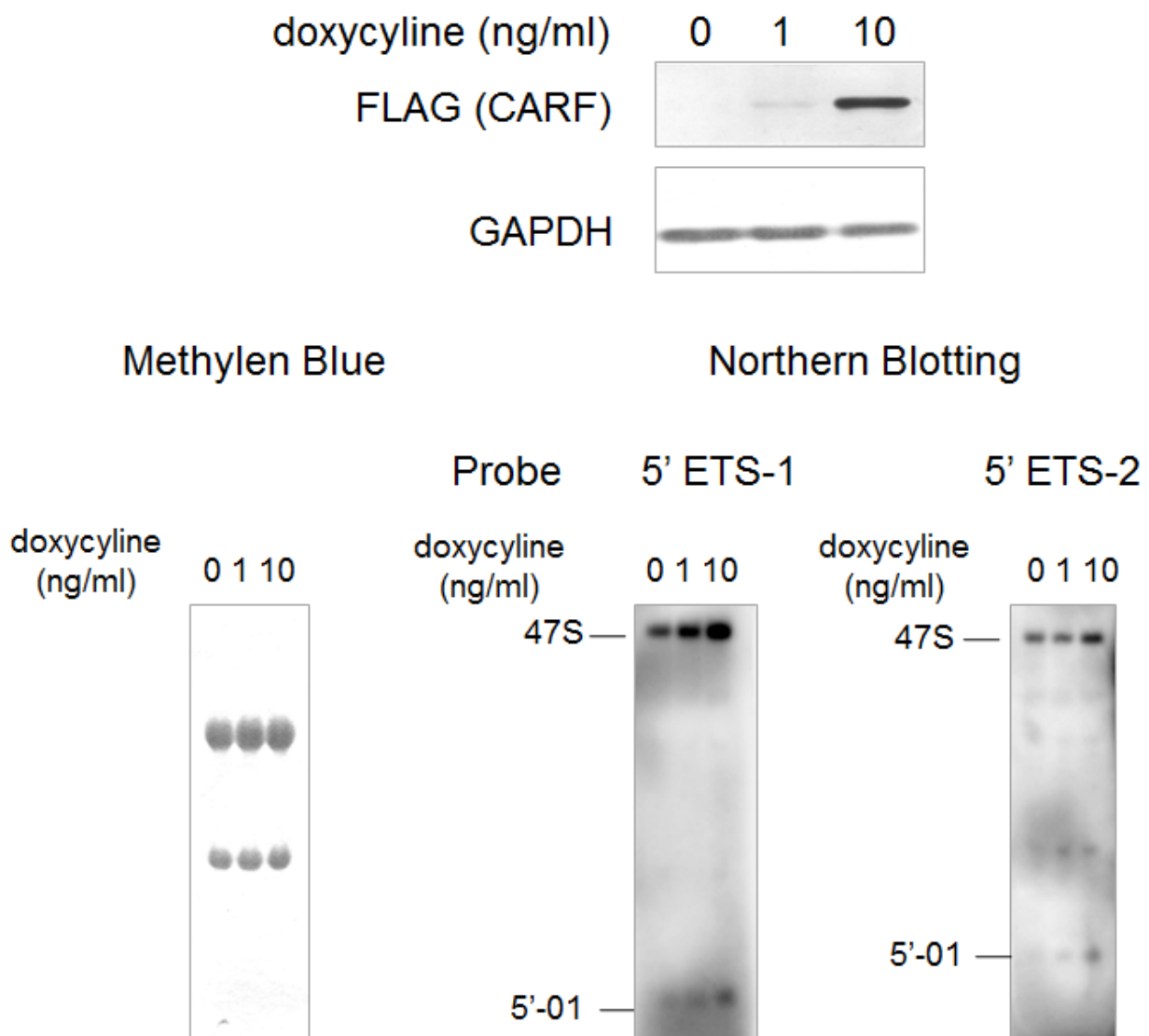


Fig. 4-9 薬剤誘導発現細胞を用いたCARF過剰発現細胞内におけるpre-rRNAsのノザンプロット法による解析

TOCARF細胞にdoxycyclineを添加し、薬剤誘導によりCARFを過剰発現させた細胞からRNAを抽出した。Fig. 4-2に示すプローブを用いたノザンプロット法によりpre-rRNAsについて解析した。ローディングコントロールとして28Sと18S rRNAのメチレンブルー染色を行った。用いたプローブを上部に、pre-rRNAを左側に示した。抽出したRNA 2.5 μ gを用いて解析した。

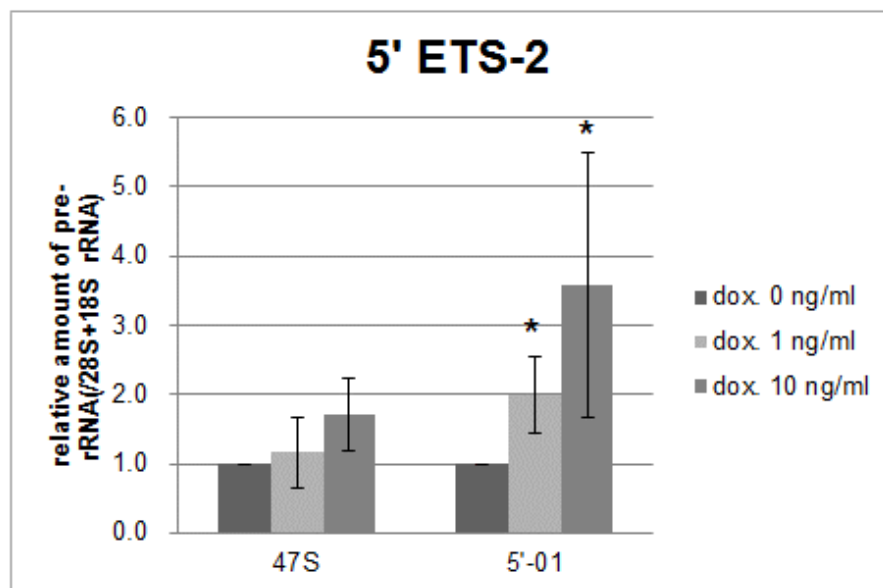
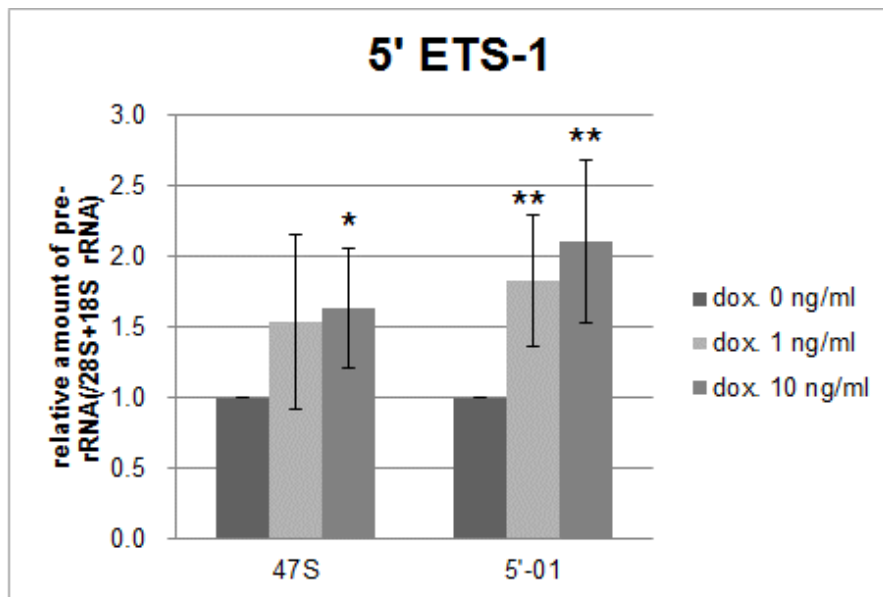


Fig. 4-10 薬剤誘導発現細胞を用いた CARF過剰発現細胞内におけるpre-rRNAsのノザンプロット法による解析の定量化

Fig. 4-9の結果を定量化し、グラフに示した。ローディングコントロールとしてメチレンブルー染色の結果から28Sと18S rRNAの合計値を用いてノーマライズした。Doxycycline非添加条件のpre-rRNA量を1として相対的な値を示した (n=3)。* Williams法増加傾向: $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

第5章 XRN2 を介した CARF によるリボソーム生合成調節機構

第1節 緒言

前章において 5'ETS 領域の pre-rRNA プロセッシングにおける XRN2 の働きを CARF が阻害することが明らかになった。そこで本章では、その作用機序について詳細に解析した。第3章において XRN2 の 1-680 aa を介して CARF が相互作用することが明らかになった。Rat1 との構造の比較から CARF は XRN2 の 5'-3'エキソヌクレアーゼ活性部位と相互作用して、その 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性を調節する可能性が考えられる。このことを証明すべく、CARF による XRN2 の酵素活性阻害について詳しく解析した。*in vitro* 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性測定法を用いて XRN2 の 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性への GST-CARF による影響について調べた。

CARF と p53 の直接結合は p53 を安定化し、活性化する (120)。しかし、CARF と p53 の結合体量がある範囲を超えて増加すると、MDM2 の働きによりプロテアソームにより分解され、CARF と p53 が減少する (126) こと、また CARF は MDM2 と直接相互作用する (128) ことから、CARF を介して XRN2 が MDM2 と複合体を形成し、ユビキチン化されプロテアソームで分解される可能性が考えられる。そこで、CARF 過剰発現細胞を用いて CARF 過剰発現による XRN2 発現量への影響について解析した。さらに、CARF のノックダウンによる XRN2 の発現量への影響についても解析した。

また、XRN2 は第2章小括で述べたように核質における pol II による pre-mRNA 転写の終結を促進する (178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185) ことや核小体におけるリボソーム生合成において働く (155, 156, 157, 158) ことが報告されていることから、その反応場所に XRN2 を導かなければならない。hnRNPK は XRN2 を poly(A)配列下流の polII による pre-mRNA の転写終結が起こる場所へ留める報告 (184) があることから、CARF もリボソーム生合成以外の XRN2 が関与する反応場所に XRN2 を導く可能性が考えられる。CARF を過剰発現及び siRNA によりノックダウンした細胞を用いて XRN2 の細胞内局在への影響を調べた。

第2節 実験方法

装置及び器具

- Program Temp Control System (ASTECC)
- Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara Bio Inc.)
- 3UVTM Transilluminator (UVP)
- Applied Biosystems 3130 ジェネティックアナライザー (Applied Biosystems)
- SOFT INCUBATOR SLI-450ND (EYELA)
- WATER BATH SHAKER PERSONAL-11 (TAITEC)
- LAS-4000
- Nano Drop (Thermo SCIENTIFIC)
- CO₂ インキュベーター (NAPCO)
- クリーンベンチ (SHOWA SCIENCE)
- オートピペッター (FALCON)
- 遠心分離機 TOMY LX-120 (TOMY)
- 遠心分離機 KUBOTA 3700 (KUBOTA)
- 遠心分離機 HIMAC (HITACHI)
- VORTEX-GENIE 2 (Scientific Industries)
- Mini Disk Rotor BL-710I (BIOCRAFT)
- Bio-Rad MODEL 550 microplate Reader (Bio-Rad)
- Dry Thermo Unit (TAITEC)
- ミニゲルスラブ泳動装置 (日本エイドー)
- パワーサプライ NEP-200/NEP-300 (NICHIRYO)
- Bio-Rad Trans Blot SD (BioRad)
- 真空エバポレーター ULVAC (SINKU KIKO)
- Bioruptor (COSMO BIO)

- ・ソフトウェア Image J (NIH)

試薬及び実験材料

- ・ Flp-In T-REx 293 細胞 (Invitrogen)
- ・ HeLa 細胞 (東京大学先端研油谷先生より供与)
- ・ TOCARF 細胞
- ・ scRNA (Invitrogen)
- ・ CARF siRNA (code No. HSS183137) (Invitrogen)
- ・ DMEM (SIGMA D0422)
- ・ FBS (JRH)
- ・ Lipofectamine 2000 (Invitrogen)
- ・ Opti-MEMI (Invitrogen)
- ・ Rat tail collagen type I (Becton Dickinson and Company)
- ・ Penicillin G (SIGMA)
- ・ Streptomycin Sulfate (WAKO)
- ・ G418 Disulfate (Nacalai tesque)
- ・ DMSO (WAKO)
- ・ KOD plus DNA polymerase (TOYOBO)
- ・ Agarose LO2 (TaKaRa)
- ・ λDNA (TaKaRa)
- ・ Ethidium bromide (WAKO)
- ・ 制限酵素 (TaKaRa)
- ・ QIAEX[®]II Gel Extraction Kit (QIAGEN)
- ・ T4 DNA Ligase (TaKaRa)
- ・ コンピテントセル DH5α: F⁻, φ80dlacZΔM15, Δ (*lacZYA - argF*) U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*,

hsdR17 ($r_k^-m_k^+$), *phoA*, *supE44*, λ -*thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

- コンピテントセル BL21 (DE3): F⁻, *dcm*, *ompT*, *hsdS* (rB-rB⁻), *gal*, λ (DE3)
- IPTG (WAKO)
- Glutathione Sepharose™ 4B (GE healthcare)
- BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
- Bacto Yeast Extract (DIFCO)
- Bacto Tryptone (DIFCO)
- Tris (WAKO)
- Acetic Acid (WAKO)
- EDTA·2Na (DOJINDO)
- フェノール (WAKO)
- フェノール・クロロホルム (WAKO)
- イソアミルアルコール (WAKO)
- 8-Quinolinol (WAKO)
- Sodium Acetate trihydrous (WAKO)
- Ethanol (WAKO)
- NaCl (WAKO)
- KCl (WAKO)
- MgSO₄ (WAKO)
- MgCl₂ (WAKO)
- Ampicillin·2Na (SIGMA)
- PIPES (DOJINDO)
- PEG8000 (WAKO)
- CaCl₂·2H₂O (WAKO)
- KOH (WAKO)

- $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (WAKO)
- SDS (Nacalai tesque)
- Na_2HPO_4 (WAKO)
- KH_2PO_4 (WAKO)
- HEPES (DOJINDO)
- PMSF (WAKO)
- トリクロロ酢酸
- Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad)
- Glycerine (WAKO)
- N, N'-Methylenebisacrylamide (WAKO)
- TEMED (WAKO)
- APS (WAKO)
- Glycine (WAKO)
- BPB (WAKO)
- Formaldehyde (WAKO)
- Methanol (WAKO)
- Urea (Nacalai tesque)
- 2-mercaptoethanol (WAKO)
- Triton X-100 (WAKO)
- Skim Milk (WAKO)
- Agarose NA (GE healthcare bioscience)
- RNase A (SIGMA)
- SP6/T7 Transcription kit (Roche Diagnostics GmbH)
- ATP (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)
- UTP (Takara Bio Inc.)

- CTP (Takara Bio Inc.)
- GTP (Takara Bio Inc.)
- GMP (Sigma)
- 7.5 M LiCl (Ambion)
- PrimeScript[®] RT reagent Kit (Perfect Real Time) (TAKARA)
- GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega)
- NBT/BCIP stock solution (Roche)
- 90 mm カルチャーディッシュ (NUNC)
- 60 mm カルチャーディッシュ (NUNC)
- 35 mm カルチャーディッシュ (FALCON)
- 12 ウェルカルチャープレート (NUNC)
- 96 ウェルカルチャープレート (NUNC)
- 8 ウェルカルチャースライド (BECKMAN)
- Burker-Turk 血球計算盤 (HIRSCHMANN EM TECHCOLOR)
- セルスクレーパー (NUNC)
- カバーガラス 24 mm×24 mm (MATSUNAMI)
- VectaShield mounting Medium (Vector Laboratories)
- VectaShield mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories)
- Ultrafree-MC 0.22 μm (MILLIPORE)
- PVDF 膜 ImmobilonTM-P (MILLIPORE)
- 透析膜 (size: 20/32, 100ft 巻き, Lot 007001) (VISKASE SALES Corp)
- XL-ladder プレステイン分子量マーカーBroad Range (APRO)
- 50 ml ポリプロピレンチューブ (NUNC)
- 15 ml ポリプロピレンチューブ (NUNC)
- 1.5 ml チューブ (WATSON)

発現プラスミドベクター

- pcDNA3.1 (+)-FLAG (第 2 章で作成)
- pcDNA3.1 (+)-CARF-FLAG (第 2 章で作成)
- pOG44 (Invitrogen)
- pcDNA5/FRT/FLAG (第 2 章で作成)
- pcDNA5/FRT/HA-CARF-TEV-FLAG (wt) (本研究室、石川英明博士より供与)
- pcDNA5/FRT/HA-CARF-TEV-FLAG (N1) (本研究室、石川英明博士より供与)
- pcDNA5/FRT/HA-CARF-TEV-FLAG (N2) (本研究室、石川英明博士より供与)
- pcDNA5/FRT/HA-CARF-TEV-FLAG (C1) (本研究室、石川英明博士より供与)
- pcDNA5/FRT/HA-CARF-TEV-FLAG (C2) (本研究室、石川英明博士より供与)
- pcDNA5/FRT/HA-CARF-TEV-FLAG (NC) (本研究室、石川英明博士より供与)
- pGEX4T2 (GE healthcare)
- pGEX4T2/FLAG-CARF (本研究室、石川英明博士より供与)
- pcDNA3.1(+)-XRN2(C 末端タグ付加用) (本研究室、石川英明博士より供与)
- pcDNA3.1 (+)-FLAG-TEV-HA (FEHc) (C 末端に FLAG タグ、TEV プロテアーゼ認識 site、HA タグを付加) (本研究室、石川英明博士より供与)
- pcDNA3.1 (+)-FEHc-XRN2 (wt)
- pcDNA3.1 (+)-FEHc-XRN2 (Δ N278)
- pSPT 19 (Roche Diagnostics)
- pENTR_{TM}/H1/TO (Invitrogen)
- pENTR_{TM}/H1/TO-CARF_880

抗体と使用時の希釈倍率 (IB: イムノブロット、IF: 免疫染色)

- Goat polyclonal anti-Lamin B antibody (sc-6217) (Lot F1206) (Santa Cruz Biotechnology; 1:

1,000 for IB)

- Mouse monoclonal anti-B23 antibody (clone Fc-61991) (Zymed; 1: 10,000 for IB, 1: 400 for IF)
- Mouse monoclonal anti-FLAG M2 antibody (SIGMA; 1: 10,000 for IB, 1:600 for IF)
- Mouse monoclonal anti-FBL antibody (Cytoskeleton; 1: 50 for IF)
- Mouse monoclonal anti-GAPDH antibody (Ambion; 1: 10,000 for IB)
- Mouse monoclonal anti-HA antibody (clone HA-7) (SIGMA; 1: 10,000 for IB)
- Mouse monoclonal anti- β -tubulin antibody (SAP4G5) (SIGMA; 1: 10,000 for IB)
- rabbit polyclonal anti-XRN2 (Bethyl Laboratories, Inc.; A301-103A; 1:5,000 for IB, 1: 100 for

IF)

- Rabbit polyclonal anti-FBL antibody (H-140) (Santa Cruz Biotechnology; 1: 1,000 for IB)
- Alkaline phosphatase-conjugated anti-goat IgG antibody (Cell Signaling; 1: 10,000)
- Alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse IgG antibody (Cell Signaling; 1: 10,000)
- Alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG antibody (Cell Signaling; 1: 10,000)
- Cy3-conjugated anti-mouse IgG antibody (SIGMA; 1: 200 for IF)
- FITC-conjugated anti-rabbit IgG antibody (American Qualex; 1: 200 for IF)

操作手順

5-2-1 細胞の培養

2-2-1 に記載した方法に従って行った。

5-2-2 発現プラスミドベクターの作製

- pcDNA3.1 (+)-FEHc-XRN2 (wt)
- pcDNA3.1 (+)-FEHc-XRN2 (Δ N278)
- pENTR_{TM}/H1/TO-CARF_880

上記に示す発現プラスミドベクターを構築した。発現プラスミドベクターの構築の概略

をはじめに記し、詳細な実験操作については 2-2-9 の終わりに実験操作ごとに記載した。

- pcDNA3.1 (+)-FEHc-XRN2 (wt) の構築

2-2-9 と同様に操作を行った。pcDNA3.1(+)-XRN2(C 末端タグ付加用)から制限酵素 *Sma*I 及び *Hind*III による制限酵素処理を行い、XRN2 を含む DNA 断片を得た。*Eco*RV/*Hind*III 処理 pcDNA3.1 (+)-FEHc プラスミドと *Sma*I/*Hind*III XRN2 断片をライゲーションし、pcDNA3.1 (+)-FEHc-XRN2 (wt) を得た。

- pcDNA3.1 (+)-FEHc-XRN2 (Δ N278) の構築

前項で作成した pcDNA3.1 (+)-FEHc-XRN2 (wt) をテンプレートとして下記のプライマーセットと KODplus DNA polymerase を用いて PCR により増幅した。

5'-GGCGAAGCTTGCCACCATGGGGTTGCCAAGA-3'

5'-GGCCCCCGGGCCATTCCAATTGTATC-3'

2-2-9 と同様に操作を行った。得られた PCR 産物を *Sma*I/*Hind*III 処理して *Sma*I/*Hind*III XRN2 断片を得た。前項で得た *Eco*RV/*Hind*III 処理 pcDNA3.1 (+)-FEHc と *Sma*I/*Hind*III XRN2 断片をライゲーションし、pcDNA3.1 (+)-FEHc-XRN2 (Δ N278) を得た。

- pENTR_{TM}/H1/TO-CARF_880 の構築

5'-CACCGGTTCTGCATCATTTGTTTCCGAAGGAAACAAATGATGCAGAACC-3'

5'-AAAAGGTTCTGCATCATTTGTTTCTTCGGGAAACAAATGATGCAGAACC-3'

上記の DNA Oligo を 200 μ M に溶解し、それぞれ 5 μ l ずつをキット添付の Oligo Annealing Buffer を最終濃度 1 x になるように希釈した溶液に添加し、混合した。95°C、4 分間加熱処理して変性させた後、室温で 5-10 分間インキュベートし DNA Oligo をアニーリングさせた。5 nM に希釈したアニーリングさせた DNA Oligo 2 μ l とキット添付の 0.75 ng/ml linearized pENTR_{TM}/H1/TO vector 2 μ l を混合し、キット添付の T4 DNA Ligase を用いて室温で 5 分間ライゲーション反応を行った。反応生成物を大腸菌 DH5 α のコンピテントセルに添加し、氷上で 30 分間形質転換した後、kanamycin を添加した LB 寒天培地に塗布し、37°C でコロニーを形成するまで約 15 時間培養した。2 x YT^{kan+}液体培地を用いた以外 2-2-9

と同様に操作を行った。pENTR™/H1/TO-CARF_880 を得た。

5-2-3 FLAG タグタンパク質融合ヒト CARF 変異体恒常発現細胞株の作製

3-2-3 と同様に行った。下記の発現プラスミドベクターを用いた。

- ・ pcDNA5/FRT/HA-CARF-TEV-FLAG (N1) (本研究室、石川英明博士より供与)
- ・ pcDNA5/FRT/HA-CARF-TEV-FLAG (N2) (本研究室、石川英明博士より供与)
- ・ pcDNA5/FRT/HA-CARF-TEV-FLAG (C1) (本研究室、石川英明博士より供与)
- ・ pcDNA5/FRT/HA-CARF-TEV-FLAG (C2) (本研究室、石川英明博士より供与)
- ・ pcDNA5/FRT/HA-CARF-TEV-FLAG (NC) (本研究室、石川英明博士より供与)

プラスミドベクターが導入された細胞の選択を行った後、96ウェルプレートに1ウェルに1細胞になるように希釈、播種し、クローニングを行った。

5-2-4 pENTR™/H1/TO-CARF_880 導入細胞株の作製

pENTR™/H1/TO-CARF_880 プラスミドベクター導入細胞株を作成するために親細胞株としてFlp-In T-Rex 293細胞を用いた。実際には、1) Lipofectamin 2000 4 µlとOpti-MEMI 100 µl、2) pENTR™/H1/TO-CARF_880 プラスミドベクター 1.6 µgとOpti-MEMI 100 µlを混合し、室温で5分間インキュベートした。1) 及び2) を混合し、20 分間インキュベート後、12-well plateに50 %細胞密度になるように培養したFlp-In T-REx 293 細胞に添加しトランスフェクションを行った。pENTR™/H1/TO vectorはZeocin耐性遺伝子をもつので、500 µg/ml Zeocinを含む培地で培養し、pENTR™/H1/TO-CARF_880 プラスミドベクターが導入された細胞の選択を行った。得られた細胞株をCARF_880 細胞と名付けた。その後、96ウェルプレートに1ウェルに1細胞になるように希釈後、播種し、クローニングを行った。

5-2-5 FEHc-XRN2 恒常発現細胞株の作製

FEHc-XRN2恒常発現細胞株を作成するために親細胞株としてCARF_880 細胞を用い

た。実際には、1) Lipofectamin 2000 2 μ l と Opti-MEMI 50 μ l、2) pc-DNA3.1 (+)-FEHc-XRN2 プラスミドベクター 500 ng と Opti-MEMI 50 μ l を混合し、室温で5分間インキュベートした。1) 及び2) を混合し、20 分間インキュベート後、24-well plate に50 %細胞密度になるように培養した Flp-In T-REx 293 細胞に添加しトランスフェクションを行った。pcDNA3.1 (+) vector は Neomycin 耐性遺伝子をもつので、500 μ g/ml G418 を含む培地で培養し、pc-DNA3.1 (+)-FEHc-XRN2 プラスミドベクターが導入された細胞の選択を行った。その後、96 ウェルプレートに1ウェルに1細胞になるように希釈後、播種し、クローニングを行った。

