

## 欠失変異型タンパク質を用いたヒト Ku 抗原 p 70 サブユニットの機能ドメイン解析

大森謙太郎

Ku 抗原はリウマチ性自己免疫疾患の患者血清が認識する自己抗原のひとつとして見いだされ、その後この Ku 抗原は p 70 サブユニットと p 86 サブユニットからなるヘテロダイマーとして核内に存在し、二本鎖 DNA に生じた損傷を修復したり遺伝子再構成に必要な機能を果たしている核蛋白であることが明らかにされてきた。この Ku 抗原がヘテロダイマーを形成したり DNA に結合したり核に移行したりする役割を持った領域は p 70 サブユニットの aa 216-241 と aa 584-609, aa 483-609 の部位にあると推察されている。そこで、p 70 サブユニットの欠失変異体を作成してゲルシフトアッセイ法や免疫共沈降法、免疫蛍光抗体法を使って Ku 抗原の分子形成に必要な領域と機能発現に必要な領域を明らかにすることを目的として実験を行った。p 70 サブユニットについて既に推察されていた3つの領域 (aa 216-241 と aa 584-609, aa 483-609) のいずれを欠失しても変異型 p 70 サブユニットは p 86 サブユニットと変異型ヘテロダイマーをつくり、DNA 断片 (77 bp) にも結合した。これに対し、これら3つとは異なる新たな領域 (aa 392-466) を欠失させると変異型ヘテロダイマーもつけれないし、DNA 断片へも結合できなくなった。次に、全長の p 70 サブユニットに存在する核局在化シグナルの部位を決めるために Sf9 細胞内で p 70 サブユニットを発現させその局在性を調べたところ、aa 483-609 を欠失させた場合には変異型 p 70 サブユニットは核に移行しなかったが、aa 584-609 を欠失させた場合には核が著しく変形したものの変異型 p 70 サブユニットは核に移行した。これらの結果から Ku 抗原の分子形成と DNA 結合能に必要な p 70 サブユニットの領域は aa 392-466 の部位であり、p 70 サブユニットが核に移行するのに必要なシグナルは aa 483-583 にあることが分かった。さらに今回見出したこれら2つの領域 (aa 392-466, aa 483-583) はタンパク質データベース中に相同なアミノ酸配列を持たないことから、Ku 抗原は今までに報告されていない全く独自の配列を使ってヘテロダイマーを形成し DNA へ結合したり、独自の核移行シグナルを使って核へ移行している可能性が示された。(平成11年4月13日受理)

### Defining the Functional Domains of Ku p70 Subunit Using Deletion Mutant Proteins

Kentaro OMORI

The Ku autoantigen has been recently found to play a crucial role in double strand break (DSB) repair of chromosomal DNA and V (D) J recombination of immunoglobulin genes. Ku is an

abundant heterodimeric nuclear protein consisting of p70 and p86 subunits, which is localized at the nucleosome linker of the chromosome. The manner in which DNA recognizes Ku is thought to be quite unique; it binds to DSB once, and freely moves to the internal portion of double stranded DNA (dsDNA). Although physical contact of the p70 subunit with DNA has been demonstrated, its molecular basis has not been well investigated.

In this report, to identify the functional domains on p70 subunits, we produced recombinant p70 deletion mutants by using the Baculovirus system. The results showed that aa392-466 on p70 was crucial for a functional Ku heterodimer. The leucine zipper like motifs and helix-turn-helix like motif are not necessary for either heterodimerization or the DNA binding property of Ku. We also investigated nuclear localization of those mutants by immunofluorescence microscopy, and found that aa483-583 was crucial for nuclear localization of p70. No homologous region between these above sequences and other known DNA binding proteins was found by database analysis.

These data may be related to the unique function of Ku. (Accepted on April 13, 1999) *Kawasaki Igakkaishi* 25(1): 35-46, 1999

**Key Words** ① Ku antigen ② Baculovirus ③ Autoantigen  
④ DNA repair

## はじめに

全身性エリテマトーデスや強皮症などのリウマチ性自己免疫疾患では、多彩な自己抗体の出現が特徴的である。特に抗核抗体と呼ばれる細胞核を認識する抗体の出現は、日常診療において不可欠な要素となっている。この抗核抗体の認識する抗原、核抗原は核酸とそれに結合するタンパク群の複合体であり、実際 intermolecular spreading で示される様、この一塊となった複合体そのものが抗原として認識されている<sup>1)~3)</sup>。よって、その抗原分子がどのような形で核酸と結合するのかが、抗原分子を解析する上で重要である。

Ku 抗原は、当初 Overlap 症候群の自己抗原として発見された核タンパク質であり、抗 Ku 抗体は本邦では筋炎を伴う強皮症に特徴的で、また欧米では全身性エリテマトーデスや混合性結合組織症の患者血清中に広く見出されている<sup>4)</sup>。

一方で Ku 抗原は二本鎖 DNA 修復因子としても注目され、その機能について検討がなされている。近年、放射線感受性細胞株の一部は二

本鎖 DNA 断裂の修復欠損が放射線感受性の原因であることが明らかにされ、さらにその細胞株では Ku 抗原のような二本鎖 DNA 断端を認識する活性が欠損していること<sup>5)</sup>、またその細胞株に Ku 抗原のサブユニットを導入することによってその放射線感受性に回復傾向が認められることが示された<sup>6)</sup>。加えて、その二本鎖 DNA 修復欠損細胞株では同時に免疫グロブリンの V (D) J 組み換え機能も欠損していることが明らかとなった<sup>7),8)</sup>。また Ono ら<sup>9)</sup>は、Ku 抗原がアデノウィルスの後期プロモーターの転写活性を強く抑制することを示し、外来遺伝子に対する生体防御因子として働くことを推察した。さらに、Ku 抗原のノックアウトマウスでは B 細胞の細胞周期が遅延をきたしたり、血清中の IgG 以降の免疫グロブリンを欠損することが示された<sup>10)~12)</sup>。さらに臨床的には放射線耐性癌細胞に併用される温熱療法は、Ku 抗原および、その複合体の構成因子である DNA-PK を不活化する事によって放射線による DNA 断裂の修復を阻害することが示された<sup>13)</sup>。またシスプラチン耐性細胞株は DNA 修復能力が高いことに加え、シスプラチンが Ku 抗原を含む遺伝子修復複合体の機能を抑制すること<sup>14)</sup>から、それが

シスプラチン耐性機序であると考えられ、癌治療における標的分子としての重要性が高まっている。

一方、Ku 抗原の分子構造については生体内で様々な組織に大量に存在するにも関わらず不明な点が多い。Ku 抗原は 70 kDa (p70) と 86 kDa (p86) の二つのサブユニットが 1対1で結合するヘテロダイマーで、Yaneva ら<sup>15)</sup>は UV クロスリンキング法の結果から、このうち p70 サブユニットが DNA 断端と接触することを示した。p70 サブユニットはそのアミノ酸配列の一次構造上に 2つの basic-leucine zipper 構造 (bZip 構造：aa215-243, aa483-518) と、その C 端に helix-turn-helix 構造 (HTH 構造：aa585-604) に類似した配列を持っている。Chou ら<sup>16)</sup>はサウスウエスタンブロット法を用いて、HTH 様構造を含む aa536-609 が DNA と結合することを示し、それら bZip 様構造、HTH 様構造が二量体形成および DNA 結合ドメインとして有力視されていた<sup>17-21)</sup>。しかし、その多くはリコンビナントタンパク質の発現に大腸菌や酵母を用いており、それらの系で得られたタンパク質は不安定かつ機能的でない。実際、その後の解析により、bZip 様構造、HTH 様構造以外の部位で Ku 抗原が DNA 断端を認識することが報告されている<sup>22-24)</sup>。さらに Ono ら<sup>25)</sup>は、機能的なリコンビナント Ku 抗原を得るためにバキュロウイルスを用いたシステムを開発し、Ku 抗原が DNA 断端を認識するためには、2つのサブユニットが二量体を形成することが必須であることを示した。本研究では、そのバキュロウイルスのシステムを用いて p70 サブユニットの欠質変異型タンパク質を作成し、その機能ドメインの決定を試みた。結果、Ku 抗原が独自の構造による DNA 結合様式および核局在化シグナルを持つことが示された。

### 材料および方法

Site-directed mutagenesis：変異型 cDNA の作成には Site-directed mutagenesis を用いた。全長

のヒト p70 cDNA をいったん pGEM 3 Zf (+) の BamHI 切断部位に T<sub>4</sub>DNA リガーゼを用いて挿入、常法にしたがいこのプラスミドを精製<sup>26)</sup>、テンプレートとした。bZip, HTH 様構造を含む 4ヶ所 (aa392-466, aa216-241, aa584-609, aa483-609) を削除するプライマーとして、5'端側をリン酸化した以下に示すオリゴヌクレオチドを合成した。p70 Δ A, 5'-CTCCAGACACTTGATGAG-3', 5'-AAGCTTCGCTTCACATAC-3'; p70 Δ B, 5'-CAAGGATATGTCAAAGCCCCCAG-3', 5'-TTGCGGAAGGTTCGCGCCAAG-3'; p70 Δ HTH, 5'-GCGGATCCAACATGTCAGGGT-3', 5'-GGATCCTCATCAGGCCTCCTTTCAGCAT-3'; p70 Δ Zip, 5'-GCAGGATCCAACATGTCAGGGT-3', 5'-AGGATCCTCACACGGGGTTCTCAAAG-3' (宝酒造)。Site-directed mutagenesis は ExSite PCR Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene 社) を用い、マニュアルに従って行った。合成したプラスミドをいったんクローニングし、DNA シーケンスで PCR エラーのないことを確認した後、その BamHI フラグメントを pBlueBac 2 (Invitrogen 社) の BamHI 切断部位へ挿入、制限酵素マッピングでインサートの挿入方向を確認し、トランスファーベクターとした (pBB 2-70Δ A, pBB 2-70 Δ B, pBB 2-70 Δ HTH, pBB 2-70Δ Zip)。トランスファーベクターの精製には QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN 社) を使用した。

リコンビナントウイルス：リコンビナントウイルスの作成には Bac-N-Blue™ Transfection Kit (Invitrogen 社) を使用した。前記のそれぞれのトランスファーベクター 2 μg と線状 バキュロウイルス (Autographa Californica nuclear polyhedrosis virus: AcNPV) DNA 1 μg を混合し、リン酸カルシウム法を用いて 25 cm<sup>2</sup> プラスチックフラスコ内で 2 × 10<sup>6</sup>個の Sf9 細胞に導入した。cDNA は細胞内で相同組換えによりウイルス DNA に挿入され、27°C、3日間培養後、培地中に放出されたリコンビナントウイルスを回収、150 μg/ml の X-gal を含む重層寒天培地

を用いてブランク精製を行った<sup>27)</sup>。

ブランク精製で選別したウイルスブランクを1 mlのcomplete TNM-FH培地に溶解し、そのうち200  $\mu$ lを24穴のプラスチックプレートを用いて $2 \times 10^5$ 個のSf9細胞に感染させ27°C、3日間培養後回収し、リコンビナントタンパク質の発現を8% SDS-PAGEにて確認した<sup>28)</sup>。目的とするリコンビナントタンパク質を発現していたウイルス溶液800  $\mu$ lを再度25 cm<sup>2</sup>プラスチックフラスコ内で $2 \times 10^6$ 個のSf9細胞に接種し、27°C、7日間培養し培養上清を回収、ウイルスストックとした(VBB 2-70 $\Delta$ A, VBB 2-70 $\Delta$ B, VBB 2-70  $\Delta$ HTH, VBB 2-70  $\Delta$ Zip)。全長のp70サブユニットとp86サブユニットのウイルスストックは、Onoら<sup>25)</sup>から供与されたものを使用した(AcNPV 2.1, VBB 2-86Ku)。