5-2-6 イムノブロット

2-2-6 に記載した方法に従って行った。

5-2-7 FEHc-XRN2 恒常発現細胞を用いた XRN2 の精製

80 % 細胞密度の FEHc-XRN2 恒常発現細胞を 150-mm カルチャーディッシュ 2 枚を PBS で洗浄後回収した。コントロールとして親細胞株として CARF_880 細胞も同時に回収した。6 x 10⁷ cells を用いて 2-2-11 に記載した方法で nuclear extract fraction-1 を調製し、2-2-4 に記載した方法で anti-FLAG M2 agarose beads 25 μ l を用いて FEHc-XRN2 を回収し、1 mg/ml FLAG peptide 120 μ l を用いて溶出した。

5-2-8 一過的過剰発現細胞を用いた FEHc-XRN2 (wt) 及び FEHc-XRN2 (Δ N278) の精製

親細胞株として Flp-In T-REx 293 細胞を用いて 2-2-10 に記載した方法と同様に pcDNA3.1 (+)-FEHc-XRN2 (wt) 及び pcDNA3.1 (+)-FEHc-XRN2 (Δ N278) を用いてリン酸カルシウム法によるトランスフェクションを行い、トランスフェクション 60 時間後に 80 % 細胞密度の 150-mm カルチャーディッシュ各 3 枚を PBS で洗浄し、回収した。6 x 10⁷ cells を用いて 2-2-11 の方法で cytosol fraction、nuclear extract fraction-1 を調製し、2-2-4 の

方法で anti-FLAG M2 agarose beads 25 μ l を用いて FEHc-XRN2 (wt) 及び FEHc-XRN2 (Δ N278) を回収し、1 mg/ml FLAG peptide 120 μ l を用いて溶出した。

5-2-9 GST 及び GST-CARF の大腸菌内での発現と精製

大腸菌内での GST 及び GST-CARF 発現のために GST 発現プラスミドベクター pGEX4T2 及び pGEX4T2/FLAG-CARF を大腸菌株 BL21 (DE3) のコンピテントセルに添加し、氷上で 30 分間処理し、42°C、45 秒間のヒートショック後、氷上で 2 分間冷やした。室温の SOC 培地を 0.5 ml 加え、30 分間振盪培養後、抗生物質を含む LB^{amp⁺}寒天培地に塗布し、37°C でコロニーを形成するまで培養した。シングルコロニーを LB^{amp⁺}液体培地で前培養後、前培養液 3 ml を LB^{amp⁺}液体培地 150 ml に植菌し、37°C で 3 時間培養した。IPTG を終濃度 0.7 mM になるように液体培地に添加し、25°C で 1 晩培養することで GST、20°C で 1 晩培養することで GST-CARF を大腸菌内で発現させた。遠心分離機 HIMAC により 3,500 rpm、4°C、10 分間遠心分離し、大腸菌体を回収した。上清を取り除き、得られた大腸菌を 4 ml の Binding Buffer (PBS (-), 0.5 mM EDTA, 0.1 mM PMSF) に懸濁し、15 ml ポリプロピレンチューブに分け、BioRuptor を用いて 4°C、1 サイクル (LEVEL medium: 20 秒間、インターバル: 20 秒間) として、GST は 18 サイクル、GST-CARF は 27 サイクル行い、大腸菌を破砕した。遠沈管に移し、遠心分離機 HIMAC により 18,000 rpm、4°C、30 分間遠心分離し、GST 及び GST-CARF を含む上清を回収した。GST 及び GST-CARF の精製には glutathione sepharose 4B ビーズを充填したカラムを用いて行い、結合した GST 及び GST-CARF は 10 mM reduced glutathione, 50 mM Tris-HCl (pH8.0) を 1 ml 添加し、4°C、10 分間インキュベートし、溶出した。この溶出の操作を 3 回繰り返す、順番に Elution 1、Elution 2、Elution 3 と名付けた。最も吸光度が高いフラクション Elution 2 を 30 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl (pH8.0) に 1 時間、4°C、3 回透析した。

5-2-10 XRN2 の 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性測定

XRN2 のエキソリボヌクレアーゼ活性を XRN1 の 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性測定の報告 (201) や XRN2 の酵母オーソログ Rat1 の 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性測定の報告 (192) を改良して活性測定を行った。その模式図を Fig. 5-1 に示した。基質として RNA 合成用 pSPT 19 プラスミドベクターを *Afl*III で切断し、SP6 RNA ポリメラーゼにより SP6/T7 Transcription kit を用いて転写を行った。その際に、Pellegrini らの報告によると GTP: GMP を 1: 6.25 以上の割合で混合すると 5'-mono P の RNA が合成されるので (201) 、この方法を利用し、1: 8 の割合で混合して RNA 合成を行った。

pSPT 19 プラスミドベクターを *Afl*III により 37°C、2 時間制限酵素反応を行い、アガロース電気泳動により DNA 断片の大きさを確認した後、0.1 mg/ml proteinase K 及び最終濃度 0.5% SDS 存在下で、50°C、30 分間反応させ、制限酵素を分解した。その後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿により DNA を精製した。沈殿を風乾後、滅菌水 20 μ l に懸濁し、Nano Drop を用いて濃度測定し、以後の実験に用いた。SP6/T7 Transcription kit に添付の Buffer を 1 x になるように加え、*Afl*III により切断した pSPT19 プラスミドベクターを 741 ng、NTPs + GMP 溶液 (10 mM ATP、10 mM UTP、10 mM CTP、2.5 mM GTP、20 mM GMP) を 10 μ l、10 U/ μ l SP6 RNA ポリメラーゼを 2 μ l、総量 20 μ l になるように Nuclease-free DW を加えて、37°C、6 時間転写反応を行った。反応液に TURBO DNase を添加して、37°C、15 分間、DNA を分解した。Nuclease-free DW 30 μ l、7.5 M LiCl 30 μ l を添加し、緩やかに攪拌した。-20 °C で 1 晩静置し、RNA を沈殿形成後、20,000 g、4°C、20 分間遠心分離し、上清を取り除いた。沈殿に氷冷 75 % EtOH を 1 ml 添加し、20,000 g、4°C、5 分間遠心分離し、上清を取り除いた。沈殿を風乾後、Nuclease-free DW 15 μ l に懸濁し、Nano Drop を用いて濃度測定し、5'-mono リン酸化 RNA として以後の実験に用いた。5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性測定は、作成した 5'-mono リン酸化 RNA 50 ng を基質として、30 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM MgCl₂、50 mM NaCl、0.5 mM DTT の反応液中に酵素 40 ng: FEHc-XRN2 (wt) もしくは FEHc-XRN2 (Δ N278)を添

加し、40°C条件下 10、20、30 分間酵素反応を行った。その際に GST もしくは GST-CARF を 50 ng 添加し、CARF による XRN2 の 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性への影響を調べた。反応温度の条件検討を行う際は FEHc-XRN2 恒常発現温細胞から精製した FEHc-XRN2 を用いて、反応時間 90 分間で酵素反応を行った。コントロールとして親細胞から同じ操作をして得られた画分を用いた。Loading Buffer (80%ホルムアミド、0.025% ブロモフェノール、10 mM EDTA (pH8.0)) を 5 μ l 添加することにより酵素反応を止めた後、ローディングコントロールとして 4 μ M Oligo nucleotide: 5'-CACCGCTCCTAAATGCAGCTATTGACGAATCAATAGCTGCATTTAGGAGC-3'を 1.1 μ l 添加し、8% アクリルアミド/7.5 M Urea PAGE により RNA 及び DNA を分離した。エチジウムブロマイド溶液で 30 分間染色を行い、LAS4000 で取り込み、AU として得られる相対的な量を求めた。

5-2-11 siRNA による CARF のノックダウン

35 mm ディッシュに 80%細胞密度に培養した HeLa 細胞もしくは CARF 恒常発現細胞をトランスフェクション前に 1 ml の Opti-MEMI に培地交換した。35 mm ディッシュ 1 枚に対して 1) Lipofectamin 2000 2.5 μ l と Opti-MEMI 250 μ l、2) 60 もしくは 100 pmol の siRNA (コントロールとして scRNA を使用) と Opti-MEMI 250 μ l を混合し、室温で 5 分間インキュベートした。1) 及び 2) を混合し、20 分間インキュベート後、Opti-MEMI に培地交換した HeLa 細胞から Opti-MEMI を除き添加しトランスフェクションを行った。37°C、5% CO₂ 条件下 5 時間培養後、ノーマル培地に培地交換した。その後、必要にあわせてトランスフェクション後 48 時間後に再度 siRNA のトランスフェクションを同様に行った。適宜継代及びスケールアップを行い実験に用いた。

• Stealth siRNA for CARF (siRNA):

5'-GCUCAGAGGUAGAAUUGCCACUAUU-3'

5'-AAUAGUGGCAAUUCUACCUCUGAGC-3'

- Stealth siRNA for control (scRNA):

5'-AAAUAGUGUAGACCAAUGCUUGUCU-3'

5'-AGACAAGCAUUGGUCUACACUAUUU-3'

5-2-12 qRT-PCR による *XRN2* 及び *CARF* の mRNA 量の定量化

4-2-4 に従い抽出した RNA を PrimeScript[®] RT reagent Kit (Perfect Real Time) のマニュアルに従い、抽出した RNA から qRT-PCR 用 cDNA を作成した。GoTaq[®] qPCR Master Mix を用いて添付のマニュアルに従って qRT-PCR を行い、*XRN2* 及び *CARF* の mRNA 量を定量した。実際には、Go Taq qPCR Master Mix を 10 µl、下記の primer set を 10 µM 濃度で 0.5 µl、template DNA を 3 µl、DNase、RNase free DW を 6 µl を用いて、下記の Standard cycling program により Real Time PCR を行った。ΔC_T method 法 (202) を用いて検量線を作製し、定量化した。*Actin* の mRNA 量を内部標準として用いて試料内の mRNA をノーマライズした。

Primer set:

- *XRN2* forward: 5'-TGTTGCTCTCTTGCCATTCGT-3'
- *XRN2* reverse: 5'-TGGGTGATGTTTCCCCACAAA-3'
- *CARF* forward: 5'-TCAAAGTGACAGATGCTCCAAC-3'
- *CARF* reverse: 5'-GGTTTTTGC GTGATCTTGCTC-3'
- *Actin* forward: 5'-CATGTACGCGTTGCTATCCAGGC-3'
- *Actin* reverse: 5'-CTCCTAATGTCACGCACGAT-3'

Standard cycling program

95°C、2分間を1サイクル、95°C、15秒間、60°C、60秒間を40サイクル、60-95°C、各サイクル終了後にデータを取得した。

5-2-13 CARF 薬剤誘導発現細胞を用いた過剰発現による XRN2 の発現量への影響の検出

Doxycycline 濃度 0、10 ng/ml で CARF の発現を 72 時間誘導した約 80%細胞密度の TOCARF 細胞を PBS で洗浄後、1 mM PMSF を含む PBS に懸濁し、BioRuptor を用いて 4°C、LEVEL high: 20 秒間、インターバル: 60 秒間を 3 サイクル行い、細胞を破碎した。タンパク質量を定量し、細胞抽出液 20 µg を用いてイムノブロットにより解析を行った。イムノブロットの結果を Image J により解析し、GAPDH を用いてノーマライズし、コントロールを 1 として相対的な値で表した (n=3)。4-2-4 に従い RNA を抽出し、5-2-11 に従い qRT-PCR により XRN2 の mRNA 量を調べた (n=3)。

5-2-14 CARF 一過的過剰発現細胞を用いた過剰発現による XRN2 の発現量への影響の検出

HeLa 細胞に CARF-FLAG 発現プラスミドベクター pcDNA3.1 (+)/CARF-FLAG を 2-2-10 に従ってトランスフェクションした。コントロールとして pcDNA3.1 (+)-FLAG をトランスフェクションした。トランスフェクション 48 時間後に、5-2-12 と同様の方法で細胞を回収、XRN2 の発現量を解析した。

5-2-15 CARF ノックダウンによる XRN2 の発現量への影響の検出

CARF をノックダウンした約 80%細胞密度の HeLa 細胞を PBS で洗浄後、1 mM PMSF を含む PBS に懸濁し、BioRuptor を用いて 4°C、LEVEL high: 20 秒間、インターバル: 60 秒間を 3 サイクル行い、細胞を破碎した。タンパク質量を定量し、細胞抽出液 10 µg を用いてイムノブロットにより解析を行った。イムノブロットの結果を Image J により定量化し、GAPDH を用いてノーマライズし、コントロールを 1 として相対的な値で表した (n=3)。4-2-4 に従い RNA を抽出し、5-2-11 に従い qRT-PCR により XRN2 の mRNA 量を解析した (n=3)。

5-2-16 CARF 過剰発現細胞における免疫染色

Doxycycline 濃度 0、10 ng/ml で CARF の発現を 72 時間誘導した約 70%細胞密度の TOCARF 細胞、CARF 恒常発現細胞もしくは CARF 変異体恒常発現細胞を 2-2-3 に記載した方法で免疫染色を行った。TOCARF 細胞の結果については CARF 発現細胞と CARF 非発現細胞について XRN2 の核小体における存在が減少し、核内で XRN2 が染色されない領域がある細胞を数え、グラフに示した。

5-2-17 CARF 恒常発現細胞における CARF ノックダウンの影響について免疫染色による検出

CARF 恒常発現細胞に 5-2-14 と同様の方法で siRNA による CARF のノックダウンを行い、約 70%細胞密度の細胞を用いて 2-2-3 に記載した方法で免疫染色を行った。同時に実験を行った細胞を PBS で洗浄後、1 mM PMSF を含む PBS に懸濁し、BioRuptor を用いて 4°C、LEVEL high: 20 秒間、インターバル: 60 秒間を 3 サイクル行い、細胞を破砕した。タンパク質量を定量し、細胞抽出液 10 µg を用いてイムノブロットにより解析を行った。イムノブロットの結果を Image J により定量化し、GAPDH を内部標準として用いてノーマライズし、コントロールを 1 として相対的な値として表した (n=3)。

5-2-18 CARF による XRN2 の細胞内局在への影響について細胞分画、イムノブロットによる検出

siRNA を用いて CARF に対するノックダウンを行った 72 時間後の約 80 %細胞密度の HeLa 細胞もしくは CARF 恒常発現細胞を PBS で洗浄後回収し、buffer F (16.7 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM NaCl, 1.67 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 0.05% TritonX-100): 1ml に懸濁後、氷上で 5 分間インキュベートし溶解した。それぞれのコントロールとして、scRNA をトランスフェクションした HeLa 細胞もしくは親細胞である Flp-In T-REx 293 細胞を用いた。その細胞溶解物を 1,000 g、4 °C 条件で 5 分間遠心分離後、上清を回収し cytosol

fraction (C) を得た。沈殿を buffer F: 1ml で洗浄後、buffer G (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF): 0.5 ml に懸濁した。オンタイム 20 秒間、インターバルタイム 90 秒間を 1 セットとし、Bioruptor を用い、ハイレベル設定で 2 回ソニケーションを行い、沈殿を破碎した。そのソニケートを 15,000 g、4 °C 条件で 15 分間遠心分離後、上清を回収し nuclear extract fraction a (NEa) を得た。沈殿を buffer G: 0.5 ml に懸濁した。オンタイム 20 秒間、インターバルタイム 90 秒間を 1 セットとし、Bioruptor を用い、ハイレベル設定で 10 回ソニケーションを行い、沈殿を破碎した。そのソニケートを 15,000 g、4 °C 条件で 30 分間遠心分離後、上清を回収し nuclear extract fraction b (NEb) を得た。沈殿を buffer E (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM DTT, 1 mM PMSF): 0.5 ml に懸濁後、前述した条件でソニケーションを行い、沈殿を破碎した。そのソニケートを 16,000 g、4 °C 条件で 30 分間遠心分離後、上清を回収し nucleolar/Cajal bodies extract fraction (NoE) を得た。得られたフラクションのタンパク質量を希釈したサンプルと同じ濃度の detergent 存在下で検量線を作成し、タンパク質定量を行い、等量の各フラクションを用いてトリクロロ酢酸 (TCA) 沈殿、エタノール洗浄を行った。沈殿に 0.1 ml の 1 x SDS sample buffer を添加し、ミキサーで 30 分間攪拌し、溶解した。試料をイムノブロットに用いた。

第3節 結果

5-3-1 CARF による XRN2 の 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性に対する影響

緒言で述べたように第3章の結果から、CARF は XRN2 の 5'-3'エキソヌクレアーゼ活性部位に相互作用する可能性が考えられる。そこで、CARF が XRN2 の 5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を阻害する可能性について調べた。*In vitro* 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性測定には、基質として 5'-mono リン酸化 RNA を用い、酵素は XRN2 及びコントロールとして活性欠失 XRN2 変異体 (Δ N278) は Flp-In T-REx 293 細胞において過剰発現させ FLAG タグを利用して pull down 精製したものをを用いた。XRN2 及び Δ N278 の模式図を Fig. 5-2 に示した。活性測定に使用した CARF は、GST タグ融合組換えタンパク質として大腸菌において発現させたものを GST アフィニティ精製したものを、またコントロールには GST タンパク質を用いた。酵素反応後、Urea PAGE により分離した RNA をエチジウムブロマイド染色により可視化し、XRN2 酵素活性により分解された RNA 量を測定した。その模式図を Fig. 5-1 に示した。

第一段階として、C 末端に FLAG タグ、TEV プロテアーゼ認識 site、HA タグ (FEHc タグ) を付加した FEHc-XRN2 の精製を試みた。FEHc-XRN2 (wt) 恒常発現細胞を樹立、2-2-11 に記載した方法で分画した Nuclear extract fraction 1 から FLAG タグに対する pull down 法により精製した。精製した FEHc-XRN2 (wt) をイムノブロットにより解析した結果、精製した FEHc-XRN2 (wt) は pull down により精製、濃縮され、核マーカーである Lamin B を含まなかった (Fig. 5-3)。この結果から、夾雑物である他の核タンパク質の混入は少ないと判断した。この精製 FEHc-XRN2 を用いて、XRN2 の 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性測定を行うこととした。

GST-CARF 及び GST の精製を Glutathione Sepharose 4B カラムを用いて行った。得られた GST-CARF 及び GST を SDS PAGE により分離後、CBB 染色により可視化した (Fig. 5-4, 5-5)。その結果、Glutathione Sepharose 4B カラムを用いた精製により予想した分子量の GST-CARF (約 87 kDa) 及び GST (約 26 kDa) を得た。

基質として使用した 5'-mono P-RNA を合成し、8% Urea PAGE により分離した。RNA をエチジウムブロマイド染色により検出後、5'-mono-P-RNA を 1 として相対的な値を示した (Fig. 5-6 右)。また電気泳動による分子量推定により約 515 nt の 5'-mono P-RNA が合成されたことを確認した (Fig. 5-6 右)。

5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性測定の温度条件を検討した。5'-mono P-RNA 50 ng と FEHc-XRN2 を 4、25、31、34、37、40、45、65°C 条件下で 90 分間酵素反応を行った (Fig. 5-7)。その結果、40°C 反応条件の酵素活性が最も高かった。一方、高温の酵素反応は XRN2 非存在下でも 5'-mono P-RNA の分解がみられた。この分解がコントロールとして使用した XRN2 を過剰発現していない細胞から得られた画分の 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性によるものか、熱分解によるものかを明らかにするために、基質として使用した 5'-mono P-RNA を各温度条件: 4、25、31、37、45、65°C で 30 分間インキュベートし、解析した (Fig. 5-8)。その結果、65°C で 30 分間の条件で RNA の分解が観察された。前述した XRN2 の 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性測定で用いた 90 分間の反応時間でも、RNA の分解が起こったと考えられた。このことから、高温の酵素反応で観察された RNA の分解はコントロールとして使用した画分に含まれるタンパク質の影響ではないと結論づけた。以後、40°C で酵素反応を行うこととした。

観察されているリボヌクレアーゼ活性が真の XRN2 の 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性であることを示すための活性測定のネガティブコントロールとして、5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性ドメインを欠いた活性欠失変異体に FEHc タグを付加した FEHc-XRN2 (Δ N278) を用いた。FEHc-XRN2 (Δ N278) を一過的に過剰発現させた細胞を分画し、Cytosol fraction 及び Nuclear extract fraction 1 から FLAG タグに対する pull down 法により精製した。イムノブロットを行った結果、精製した FEHc-XRN2 (Δ N278) は主に Cytosol fraction に存在していた (Fig. 5-9)。Cytosol fraction から精製した FEHc-XRN2 (Δ N278) 及び FEHc-XRN2 (wt) は pull down 法により濃縮、精製され、細胞質マーカーである GAPDH を含まなかった (Fig. 5-9)。このことから、夾雑物である他の細胞質タンパク質の

混入は少ないと推測された。Cytosol fraction から精製した FEHc- XRN2 (Δ N278) 及び FEHc- XRN2 (wt) を用いて、GST-CARF による XRN2 の 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性への影響を解析した。

基質 5'-mono-P-RNA 50 ng に酵素 40 ng: FEHc-XRN2 (wt) あるいは FEHc-XRN2 (Δ N278) を添加し、GST あるいは GST-CARF (50 ng) 存在下 40°C で 10、20、30 分間酵素反応を行った。GST-CARF による XRN2 の 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性に対する影響は検出できなかった (Fig. 5-10)。さらに GST-CARF を添加する量を 800 ng に増やしたが、GST-CARF による XRN2 の 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性に対する影響は検出できなかった (結果未提示)。XRN2 を精製した際に XRN2 相互作用因子群を含んでいて、CARF の影響が検出できていない可能性が考えられた。そこで、HA タグによる pull down、TEV プロテアーゼによる溶出、そして FLAG タグによる pull down を行う 3 段階精製を行った XRN2 を用いて、5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性を測定した (Fig. 5-11, 5-12)。その結果、XRN2 の 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性が著しく低下し、XRN2 と基質を 120 分間反応させた条件でもコントロールと比較して僅かな RNA の分解しか検出されなかった。多段階精製により、XRN2 の 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性が失活した可能性が考えられる。

5-3-2 CARF による XRN2 の発現量への影響についての検証

緒言で述べた理由から CARF 薬剤誘導発現細胞及び一過的過剰発現細胞を用いて CARF による XRN2 の発現量への影響について解析した。その結果、CARF の過剰発現による XRN2 の発現量への影響は検出されなかった (Fig. 5-13-a, 5-13-b)。さらに CARF のノックダウンによる XRN2 の発現量に対する影響についても解析した。CARF ノックダウンにより CARF の mRNA 量が 20%程度まで減少した細胞においても、XRN2 の発現量に影響がなかった (Fig. 5-14)。

5-3-3 CARF による XRN2 の細胞内局在の変動

CARF が XRN2 の細胞内分布を変えることにより 5'ETS 領域の pre-rRNA プロセッシングにおける XRN2 の働きを阻害する可能性について調べた。はじめに、CARF の過剰発現により XRN2 の細胞内分布が変化するか調べた。CARF 薬剤誘導発現細胞を用いて CARF の発現による XRN2 の細胞内分布への影響を免疫染色により解析した。その結果、CARF が過剰発現した細胞では XRN2 が核にも核小体にも分布するが、そのうち核小体への分布が減弱した (Fig. 5-15)。CARF が過剰発現した細胞において XRN2 の分布が変化した細胞数を調べた結果、免疫染色した写真 12 枚中平均 92.8%の細胞において XRN2 の核小体での染色が減弱した。

次に、CARF 恒常発現細胞における XRN2 の細胞内分布を解析した。その結果、CARF 恒常発現細胞において CARF 薬剤誘導発現による影響と同様に XRN2 は核にも核小体にも分布するが、そのうち核小体の分布が減弱した (Fig. 5-16)。他の過剰発現系を用いても CARF が XRN2 の細胞内分布を変化させた。

また、前述した XRN2 の細胞内分布変化が CARF と XRN2 の相互作用によるものなのか間接的な影響なのかを CARF 変異体恒常発現細胞を用いて調べた。その結果、第 3 章において XRN2 との相互作用がみられなかった CARF 変異体: C1、C2、NC を恒常発現した細胞では XRN2 の細胞内分布の変化は観察されなかった (Fig. 5-17)。一方で、XRN2 との相互作用した CARF 変異体: N1、N2 の恒常発現細胞では XRN2 の細胞内分布の変化が観察された (Fig. 5-17)。これらの結果から、CARF との相互作用が XRN2 の細胞内分布を変化させることが明らかになった。

次に、CARF 恒常発現細胞に siRNA による CARF のノックダウンを行うことにより XRN2 の細胞内分布が元に戻るか調べた。XRN2 の核内の分布を調べるために核小体のマーカーである Fibrillarin の分布を調べた。その結果、CARF のノックダウンによって FLAG-CARF 染色の減弱がみられた細胞では、XRN2 の核小体での染色が確認された (Fig. 5-18)。このことは、CARF が XRN2 を核質に留めることを示唆している。

最後に、蛍光免疫染色の手法に加えて、細胞分画法を用いて XRN2 の細胞内分布が CARF によって変化するのか検証した。siRNA により CARF をノックダウンした HeLa 細胞を細胞分画し、イムノブロットにより XRN2 の細胞内分布を調べた。その結果、CARF のノックダウンにより Nucleolar/Cajal bodies extract fraction における XRN2 の分布が増加し、Nuclear extract fraction a における XRN2 の量が減少した (Fig. 5-19)。このことから、CARF が XRN2 を核質に留める機構に関与することが示唆された。逆に、CARF 恒常発現細胞を分画し、イムノブロットにより CARF 過剰発現による XRN2 の細胞内分布への影響を調べた。その結果、CARF 恒常発現細胞は親細胞株 Flp-In T-REx 293 細胞と比べて、Nucleolar/Cajal bodies extract フラクションにおける XRN2 の量が減少し、Nuclear extract fraction a における XRN2 の量が増加した (Fig. 5-20)。このことから、細胞分画法を用いても CARF が XRN2 の細胞内局在を核質に留めることが明らかになった。