免疫共沈降法：5 cm<sup>2</sup>ディッシュ内で $3 \times 10^5$ 個のSf9細胞にリコンビナントウイルスを感染させ67時間培養した後、細胞をメチオニン不含グレース培地で洗浄、100  $\mu$ Ci/mlのTRAN<sup>35</sup>S-LABEL (ICN社)を加えメチオニン不含グレース培地でさらに21時間培養した。ラベルした細胞を回収しPBSで洗浄後、 $3 \times 10^5$ 個/250  $\mu$ lになるように50 mM Tris-HCl pH7.5, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 1  $\mu$ g/ml Leupeptin, 1  $\mu$ g/ml Pepstatin A, 1 mM PMSFを加え凍結融解、超音波破碎(4°C, 20 kHz, 50 W, 3 min.)、遠心による不溶画分の除去を行い、このうち30  $\mu$ lをとり上記の溶媒を用いて100  $\mu$ lに希釈、あらかじめ同一の溶媒で平衡化した40  $\mu$ l (50%スラリー)のプロテインAアガロースビーズ (Sigma社)を加えて4°Cで16時間前処理をし、その上清をタンパク質溶液とした。固定化抗体は2  $\mu$ lの抗ヒトp86抗体と20  $\mu$ l (50%スラリー)のプロテインAアガロースビーズを混合し、4°Cで16時間反応後5% BSA-PBSで洗浄し作成した。この固定化抗体に前記のタンパク質溶液を加えて4°Cで1時間反応させた後、ビーズを50 mM Tris-HCl pH7.5で洗浄、20  $\mu$ lの2 $\times$  Laemmli 緩衝液を加

えて3分間煮沸、その上清を8% SDS-PAGEで展開しオートラジオグラフィーで可視化した。

ゲルシフトアッセイ：Sf9細胞にリコンビナントウイルスを感染させ72時間後に細胞を回収、PBSで洗浄、 $2 \times 10^5$ 個/mlになるように40 mM HEPES pH7.9, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.1% Nonidet P-40に溶解し凍結融解、超音波破碎(4°C, 20 kHz, 50 W, 3 min.)を行った。この上清100  $\mu$ lをとり、100  $\mu$ lの1 M KCl, 1  $\mu$ lの200 mM MgCl<sub>2</sub>を加え遠心による不溶画分の除去を行った。この上清に600  $\mu$ lの20 mM HEPES pH 7.9, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.05% Nonidet P-40, 25%グリセロールを加え、そのうち500  $\mu$ lをとり1000 mlの20 mM HEPES pH7.9, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 150 mM KCl, 0.05% Nonidet P-40, 25%グリセロールで透析しタンパク質溶液とした。線状二本鎖DNAプロローブはp70 cDNAからプライマーとして、合成オリゴヌクレオチドを使用しPCRで77 bpの断片を作成、 $\gamma$ <sup>32</sup>P-ATPで5'端標識したものを使用した。合成オリゴヌクレオチドは以下のものを使用した。5'-ATTCTA GAGCTTGACCAG-3', 5'-TATCTAGATCCGT GGCCCATC-3'。前記のタンパク質溶液3  $\mu$ lとDNAプロローブを20  $\mu$ lの20 mM HEPES pH 7.9, 20%グリセロール, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.0075% Xylenecyanol, 0.0075% Bromophenol blue中に混合、室温で40分間反応させた後、ポリアクリルアミドゲル(4%アクリルアミド, 0.1%ビスアクリルアミド, 50 mM Tris-borate, 1 mM EDTA, 2%グリセロール)上に展開、オートラジオグラフィーで可視化した。

免疫蛍光抗体法：Sf9細胞をスライドチャンパー (NUNC社)上で培養し、感染48時間後、室温のアセトン/メタノール (=50:50)で2分固定、抗ヒトKu血清およびFITCラベル二次抗体で染色し、蛍光顕微鏡 (Nikon ECLIPSE E 400)下でそれぞれの変異型p70サブユニットの局在を観察した。

データベースを用いた相同性の検索及び親水

性・疎水性の解析：データベースを用いた相同性の検索及び親水性・疎水性の解析は Basic Local Alignment Search Tool (GenomeNet, <http://www.blast.genome.ad.jp/>) 及び GENETYX 遺伝情報処理ソフトウェア (ソフトウェア開発株式会社) を用いて行った。

## 結 果

変異型 Ku 抗原の作成：Site-directed mutagenesis 及びバキュロウイルスを用いて、p70 サブユニットのアミノ酸配列から推定された HTH 構造、bZip 構造およびその中間部分を削除した変異型 Ku 抗原を作成した (Fig. 1)。機能的な Ku 抗原は、p86 と p70 の二つのサブユニットからなるヘテロダイマーである。そこで、二つのサブユニットを同時に等量発現させるウイルス混合液を得るため、さらにウイルスストックの滴定を行った。AcNPV 2.1, VBB 2-70△A, VBB 2-70△B, VBB 2-70△HTH および VBB 2-70△Zip と VBB 2-86 Ku のウイルスストックをあらかじめ段階的 (AcNPV 2.1 及び VBB 2-変異型 p70 : VBB 2-86Ku = 1 : 7, 1 : 3, 3 : 5, 1 : 1, 5 : 3, 3 : 1, 7 : 1) に混合し、24穴プラスチックプレート内で  $2 \times 10^5$  個の Sf9 細胞に感染させた。72時間培養後、細胞を回収、8% SDS-PAGE に展開し二つのサブユニットが等量のタンパク質を発現するウイ

ルスストック量を決定した。作成したタンパク質の発現は 8% SDS-PAGE で確認し、クーマシーブリリアントブルー染色で可視化した。今回作成したウイルスストックでは VBB2-変異型 p70 : VBB2-86Ku = 3 : 5 で二つのサブユニットがほぼ等量に、またそのサイズから目的とするタンパク質が発現した (Fig. 2)。

変異型 Ku 抗原の DNA 結合能：作成した変異型 Ku 抗原の DNA 結合能を検討するため

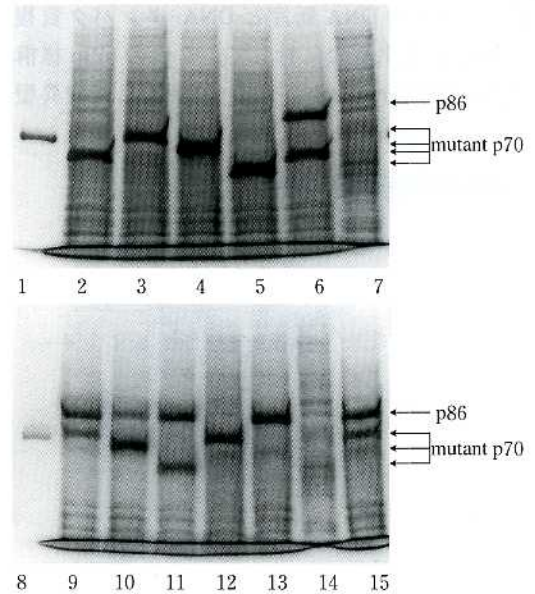


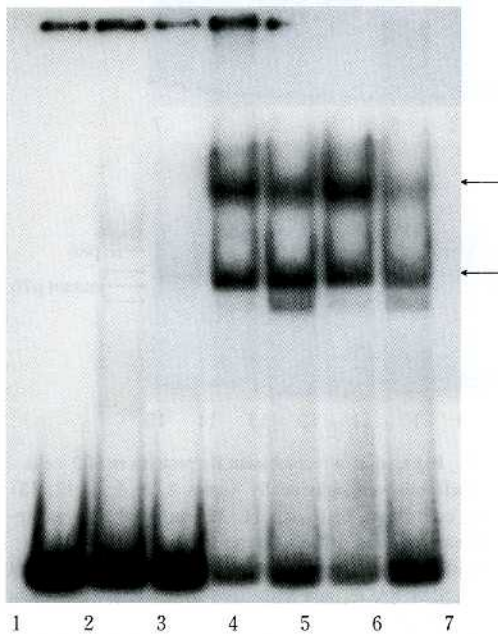
Fig. 2. Expression of recombinant Ku proteins in Sf9 cells. Each cells were individually (lanes 2, 3, 4, 5, 12, 13) or co- (lanes 6, 9, 10, 11, 15) infected with recombinant viruses. Cells were harvested after 72 hr. postinfection. Production of Ku proteins was analyzed on SDS-PAGE, and visualized by Coomassie brilliant blue staining.

Lane 1, bovine serum albumin; lane 2, VBB 2-70△A infected Sf9 cells; lane 3, VBB 2-70△B infected Sf9 cells; lane 4, VBB 2-70△HTH infected Sf9 cells; lane 5, VBB 2-70△Zip infected Sf9 cells; lane 6, VBB 2-86 Ku and VBB 2-70△A infected Sf9 cells; lane 7, non-infected Sf9 cells; lane 8, bovine serum albumin; lane 9, VBB 2-86 Ku and VBB 2-70△B infected Sf9 cells; lane 10, VBB 2-86 Ku and VBB 2-70△HTH infected Sf9 cells; lane 11, VBB 2-86 Ku and VBB 2-70△Zip infected Sf9 cells; lane 12, AcNPV 2.1 infected Sf9 cells; lane 13, VBB 2-86 Ku infected Sf9 cells; lane 14, non-infected Sf9 cells; lane 15, VBB 2-86 Ku and AcNPV 2.1 infected Sf9 cells. The positions of p86 subunit and mutant p70 subunits were indicated by arrow.



Fig. 1. Construction of the deletion mutants of p70 subunit. A human p70 cDNA fragment was subcloned into BamHI site of pGEM 3 Zf (+). The deletion mutants were constructed by the site-directed mutagenesis. The numbers indicate the positions of amino acids. The thin lines indicate deleted position. bZip; basic-leucine zipper like motif, HTH; helix-turn-helix like motif.

にゲルシフトアッセイを行った。その結果 **Figure 3** に示すように、推定された機能ドメインのいずれの削除 (aa 216-241 : lane 4, aa 584-609 : lane 5, aa 483-609 : lane 6) もバンドシフトを形成したのに対し、lane 3 の2つの bZip 様構造の中間部分 (aa 392-466) を削除した変異型 Ku 抗原 (p 86 Ku + p 70  $\Delta$  A) は、バンドシフトを形成しなかった。この結果から、推定された機能ドメインの削除 (aa 216-241, aa 584-609, aa 483-609) は全長の Ku 抗原と同様に 77 bp の DNA 断片と DNA-タンパク質複合体を形成するのに対して、2つの bZip 様構造の中間部分 (aa 392-466) を削除した変異型

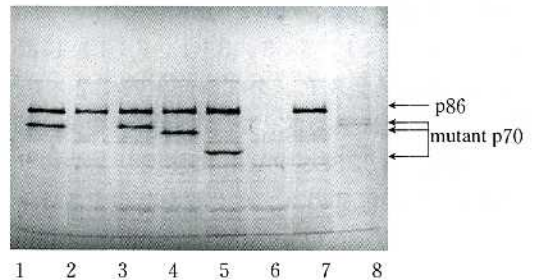


**Fig. 3.** DNA binding activity of recombinant Ku proteins. Three microliter of each protein sample was reacted with  $^{32}$ P-labeled linear dsDNA for 40 min. at room temperature. The DNA-Ku complex formation was analyzed by electrophoretic mobility shift assay on a 4 % acrylamide gel, and visualized by autoradiography. Lane 1, free probe; lane 2, non-infected Sf9 cells; lane 3, VBB 2-86 Ku and VBB 2-70 $\Delta$  A infected Sf9 cells; lane 4, VBB 2-86 Ku and VBB 2-70 $\Delta$  B infected Sf9 cells; lane 5, VBB 2-86 Ku and VBB 2-70 $\Delta$  HTH infected Sf9 cells; lane 6, VBB 2-86 Ku and VBB 2-70 $\Delta$  Zip infected Sf9 cells; lane 7, VBB 2-86 Ku and AcNPV 2.1 infected Sf9 cells. The arrows indicate position of the DNA-Ku complex.

Ku 抗原は DNA-タンパク質複合体を形成しないことが示された。

変異型 Ku 抗原の二量体形成能：それぞれの変異型 Ku 抗原の二量体形成を確認するために、抗ヒト p86 抗体を用いて免疫共沈降法を行った (**Fig. 4**)。ゲルシフトアッセイで DNA 結合能を欠如していた aa 392-466 を削除した変異型 Ku 抗原 (p 86 Ku + p 70  $\Delta$  A : lane 2) は、抗ヒト p 86 抗体に対して沈降されなかったのに対して、他の DNA 結合能を保持していた変異型 Ku 抗原 (p 86 Ku + p 70  $\Delta$  B : lane 3, p 86 Ku + p 70  $\Delta$  HTH : lane 4, p 86 Ku + p 70  $\Delta$  Zip : lane 5) は p 86 サブユニットとほぼ等量沈降された。この結果、ゲルシフトアッセイで DNA 結合能を欠如していた変異型 Ku 抗原は、p 86 サブユニットと二量体を形成していないことが示された。

変異型 p 70 サブユニットの細胞内局在：当教室では過去に、p 70 サブユニットが単独でも核内に移行されることを示した<sup>29)</sup>。そこで、推定された bZip, HTH 構造の削除による p 70 サ