第4節 小括

前章において、5'ETS 領域の pre-rRNA プロセッシングにおける XRN2 の働きを CARF が阻害することが明らかになったことから、その作用機序について調べた。CARF が XRN2 の酵素活性を阻害することにより、XRN2 が有する 5'ETS 領域の pre-rRNA プロセッシングの過程が阻害される可能性について解析した。XRN2 を過剰発現させた細胞から 3 段階精製により得られた XRN2 の 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性は著しく低下していた(Fig. 5-11, 5-12)。多段階の精製により、XRN2 を失活させた可能性が考えられる。原因として 1) 精製に時間が掛かったために途中で酵素活性が失活した、2) 酵母オーソログ Rat1 の酵素活性が Rai1 により促進される (192) ように XRN2 の酵素活性には他の因子が必要であり、3 段階精製を行う途中でその因子が外れた可能性が考えられた。大腸菌で発現させ精製した recombinant XRN2 を用いた *in vitro* での XRN2 の 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性測定の報告があることから (180)、前述の 2) の可能性は除外した。そこで、HA タグに対する pull down 法と FLAG タグに対する pull down 法で比較し、収量の多かった FLAG タグに対する pull down 法のみで精製した FEHc-XRN2 を用いて 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性測定を行った (Fig. 5-7)。その結果、XRN2 の 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性が十分に測定可能であった。さらに、分画した細胞抽出液から精製した XRN2 を用いて 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性測定を行った。コントロールとして用いた $\Delta N278$ が cytosol fraction に分画された。そこで、夾雑物を同じにするために XRN2 についても cytosol fraction 分画から精製した。第 3 章 3-3-3 の mKG レポーターシステムを用いた結果から、CARF と XRN2 は核質で相互作用するので、核質と細胞質で XRN2 のリン酸化などの修飾が異なり、cytosol fraction から精製した XRN2 を用いた 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性への CARF の影響が検出されなかった可能性も考えられる。活性測定に用いた XRN2 は FLAG タグに対する pull down のみを用いた精製だったので、CARF を含む XRN2 相互作用因子群を含んでいる可能性が考えられる。このために精製した recombinant CARF を反応させても、5'-3'エキソリボヌクレアーゼ活性に影響がみられなかった可能性

も考えられる。酵素反応開始 10 分後に基質である RNA が全て分解されていることから (Fig. 5-10)、反応時間や温度、XRN2、基質、CARF の添加量などの条件を検討することが必要である。CARF が XRN2 の酵素活性へどのような影響を与えるかを結論づけるには更なる検証が必要である。*C. elegans* では、CARF の N 末端領域に存在する DUF3469 ドメインを持つ PAXT-1 は XRN2 のエキソリボヌレアーゼ活性を促進する (133)。PAXT-1 の DUF3469 ドメインは XRN2 のエキソリボヌレアーゼ活性へ影響を与えるのではなく、XRN2 との相互作用の安定化に働いている (133) ことから、CARF は XRN2 のエキソリボヌレアーゼ活性に影響を与えない可能性が考えられる。

CARF が XRN2 の細胞内分布を変えて 5'ETS 領域の pre-rRNA プロセッシングにおける XRN2 の働きを阻害する可能性について解析した。免疫染色法により CARF を過剰発現させた影響を調べた結果、核質及び核小体で見られた XRN2 の染色のうち核小体での染色が減弱した (Fig. 5-15, 5-16)。この CARF の過剰発現による XRN2 の核小体での染色の減弱が CARF のノックダウンによって、XRN2 の核小体での染色が確認されるようになった (Fig. 5-18)。これらの結果から、CARF が XRN2 を核質に留めることが明らかになった。XRN2 の細胞内局在変化が CARF と XRN2 の相互作用によるのか間接的なものなのかを調べた際に、CARF 変異体 NC は非常に発現が低く、免疫染色によるはっきりした染色像が得られなかった。これは第 3 章における一過的過剰発現の実験系においても発現が確認できなかった結果とも符合する。細胞分画法を用いた生化学的手法により XRN2 の細胞内分布が CARF により制御されるのか解析した結果でも、CARF が XRN2 を核質に留めていた (Fig. 5-19, 5-20)。免疫染色法を用いた実験及び生化学的手法を用いた実験でも HeLa 細胞、Flp-In T-REx 293 細胞と 2 種の細胞株を用いたことから、ある細胞株特異的な現象とは考えにくい。

以上の結果から、CARF は XRN2 を核質に留めることにより、5'ETS 領域の pre-rRNA プロセッシングにおける XRN2 の働きを阻害することが明らかになった。次章では総括として本論文を簡潔にまとめ、今回発見した CARF の新規細胞内機能の生理的意義について

包括的に議論を試みる。

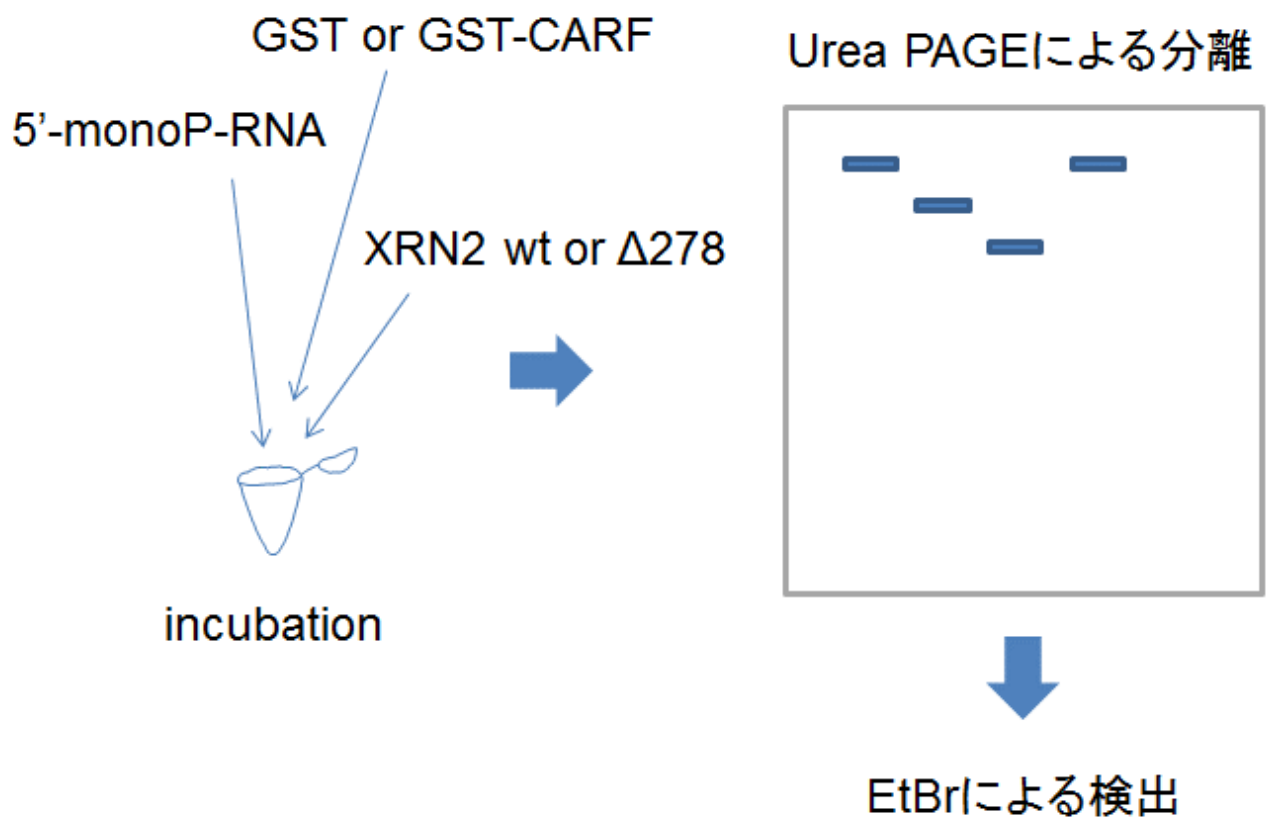


Fig. 5-1 XRN2のエキソリボヌクラーゼ活性測定模式図

XRN2

XRN_N: 5'-3' exonuclease N-terminus domain

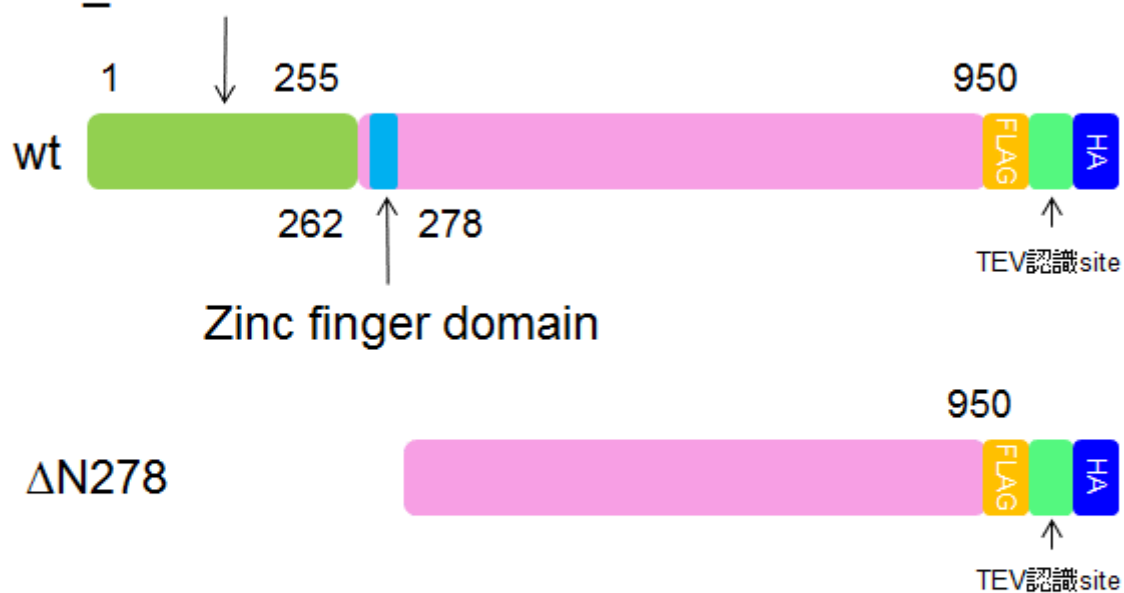


Fig. 5-2 XRN2変異体のタンパク質の模式図

XRN2のエキソリボヌクラーゼ活性測定に用いたXRN2の模式図を示した。

wt : wild type

$\Delta N278$: N末端側1-278アミノ酸を欠損した変異体

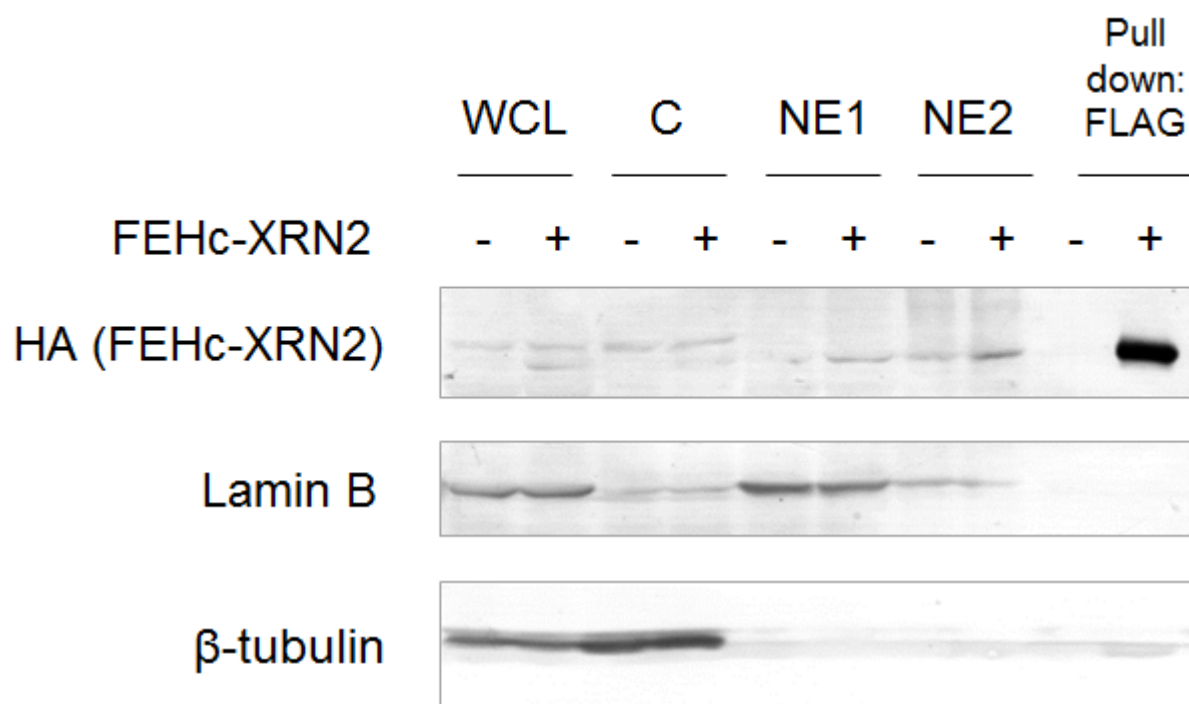


Fig. 5-3 FEHc-XRN2恒常発現細胞を用いたXRN2の精製

FEHc-XRN2恒常発現細胞を分画し、NE1フラクションを用いてFLAGタグタンパク質に対するpull down法によりFEHc-XRN2を精製した。抗HA抗体を用いたイムノプロット法により精製したXRN2を検出した。分画マーカーとして抗Lamin B抗体、抗β-tubulin抗体を用いたイムノプロットも行った。用いた抗体を左側に示した。

WCL: 細胞全抽出液, C: Cytosol, NE1: Nuclear extract fraction 1, NE2: Nuclear extract fraction 2についてそれぞれ15 μgを解析した。IP: 6 × 10⁷ cellから得られたFEHc-XRN2の1/6を解析した。

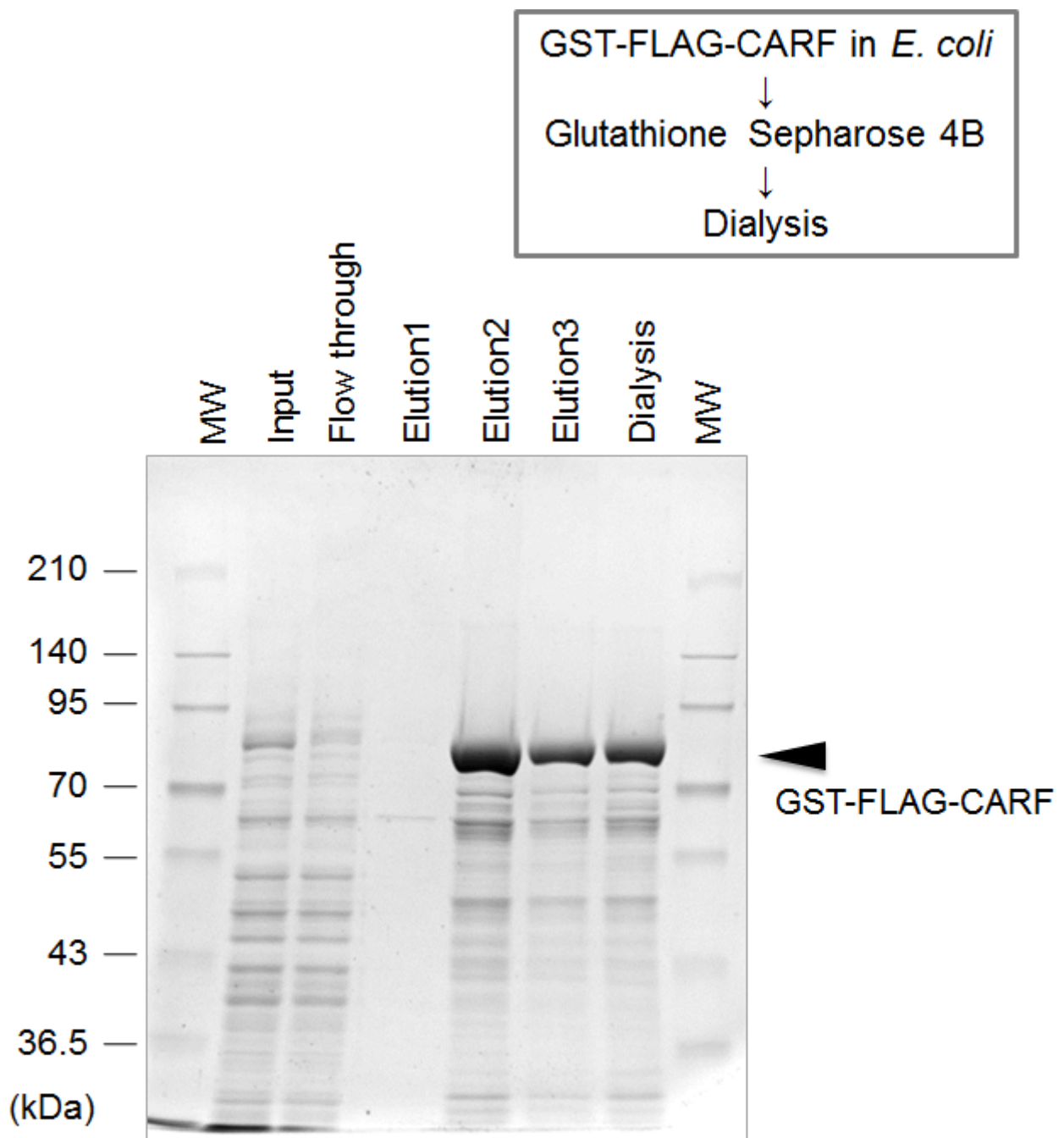


Fig. 5-4 GST-CARFの精製

0.7 mM IPTGでGST-CARFの発現を誘導し、Glutathione Sepharose 4Bカラムを用いてGST-CARFを精製した。還元型glutathioneを用いて溶出後、Elution2を透析した。各フラクションをSDS PAGEにより分離後、CBB染色により可視化した。

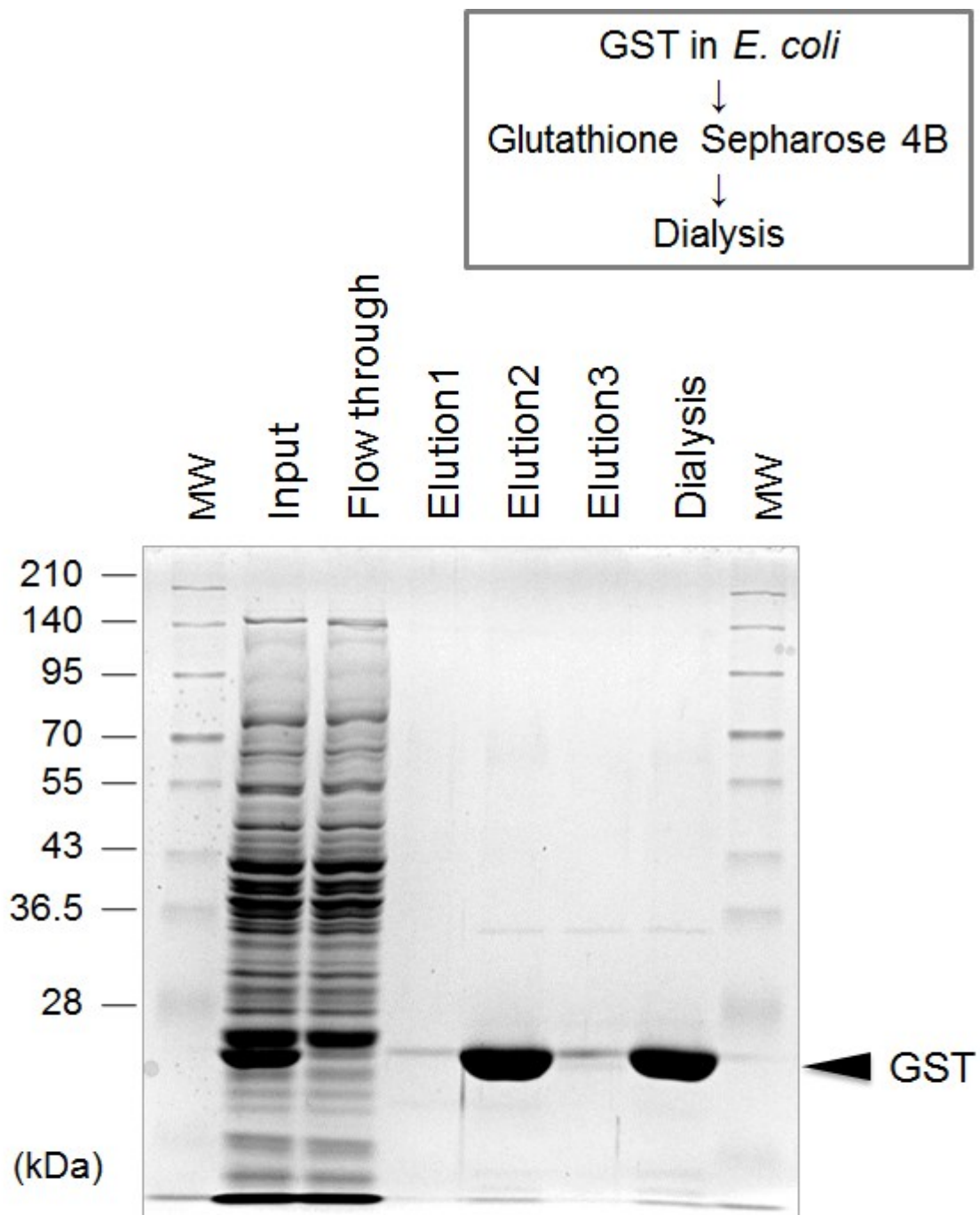


Fig. 5-5 GSTの精製

0.7 mM IPTGでGSTの発現を誘導し、Glutathione Sepharose 4Bカラムを用いてGSTを精製した。還元型glutathioneを用いて溶出後、Elution2を透析した。各フラクションをSDS PAGEにより分離後、CBB染色により可視化した。

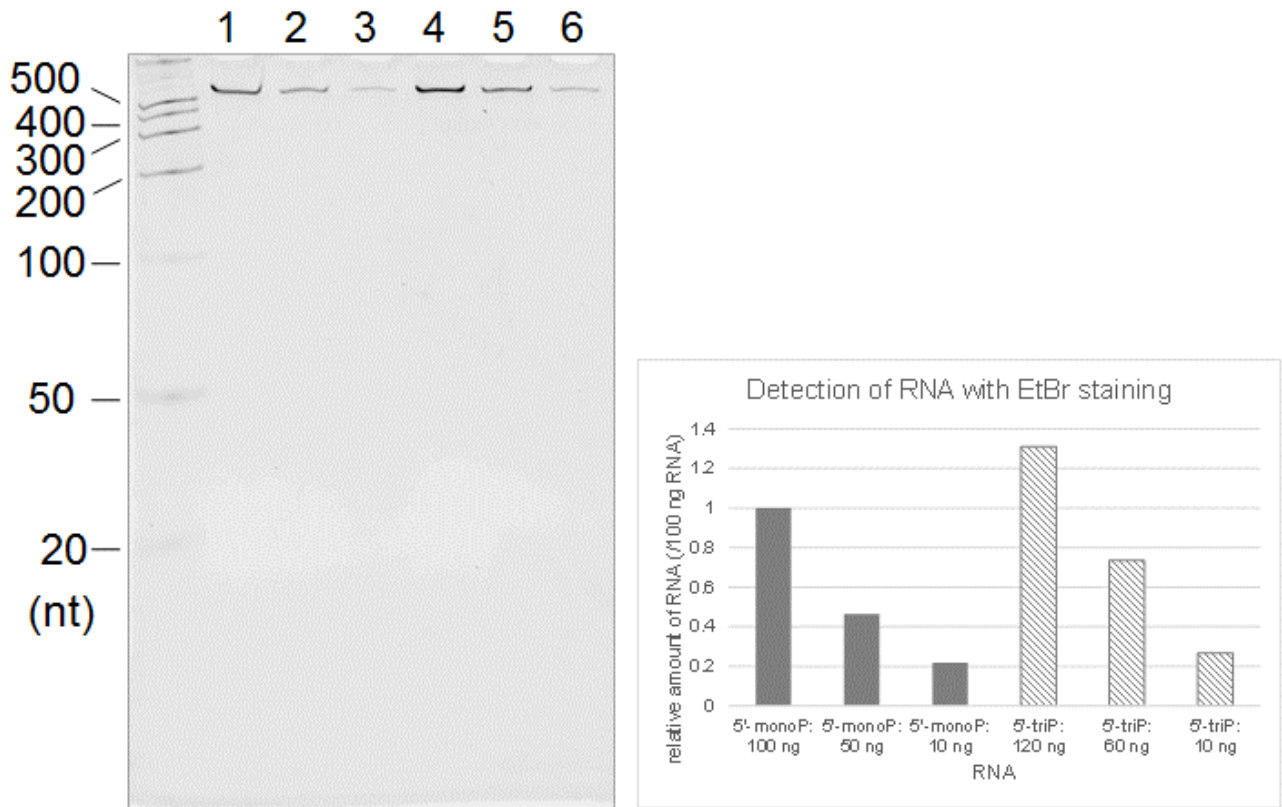


Fig. 5-6 pSPT19/AflIII: 5'-monoP-, 5'-triP- RNAの合成

RNA合成用pSPT19プラスミドベクターをAflIIIで切断し、SP6RNAポリメラーゼにより転写反応を行った。合成されたRNAをフェノールクロロホルム抽出、インプロパノール沈殿後8%Urea PAGEにより分離した。エチジウムブロマイド染色によりRNAを検出後、5'-mono-P-RNAを1として相対的な値を示した。レーン1: 5'-mono-P-RNA 100ng、レーン2: 5'-mono-P-RNA 50ng、レーン3: 5'-mono-P-RNA 10ng、レーン4: 5'-tri-P-RNA 120ng、レーン5: 5'-tri-P-RNA 60ng、レーン6: 5'-tri-P-RNA 10ng

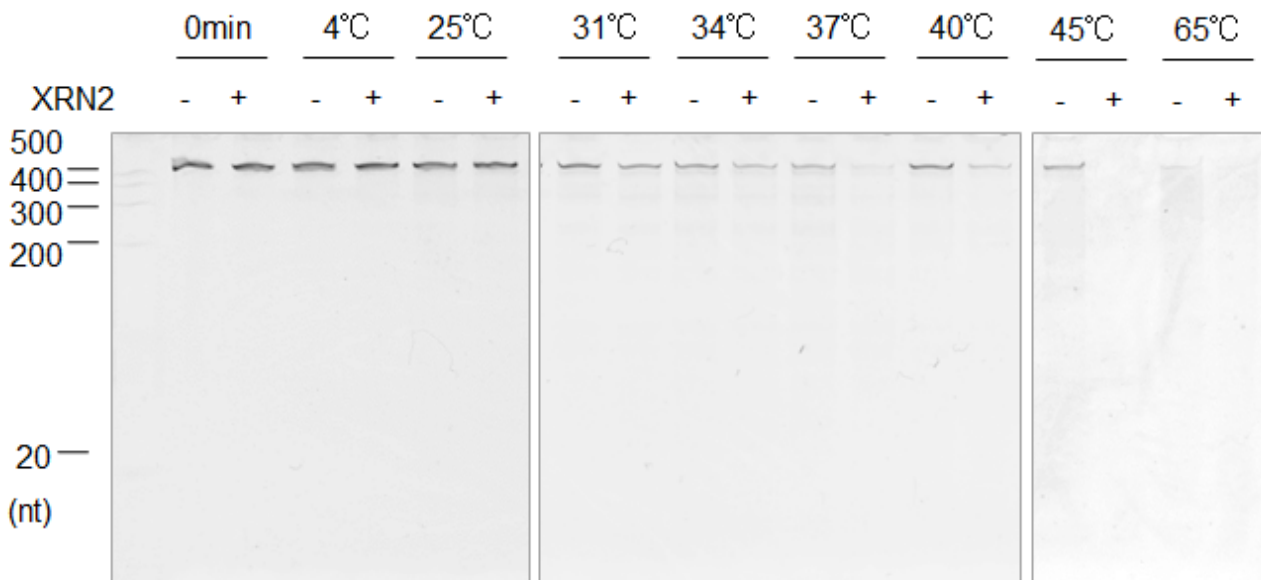
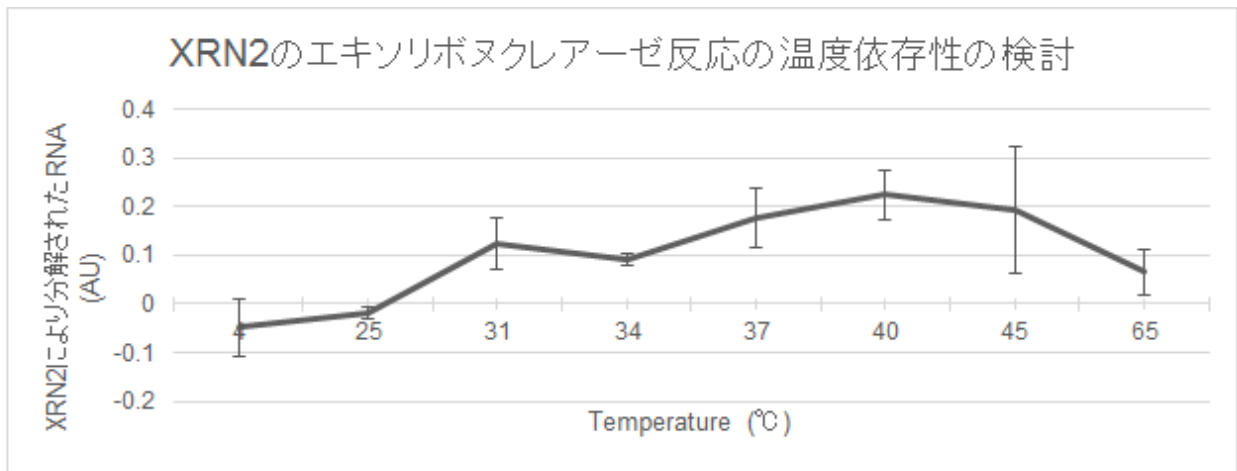


Fig. 5-7 XRN2のエキソリボヌクラーゼ反応の温度依存性の検討

XRN2と5'-monoリン酸化RNAをグラフに示した各温度条件でインキュベートしエキソリボヌクラーゼ反応を行った。その反応物をUrea PAGEによりRNAを分離し、エチジウムブロマイド染色により検出した。XRN2を過剰発現していない細胞から得られた画分を未反応コントロールとして、反応後のRNA量との差からXRN2により分解されたRNA量をArbitrary Unit (AU)として表し、XRN2のエキソリボヌクラーゼ活性測定とした。(n=2-4) Error bar: standard deviation

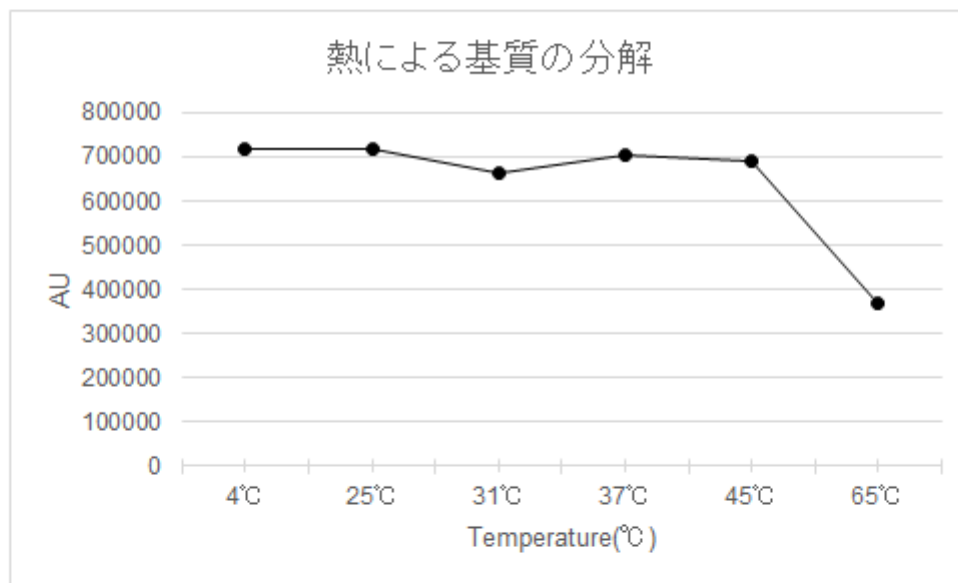
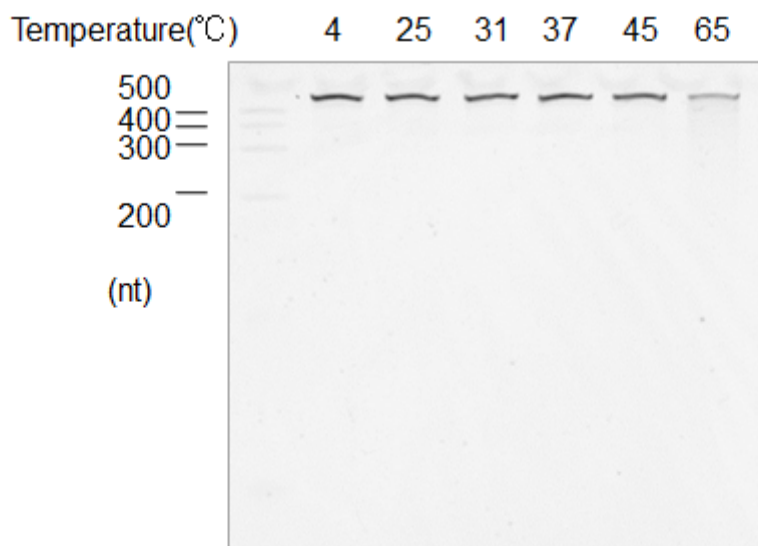


Fig. 5-8 XRN2のエキソリボヌクラーゼ反応における基質の熱安定性の検討

エキソリボヌクラーゼ活性測定のための基質として用いた5'-monoリン酸化RNAを各温度条件で30分間インキュベートして、その安定性を解析した。その反応物をUrea PAGEによりRNAを分離し、エチジウムブロマイド染色により残存する基質の相対的な量をArbitrary Unit (AU) で示した。

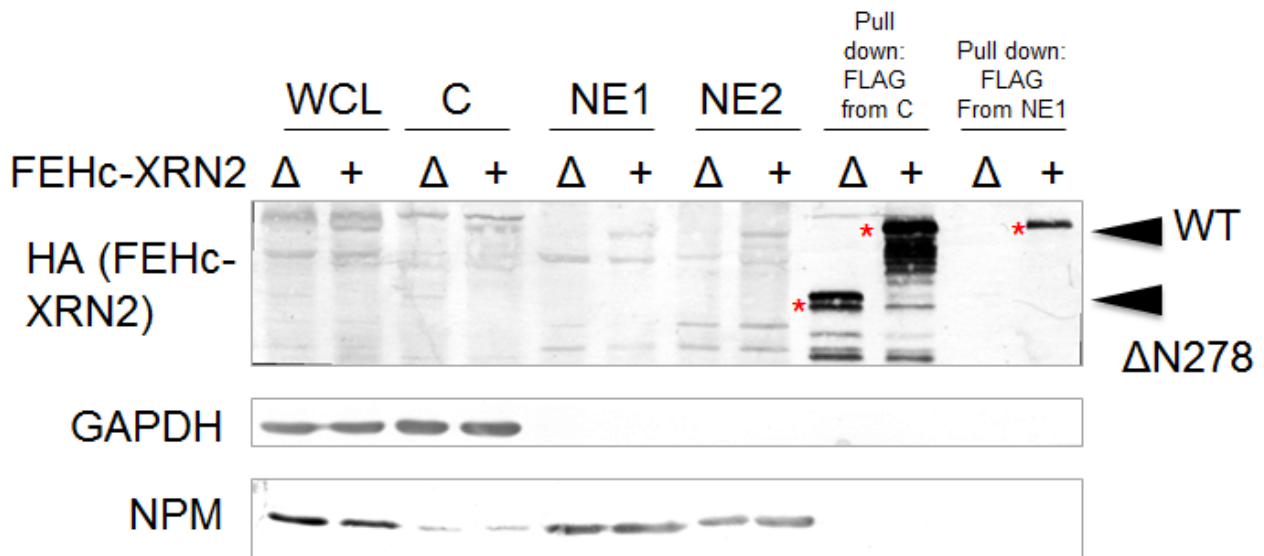


Fig. 5-9 一過的過剰発現細胞を用いたFEHc-XRN2 (wt) およびFEHc-XRN2 (Δ N278) の精製

FEHc-XRN2 (wt) およびFEHc-XRN2 (Δ N278)を一過的に過剰発現させた細胞を分画し、Cytosol fractionおよびNuclear extract fraction 1を用いてFLAGタグに対するpull downによりFEHc-XRN2 (wt) およびFEHc-XRN2 (Δ N278)を精製した。抗HA抗体を用いたイムノブロットにより精製したXRN2を解析した。Cytosolのマーカースとして抗GAPDH抗体、核のマーカースとして抗NPM抗体を用いた。用いた抗体を左側に示した。WCL: 細胞全抽出液, C: Cytosol fraction, NE1: Nuclear extract fraction 1, NE2: Nuclear extract fraction 2についてそれぞれ30 μ gを解析した。Pull down: 6×10^7 cellから得られたFEHc-XRN2の1/6を解析した。XRN2変異体を*で示した。

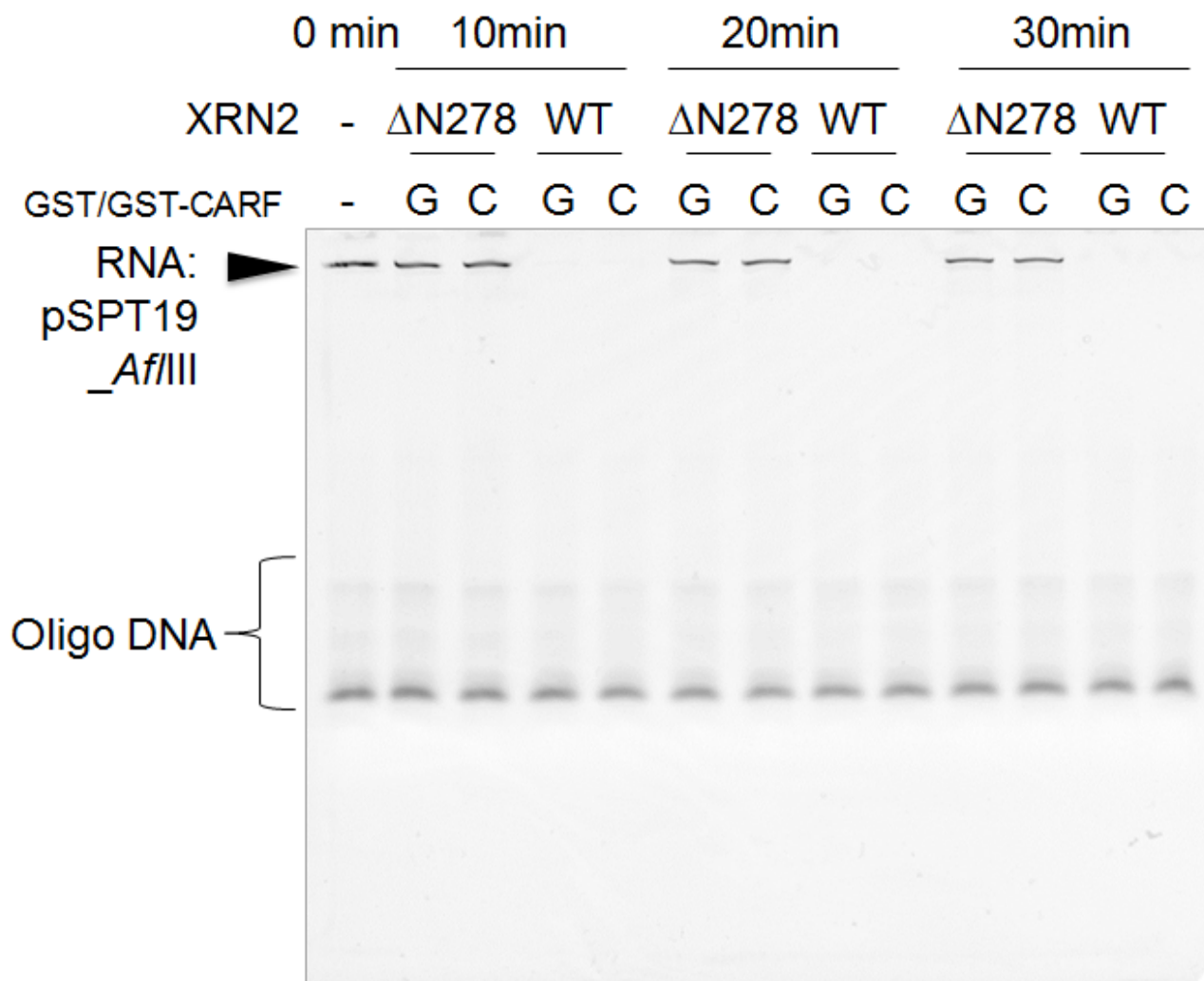


Fig. 5-10 XRN2のエキソリボヌクラーゼ活性へのCARFの影響についての検討

XRN2と5'-monoリン酸化RNAをインキュベートしエキソリボヌクラーゼ反応を行った。その反応物をUrea PAGEによりRNAを分離し、エチジウムブロマイド染色により検出した。コントロールとしてXRN2変異体 Δ N278を用いた。酵素反応時間を上部に示した。WT: XRN2 wild type、 Δ N278: XRN2 Δ N278、G: GST、C: GST-CARFと表記した。分離されたRNAおよびDNAは左側に示した。

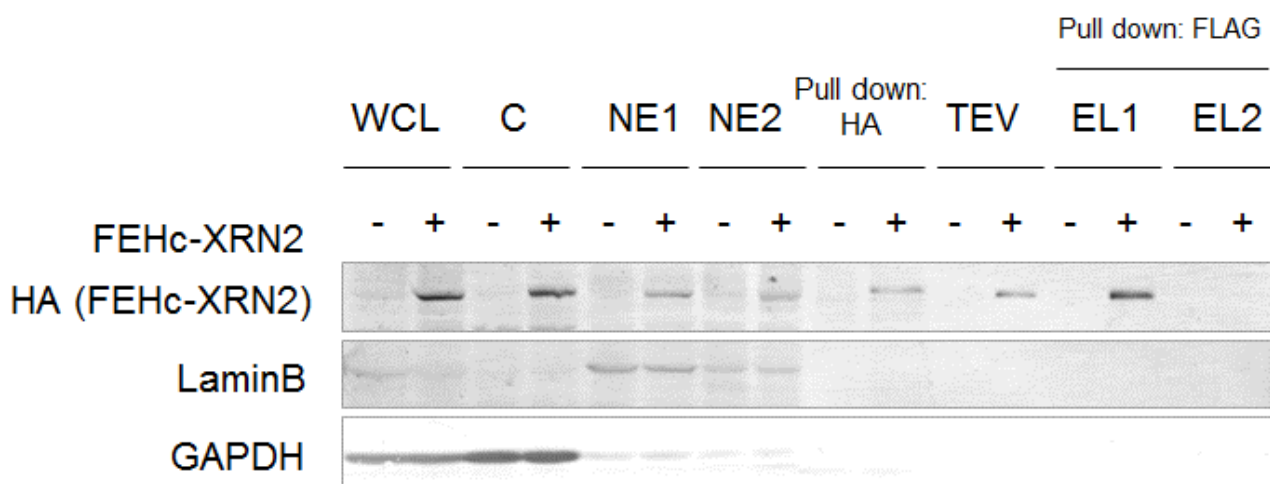


Fig. 5-11 3段階精製によるFEHc-XRN2 (wt) の精製

FEHc-XRN2 (wt)を一過的に過剰発現させた細胞を分画し、Nuclear extract fraction 1を用いてHAタグによるpull down後、TEVプロテアーゼによる溶出を行った。そのフラクションを用いて、FLAGタグによるpull downを行い、3段階精製した。抗HA抗体を用いたイムノプロットにより精製したXRN2を解析した。Cytosolのマーカースとして抗GAPDH抗体、核のマーカースとして抗LaminB抗体を用いた。用いた抗体を左側に示した。WCL: 細胞全抽出液, C: Cytosol fraction, NE1: Nuclear extract fraction 1, NE2: Nuclear extract fraction 2についてそれぞれ15 μ gを解析した。Pull down: HA: 1.8×10^7 cellからHAタグに対するpull down後のビーズ、TEV: TEVプロテアーゼによる溶出後得られたフラクション、Pull down: FLAG (EL1, EL2): 溶出フラクションからFLAGタグに対するpull down後、FLAGペプチドで溶出したフラクションそれぞれを1/60を解析した。

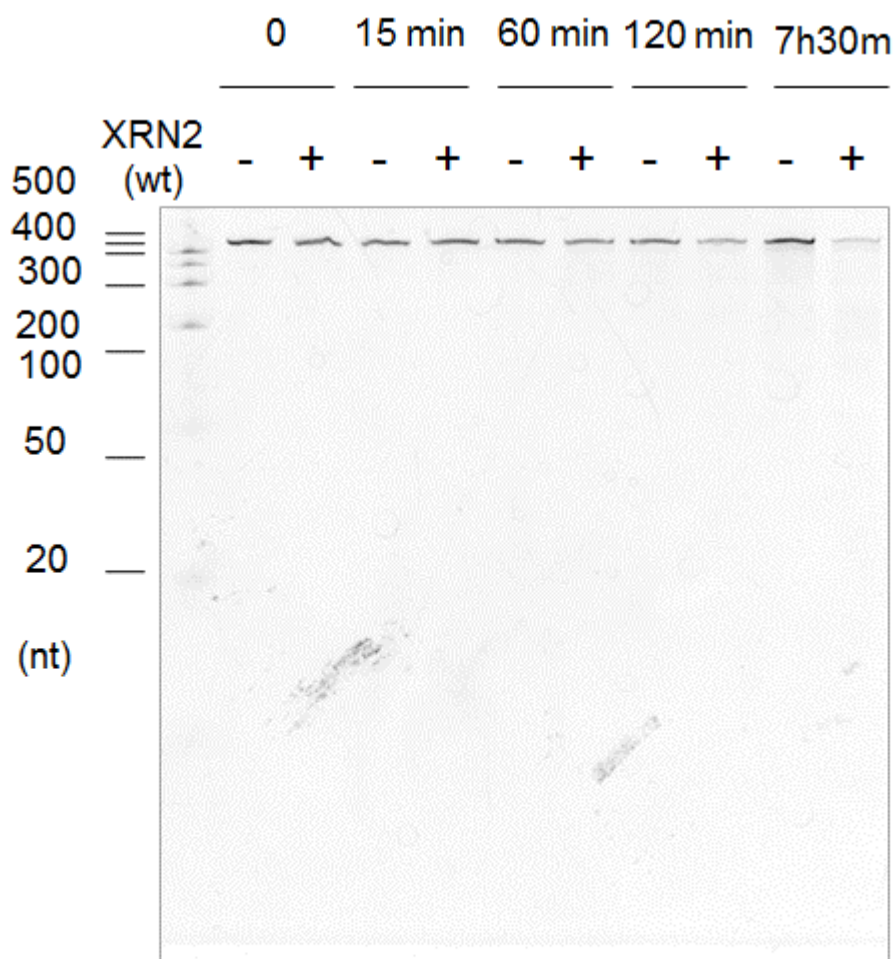


Fig. 5-12 3段階精製したXRN2のエキソリボヌクラーゼ活性

XRN2と5'-monoリン酸化RNAをインキュベートしエキソリボヌクラーゼ反応を行った。その反応物を経時的に採取してUrea PAGEによりRNAを分離し、エチジウムブロマイド染色により検出した。コントロールとしてpcDNA3.1(+)をトランスフェクションした細胞から得られたフラクションを用いた。酵素反応時間を上部に示した。

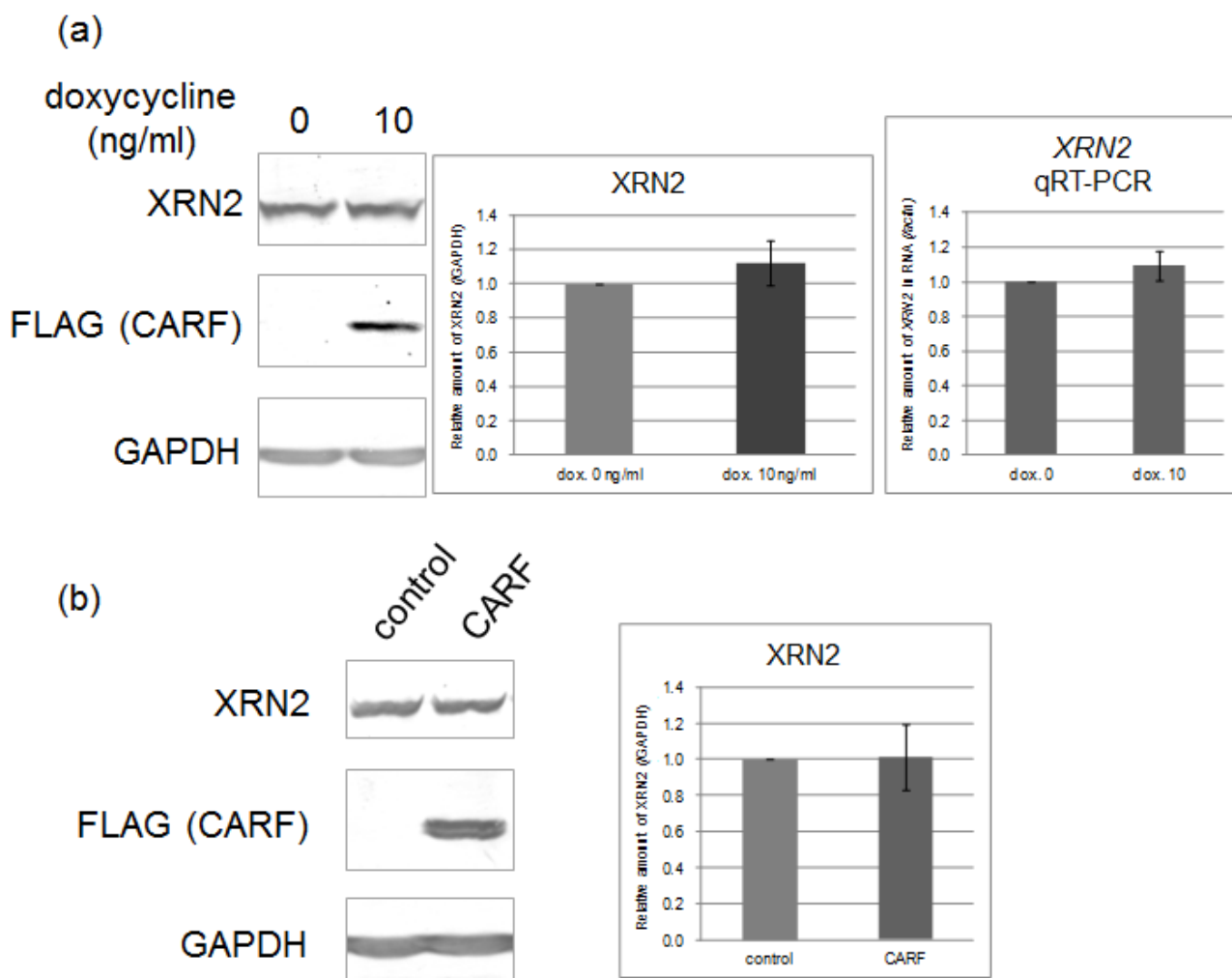


Fig. 5-13 CARF過剰発現によるXRN2の発現量への影響についての検討

CARF過剰発現によるXRN2の発現量への影響についてCARF薬剤誘導発現細胞とCARF一過的過剰発現細胞のXRN2の発現量を調べた。(a) 10 ng/ml doxycyclineにより72時間CARFの発現を誘導したTOCARF細胞の細胞抽出液20 μ gを用いてイムノプロットにより解析した。使用した抗体は左側に示した。コントロールとしてdoxycycline非添加細胞を用いた。(b) HeLa細胞にCARF-FLAG発現プラスミドベクターをトランスフェクションし、イムノプロットによりXRN2の発現量を調べた。使用した抗体は左側に示した。コントロールとしてFLAGタグのみを発現するプラスミドベクターを用いた。(a)、(b) ローディングコントロールとして抗GAPDH抗体を用いた。イムノプロットの結果をImage Jにより定量化し、GAPDHを用いてノーマライズし、相対的な値を示した (n=3)。(a) qRT-PCRによりXRN2のmRNA量を調べた。*actin*を内部標準としてノーマライズし、相対的な値を示した (n=3)。Error bar: standard deviation