**Fig. 4.** Co-immunoprecipitation of recombinant Ku proteins. Cells were co-infected with recombinant viruses and labeled with  $^{35}$ S methionine. Then, cells were lysed, and precipitated by anti-human p 86 antibody coated protein A beads. Samples were analyzed on 8% SDS-PAGE, and visualized by autoradiography. Lane 1, VBB 2-86 Ku and AcNPV 2.1 infected Sf9 cells; lane 2, VBB 2-86 Ku and VBB 2-70 $\Delta$  A infected Sf9 cells; lane 3, VBB 2-86 Ku and VBB 2-70 $\Delta$  B infected Sf9 cells; lane 4, VBB 2-86 Ku and VBB 2-70 $\Delta$  HTH infected Sf9 cells; lane 5, VBB 2-86 Ku and VBB 2-70 $\Delta$  Zip infected Sf9 cells; lane 6, AcNPV 2.1 infected Sf9 cells; lane 7, VBB 2-86 Ku infected Sf9 cells; lane 8, non-infected Sf9 cells. Positions of p 70 mutant proteins and p 86 protein are indicated.

ブユニットの、Sf9細胞内での局在に対する影響を免疫蛍光抗体法を用いて観察した。結果、Figure 5に示すとおり aa 392-466, aa 216-241を削除した変異型 p 70 サブユニットは全長の p 70 サブユニットと同様に核に移行されたのに対して (Fig. 5: A', B'), aa 481-609 を削除した変異型 p 70 サブユニットでは核へ移行されなかった (Fig. 5: D'), aa 584-609 を削除した変異型 p 70 サブユニットでは、核へ移行されたものの核は著しく膨化した (Fig. 5: C, C')。

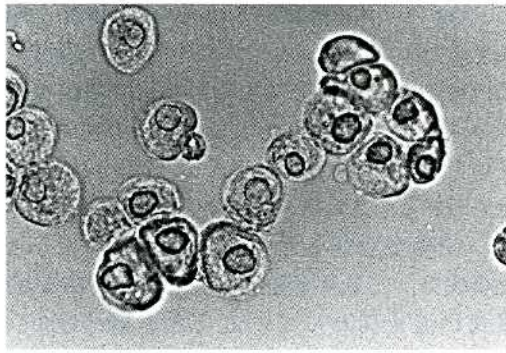
データベースを用いた相同性の検索及び親水性・疎水性の解析：前記の結果を基にアミノ酸配列の構造解析を行った。すなわち、そのアミノ酸残基から Hopp と Woods の方法に従って GENETYX 遺伝情報処理ソフトウェア (ソフトウェア開発株式会社) を用いて親水性・疎水性の解析を行った<sup>30)</sup>。結果、aa 392-466 および aa 483-609 の領域内には極性の極端な変化、いわゆる acidic/basic lesion を認める部位が存在した (Fig. 6)。BLAST を用いたタンパク質データベースとの相同性の検索では、これらの部位に既知の DNA 結合タンパクとの有意な相同性を認めなかった。

## 考 察

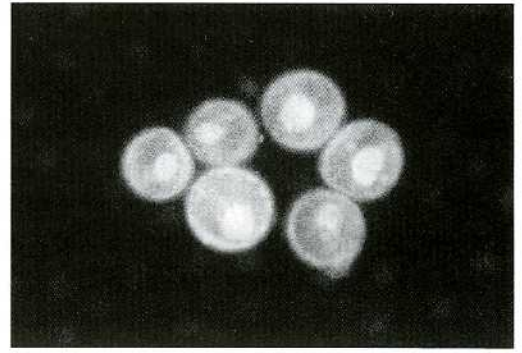
本研究ではバキュロウイルスを用い Ku 抗原の欠失変異体を作成し、さらにこれを用いて二量体形成能、DNA 結合能、および p 70 サブユニットの細胞内における局在に重要な領域を検討した。結果、aa 392-466 を削除した変異型 Ku 抗原はその二量体形成能及び DNA 結合能を欠如した。一方で、既知の転写調節因子の機能ドメインに類似した bZip 様構造、HTH 様構造の削除は、変異型 Ku 抗原の DNA 結合能および二量体形成能に影響しなかった。また、aa 483-609 を削除した変異型 p 70 サブユニットは細胞核への移行能を欠如し、aa 584-609 を削除した変異型 p 70 サブユニットは細胞核への移行能は保持していたが細胞核を著しく変形させ

た (Fig. 7)。Ku 抗原が二本鎖 DNA 断端を認識するためには 2 つのサブユニットが二量体を形成することが必須である。よって本研究で DNA 結合能を欠如した aa 392-466 の削除は二量体を形成しないため DNA を認識しないものと思われる。さらに本研究で二量体を形成し、かつ DNA 結合能を失う部位は認められなかった事実は、二量体形成が Ku 抗原の DNA 結合様式に深く関わっていることを裏付けた。Wang ら<sup>22)</sup> はバキュロウイルスを用いたその報告の中で、p 70 サブユニットの aa 1-115, aa 430-482 が抗ヒト p 86 抗体による免疫共沈降法で p 86 サブユニットと沈降する事を示し、Wu ら<sup>23)</sup> は yeast two-hybrid 法を用いて aa 439-609 が p 86 サブユニットと結合すること、aa 254-439 がゲルシフトアッセイで DNA-Ku 複合体を形成することを示した。本研究で示した領域は彼らの指摘した領域の一部と重複しており、この部位に p 70 サブユニットの機能ドメインが存在する可能性がある。さらに Wu らは前記の報告の中で、p 70 サブユニットのアミノ酸配列中に種族間でよく保存された配列があることを指摘している。本研究で削除した aa 392-466 の一部にも、彼らの指摘する種族間で保存されたアミノ酸配列 (aa 362-411, aa 431-446) を含んでおり、この部位が重要な役割を持っている可能性がある。さらに aa 392-466 にはデータベース上既知の DNA 結合タンパク質との相同性はなく、タンパク質結合ドメイン、DNA 結合ドメインとして考えられるアミノ酸配列を含んでいない。Mermod ら<sup>31)</sup> は転写調節因子の転写活性ドメインは高プロリン領域と一致するものがあることを指摘している。本研究で示した aa 392-466 には p 70 サブユニットの他の領域に比べて比較的多くのプロリンを含んでおり (11%)、また、親水性・疎水性の解析結果から aa 392-466 には極性の極端な変化が認められ、同部位に重要な機能ドメインが存在する可能性が考えられた。