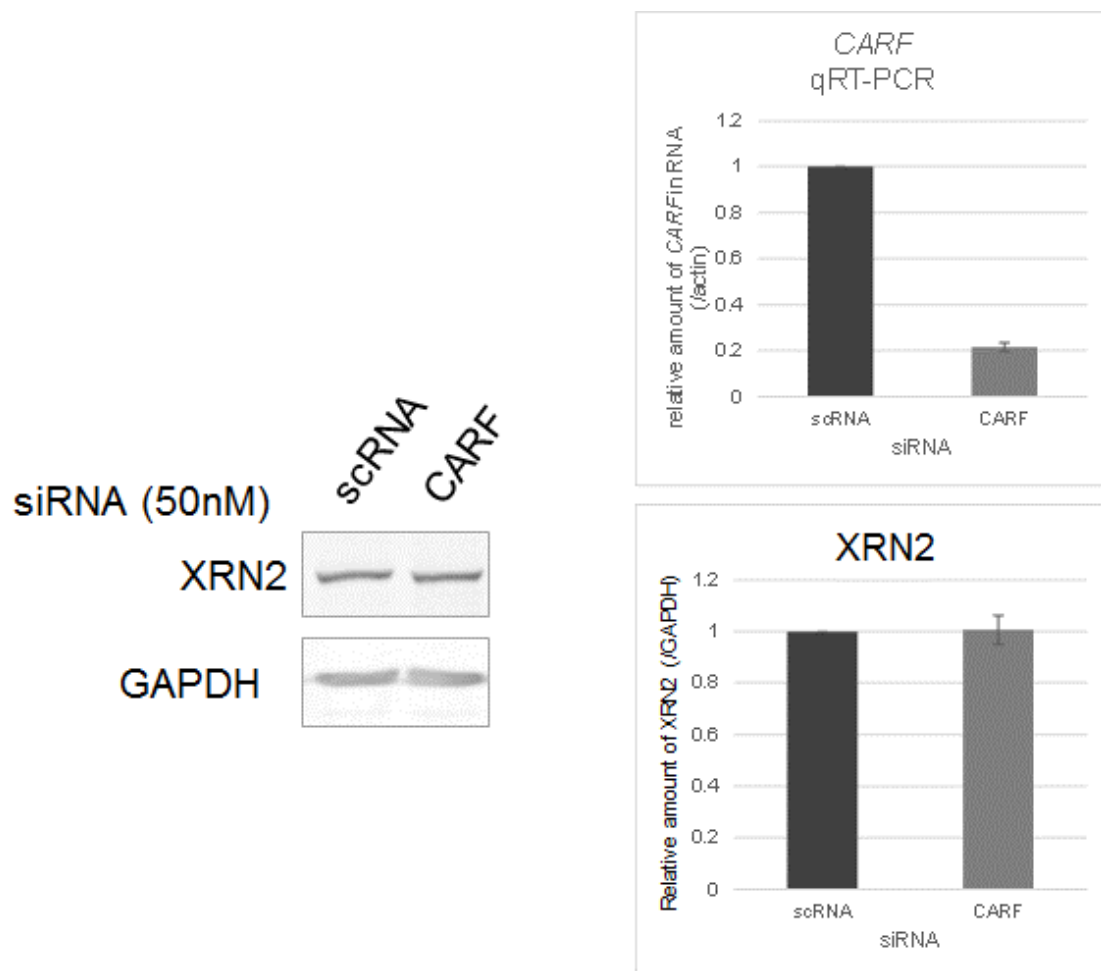


Fig. 5-14 CARFノックダウンによるXRN2の発現量への影響についての検討

HeLa細胞にsiRNAを用いてCARFをノックダウンした際のXRN2の発現量を解析した。HeLa細胞にCARFのsiRNAをトランスフェクション後、total RNAおよび細胞抽出液を回収し、RNAを用いてqRT-PCRによりCARFのmRNA量を調べた。内部標準としてactinを用いてノーマライズし、相対的な値を示した。コントロールとしてscRNAをトランスフェクションした (n=3)。細胞抽出液10 μgを用いてイムノプロットにより解析した。使用した抗体は左側に示した。ローディングコントロールとして抗GAPDH抗体を用いた。イムノプロットの結果をImage Jにより定量化し、GAPDHを用いてノーマライズし、相対的な値を示した。Error bar: standard deviation

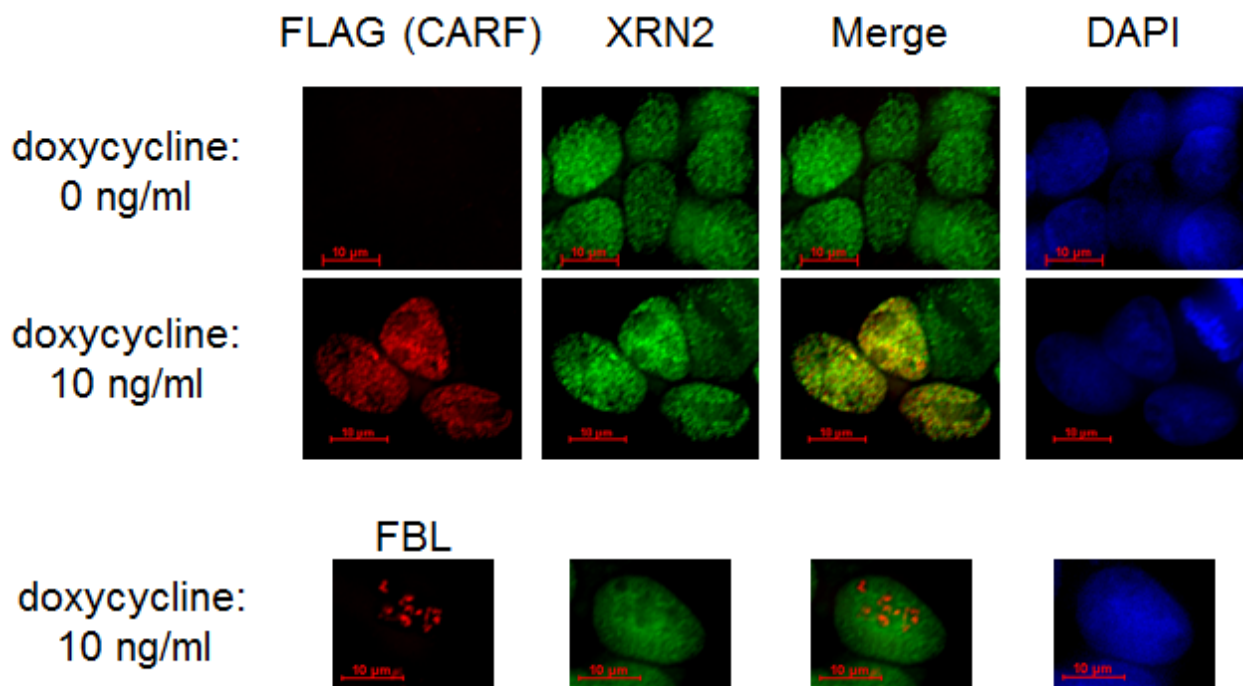


Fig. 5-15 CARF薬剤誘導発現細胞を用いたCARF過剰発現によるXRN2の細胞内局在への影響についての検討

10 ng/ml doxycyclineによりCARF発現誘導したCARF薬剤誘導発現細胞のXRN2の細胞内局在を免疫染色法により調べた。使用した抗体は上部に示した。コントロールとしてdoxycycline非添加細胞を用いた。核はDAPIで染色した。核小体マーカーとしてFBLの免疫染色を行った。スケールバーは10 μm 。

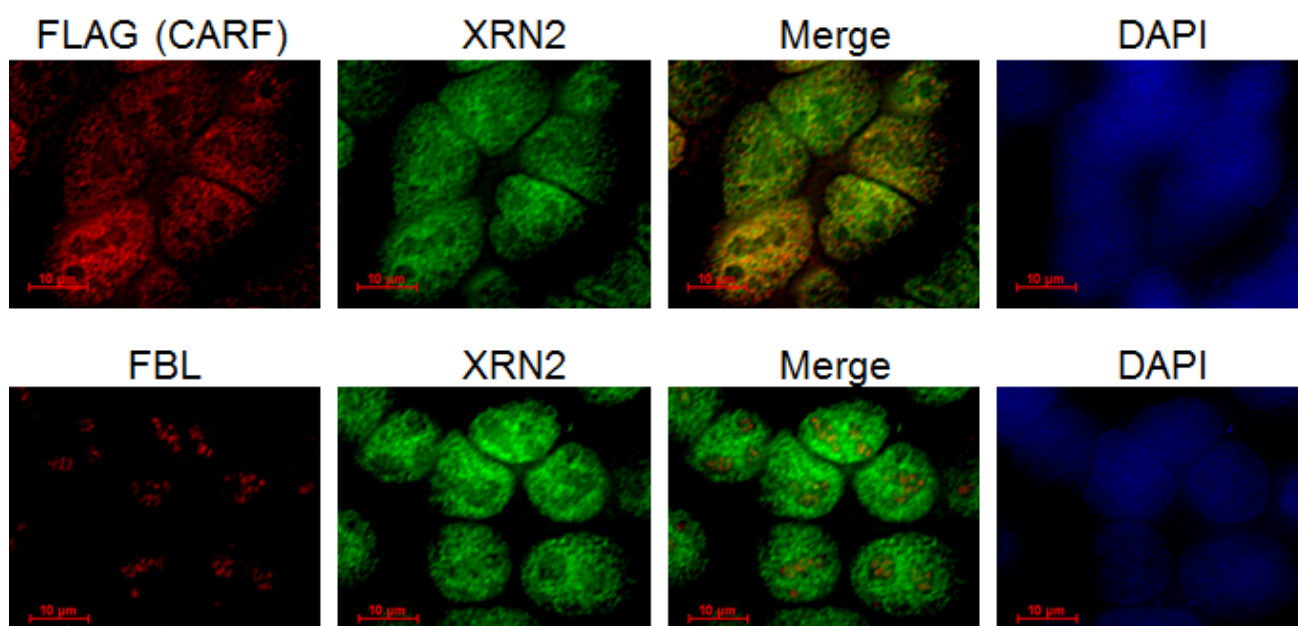


Fig. 5-16 CARF恒常発現細胞を用いたCARF過剰発現によるXRN2の細胞内局在への影響についての検討

CARF恒常発現細胞のXRN2の細胞内局在を免疫染色法により調べた。使用した抗体は上部に示した。核はDAPIで染色した。核小体マーカーとしてFibrillarin (FBL)の免疫染色を行った。スケールバーは10 μm。

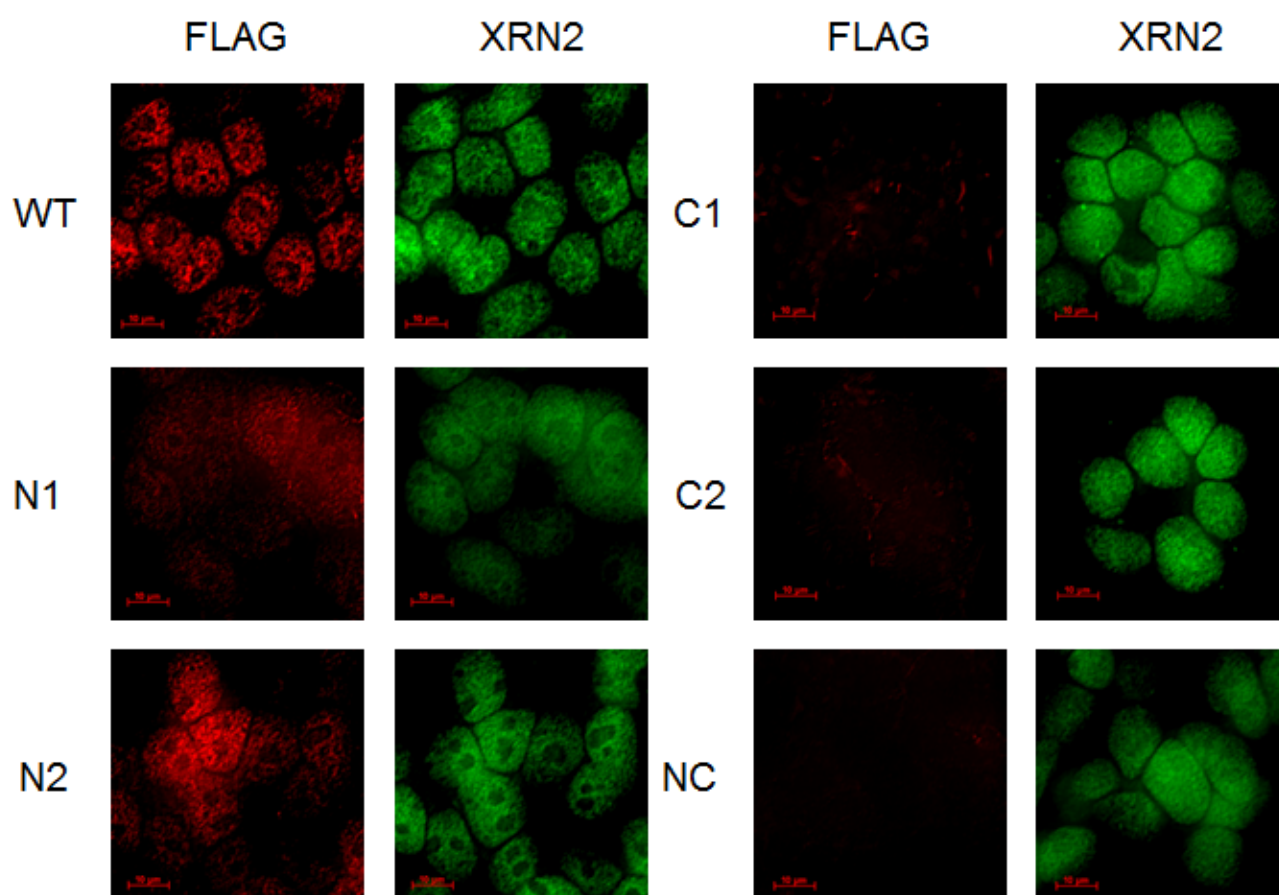


Fig. 5-17 CARF変異体恒常発現細胞を用いたCARF過剰発現によるXRN2の細胞内局在への影響についての検討

CARF変異体恒常発現細胞のXRN2の細胞内局在を免疫染色法により調べた。使用した抗体は上部に示した。CARF変異体を写真の左側に示し、各変異体の模式図はFig. 3-9に示した。N1: CARF変異体1-425 aa、N2: CARF変異体1-180 aa、C1: CARF変異体175-580 aa、C2: CARF変異体417-580 aa、NC: CARF変異体175-425 aa、スケールバーは10 μm。

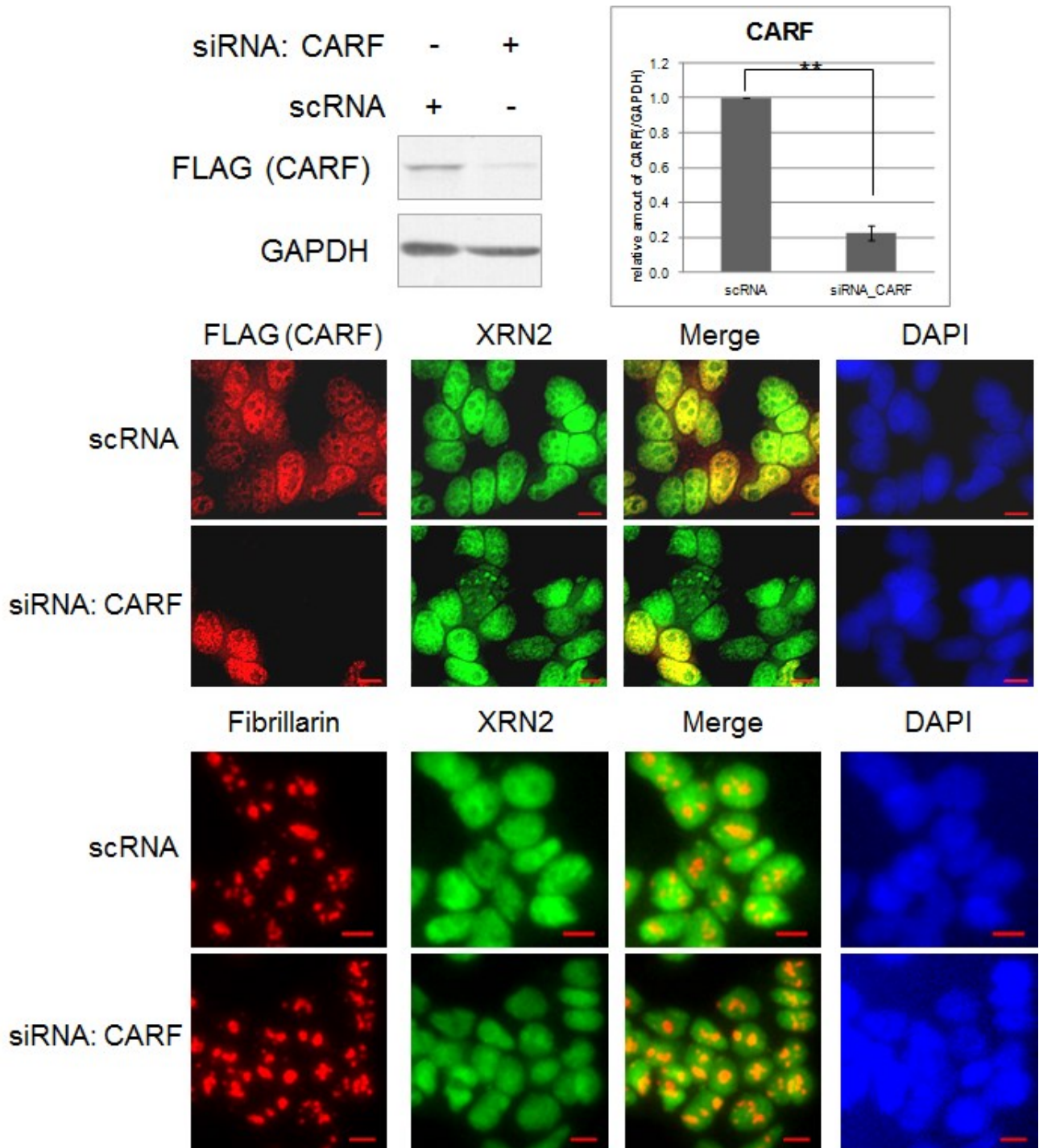


Fig. 5-18 CARF恒常発現細胞を用いたCARFノックダウンによるXRN2の細胞内局在への影響についての検討

CARF恒常発現細胞に対してCARFのノックダウンすることによりXRN2の細胞内局在が元に戻るかを免疫染色法により調べた。使用した抗体は上部に示した。核はDAPIで染色した。スケールバーは10 μ m。CARFのノックダウン効率を免疫プロットにより解析した。抗体を左側に示した。ローディングコントロールとして抗GAPDH抗体を用いて免疫プロットを行い、CARFの値をノーマライズし相対的な値を示した。**student's t-test: $p < 0.01$. Error bar: standard deviation

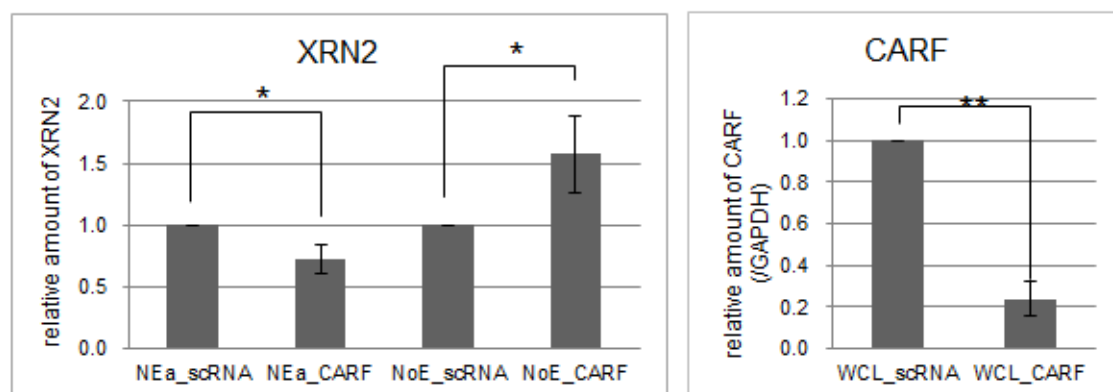
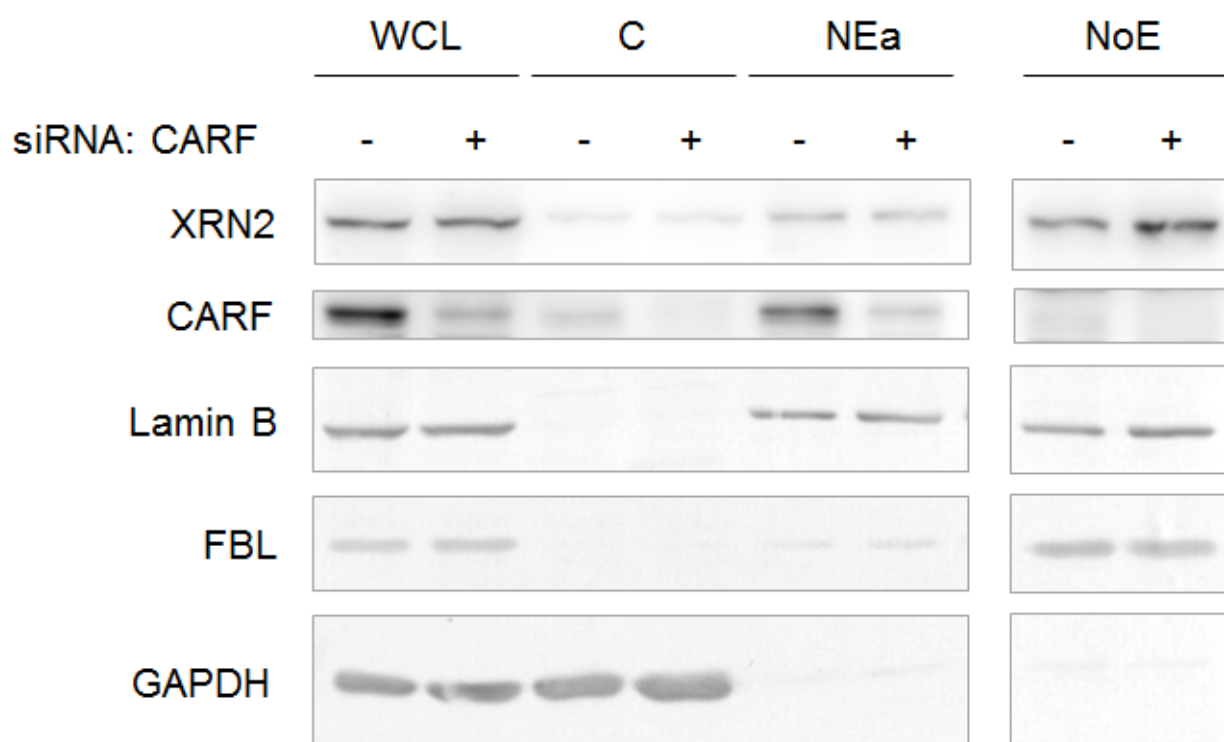


Fig. 5-19 細胞分画法を用いたCARFノックダウンによるXRN2の細胞内局在への影響についての検討

CARFをノックダウンしたHeLa細胞を分画し、免疫ブロットにより解析した。コントロールとしてscRNAをトランスフェクションした。抗CARF抗体、抗XRN2抗体、核のマーカースとして抗Lamin B抗体、核小体のマーカースとして抗FBL抗体、Cytosolのマーカースとして抗GAPDH抗体を用いた。用いた抗体を左側に示した。WCL: Whole cell lysate, C: Cytosol fraction, NEa: Nuclear extract fraction a, NoE: Nucleolar/Cajal bodies extract fractionをそれぞれ10 μ g用いた。免疫ブロットの結果はそれぞれの分画マーカースを内部標準として用いてノーマライズし、コントロールに対する相対的な値を示した(n=3)。* student's t-test: p < 0.05; ** student's t-test: p < 0.01. Error bar: standard deviation