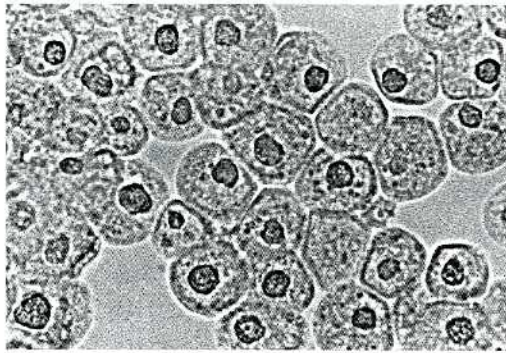
Ku 抗原の DNA 結合様式は非常にユニークである。Ku 抗原は DNA の特定の部位に結合



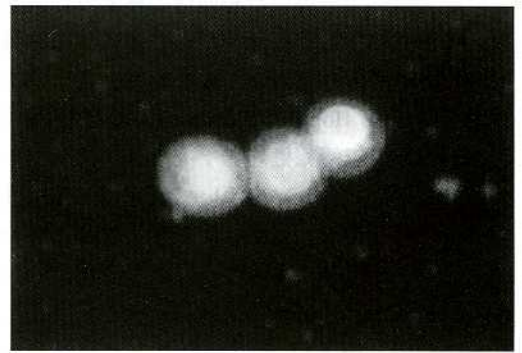
A



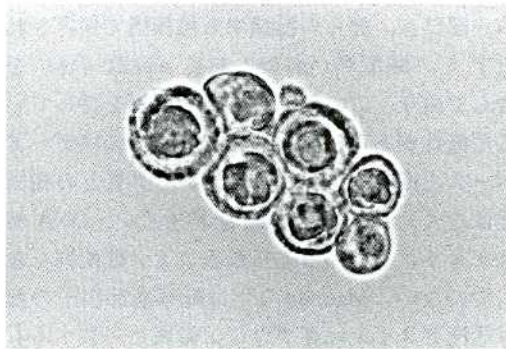
A'



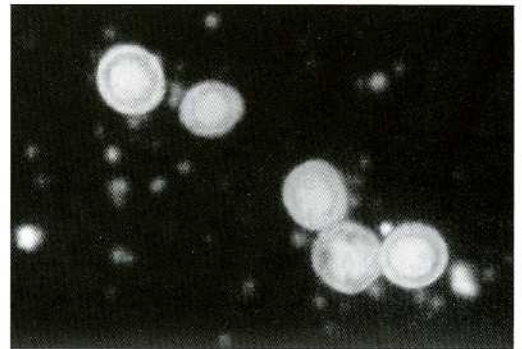
B



B'



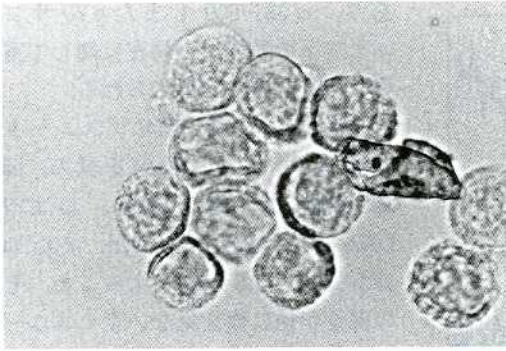
C



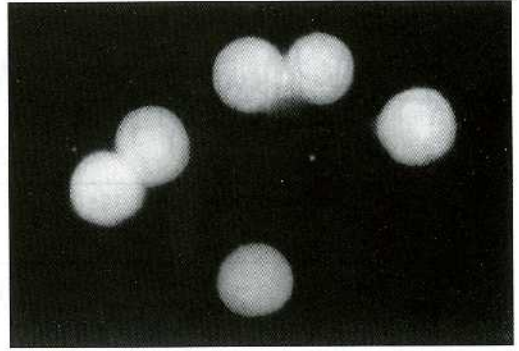
C'

**Fig. 5.** Localization of p 70 deletion mutant proteins in Sf9 cells. The cells grown in chamber slides were fixed 48 hrs. postinfection, stained with anti-Ku antiserum and FITC labeled second antibody. A, A', VBB 2-70 $\Delta$  A infected Sf9 cells ; B, B', VBB 2-70 $\Delta$  B infected Sf9 cells ; C, C', VBB 2-70 $\Delta$  HTH infected Sf9 cells ; D, D', VBB 2-70 $\Delta$  Zip infected Sf9 cells ; E, E', AcNPV 2. 1 infected Sf9 cells ; F, F', non-infected Sf9 cells. (A, B, C, D, E, F : phase-contrast microscopy,  $\times 800$ . A', B', C', D', E', F' : fluorescence microscopy,  $\times 800$ .)

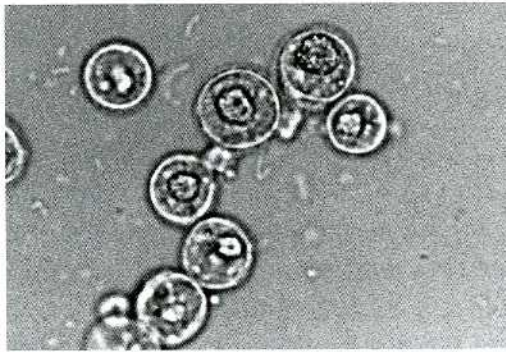




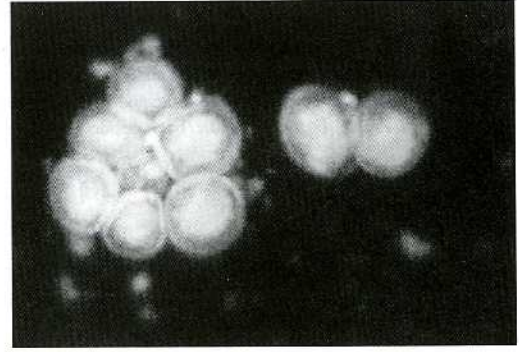
D



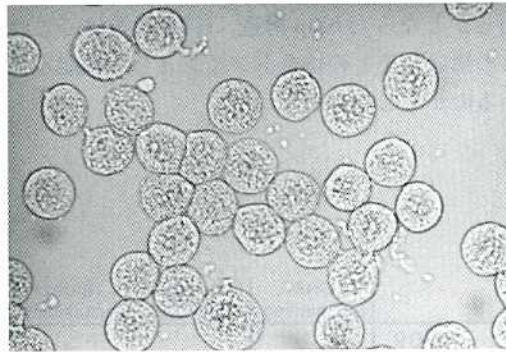
D'