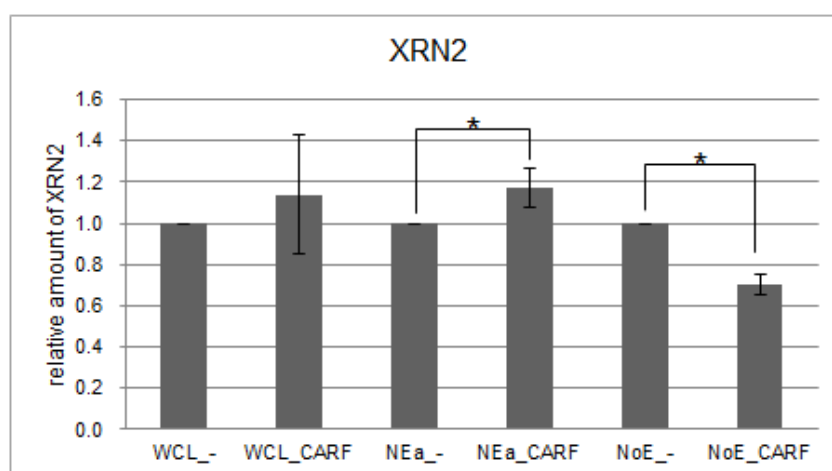
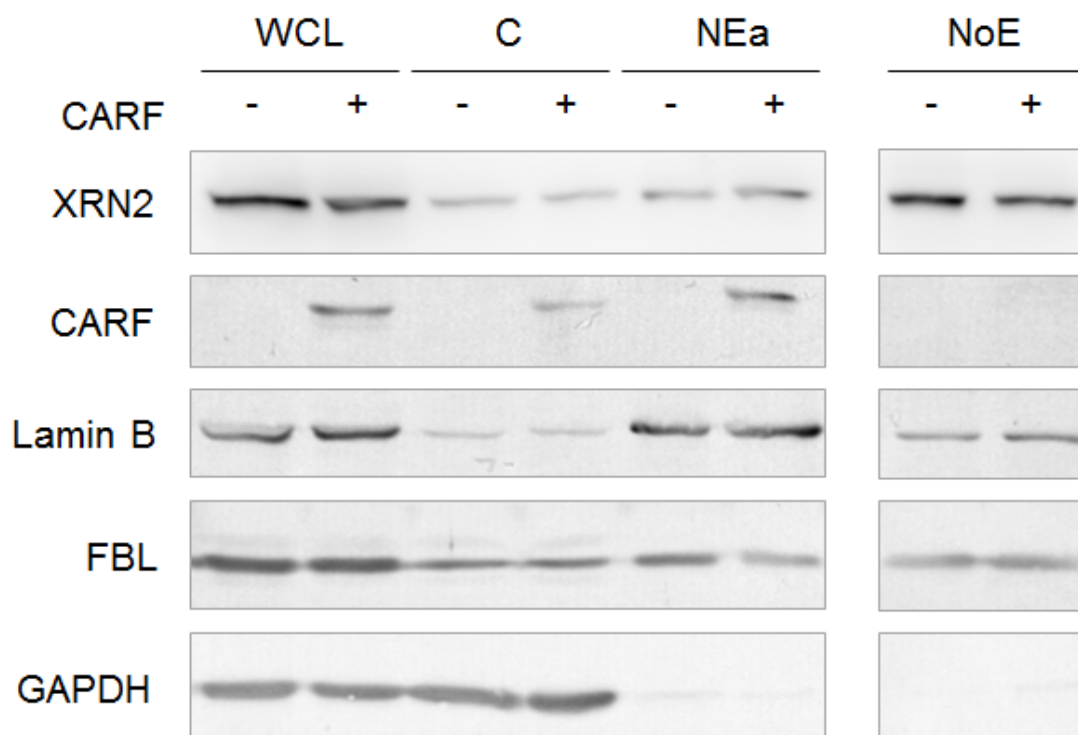


Fig. 5-20 細胞分画法を用いたCARF過剰発現によるXRN2の細胞内局在への影響についての検討

CARF恒常発現細胞を分画し、イムノブロット法により解析した。コントロールとして親細胞Flp-In T-REx 293細胞を用いた。抗CARF抗体、抗XRN2抗体、核のマーカとして抗Lamin B抗体、核小体のマーカとして抗FBL抗体、Cytosolのマーカとして抗GAPDH抗体を用いた。用いた抗体を左側に示した。WCL: Whole cell lysate, C: Cytosol fraction, NEa: Nuclear extract fraction a, NoE: Nucleolar/Cajal bodies extract fractionをそれぞれ10 μ g用いた。イムノブロットの結果はそれぞれの分画マーカを内部標準として用いてノーマライズし、コントロールに対する相対的な値で示した (n=3)。* student's t-test: p < 0.05. Error bar: standard deviation

第6章 総括

本学位論文において、以下の9点を明らかにした。

1) CARF は、リボソーム生合成に関与するタンパク質3種、pre-mRNA スプライシングに関与するタンパク質7種、シャペロンタンパク質が4種、p53 関連アポトーシスに関与するタンパク質、翻訳に関与するタンパク質、機能未知タンパク質、その他のタンパク質2種の計19種のタンパク質と相互作用する。

2) CARF は、1) で同定したタンパク質のうち XRN2 と細胞内の核質で直接相互作用する。

3) CARF は、そのN末端領域1-175 aa を介して XRN2 と相互作用する。

4) XRN2 は、その1-680 aa を介して CARF と相互作用し、XRN2 の1-151 aa、501-680 aa が必要である。

以上4つの結果から、XRN2 が CARF の相互作用因子であると結論づけた。

その相互作用の生理機能として XRN2 のリボソーム生合成における働きに CARF が関与するか調べ、下記の事項を明らかにした。

5) CARF は、5'ETS 領域の pre-rRNA プロセッシングで 01 site の切断における XRN2 の働きを阻害する。

6) CARF は、5'ETS 領域の pre-rRNA プロセッシングで 01 site の切断が起こらないと次の pre-rRNA プロセッシング過程へ進ませないという品質管理の役割を果たす XRN2 の作用を阻害しない。

7) CARF は、pre-rRNA プロセッシングで XRN2 による 5'-ETS-pre-rRNA fragments の分解を阻害する。

以上3つの結果から、5'ETS 領域の pre-rRNA プロセッシングにおける XRN2 の2つの働きを CARF が阻害すると結論づけた。

更に、そのメカニズムについて解析を行い、下記の事項を明らかにした。

8) CARF は、XRN2 の発現量に対して影響を与えない。

9) CARF は、XRN2 を核質に留める。

これらの結果から、CARF は XRN2 を核質に留めることにより、5'ETS 領域の pre-rRNA プロセッシングにおける XRN2 の働きを阻害すると結論づけた。本研究により初めて明らかにされた CARF が XRN2 を核質に留めること、pre-rRNA プロセッシングにおける XRN2 の働きを CARF が阻害することの生理的意義について考察する。

「pre-rRNA プロセッシングにおける XRN2 の生理的機能と CARF」

CARF の既知の生理機能は、ARF 依存的/非依存的に p53-p21^{WAF} 経路を介してがん細胞の増殖を調節すること (43, 126) や p53-p21^{WAF} 経路以外に、ミトコンドリアストレスに含まれる ATM-ATR や Ras-MAPK、RB-E2F1 経路を介してアポトーシスを引き起こすことも知られている (131) が、いずれにしても細胞の異常を感知して働くシグナル経路を介した機能である。一方、本論文において見出された CARF が XRN2 を核質に留め、5'ETS 領域の pre-rRNA プロセッシングにおける XRN2 の働きを阻害することは通常条件下の細胞での生理的機能である。

第 4 章において CARF は、5'ETS 領域の pre-rRNA プロセッシングで 01 site の切断における XRN2 の働き及び XRN2 による 5'-ETS-pre-rRNA fragments の分解を阻害することを明らかにした。一方で、01 site の切断が起こらないと次の pre-rRNA プロセッシング過程へ進ませないという品質管理の役割を果たす XRN2 の作用を阻害しなかった。01 site の切断において XRN2 以外の多くの因子: nucleolin (159, 160, 161)、U3 snoRNP (158, 203)、U14 snoRNP (203)、U17 snoRNP (203)、E3 snoRNP (203)、UTP4 (158, 204)、UTP10 (158, 204)、UTP12 (158)、UTP23 (158)、UTP24 (158)、RCL1 (158)、BMS1 (158)、IMP3 (158)、MTR4 (158) が働くことが報告されている。まず、rDNA に SSU processome の complex である tUTP complex が相互作用し、そのことにより U3 snoRNP complex、MPP complex、bUTP complex などが recruit されると推測されている (158, 161)。SSU processome、MTR4、nucleolin、XRN2 などの働きにより、01 site が切断される (158)。nucleolin の pre-rRNA 結合部位は 01 site を含む領域であり (161)、01 site が切断され、pre-rRNA fragment: 5'-01 が

切り離されることにより nucleolin と pre-rRNA の結合が不安定になり、SSU processome を含む complex 群から遊離する可能性が考えられる。SSU processome と Nucleolin の結合量から、Nucleolin は U3 snoRNP を pre-rRNA に輸送後、01 site を切断するエンドヌクレアーゼが結合できるように遊離する可能性も提案されている (161)。01 site の切断に必須な SSU processome 構成 complex である tUTP も 01 site 切断中もしくは切断後すぐに pre-rRNA から遊離する (161)。このように 01 site 切断に伴い、いくつかのタンパク質 (01 site-trans-acting タンパク質群と名付ける) が遊離し、次の pre-rRNA プロセッシング過程に必要なタンパク質が SSU processome を含む complex 群に結合する (158, 161)。そこで、01 site 切断後 01 site-trans-acting タンパク質群が complex 群から遊離する際に XRN2 が重要な役割を担うという仮説をたてた。01 site 切断後 01 site-trans-acting タンパク質群が XRN2 により complex 群から遊離することで、次の pre-rRNA プロセッシング過程に必要なタンパク質が complex 群に結合し、次の pre-rRNA プロセッシング過程に進むことができると考えられる。第 4 章で CARF 過剰発現条件において CARF により XRN2 が核質に留められ、01 site に XRN2 が分布しないために、本来なら XRN2 により complex 群から遊離する 01 site-trans-acting タンパク質群が遊離できず、次の pre-rRNA プロセッシング過程に必要なタンパク質が complex 群に結合できないため次の pre-rRNA プロセッシング過程に進むことができなかつたと推論される。そのため 01 site の切断が起こらないと次の pre-rRNA プロセッシング過程へ進まないという XRN2 の品質管理に CARF が影響しなかつた実験結果になったと推論される。一方で、01 site の切断や 5'-ETS-pre-rRNA fragments の分解は、5'ETS 領域付近に XRN2 が存在する必要があるため、CARF により 5'ETS 領域付近に XRN2 が分布しないために、CARF によりこれらの生理的機能が阻害されたと考えられ、前述した仮説と第 4 章の実験結果は符合する。しかし、XRN2 をノックダウンしたときには次の pre-rRNA プロセッシング過程に進むことができるので、他の XRN2 の作用が存在するもしくは XRN2 が仮説の役割を担っていないと考えられ、更なる研究が必要である。

この pre-rRNA プロセッシングにおける XRN2 の生理的機能の CARF による阻害は正常

の状態ではバランスが保たれているが、細胞の異常を感知して CARF が増加すると、不要な 5'ETS-pre-rRNAs が分解されず、新規に必要な pre-rRNAs の合成の材料として使用することができないため rRNA のリサイクリングが滞る可能性が考えられる。増殖期にある細胞は、消費する 70~80% のエネルギーと物質をリボソーム合成に費やす必要があり、速やかな rRNA のリサイクリングが必須である。CARF の過剰発現状態が続けば、XRN2 の pre-rRNA プロセッシングが CARF により阻害された状態が続き、長期間に渡れば rRNA の生合成が低下する可能性が考えられる。CARF の過剰発現が細胞増殖を抑制する報告もあり (130, 132) 、今まで考えられてきた様々なシグナル経路を介した働きのみではなく CARF が XRN2 の pre-rRNA プロセッシングにおける生理的機能を阻害することに起因する細胞増殖停止である可能性も考えられる。

「XRN2 の細胞内局在と CARF」

第 2 章小括で述べたように XRN2 は核質における pol II による RNA 転写の終結を促進する (178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185) ことから、pol II による pre-mRNA 転写の終結点に CARF が XRN2 を留めることも予想される。hnRNPK は XRN2 を poly(A)シグナル配列下流の polII による RNA 転写の終結点へ留める報告 (184) があり、第 2 章で同定された相互作用因子群に hnRNP K が含まれたことから、CARF が XRN2 及び hnRNP K と複合体を形成し、XRN2 を pol II による RNA 転写の終結点に XRN2 を留めることも考えられる。同じ場所に XRN2 を留める他のタンパク質は p54 や PSF が報告されており、これらタンパク質の相互作用因子群に hnRNP L が含まれていた (180)。hnRNP L は XRN2 の C 末端側: 786-950 aa を介して相互作用している (180) ことと、第 3 章で CARF が XRN2: 1-680 aa を介して直接相互作用すること (Fig. 3-12) は、XRN2 上の CARF と hnRNPL における相互作用領域が重複しないことを示している。これら 3 つのタンパク質は 3 量体を形成する可能性が考えられる。更に、XRN2-hnRNP K は直接相互作用であり (184)、hnRNP K 相互作用因子群に hnRNP L が XRN2 と共に含まれていた (184) ことを前述の

hnRNP L と CARF の XRN2 の相互作用領域を併せて考えると、hnRNP K の相互作用領域が狭い範囲に限定されるが、相互作用領域が重複しないことから4つのタンパク質は4量体を形成する可能性も考えられる。これらのことから、CARF が XRN2 を pol II による pre-mRNA 転写の終結点に留め、その反応を促進している可能性も考えられる。細胞の異常を感知して CARF が増加すると、XRN2 が pol II の pre-mRNA 転写の終結点に必要以上に蓄積し、pol II による pre-mRNA 転写の終結が過剰に進み、細胞増殖が正常に行われないう可能性も考えられる。

「がん抑制と CARF」

CARF は ARF と相互作用し、p53-p21^{WAF} 経路を介して細胞増殖を抑制する (43, 126)。本研究において CARF は XRN2 とも相互作用することが明らかとなったことから、ARF と XRN2 が CARF を相互作用因子として競合すると推測される。ARF は CARF を介さない経路においてがん化抑制機能を果たす (15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22) ので、CARF と相互作用していない ARF もがん化抑制機能を果たすと考えられる。前述したように CARF が XRN2 の pre-rRNA プロセッシングを阻害することによりリボソーム生合成が低下し、細胞増殖が低下する可能性も考えられる。従って、CARF が関与する2つの作用機序によりがん化抑制が促進されると考えらる。がん細胞特異的に CARF の発現を誘導できるような薬剤を開発できれば、新たな抗がん剤の開発につながる可能性が期待される。CARF を中程度過剰発現すると細胞増殖を抑制したが、過度に過剰発現するとヌードマウスにおいてがんを形成した (132) という報告を考慮すると、細胞内の CARF の量を厳密に規定できなくてはならない。抗がん剤である doxorubicin を U2OS 細胞や HeLa 細胞に低濃度条件で添加すると、CARF が増加し、細胞増殖が停止した (130)。この現象は CARF の増加によるのではなく、doxorubicin の細胞傷害性に起因する可能性も考えらる。今後、CARF と XRN2 の相互作用や生理的機能に関する更なる研究が進み、私の研究を基礎として新規抗がん剤が開発されることを待ち望みたい。

参考文献

- [1] 加仁第 40 号 2013, 2013 年 5 月発行、がんの統計'12 公益財団法人がん研究振興財団
- [2] 全国がん罹患モニタリング集計 2003-2005 年生存率報告 (独立行政法人国立がん研究センターがん対策情報センター, 2013)
- [3] 独立行政法人国立がん研究センターがん研究開発費「地域がん登録精度向上と活用に関する研究」平成 22 年度報告書
- [4] がんの統計'10 公益財団法人がん研究振興財団
- [5] Cancer and ageing: rival demons? Campisi J. (2003) *Nature Reviews Cancer*. **3**, 339-49
- [6] Principles of tumor suppression. Sherr CJ. (2004) *Cell*. Jan 23; 116 (2): 235-46
- [7] 「細胞の分子生物学第 4 版」(Molecular Biology of the Cell. Fourth Edition), Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter 著 中村桂子、松原謙一 監訳 Newton Press)
- [8] The P53 pathway: what questions remain to be explored? Levine AJ, Hu W, Feng Z. (2006) *Cell Death Differ*. **13**, 1027-36. Review
- [9] NK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. Sharpless NE. (2005) *Mutat Res*. **576**, 22-38. Review
- [10] Live or let die: the cell's response to p53. Vousden KH, Lu X. (2002) *Nat Rev Cancer*. **2**, 594-604. Review.
- [11] The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liégeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW, Cordon-Cardo C, DePinho RA. (1998) *Cell*. **92**, 713-23.
- [12] ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. (1998) *Cell*. **2**, 725-34.
- [13] Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. Kamijo

T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 8292-7

[14] The alternative product from the human CDKN2A locus, p14 (ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden KH, Peters G. (1998) *EMBO J.* **17**, 5001-14.

[15] p53-independent functions of the p19 (ARF) tumor suppressor. Weber JD, Jeffers JR, Rehg JE, Randle DH, Lozano G, Roussel MF, Sherr CJ, Zambetti GP. (2000) *Genes Dev.* **14**, 2358-65.

[16] RNA helicase DDX5 is a p53-independent target of ARF that participates in ribosome biogenesis. Saporita A, Chang HC, Winkeler C, Apicelli A, Kladney R, Wang J, Townsend R, Michel LS, Weber JD. (Sep 21, 2011) *Cancer Res.* 10.1158/0008-5472.CAN-11-1472

[17] Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. Bertwistle D, Sugimoto M, Sherr CJ. (2004) *Mol Cell Biol.* **3**, 985-96

[18] Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. Itahana K, Bhat KP, Jin A, Itahana Y, Hawke D, Kobayashi R, Zhang Y. (2003) *Mol Cell.* **12**, 1151-64.

[19] B23 and ARF: friends or foes? Lindström MS, Zhang Y. (2006) *Cell Biochem Biophys.* **46**, 79-90.

[20] The ARF-B23 connection: implications for growth control and cancer treatment. Zhang Y. (2004) *Cell Cycle.* **3**, 259-62.

[21] The ARF tumor suppressor controls ribosome biogenesis by regulating the RNA polymerase I transcription factor TTF-I. Lessard F, Morin F, Ivanchuk S, Langlois F, Stefanovsky V, Rutka J, Moss T. (2010) *Mol Cell.* **38**, 539-50.

[22] Physical and functional interaction of the p14ARF tumor suppressor with ribosomes. Rizos H, McKenzie HA, Ayub AL, Woodruff S, Becker TM, Scurr LL, Stahl J, Kefford RF. (2006) *J Biol*

Chem. **281**, 38080-8

[23] Growth control and ribosome biogenesis. Lempiäinen H, Shore D. (2009) *Curr Opin Cell Biol.* **21**, 855-63. doi: 10.1016/j.ceb.2009.09.002. Epub 2009 Sep 30. Review. Erratum in: *Curr Opin Cell Biol.* 2010 Aug; **22**, 555.

[24] Dose the ribosome translate cancer? Ruggero D, Pandolfi PP. (2003) *Nat Rev Cancer.* **3**, 179-92.

[25] Nucleolar Arf tumor suppressor inhibits ribosomal RNA processing. Sugimoto M, Kuo ML, Roussel MF, Sherr CJ. (2003) *Mol Cell.* **2**, 415-24.

[26] The HIV-1 envelope protein gp120 impairs B cell proliferation by inducing TGF- β 1 production and FcRL4 expression. Jelacic K, Cimbro R, Nawaz F, Huang da W, Zheng X, Yang J, Lempicki RA, Pascuccio M, Van Ryk D, Schwing C, Hiatt J, Okwara N, Wei D, Roby G, David A, Hwang IY, Kehrl JH, Arthos J, Cicala C, Fauci AS. (2013) *Nat Immunol.* **14**, 1256-65. doi: 10.1038/ni.2746. Epub 2013 Oct 27. PubMed PMID: 24162774; PubMed Central PMCID: PMC3870659.

[27] ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. Chen D, Kon N, Li M, Zhang W, Qin J, Gu W. (2005) *Cell.* , **121**, 1071-83.

[28] Inhibition of pRb phosphorylation and cell-cycle progression by a 20-residue peptide derived from p16CDKN2/INK4A. Fåhræus R, Paramio JM, Ball KL, Láin S, Lane DP. (1996) *Curr Biol.* **6**, 84-91.

[29] Characterization of the cyclin-dependent kinase inhibitory domain of the INK4 family as a model for a synthetic tumour suppressor molecule. Fåhræus R, Láin S, Ball KL, Lane DP. (1998) *Oncogene.* **16**, 587-96.

[30] Biologic and biochemical analyses of p16(INK4a) mutations from primary tumors. Yarbrough WG, Buckmire RA, Bessho M, Liu ET. (1999) *J Natl Cancer Inst.* **91**, 1569-74.

- [31] CDKN2A and CDK4 mutation analysis in Italian melanoma-prone families: functional characterization of a novel CDKN2A germ line mutation. Della Torre G, Pasini B, Frigerio S, Donghi R, Rovini D, Delia D, Peters G, Huot TJ, Bianchi-Scarra G, Lantieri F, Rodolfo M, Parmiani G, Pierotti MA. (2001) *Br J Cancer*. **85**, 836-44.
- [32] Targeting fusion protein/corepressor contact restores differentiation response in leukemia cells. Racanicchi S, Maccherani C, Liberatore C, Billi M, Gelmetti V, Panigada M, Rizzo G, Nervi C, Grignani F. (2005) *EMBO J*. **24**, 1232-42. Epub 2005 Feb 24. Erratum in: *EMBO J*. 2005 May 18;24 (10):1899.
- [33] The tumor suppressor p16(INK4a) prevents cell transformation through inhibition of c-Jun phosphorylation and AP-1 activity. Choi BY, Choi HS, Ko K, Cho YY, Zhu F, Kang BS, Ermakova SP, Ma WY, Bode AM, Dong Z. (2005) *Nat Struct Mol Biol*. **12**, 699-707. Epub 2005 Jul 10.
- [34] The p14ARF tumor suppressor protein facilitates nucleolar sequestration of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and inhibits HIF-1-mediated transcription. Fatyol K, Szalay AA. (2001) *J Biol Chem*. **276**, 28421-9. Epub 2001 May 29.
- [35] An N-terminal p14ARF peptide blocks Mdm2-dependent ubiquitination in vitro and can activate p53 in vivo. Midgley CA, Desterro JM, Saville MK, Howard S, Sparks A, Hay RT, Lane DP. (2000) *Oncogene*. **19**, 2312-23.
- [36] p14 Arf promotes small ubiquitin-like modifier conjugation of Werners helicase. Woods YL, Xirodimas DP, Prescott AR, Sparks A, Lane DP, Saville MK. (2004) *J Biol Chem*. **279**, 50157-66. Epub 2004 Sep 7.
- [37] Oligomerization of the human ARF tumor suppressor and its response to oxidative stress. Menéndez S, Khan Z, Coomber DW, Lane DP, Higgins M, Koufali MM, Lain S. (2003) *J Biol Chem*. **278**, 18720-9. Epub 2003 Feb 11.
- [38] p19ARF directly and differentially controls the functions of c-Myc independently of p53. Qi Y, Gregory MA, Li Z, Brousal JP, West K, Hann SR. (2004) *Nature*. **431**, 712-7. Epub 2004 Sep 8.

- [39] The human tumor suppressor arf interacts with spinophilin/neurabin II, a type 1 protein-phosphatase-binding protein. Vivo M, Calogero RA, Sansone F, Calabrò V, Parisi T, Borrelli L, Saviozzi S, La Mantia G. (2001) *J Biol Chem.* **276**, 14161-9. Epub 2001 Jan 30.
- [40] Functional and physical interaction of the human ARF tumor suppressor with Tat-binding protein-1. Pollice A, Nasti V, Ronca R, Vivo M, Lo Iacono M, Calogero R, Calabrò V, La Mantia G. (2004) *J Biol Chem.* **279**, 6345-53. Epub 2003 Dec 9.
- [41] Yin Yang 1 is a negative regulator of p53. Sui G, Affar el B, Shi Y, Brignone C, Wall NR, Yin P, Donohoe M, Luke MP, Calvo D, Grossman SR, Shi Y. (2004) *Cell.* **117**, 859-72.
- [42] Identification of novel ARF binding proteins by two-hybrid screening. Tompkins V, Hagen J, Zediak VP, Quelle DE. (2006) *Cell Cycle.* **5**, 641-6. Epub 2006 Mar 15.
- [43] CARF is a novel protein that cooperates with mouse p19ARF (human p14ARF) in activating p53. Hasan MK, Yaguchi T, Sugihara T, Kumar PK, Taira K, Reddel RR, Kaul SC, Wadhwa R. (2002) *J Biol Chem.* **277**, 37765-70. Epub 2002 Aug 1.
- [44] Cyclin G1 has growth inhibitory activity linked to the ARF-Mdm2-p53 and pRb tumor suppressor pathways. Zhao L, Samuels T, Winckler S, Korgaonkar C, Tompkins V, Horne MC, Quelle DE. (2003) *Mol Cancer Res.* **1**, 195-206.
- [45] Self-assembling protein microarrays. Ramachandran N, Hainsworth E, Bhullar B, Eisenstein S, Rosen B, Lau AY, Walter JC, LaBaer J. (2004) *Science.* **305**, 86-90.
- [46] Identification of CDK4 sequences involved in cyclin D1 and p16 binding. Coleman KG, Wautlet BS, Morrissey D, Mulheron J, Sedman SA, Brinkley P, Price S, Webster KR. (1997) *J Biol Chem.* **272**, 18869-74.
- [47] Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a. Russo AA, Tong L, Lee JO, Jeffrey PD, Pavletich NP. (1998) *Nature.* **395**, 237-43.
- [48] A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. (1993) *Nature.* **366**, 704-7.