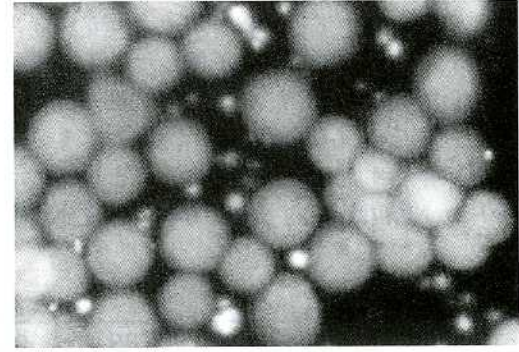
E



E'



F



F'

するのではなく DNA 断端を認識した後、エネルギー非依存性に内部に移動し、それが次々に繰り返され最終的に DNA 上で Ku 抗原が飽和状態になる<sup>32)</sup>。de Vriess ら<sup>32)</sup>は電顕を用いて、また Yaneva ら<sup>33)</sup>は原子間力顕微鏡を用いて、実際 Ku 抗原分子が DNA の断端ではなく内部に結合していることを観察している。故に、

Ku 抗原は特定の DNA 結合ドメインを持たず、ヒストンの様に DNA を巻き付ける、またはビーズ球のごとく環状になるなどその立体構造によって DNA と接触しているため自由に DNA 上を移動することが可能なのかもしれない。

p70 サブユニットのアミノ酸配列には既知の核局在化シグナル (Nuclear localization sequen-

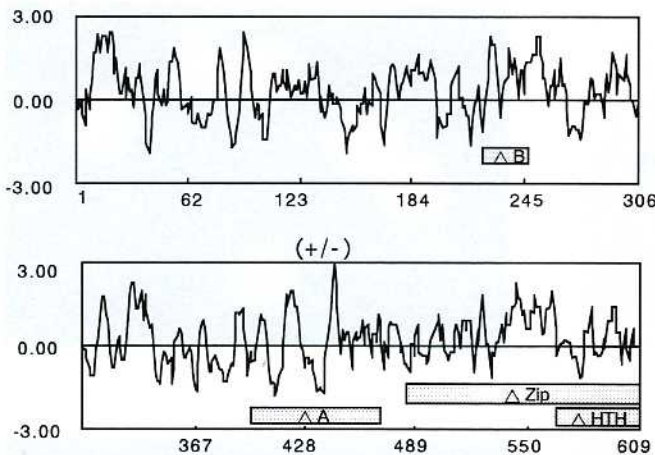


Fig. 6. A hydrophilicity profile of the deduced amino acid sequence of p70 subunit is plotted according to Hopp and Woods. Positions of each deletions were indicated in the figure ( $\Delta A$ ,  $\Delta B$ ,  $\Delta HTH$ ,  $\Delta Zip$ ). (+/-); acidic/basic lesion.

ce: NLS) は認められていない<sup>34)</sup>。本研究において aa 483-609 を削除した変異型 p70 サブユニットでは, Sf9 細胞内で核への移行は認めなかった。aa 584-609 を削除した変異型 p70 サブユニットでは, 核への移行は認めたもののその核の形態は著しく膨化した。Boulikas は<sup>35)</sup> 転写因子の既知の NLS をそのアミノ酸配列から 9 つのグループに分けており, p70 サブユニットでは aa 539-544 に類似したアミノ酸配列 (KVTKRK) を含む。また, aa 505-527 にも Wu らの指摘する種族間に保存されたアミノ酸配列が存在する。したがって, p70 サブユニットの NLS は aa 483-583 に存在する可能性が

あり, aa 584-609 もまた p70 サブユニットの核内での局在に関して重要な役割を持つと考えられる。

今回, Ku 抗原 p70 サブユニットの機能ドメインの決定を試み, aa 392-466 に二量体形成, および DNA 結合に重要な部位が, また aa 483-583 に NLS が存在すること, その部位が他に類を見ない全くユニークな一次構造をとっていることを示した。さらに, アミノ酸配列から想定されていた bZip 構造, および HTH 構造が DNA 結合を担っていないことを示した。Ku 抗原は様々な組織に普遍的に大量に発現していることから多機能タンパク質と考え

られている。しかしその一次構造には酵素活性ドメインは認められておらず<sup>36)</sup>, Ku 抗原が単独で DNA 修復を担っているとは考えにくい。以上より Ku 抗原が DNA 結合分子として DNA 修復複合体の中核をなし, DNA と他の構成分子との橋渡しをしている可能性が考えられた。また今回 DNA 結合には関与しないことが明らかとなった bZip 構造, HTH 構造は, これらの構成分子との結合ドメインとして機能しているのかもしれない。

	DNA end binding	Interaction with p86	Nuclear localization
p70 $\Delta A$	-	-	+
p70 $\Delta B$	+	+	+
p70 $\Delta HTH$	+	+	(+) Deform the nuclei
p70 $\Delta Zip$	+	+	-

Fig. 7. Regions of p70 subunit required for DNA end binding, interaction with p86, and nuclear localization.