- [49] Human ARF binds E2F1 and inhibits its transcriptional activity. Eymin B, Karayan L, Séité P, Brambilla C, Brambilla E, Larsen CJ, Gazzéri S. (2001) *Oncogene*. **20**, 1033-41.
- [50] p14 (ARF) regulates E2F activity. Mason SL, Loughran O, La Thangue NB. (2002) *Oncogene*. **21**, 4220-30.
- [51] Association of p14ARF with the p120E4F transcriptional repressor enhances cell cycle inhibition. Rizos H, Diefenbach E, Badhwar P, Woodruff S, Becker TM, Rooney RJ, Kefford RF. (2003) *J Biol Chem*. **278**, 4981-9. Epub 2002 Nov 21.
- [52] Yu J, Zhang SS, Saito K, Williams S, Arimura Y, Ma Y, Ke Y, Baron V, Mercola D, Feng GS, Adamson E, Mustelin T. PTEN regulation by Akt-EGR1-ARF-PTEN axis. (2009) *EMBO J*. **28**, 21-33. doi: 10.1038/emboj.2008.238. Epub 2008 Dec 4.
- [53] The nuclear protein p34SEI-1 regulates the kinase activity of cyclin-dependent kinase 4 in a concentration-dependent manner. Li J, Melvin WS, Tsai MD, Muscarella P. (2004) *Biochemistry*. **43**, 4394-9.
- [54] Regulation of CDK4 activity by a novel CDK4-binding protein, p34(SEI-1). Sugimoto M, Nakamura T, Ohtani N, Hampson L, Hampson IN, Shimamoto A, Furuichi Y, Okumura K, Niwa S, Taya Y, Hara E. (1999) *Genes Dev*. **13**, 3027-33.
- [55] Direct interaction and cooperative role of tumor suppressor p16 with band 3 (AE1). Fu GH, Wang Y, Xi YH, Shen WW, Pan XY, Shen WZ, Jiang XS, Chen GQ. (2005) *FEBS Lett*. **579**, 2105-10.
- [56] Supramolecular complex formation between Rad6 and proteins of the p53 pathway during DNA damage-induced response. Lyakhovich A, Shekhar MP. (2003) *Mol Cell Biol*. **23**, 2463-75.
- [57] Induction of extracellular matrix-remodeling genes by the senescence-associated protein APA-1. Benanti JA, Williams DK, Robinson KL, Ozer HL, Galloway DA. (2002) *Mol Cell Biol*. **22**, 7385-97.

- [58] ARF-dependent regulation of ATM and p53 associated KZNF (Apak) protein activity in response to oncogenic stress. Wang S, Tian C, Xing G, Gao M, Jiao W, Xiao T, Yin Y, He F, Zhang L. (2010) *FEBS Lett.* **584**, 3909-15. doi: 10.1016/j.febslet.2010.08.015. Epub 2010 Aug 14.
- [59] Proteomic analysis of p16ink4a-binding proteins. Souza-Rodríguez E, Estanyol JM, Friedrich-Heineken E, Olmedo E, Vera J, Canela N, Brun S, Agell N, Hübscher U, Bachs O, Jaumot M. (2007) *Proteomics.* **7**, 4102-11.
- [60] A high-throughput approach for measuring temporal changes in the interactome. Kristensen AR, Gsponer J, Foster LJ. (2012) *Nat Methods.* **9**, 907-9. doi: 10.1038/nmeth.2131. Epub 2012 Aug 5.
- [61] Regulation of NF-kappaB and p53 through activation of ATR and Chk1 by the ARF tumour suppressor. Rocha S, Garrett MD, Campbell KJ, Schumm K, Perkins ND. (2005) *EMBO J.* **24**, 1157-69. Epub 2005 Mar 10.
- [62] Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. Ewing RM, Chu P, Elisma F, Li H, Taylor P, Climie S, McBroom-Cerajewski L, Robinson MD, O'Connor L, Li M, Taylor R, Dharsee M, Ho Y, Heilbut A, Moore L, Zhang S, Ornatsky O, Bukhman YV, Ethier M, Sheng Y, Vasilescu J, Abu-Farha M, Lambert JP, Duewel HS, Stewart II, Kuehl B, Hogue K, Colwill K, Gladwish K, Muskat B, Kinach R, Adams SL, Moran MF, Morin GB, Topaloglou T, Figeys D. (2007) *Mol Syst Biol.* **3**. Epub 2007 Mar 13.
- [63] Interaction of p14ARF with Brcal in cancer cell lines and primary breast cancer. He L, Fan C, Ning X, Feng X, Liu Y, Chen B, Tang D. (2008) *Cell Biol Int.* **32**, 1302-9. doi: 10.1016/j.cellbi.2008.07.018. Epub 2008 Jul 25.
- [64] The ARF tumor suppressor inhibits BCL6-mediated transcriptional repression. Suzuki H, Kurita M, Mizumoto K, Moriyama M, Aiso S, Nishimoto I, Matsuoka M. (2005) *Biochem Biophys Res Commun.* **326**, 242-8.

- [65] CDK4 and CDK6 delay senescence by kinase-dependent and p16INK4a-independent mechanisms. Ruas M, Gregory F, Jones R, Poolman R, Starborg M, Rowe J, Brookes S, Peters G. (2007) *Mol Cell Biol.* **27**, 4273-82. Epub 2007 Apr 9.
- [66] Novel insights into the INK4-CDK4/6-Rb pathway: counter action of gankyrin against INK4 proteins regulates the CDK4-mediated phosphorylation of Rb. Li J, Tsai MD. (2002) *Biochemistry.* **41**, 3977-83.
- [67] The protein interaction landscape of the human CMGC kinase group. Varjosalo M, Keskitalo S, Van Drogen A, Nurkkala H, Vichalkovski A, Aebersold R, Gstaiger M. (2013) *Cell Rep.* **3**, 1306-20. doi: 10.1016/j.celrep.2013.03.027. Epub 2013 Apr 18.
- [68] Expression of TIP-1 confers radioresistance of malignant glioma cells. Han M, Wang H, Zhang HT, Han Z. (2012) *PLoS One.* **7**, e45402. doi: 10.1371/journal.pone.0045402. Epub 2012 Sep 17.
- [69] A novel ARF-binding protein (LZAP) alters ARF regulation of HDM2. Wang J, He X, Luo Y, Yarbrough WG. (2006) *Biochem J.* **393**, 489-501.
- [70] Tumor suppressor ARF promotes non-classic proteasome-independent polyubiquitination of COMMD1. Huang Y, Wu M, Li HY. (2008) *J Biol Chem.* **283**, 11453-60. doi: 10.1074/jbc.M708544200. Epub 2008 Feb 27.
- [71] Dynamics of cullin-RING ubiquitin ligase network revealed by systematic quantitative proteomics. Bennett EJ, Rush J, Gygi SP, Harper JW. (2010) *Cell.* **143**, 951-65. doi: 10.1016/j.cell.2010.11.017.
- [72] Toward an understanding of the protein interaction network of the human liver. Wang J, Huo K, Ma L, Tang L, Li D, Huang X, Yuan Y, Li C, Wang W, Guan W, Chen H, Jin C, Wei J, Zhang W, Yang Y, Liu Q, Zhou Y, Zhang C, Wu Z, Xu W, Zhang Y, Liu T, Yu D, Zhang Y, Chen L, Zhu D, Zhong X, Kang L, Gan X, Yu X, Ma Q, Yan J, Zhou L, Liu Z, Zhu Y, Zhou T, He F, Yang X. (2011) *Mol Syst Biol.* **7**, 536. doi: 10.1038/msb.2011.67.

- [73] Targeting of C-terminal binding protein (CtBP) by ARF results in p53-independent apoptosis. Paliwal S, Pande S, Kovi RC, Sharpless NE, Bardeesy N, Grossman SR. (2006) *Mol Cell Biol.* **26**, 2360-72.
- [74] p14ARF interacts with DAXX: effects on HDM2 and p53. Ivanchuk SM, Mondal S, Rutka JT. (2008) *Cell Cycle.* **7**, 1836-50. Epub 2008 Jun 30.
- [75] TRIM65 regulates microRNA activity by ubiquitination of TNRC6. Li S, Wang L, Fu B, Berman MA, Diallo A, Dorf ME. (2014) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **111**, 6970-5. doi: 10.1073/pnas.1322545111. Epub 2014 Apr 28.
- [76] EBV-encoded EBNA-5 associates with P14ARF in extranucleolar inclusions and prolongs the survival of P14ARF-expressing cells. Kashuba E, Mattsson K, Pokrovskaja K, Kiss C, Protopopova M, Ehlin-Henriksson B, Klein G, Szekely L. (2003) *Int J Cancer.* **105**, 644-53.
- [77] Interaction of FK506-binding protein 13 with brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 1 (BIG1): effects of FK506. Padilla PI, Chang MJ, Pacheco-Rodriguez G, Adamik R, Moss J, Vaughan M. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 2322-7. Epub 2003 Feb 26.
- [78] Nucleostemin stabilizes ARF by inhibiting the ubiquitin ligase ULF. Lo D, Zhang Y, Dai MS, Sun XX, Zeng SX, Lu H. (2014) *Oncogene.* doi: 10.1038/onc.2014.103. [Epub ahead of print]
- [79] Selective requirement of H2B N-Terminal tail for p14ARF-induced chromatin silencing. Choi J, Kim H, Kim K, Lee B, Lu W, An W. (2011) *Nucleic Acids Res.* **39**, 9167-80. doi: 10.1093/nar/gkr642. Epub 2011 Aug 16.
- [80] IKKbeta specifically binds to P16 and phosphorylates Ser8 of P16. Guo Y, Yuan C, Weghorst CM, Li J. (2010) *Biochem Biophys Res Commun.* **393**, 504-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.02.035. Epub 2010 Feb 10.
- [81] Human inhibitor of growth 1 inhibits hepatoma cell growth and influences p53 stability in a variant-dependent manner. Zhu Z, Luo Z, Li Y, Ni C, Li H, Zhu M. (2009) *Hepatology.* **49**, 504-12. doi: 10.1002/hep.22675.

- [82] Two wobble-splicing events affect ING4 protein subnuclear localization and degradation. Tsai KW, Tseng HC, Lin WC. (2008) *Exp Cell Res*. **314**, 3130-41. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.08.002. Epub 2008 Aug 15.
- [83] p14ARF activates a Tip60-dependent and p53-independent ATM/ATR/CHK pathway in response to genotoxic stress. Eymin B, Claverie P, Salon C, Leduc C, Col E, Brambilla E, Khochbin S, Gazzeri S. (2006) *Mol Cell Biol*. **26**, 4339-50.
- [84] Structural conservation of components in the amino acid sensing branch of the TOR pathway in yeast and mammals. Kogan K, Spear ED, Kaiser CA, Fass D. (2010) *J Mol Biol*. **402**, 388-98. doi: 10.1016/j.jmb.2010.07.034. Epub 2010 Jul 23.
- [85] MdmX binding to ARF affects Mdm2 protein stability and p53 transactivation. Jackson MW, Lindstrom MS, Berberich SJ. (2001) *J Biol Chem*. **276**, 25336-41. Epub 2001 Apr 10.
- [86] p14ARF interacts with N-Myc and inhibits its transcriptional activity. Amente S, Gargano B, Diolaiti D, Della Valle G, Lania L, Majello B. (2007) *FEBS Lett*. **581**, 821-5. Epub 2007 Feb 2.
- [87] NMI mediates transcription-independent ARF regulation in response to cellular stresses. Li Z, Hou J, Sun L, Wen T, Wang L, Zhao X, Xie Q, Zhang SQ. (2012) *Mol Biol Cell*. **23**, 4635-46. doi: 10.1091/mbc.E12-04-0304. Epub 2012 Oct 3.
- [88] Essential role of the B23/NPM core domain in regulating ARF binding and B23 stability. Enomoto T, Lindström MS, Jin A, Ke H, Zhang Y. (2006) *J Biol Chem*. **281**, 18463-72. Epub 2006 May 5.
- [89] The nucleolar SUMO-specific protease SENP3 reverses SUMO modification of nucleophosmin and is required for rRNA processing. Haindl M, Harasim T, Eick D, Muller S. (2008) *EMBO Rep*. **9**, 273-9. doi: 10.1038/embor.2008.3. Epub 2008 Feb 8.
- [90] The Arf tumor suppressor protein inhibits Miz1 to suppress cell adhesion and induce apoptosis. Herkert B, Dwertmann A, Herold S, Abed M, Naud JF, Finkernagel F, Harms GS, Orian A, Wanzel M, Eilers M. (2010) *J Cell Biol*. **188**, 905-18. doi: 10.1083/jcb.200908103.

- [91] TRADD contributes to tumour suppression by regulating ULF-dependent p19Arf ubiquitylation. Chio II, Sasaki M, Ghazarian D, Moreno J, Done S, Ueda T, Inoue S, Chang YL, Chen NJ, Mak TW. (2012) *Nat Cell Biol.* **14**, 625-33. doi: 10.1038/ncb2496.
- [92] ARF antagonizes the ability of Miz-1 to inhibit p53-mediated transactivation. Miao L, Song Z, Jin L, Zhu YM, Wen LP, Wu M. (2010) *Oncogene.* **29**, 711-22. doi: 10.1038/onc.2009.372. Epub 2009 Nov 9.
- [93] A limited screen for protein interactions reveals new roles for protein phosphatase 1 in cell cycle control and apoptosis. Flores-Delgado G, Liu CW, Sposto R, Berndt N. (2007) *J Proteome Res.* **6**, 1165-75. Epub 2007 Feb 3. Erratum in: *J Proteome Res.* 2008 Mar;7(3):1352.
- [94] TBP-1 protects the human oncosuppressor p14ARF from proteasomal degradation. Pollice A, Sepe M, Vilella VR, Tolino F, Vivo M, Calabrò V, La Mantia G. (2007) *Oncogene.* **26**, 5154-62. Epub 2007 Mar 5.
- [95] Ubiquitin-independent degradation of cell-cycle inhibitors by the REGgamma proteasome. Chen X, Barton LF, Chi Y, Clurman BE, Roberts JM. (2007) *Mol Cell.* **26**, 843-52.
- [96] RING1B ubiquitination and stability are regulated by ARF. de Bie P, Ciechanover A. (2012) *Biochem Biophys Res Commun.* **426**, 49-53. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.08.030. Epub 2012 Aug 13.
- [97] Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. Zhang Y, Wolf GW, Bhat K, Jin A, Allio T, Burkhardt WA, Xiong Y. (2003) *Mol Cell Biol.* **23**, 8902-12.
- [98] Identification and characterization of SAP25, a novel component of the mSin3 corepressor complex. Shiio Y, Rose DW, Aur R, Donohoe S, Aebersold R, Eisenman RN. (2006) *Mol Cell Biol.* **26**, 1386-97.
- [99] Arf-induced turnover of the nucleolar nucleophosmin-associated SUMO-2/3 protease Senp3. Kuo ML, den Besten W, Thomas MC, Sherr CJ. (2008) *Cell Cycle.* **7**, 3378-87. Epub 2008 Nov 4.

- [100] Siva1 inhibits p53 function by acting as an ARF E3 ubiquitin ligase. Wang X, Zha M, Zhao X, Jiang P, Du W, Tam AY, Mei Y, Wu M. (2013) *Nat Commun.* **4**, 1551. doi: 10.1038/ncomms2533.
- [101] The chromatin remodeling factor BRG1 is a novel binding partner of the tumor suppressor p16INK4a. Becker TM, Haferkamp S, Dijkstra MK, Scurr LL, Frausto M, Diefenbach E, Scolyer RA, Reisman DN, Mann GJ, Kefford RF, Rizos H. (2009) *Mol Cancer.* **8**, 4. doi: 10.1186/1476-4598-8-4.
- [102] Bidirectional autoregulatory mechanism of metastasis-associated protein 1-alternative reading frame pathway in oncogenesis. Li DQ, Pakala SB, Reddy SD, Ohshiro K, Zhang JX, Wang L, Zhang Y, Moreno de Alborán I, Pillai MR, Eswaran J, Kumar R. (2011) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**, 8791-6. doi: 10.1073/pnas.1018389108. Epub 2011 May 9.
- [103] Human Arf tumor suppressor specifically interacts with chromatin containing the promoter of rRNA genes. Ayrault O, Andrique L, Larsen CJ, Seite P. (2004) *Oncogene.* **23**, 8097-104.
- [104] The tumor suppressor UCHL1 forms a complex with p53/MDM2/ARF to promote p53 signaling and is frequently silenced in nasopharyngeal carcinoma. Li L, Tao Q, Jin H, van Hasselt A, Poon FF, Wang X, Zeng MS, Jia WH, Zeng YX, Chan AT, Cao Y. (2010) *Clin Cancer Res.* **16**, 2949-58. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-3178. Epub 2010 Apr 15.
- [105] Inhibition of p63 transcriptional activity by p14ARF: functional and physical link between human ARF tumor suppressor and a member of the p53 family. Calabrò V, Mansueto G, Santoro R, Gentilella A, Pollice A, Ghioni P, Guerrini L, La Mantia G. (2004) *Mol Cell Biol.* **24**, 8529-40.
- [106] Transcription-independent ARF regulation in oncogenic stress-mediated p53 responses. Chen D, Shan J, Zhu WG, Qin J, Gu W. (2010) *Nature.* **464**, 624-7. doi: 10.1038/nature08820. Epub 2010 Mar 7.
- [107] The cellular abundance of the essential transcription termination factor TTF-I regulates ribosome biogenesis and is determined by MDM2 ubiquitylation. Lessard F, Stefanovsky V,

Tremblay MG, Moss T. (2012) *Nucleic Acids Res.* **40**, 5357-67. doi: 10.1093/nar/gks198. Epub 2012 Mar 1.

[108] Systematic analysis of human protein complexes identifies chromosome segregation proteins. Hutchins JR, Toyoda Y, Hegemann B, Poser I, Hériché JK, Sykora MM, Augsburg M, Hudecz O, Buschhorn BA, Bulkescher J, Conrad C, Comartin D, Schleiffer A, Sarov M, Pozniakovsky A, Slabicki MM, Schloissnig S, Steinmacher I, Leuschner M, Ssykor A, Lawo S, Pelletier L, Stark H, Nasmyth K, Ellenberg J, Durbin R, Buchholz F, Mechtler K, Hyman AA, Peters JM. (2010) *Science.* **328**, 593-9. doi: 10.1126/science.1181348. Epub 2010 Apr 1.

[109] Mass spectrometric analysis of lysine ubiquitylation reveals promiscuity at site level. Danielsen JM, Sylvestersen KB, Bekker-Jensen S, Szklarczyk D, Poulsen JW, Horn H, Jensen LJ, Møllgaard N, Nielsen ML. (2011) *Mol Cell Proteomics.* **10**, M110.003590. doi: 10.1074/mcp.M110.003590. Epub 2010 Dec 7.

[110] Quantitative analysis of global ubiquitination in HeLa cells by mass spectrometry. Meierhofer D, Wang X, Huang L, Kaiser P. (2008) *J Proteome Res.* **7**, 4566-76. doi: 10.1021/pr800468j. Epub 2008 Sep 10.

[111] N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor. Kuo ML, den Besten W, Bertwistle D, Roussel MF, Sherr CJ. (2004) *Genes Dev.* **18**, 1862-74.

[112] p14ARF interacts with the SUMO-conjugating enzyme Ubc9 and promotes the sumoylation of its binding partners. Rizos H, Woodruff S, Kefford RF. (2005) *Cell Cycle.* **4**, 597-603. Epub 2005 Apr 7.

[113] Proteomic dissection of the von Hippel-Lindau (VHL) interactome. Lai Y, Song M, Hakala K, Weintraub ST, Shii Y. (2011) *J Proteome Res.* **10**, 5175-82. doi: 10.1021/pr200642c. Epub 2011 Oct 11.

[114] Duan DR, Humphrey JS, Chen DY, Weng Y, Sukegawa J, Lee S, Gnarr JR, Linehan WM, Klausner RD. Characterization of the VHL tumor suppressor gene product: localization, complex

formation, and the effect of natural inactivating mutations. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**, 6459-63.

[115] Global landscape of HIV-human protein complexes. Jäger S, Cimermancic P, Gulbahce N, Johnson JR, McGovern KE, Clarke SC, Shales M, Mercenne G, Pache L, Li K, Hernandez H, Jang GM, Roth SL, Akiva E, Marlett J, Stephens M, D'Orso I, Fernandes J, Fahey M, Mahon C, O'Donoghue AJ, Todorovic A, Morris JH, Maltby DA, Alber T, Cagney G, Bushman FD, Young JA, Chanda SK, Sundquist WI, Kortemme T, Hernandez RD, Craik CS, Burlingame A, Sali A, Frankel AD, Krogan NJ. (2011) *Nature*. **481**, 365-70. doi: 10.1038/nature10719.

[116] p14ARF is capable of promoting HIV-1 tat degradation. Gargano B, Fiorillo M, Amente S, Majello B, Lania L. (2008) *Cell Cycle*. **7**, 1433-9. Epub 2008 Feb 28.

[117] A novel putative collaborator of p19ARF. Wadhwa R, Sugihara T, Hasan MK, Duncan EL, Taira K, Kaul SC. (2003) *Exp Gerontol*. **38**, 245-52.

[118] NCBI データベースより引用: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/55602>

[119] Bienvenut W.V., Dozynkiewicz M., Norman J.C. Submitted (JUN-2009) to UniProtKBCited for: PROTEIN SEQUENCE OF 2-14; 42-68; 129-142 AND 209-229, CLEAVAGE OF INITIATOR METHIONINE, ACETYLATION AT ALA-2, IDENTIFICATION BY MASS SPECTROMETRY. Tissue: Ovarian carcinoma

[120] N-terminal acetylome analyses and functional insights of the N-terminal acetyltransferase NatB. Van Damme P, Lasa M, Polevoda B, Gazquez C, Elosegui-Artola A, Kim DS, De Juan-Pardo E, Demeyer K, Hole K, Larrea E, Timmerman E, Prieto J, Arnesen T, Sherman F, Gevaert K, Aldabe R. (2012) *Proc Natl Acad Sci U S A*. **109**, 12449-54. doi: 10.1073/pnas.1210303109. Epub 2012 Jul 18. PubMed PMID: 22814378; PubMed Central PMCID: PMC3412031.

[121] Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions. Mayya V, Lundgren DH, Hwang SI, Rezaul K, Wu L,

Eng JK, Rodionov V, Han DK. (2009) *Sci Signal.* **2**, ra46. doi: 10.1126/scisignal.2000007. PubMed PMID: 19690332.

[122] A probability-based approach for high-throughput protein phosphorylation analysis and site localization. Beausoleil SA, Villén J, Gerber SA, Rush J, Gygi SP. (2006) *Nat Biotechnol.* **24**, 1285-92. Epub 2006 Sep 10. PubMed PMID: 16964243.

[123] A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. Dephore N, Zhou C, Villén J, Beausoleil SA, Bakalarski CE, Elledge SJ, Gygi SP. (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**, 10762-7. doi: 10.1073/pnas.0805139105. Epub 2008 Jul 31. PubMed PMID: 18669648; PubMed Central PMCID: PMC2504835.

[124] InParanoid 7: new algorithms and tools for eukaryotic orthology analysis. Ostlund G, Schmitt T, Forslund K, Köstler T, Messina DN, Roopra S, Frings O, Sonnhammer EL. (2010) *Nucleic Acids Res.* **38** (Database issue):D196-203. doi: 10.1093/nar/gkp931. Epub 2009 Nov 5.

[125] Molecular characterization of collaborator of ARF (CARF) as a DNA damage response and cell cycle checkpoint regulatory protein. Singh R, Kalra RS, Hasan K, Kaul Z, Cheung CT, Huschtscha L, Reddel RR, Kaul SC, Wadhwa R. (2014) *Exp Cell Res.* **322**, 324-34. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.01.022. Epub 2014 Jan 28. PubMed PMID: 24485912

[126] Alternative reading frame protein (ARF)-independent function of CARF (collaborator of ARF) involves its interactions with p53: evidence for a novel p53-activation pathway and its negative feedback control. Hasan, M. K., Yaguchi, T., Minoda, Y., Hirano, T., Taira, K., Wadhwa, R., and Kaul S. C. (2004) *Biochem. J.* **380**, 605-10 PubMed PMID: 15109303; PubMed Central PMCID: PMC1224239.

[127] CARF binds to three members (ARF, p53, and HDM2) of the p53 tumor-suppressor pathway. Kamrul, H. M., Wadhwa, R., and Kaul, S. C. (2007) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1100**, 312-5

- [128] CARF (collaborator of ARF) interacts with HDM2: evidence for a novel regulatory feedback regulation of CARF-p53-HDM2-p21WAF1 pathway. Hasan, M. K., Yaguchi, T., Harada, J. I., Hirano, T., Wadhwa, R., Kaul, S. C. (2008) *Int. J. Oncol.* **32**, 663-71 PubMed PMID: 18292944.
- [129] Network modeling of MDM2 inhibitor-oxaliplatin combination reveals biological synergy in wt-p53 solid tumors. Oncotarget. Azmi, A. S., Banerjee, S., Ali, S., Wang, Z., Bao, B., Beck, F. W., Maitah, M., Choi, M., Shields, T. F., Philip, P. A., Sarkar, F. H., and Mohammad, R. M. (2011), *Oncotarget* **2**, 378-92 PubMed PMID: 21623005; PubMed Central PMCID: PMC3248191.
- [130] CARF Is a vital dual regulator of cellular senescence and apoptosis. Hasan, K., Cheung, C., Kaul, Z., Shah, N., Sakaushi, S., Sugimoto, K., Oka, S., Kaul, S. C, and Wadhwa, R. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 1664-72 doi: 10.1074/jbc.M805778200. Epub 2008 Nov 10. PubMed PMID: 19001376.
- [131] Molecular characterization of apoptosis induced by CARF silencing in human cancer cells. Cheung, C. T., Singh, R., Yoon, A. R., Hasan, M. K., Yaguchi, T., Kaul, S. C., Yun, C. O., and Wadhwa, R. (2011) *Cell Death Differ.* **18**, 589-601. Erratum in: (2011) *Cell Death Differ.* **18**, 1238 PubMed PMID: 21052095; PubMed Central PMCID: PMC3131902.
- [132] Collaborator of ARF (CARF) Regulates Proliferative Fate of Human Cells by Dose-dependent Regulation of DNA Damage Signaling. Cheung CT, Singh R, Kalra RS, Kaul SC, Wadhwa R. (2014) *J Biol Chem.* **28**, 18258-69. doi: 10.1074/jbc.M114.547208. Epub 2014 May 13. PubMed PMID: 24825908.
- [133] PAXT-1 promotes XRN2 activity by stabilizing it through a conserved domain. Miki TS, Richter H, Rüegger S, Großhans H. (2014) *Mol Cell.* **53**, 351-60. doi: 10.1016/j.molcel.2014.01.001. PubMed PMID: 24462208.
- [134] Cancer-related transcriptional targets of the circadian gene NPAS2 identified by genome-wide ChIP-on-chip analysis. Yi CH, Zheng T, Leaderer D, Hoffman A, Zhu Y. (2009) *Cancer Lett.* **284**, 149-56. doi: 10.1016/j.canlet.2009.04.017. Epub 2009 May 19. PubMed PMID: 19457610; PubMed Central PMCID: PMC3182267.

- [135] Charting the landscape of tandem BRCT domain-mediated protein interactions. Woods NT, Mesquita RD, Sweet M, Carvalho MA, Li X, Liu Y, Nguyen H, Thomas CE, Iversen ES Jr, Marsillac S, Karchin R, Koomen J, Monteiro AN. (2012) *Sci Signal*. **5**, rs6. PubMed PMID: 22990118; PubMed Central PMCID: PMC4064718.
- [136] Mapping a dynamic innate immunity protein interaction network regulating type I interferon production. Li S, Wang L, Berman M, Kong YY, Dorf ME. (2011) *Immunity*. **35**, 426-40. doi: 10.1016/j.immuni.2011.06.014. Epub 2011 Sep 8. Erratum in: *Immunity*. 2011 Oct 28;35(4):647-8. PubMed PMID: 21903422; PubMed Central PMCID: PMC3253658.
- [137] A census of human soluble protein complexes. Havugimana PC, Hart GT, Nepusz T, Yang H, Turinsky AL, Li Z, Wang PI, Boutz DR, Fong V, Phanse S, Babu M, Craig SA, Hu P, Wan C, Vlasblom J, Dar VU, Bezginov A, Clark GW, Wu GC, Wodak SJ, Tillier ER, Paccanaro A, Marcotte EM, Emili A. (2012) *Cell*. **150**, 1068-81. doi: 10.1016/j.cell.2012.08.011. PubMed PMID: 22939629; PubMed Central PMCID: PMC3477804.
- [138] A cohesin-RAD21 interactome. Panigrahi AK, Zhang N, Otta SK, Pati D. (2012) *Biochem J*. **442**, 661-70. doi: 10.1042/BJ20111745. PubMed PMID: 22145905.
- [139] PRP19 transforms into a sensor of RPA-ssDNA after DNA damage and drives ATR activation via a ubiquitin-mediated circuitry. Maréchal A, Li JM, Ji XY, Wu CS, Yazinski SA, Nguyen HD, Liu S, Jiménez AE, Jin J, Zou L. (2014) *Mol Cell*. **53**, 235-46. doi: 10.1016/j.molcel.2013.11.002. Epub 2013 Dec 12. PubMed PMID: 24332808; PubMed Central PMCID: PMC3946837.
- [140] A COFRADIC protocol to study protein ubiquitination. Stes E, Laga M, Walton A, Samyn N, Timmerman E, De Smet I, Goormachtig S, Gevaert K. (2014) *J Proteome Res*. **13**, 3107-13. doi: 10.1021/pr4012443. Epub 2014 May 20. PubMed PMID: 24816145.

- [141] A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles. Wagner SA, Beli P, Weinert BT, Nielsen ML, Cox J, Mann M, Choudhary C. (2011) *Mol Cell Proteomics*. **10**, M111.013284. doi: 10.1074/mcp.M111.013284. Epub 2011 Sep 1. PubMed PMID: 21890473; PubMed Central PMCID: PMC3205876.
- [142] VCP phosphorylation-dependent interaction partners prevent apoptosis in Helicobacter pylori-infected gastric epithelial cells. Yu CC, Yang JC, Chang YC, Chuang JG, Lin CW, Wu MS, Chow LP. (2013) *PLoS One*. **8**, e55724. doi: 10.1371/journal.pone.0055724. Epub 2013 Jan 31. PubMed PMID: 23383273; PubMed Central PMCID: PMC3561343.
- [143] Multiple myeloma-associated chromosomal translocation activates orphan snoRNA ACA11 to suppress oxidative stress. Chu L, Su MY, Maggi LB Jr, Lu L, Mullins C, Crosby S, Huang G, Chng WJ, Vij R, Tomasson MH. (2012) *J Clin Invest*. **122**, 2793-806. doi: 10.1172/JCI63051. Epub 2012 Jul 2. PubMed PMID: 22751105; PubMed Central PMCID: PMC3408744.
- [144] Human Ccr4-Not complexes contain variable deadenylase subunits. Lau NC, Kolkman A, van Schaik FM, Mulder KW, Pijnappel WW, Heck AJ, Timmers HT. (2009) *Biochem J*. **422**, 443-53. doi: 10.1042/BJ20090500. PubMed PMID: 19558367.
- [145] Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae. Gritz L, Davies J. (1983) *Gene*. **25**, 179-88. PubMed PMID: 6319235.
- [146] Cloning, Structure, and Expression of the Mitochondrial Cytochrome P-450 Sterol 26-Hydroxylase, a Bile Acid Biosynthetic Enzyme. Andersson, S., Davis, D. L., Dahlback, H., Jornvall, H., and Russell, D. W. (1989) *J. Biol. Chem*. **264**, 8222-8229.
- [147] A Very Strong Enhancer is Located Upstream of an Immediate Early Gene of Human Cytomegalovirus. Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Hasler, K., Fleckenstein, B., and Schaffner, W. (1985) *Cell*. **41**, 521-530.

- [148] Mechanisms Underlying Expression of Tn10 Encoded Tetracycline Resistance. Hillen, W., and Berens, C. (1994) *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 345-369.
- [149] Control of Expression of the Tn10-encoded Tetracycline Resistance Genes: Equilibrium and Kinetic Investigations of the Regulatory Reactions. Hillen, W., Gatz, C., Altschmied, L., Schollmeier, K., and Meier, I. (1983) *J. Mol. Biol.* **169**, 707-721.
- [150] Negative and Positive Regulation by a Short Segment in the 5'-Flanking Region of the Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Gene. Nelson, J. A., Reynolds-Kohler, C., and Smith, B. A. (1987) *Mol. Cell. Biol.* **7**, 4125-4129.
- [151] Isolation and proteomic characterization of the major proteins of the nucleolin-binding ribonucleoprotein complexes. Yanagida, M., Shimamoto, A., Nishikawa, K., Furuichi, Y., Isobe, T., and Takahashi, N. (2001) *Proteomics.* **1**, 1390–1404 PubMed PMID: 11922599.
- [152] Parvulin (Par14), a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, is a novel rRNA processing factor that evolved in the metazoan lineage. Fujiyama-Nakamura, S., Yoshikawa, H., Homma, K., Hayano, T., Tsujimura-Takahashi, T., Izumikawa, K., Ishikawa, H., Miyazawa, N., Yanagida, M., Miura, M., Shinkawa, T., Yamauchi, Y., Isobe, T., and Takahashi, N. (2009) *Mol. Cell. Proteomics.* **8**, 1552–1565 doi: 10.1074/mcp.M900147-MCP200. Epub 2009 Apr 14. PubMed PMID: 19369196; PubMed Central PMCID: PMC2716718.
- [153] Mascot Server 2.4 取り扱い説明書, 2012年6月 第10版 Copyright 2004 - 2012 Matrix Science Ltd. マトリックスサイエンス株式会社
- [154] Evidence that replication of the antitumor adenovirus ONYX-015 is not controlled by the p53 and p14(ARF) tumor suppressor genes. Edwards SJ, Dix BR, Myers CJ, Dobson-Le D, Huschtscha L, Hibma M, Royds J, Braithwaite AW. (2002) *J Virol.* **76**, 12483-90. PubMed PMID: 12438574; PubMed Central PMCID: PMC136704.

- [155] 5'-end surveillance by Xrn2 acts as a shared mechanism for mammalian pre-rRNA maturation and decay. Wang M, Pestov DG. (2011) *Nucleic Acids Res.* **39**, 1811-22. doi: 10.1093/nar/gkq1050. Epub 2010 Oct 29. PubMed PMID: 21036871; PubMed Central PMCID: PMC3061060.
- [156] Gradual processing of the ITS1 from the nucleolus to the cytoplasm during synthesis of the human 18S rRNA. Preti M, O'Donohue MF, Montel-Lehry N, Bortolin-Cavaillé ML, Choessel V, Gleizes PE. (2013) *Nucleic Acids Res.* **41**, 4709-23. doi: 10.1093/nar/gkt160. Epub 2013 Mar 12. PubMed PMID: 23482395; PubMed Central PMCID: PMC3632142.
- [157] Both endonucleolytic and exonucleolytic cleavage mediate ITS1 removal during human ribosomal RNA processing. Sloan KE, Mattijssen S, Lebaron S, Tollervey D, Pruijn GJ, Watkins NJ. (2013) *J Cell Biol.* **200**, 577-88. doi: 10.1083/jcb.201207131. Epub 2013 Feb 25. PubMed PMID: 23439679; PubMed Central PMCID: PMC3587827.
- [158] The roles of SSU processome components and surveillance factors in the initial processing of human ribosomal RNA. Sloan KE, Bohnsack MT, Schneider C, Watkins NJ. (2014) *RNA.* **20**, 540-50. doi: 10.1261/rna.043471.113. Epub 2014 Feb 18. PubMed PMID: 24550520; PubMed Central PMCID: PMC3964915.
- [159] Structure and functions of nucleolin. Ginisty H, Sicard H, Roger B, Bouvet P. (1999) *J Cell Sci.* **112**, 761-72. Review. PubMed PMID: 10036227.
- [160] Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. Ginisty H, Amalric F, Bouvet P. (1998) *EMBO J.* **17**, 1476-86. PubMed PMID: 9482744; PubMed Central PMCID: PMC1170495.
- [161] A novel small-subunit processome assembly intermediate that contains the U3 snoRNP, nucleolin, RRP5, and DBP4. Turner AJ, Knox AA, Prieto JL, McStay B, Watkins NJ. (2009) *Mol Cell Biol.* **29**, 3007-17. doi: 10.1128/MCB.00029-09. Epub 2009 Mar 30. PubMed PMID: 19332556; PubMed Central PMCID: PMC2682003.

- [162] hnRNP K: one protein multiple processes. Bomsztyk K, Denisenko O, Ostrowski J. (2004) *Bioessays*. **26**, 629-38. Review. PubMed PMID: 15170860.
- [163] DNA damage-induced heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K sumoylation regulates p53 transcriptional activation. Pelisch,F., Pozzi,B., Risso,G., Munoz,M.J. and Srebrow,A. (2012) *J. Biol. Chem.* **287**, 30789–30799.
- [164] SUMOylation of hnRNP-K is required for p53-mediated cell-cycle arrest in response to DNA damage. Lee,S.W., Lee,M.H., Park,J.H., Kang,S.H., Yoo,H.M., Ka,S.H., Oh,Y.M., Jeon,Y.J. and Chung,C.H. (2012) *EMBO J.* **31**, 4441–4452.
- [165] ATM-dependent phosphorylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K promotes p53 transcriptional activation in response to DNA damage. Moumen,A., Magill,C., Dry,K.L. and Jackson,S.P. (2013) *Cell Cycle* **12**, 698–704.
- [166] Multi-layered molecular mechanisms of polypeptide holding, unfolding and disaggregation by HSP70/HSP110 chaperones. Finka A, Sharma SK, Goloubinoff P. (2015) *Front. Mol. Biosci.* **2**, 29. doi: 10.3389/fmolb.2015.00029. eCollection 2015. Review. PMID: 26097841
- [167] Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. Rüdiger S, Germeroth L, Schneider-Mergener J, Bukau B. *EMBO J.* 1997 **16**, 1501-7. PubMed PMID: 9130695; PubMed Central PMCID: PMC1169754.
- [168] Translational initiation factor and ribosome association with the cytoskeletal framework fraction from HeLa cells. Howe JG, Hershey JW. (1984) *Cell.* **37**, 85-93. PubMed PMID: 6722878.
- [169] DBC1 functions as a tumor suppressor by regulating p53 stability. Qin B, Minter-Dykhouse K, Yu J, Zhang J, Liu T, Zhang H, Lee S, Kim J, Wang L, Lou Z. (2015) *Cell Rep.* **10**, 1324-34. doi: 10.1016/j.celrep.2015.01.066. Epub 2015 Feb 26. PubMed PMID: 25732823; PubMed Central PMCID: PMC4351187.
- [170] S1-1 nuclear domains: characterization and dynamics as a function of transcriptional activity. Inoue A, Tsugawa K, Tokunaga K, Takahashi KP, Uni S, Kimura M, Nishio K, Yamamoto N,

Honda K, Watanabe T, Yamane H, Tani T. (2008) *Biol Cell*. **100**, 523-35. doi:

10.1042/BC20070142. PubMed PMID: 18315527.

[171] The human La (SS-B) autoantigen interacts with DDX15/hPrp43, a putative DEAH-box RNA helicase. Fouraux MA, Kolkman MJ, Van der Heijden A, De Jong AS, Van Venrooij WJ, Pruijn GJ. (2002) *RNA*. **8**, 1428-43. PubMed PMID: 12458796; PubMed Central PMCID: PMC1370349.

[172] Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L Is a subunit of human KMT3a/Set2 complex required for H3 Lys-36 trimethylation activity in vivo. Yuan W, Xie J, Long C, Erdjument-Bromage H, Ding X, Zheng Y, Tempst P, Chen S, Zhu B, Reinberg D. (2009) *J Biol Chem*. **284**, 15701-7. doi: 10.1074/jbc.M808431200. Epub 2009 Mar 30. PubMed PMID: 19332550; PubMed Central PMCID: PMC2708867.

[173] Control of c-myc mRNA stability by IGF2BP1-associated cytoplasmic RNPs. Weidensdorfer D, Stöhr N, Baude A, Lederer M, Köhn M, Schierhorn A, Buchmeier S, Wahle E, Hüttelmaier S. (2009) *RNA*. **15**, 104-15. doi: 10.1261/rna.1175909. Epub 2008 Nov 24. PubMed PMID: 19029303; PubMed Central PMCID: PMC2612774.

[174] Interaction of muscleblind, CUG-BP1 and hnRNP H proteins in DM1-associated aberrant IR splicing. Paul S, Dansithong W, Kim D, Rossi J, Webster NJ, Comai L, Reddy S. (2006) *EMBO J*. **25**, 4271-83. Epub 2006 Aug 31. PubMed PMID: 16946708; PubMed Central PMCID: PMC1570429.

[175] An RNA-binding protein, hnRNP A1, and a scaffold protein, septin 6, facilitate hepatitis C virus replication. Kim CS, Seol SK, Song OK, Park JH, Jang SK. (2007) *J Virol*. **81**, 3852-65. Epub 2007 Jan 17. PubMed PMID: 17229681; PubMed Central PMCID: PMC1866118.

[176] NS1-Binding protein (NS1-BP): a novel human protein that interacts with the influenza A virus nonstructural NS1 protein is relocalized in the nuclei of infected cells. Wolff T, O'Neill RE, Palese P. (1998) *J Virol*. **72**, 7170-80. PubMed PMID: 9696811; PubMed Central PMCID: PMC109939.

- [177] Cloning and mapping of the XRN2 gene to human chromosome 20p11.1-p11.2. Zhang M, Yu L, Xin Y, Hu P, Fu Q, Yu C, Zhao S. (1999) *Genomics*. **59**, 252-4. PubMed PMID: 10409438.
- [178] Premature termination of transcription by RNAP II: the beginning of the end. Contreras X, Benkirane M, Kiernan R. (2013) *Transcription*. **4**, 72-6. doi: 10.4161/trns.24148. PubMed PMID: 23714697; PubMed Central PMCID: PMC3646057.
- [179] mRNA decapping factors and the exonuclease Xrn2 function in widespread premature termination of RNA polymerase II transcription. Brannan K, Kim H, Erickson B, Glover-Cutter K, Kim S, Fong N, Kiemele L, Hansen K, Davis R, Lykke-Andersen J, Bentley DL. (2012) *Mol Cell*. **46**, 311-24. doi: 10.1016/j.molcel.2012.03.006. Epub 2012 Apr 5. PubMed PMID: 22483619; PubMed Central PMCID: PMC3806456.
- [180] The multifunctional protein p54nrb/PSF recruits the exonuclease XRN2 to facilitate pre-mRNA 3' processing and transcription termination. Kaneko S, Rozenblatt-Rosen O, Meyerson M, Manley JL. (2007) *Genes Dev*. **21**, 1779-89. PubMed PMID: 17639083; PubMed Central PMCID: PMC1920172.
- [181] Pause sites promote transcriptional termination of mammalian RNA polymerase II. Gromak N, West S, Proudfoot NJ. (2006) *Mol Cell Biol*. **26**, 3986-96. PubMed PMID: 16648491; PubMed Central PMCID: PMC1488997.
- [182] Human 5' --> 3' exonuclease Xrn2 promotes transcription termination at co-transcriptional cleavage sites. West S, Gromak N, Proudfoot NJ. (2004) *Nature*. **432**, 522-5. PubMed PMID: 15565158.
- [183] Effects of Transcription Elongation Rate and Xrn2 Exonuclease Activity on RNA Polymerase II Termination Suggest Widespread Kinetic Competition. Fong N, Brannan K, Erickson B, Kim H, Cortazar MA, Sheridan RM, Nguyen T, Karp S, Bentley DL. (2015) *Mol Cell*. **60**, 256-67. doi: 10.1016/j.molcel.2015.09.026. PubMed PMID: 26474067; PubMed Central PMCID: PMC4654110

- [184] Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (HnRNP) K genome-wide binding survey reveals its role in regulating 3'-end RNA processing and transcription termination at the early growth response 1 (EGR1) gene through XRN2 exonuclease. Mikula M, Bomsztyk K, Goryca K, Chojnowski K, Ostrowski J (2013) *J Biol Chem.* **288**, 24788-98. doi: 10.1074/jbc.M113.496679. Epub 2013 Jul 15. PubMed PMID: 23857582; PubMed Central PMCID: PMC3750174.
- [185] Co-transcriptional degradation of aberrant pre-mRNA by Xrn2. Davidson L, Kerr A, West S. (2012) *EMBO J.* **31**, 2566-78. doi: 10.1038/emboj.2012.101. Epub 2012 Apr 20. PubMed PMID: 22522706; PubMed Central PMCID: PMC3365414.
- [186] Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. Kedersha N, Chen S, Gilks N, Li W, Miller IJ, Stahl J, Anderson P. (2002) *Mol Biol Cell.* **13**, 195-210. PubMed PMID: 11809833; PubMed Central PMCID: PMC65082.
- [187] Mechanisms of heat shock response in mammals. Velichko AK, Markova EN, Petrova NV, Razin SV, Kantidze OL. (2013) *Cell Mol Life Sci.* **70**, 4229-41. doi: 10.1007/s00018-013-1348-7. Epub 2013 Apr 30. Review. PubMed PMID: 23633190.
- [188] mTOR regulates the nucleoplasmic diffusion of Xrn2 under conditions of heat stress. Watanabe K, Ijiri K, Ohtsuki T. (2014) *FEBS Lett.* **588**, 3454-60. doi: 10.1016/j.febslet.2014.08.003. Epub 2014 Aug 12. PubMed PMID: 25128458.
- [189] Degradation of initiator tRNA^{Met} by Xrn1/2 via its accumulation in the nucleus of heat-treated HeLa cells. Watanabe K, Miyagawa R, Tomikawa C, Mizuno R, Takahashi A, Hori H, Ijiri K. (2013) *Nucleic Acids Res.* **41**, 4671-85. doi: 10.1093/nar/gkt153. Epub 2013 Mar 6. PubMed PMID: 23471000; PubMed Central PMCID: PMC3632136.
- [190] Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. Johnsson N, Varshavsky A. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**, 10340-4. PubMed PMID: 7937952; PubMed Central PMCID: PMC45015.

- [191] Sequential binding of cytosolic Phox complex to phagosomes through regulated adaptor proteins: evaluation using the novel monomeric Kusabira-Green System and live imaging of phagocytosis. Ueyama T, Kusakabe T, Karasawa S, Kawasaki T, Shimizu A, Son J, Leto TL, Miyawaki A, Saito N. (2008) *J Immunol.* **181**, 629-40. PubMed PMID: 18566430.
- [192] Structure and function of the 5'-->3' exoribonuclease Rat1 and its activating partner Rai1. Xiang S, Cooper-Morgan A, Jiao X, Kiledjian M, Manley JL, Tong L. (2009) *Nature.* **458**, 784-8. doi: 10.1038/nature07731. Epub 2009 Feb 4. PubMed PMID: 19194460; PubMed Central PMCID: PMC2739979.
- [193] Functional Characterization of the Serine-Rich Tract of Varicella-Zoster Virus IE62. Kim SK, Shakya AK, Kim S, O'Callaghan DJ. (2015) *J Virol.* pii: JVI.02096-15. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26537679.
- [194] A conserved double-stranded RNA-binding domain. St Johnston D, Brown NH, Gall JG, Jantsch M. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**, 10979-83. PubMed PMID: 1438302; PubMed Central PMCID: PMC50466.
- [195] Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. Manche L, Green SR, Schmedt C, Mathews MB. (1992) *Mol Cell Biol.* **12**, 5238-48. PubMed PMID: 1357546; PubMed Central PMCID: PMC360457.
- [196] Preferential selection of adenosines for modification by double-stranded RNA adenosine deaminase. Polson AG, Bass BL. (1994) *EMBO J.* **13**, 5701-11. PubMed PMID: 7527340; PubMed Central PMCID: PMC395536.
- [197] Does the ribosome translate cancer? Ruggero D, Pandolfi PP. (2003) *Nat Rev Cancer.* **3**, 179-92. Review. PubMed PMID: 12612653.
- [198] The multifunctional nucleolus. Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI. (2007) *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**, 574-85. Review. PubMed PMID: 17519961.

- [199] Structure and function of ribosomal RNA gene chromatin. Birch JL, Zomerdijk JC. (2008) *Biochem Soc Trans.* **36**, 61934. doi: 10.1042/BST0360619. Review. PubMed PMID: 18731128; PubMed Central PMCID: PMC3858719.
- [200] Making ribosomes. Fatica A, Tollervey D. (2002) *Curr Opin Cell Biol.* **14**, 313-8. Review. PubMed PMID: 12067653.
- [201] *In vitro* assays of 5' to 3'-exoribonuclease activity. Pellegrini O., Mathy N., Condon C. and Benard L. (2008) *Methods Enzymol.*, **448**, 167-83 doi: 10.1016/S0076-6879(08)02609-8. PubMed PMID: 19311176.
- [202] Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method. Schmittgen, T.D. and Livak, K.J. (2008) *Nat. protoc.*, **3**, 1101-1108. PubMed PMID: 18546601.
- [203] 5'ETS rRNA processing facilitated by four small RNAs: U14, E3, U17, and U3. Enright CA, Maxwell ES, Eliceiri GL, Sollner-Webb B (1996) *RNA*. **2**, 1094-9. Erratum in: *RNA* 1996 Dec;2(12):1318. PubMed PMID: 8903340; PubMed Central PMCID: PMC1369439.
- [204] Recruitment of factors linking transcription and processing of pre-rRNA to NOR chromatin is UBF-dependent and occurs independent of transcription in human cells. Prieto JL, McStay B. (2007) *Genes Dev.* **21**, 2041-54. PubMed PMID: 17699751; PubMed Central PMCID: PMC1948859.

謝辞

本研究を遂行するに当たり、終始ご指導、ご鞭撻を賜り、本論文の提出の機会を授けて下さいました東京農工大学連合農学研究科教授 高橋信弘先生に心より厚くお礼申し上げます。本論文のご指導賜りました東京農工大学連合農学研究科元教授 矢ヶ崎一三先生に深く感謝いたします。本論文のご校閲とご指導賜りました東京農工大学連合農学研究科教授 西河淳先生、東京農工大学連合農学研究科客員教授 遠藤昌吾先生、茨城大学農学部教授 西原宏史先生、宇都宮大学連合農学研究科教授 松田勝先生に深く感謝申し上げます。

プロテオミクスの技術習得に関して多大なるご指導賜りました、首都大学東京理学部特任教授 磯部俊明先生、同大学研究員 山内芳雄博士に深く感謝申し上げます。

研究生活における知識や技術をご指導頂きました東京農工大学農学部特任助教 石川英明先生、東京農工大学農学部特任助教 泉川桂一先生、に深く感謝申し上げます。研究生活における知識や技術、研究室のルールをご指導頂きました現ダンディー大学研究員 吉川治孝博士に深く感謝いたします。研究室全般にわたりお世話になりました東京農工大学応用生物科学科構造生化学研究室の皆様心より感謝申し上げます。

本論文作成に当たり、ご理解頂き暖かく見守って下さいました福島県立医科大学教授 渡辺慎哉先生、福島県立医科大学教授 家村俊一郎先生に深く感謝申し上げます。

最後に、仕事を辞めて、博士課程に進むことを何も言わず応援してくれた家族に心から深く感謝を申し上げます。