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜った川崎医科大学皮膚科学教室植木宏明教授に謹んで感謝いた

します。また本研究の遂行に直接ご指導いただいた同小野雅史講師に深く感謝いたします。なお、本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費（9-108）、大学院重点特別経費（平成9年度）の援助によって行われたものである。

## 文 献

- 1) Reeves WH, Satoh M : Features of autoantigens. *Mol Biol Rep* 23 : 217-226, 1996
- 2) Keech CL, Gordon TP, McCluskey J : The immune response to 52-kDa Ro and 60-kDa Ro is linked in experimental autoimmunity. *J Immunol* 157 : 3694-3699, 1996
- 3) Topfer F, Gordon T, McCluskey J : Intra- and intermolecular spreading of autoimmunity involving the nuclear self-antigens La (SS-B) and Ro (SS-A). *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 875-879, 1995
- 4) Mimori T, Akizuki M, Yamagata H, Inada S, Yoshida S, Homma M : Characterization of high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J Clin Invest* 68 : 611-620, 1981
- 5) Getts RC, Stamato TD : Absence of a Ku-like DNA end binding activity in the *xrs* double-strand DNA repair-deficient mutant. *J Biol Chem* 269 : 15981-15984, 1994
- 6) Smider V, Rathmell WK, Lieber MR, Chu G : Restoration of X-ray resistance and V(D)J recombination in mutant cells by Ku cDNA. *Science* 266 : 288-291, 1994
- 7) Taccioli GE, Gottlieb TM, Blunt T, Priestly A, Demengeot J, Mizuta R, Lehmann AR, Alt FW, Jackson SP, Jeggo PA : Ku80 : Product of the *XRCC5* gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination. *Science* 265 : 1442-1445, 1994
- 8) Li Z, Otevrel T, Gao Y, Cheng HI, Seed B, Stamato TD, Taccioli GE, Alt FW : The *XRCC4* gene encodes a novel protein involved in DNA double-strand break repair and V(D)J recombination. *Cell* 83 : 1079-1089, 1995
- 9) Ono M, Tucker PW, Capra JD : Ku is a general inhibitor of DNA-Protein complex formation and transcription. *Mol Immunol* 33 : 787-796, 1996
- 10) Zelazowski P, Max EE, Kehry MR, Snapper CM : Regulation of Ku expression in normal murine B cells by stimuli that promote switch recombination. *J Immunol* 159 : 2559-2562, 1997
- 11) Casellas R, Nussenzweig A, Wuerffel R, Pelanda R, Reichlin A, Suh H, Qin XF, Besmer E, Kenter A, Rajewsky K, Nussenzweig MC : Ku80 is required for immunoglobulin isotype switching. *EMBO J* 17 : 2404-2411, 1998
- 12) Manis JP, Gu Y, Lansford R, Sonoda E, Ferrini R, Davidson L, Rajewsky K, Alt FW : Ku70 is required for late B cell development and immunoglobulin heavy chain class switching. *J Exp Med* 187 : 2081-2089, 1998
- 13) Matsumoto Y, Suzuki N, Sakai K, Morimatsu A, Hirano K, Murofushi H : A possible mechanism for hyperthermic radiosensitization mediated through hyperthermic lability of Ku subunits in DNA-dependent Protein Kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 234 : 568-572, 1997
- 14) Turchi JJ, Henkels K : Human Ku autoantigen binds cisplatin-damaged DNA but fails to stimulate human DNA-activated protein kinase. *J Biol Chem* 271 : 13861-13867, 1996
- 15) Zhang WW, Yaneva M : On the mechanisms of Ku protein binding to DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 186 : 574-579, 1992
- 16) Chou CH, Wang J, Knuth MW, Reeves WH : Role of a major autoepitope in forming the DNA binding site of the p70 (Ku) antigen. *J Exp Med* 175 : 1677-1687, 1992
- 17) Chan JYC, Lerman MI, Prabhakar BS, Isozaki O, Santisteban P, Kuppers RC, Oates EL, Notkins AL, Kohn LD : Cloning and characterization of a cDNA that encodes a 70-kDa novel human thyroid autoantigen. *J Biol Chem* 264 :

- 3651-3654, 1989
- 18) Messier H, Fuller T, Mangal S, Brickner H, Igarashi S, Gaikwad J, Fotedar R, Fotedar A : p70 lupus autoantigen binds the enhancer of the T-cell receptor  $\beta$ -chain gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 2685-2689, 1993
  - 19) Paillard S, Strauss F : Analysis of the mechanism of interaction of simian Ku protein with DNA. *Nucleic Acids Res* 19 : 5619-5624, 1991
  - 20) Reeves WH, Stoeber ZM : Molecular cloning of cDNA encoding the p70 (Ku) Lupus autoantigen. *J Biol Chem* 264 : 5047-5052, 1989
  - 21) Yaneva M, Wen J, Ayala A, Cook R : cDNA-derived amino acid sequence of the 86-kDa subunit of the Ku antigen. *J Biol Chem* 264 : 13407-13411, 1989
  - 22) Wang J, Dong X, Myung K, Hendrickson EA, Reeves WH : Identification of two domains of the p70 Ku protein mediating dimerization with p80 and DNA binding. *J Biol Chem* 273 : 842-848, 1998
  - 23) Wu X, Lieber MR : Protein-protein and protein-DNA interaction regions within the DNA end-binding protein Ku70-Ku86. *Mol Cell Biol* 16 : 5186-5193, 1996
  - 24) Osipovich O, Durum SK, Muegge K : Defining the minimal domain of Ku80 for interaction with Ku70. *J Biol Chem* 272 : 27259-27265, 1998
  - 25) Ono M, Tucker PW, Capra JD : Production and characterization of recombinant human Ku antigen. *Nucleic Acids Res* 22 : 3918-3924, 1994
  - 26) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T : *Molecular cloning of laboratory manual*. NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, pp 1.21-1.52
  - 27) Summers MD, Smith GE : *A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures*. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555
  - 28) Laemmli EK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685, 1970
  - 29) 小野雅史, 小野麻理子, 植木宏明 : Baculovirus を用いた機能的リコンビナント Ku 抗原の作成. *川崎医学会誌* 20 : 167-176, 1994
  - 30) Hopp TP, Woods KR : Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 78 : 3824-3828, 1981
  - 31) Mermod N, O'Neil EA, Kelly TJ, Tjian R : The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-1 is distinct from the replication and DNA binding domain. *Cell* 58 : 741-753, 1989
  - 32) de Vries E, van Driel W, Bergsma WG : HeLa nuclear protein recognizing DNA termini and translocating on DNA forming a regular DNA-multimeric protein complex. *J Mol Biol* 208 : 65-78, 1989
  - 33) Yaneva M, Kowalewski T, Lieber MR : Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku : Biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J* 16 : 5098-5112, 1997
  - 34) Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C : Two interdependent basic domains in nucleoplasmic nuclear targeting sequence : Identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64 : 615-623, 1991
  - 35) Boulikas T : Putative nuclear localization signals (NLS) in protein transcription factors. *J Cell Biochem* 55 : 32-58, 1994
  - 36) Reeves WH : Antibodies to the p70/p80 (Ku) antigens in systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 18 : 391-414, 1992