

## Baculovirus を用いた機能的リコンビナント Ku 抗原の作成

小野 雅史, 小野麻理子, 植木 宏明

Human Ku p70および p86 subunit を持つ 2 つのこのリコンビナント Baculovirus を作成し, それぞれの subunit を Sf9 細胞内で発現させた. さらにこの 2 つの virus を co-infect することにより機能的な p70/p86 heterodimer を作成, また hexa-histidine tag と fusion protein にすることで簡便にかつ大量に精製, 回収した. またこのリコンビナントタンパクを用いて heterodimer を構成することが Ku 抗原が DNA に結合するために必須であることを示した. (平成 6 年 7 月 14 日採用)

### Production of Functional Human Ku Heterodimer Using Baculovirus System

Masashi Ono, Mariko Ono and Hiroaki Ueki

Attempts to produce functional recombinant Ku have been largely unsuccessful. In this article, two recombinant Baculoviruses that carry p70 and p86 cDNA are constructed. These viruses express the human Ku subunits individually as well as assembled them into the Ku heterodimer. A simple method of isolation for highly purified recombinant Ku is also described. Further, these products are analyzed by an EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), and finally it is confirmed that heterodimerization is necessary for Ku to bind DNA. (Accepted on July 14, 1994)

*Kawasaki Igakkaishi* 20(3) : 167-176, 1994

**Key Words** ① Recombinant Ku ② Baculovirus ③ EMSA  
④ Ku heterodimer

#### 緒 言

多彩な抗核酸及び抗核タンパク抗体の出現は, SLE などの自己免疫疾患に普遍的な徴候である. 時としてこれらの自己抗体と個々の疾患サブセットの臨床経過や予後との間に強い関連が認められることは広く知られ, 臨床に応用されている. また, こうした自己抗体を解析することにより, その抗原となった未知の生体分子を発見

する端緒となる場合がある. Ku 抗原もこのようにして Overlap syndrome 患者の自己抗原として初めて報告された核タンパクである<sup>1)</sup>. 一方, Ku 抗原はそれとは全く別の分野から核酸結合タンパク (NFIV) としても報告され<sup>2),3)</sup>, その性質, 機能のついては種々の検討がなされてきた.

Ku 抗原は広く生体内に存在する核タンパクで, p70 及び p86 のふたつの subunits からなる二量体であることが知られている. cDNA の解析結果などから, 各々の subunits は Zip ないし

はbZip構造を、またp70 subunitのC端にHTH構造が推定されており、これらが二量体形および核酸への結合ドメインであろうと考えられている<sup>4)~6)</sup>。しかし、その核酸結合の特性や機能、役割については、Ku抗原が細胞間に普遍的で大量に存在するにもかかわらず、全く不明のままである。一つの仮説としてKu抗原が遺伝子の転写に関わるタンパク複合体の一部ではないかとする考え方があるが、これはKu抗原がいくつか特定の転写因子を核より抽出する際混入しやすいこと<sup>7)~10)</sup>、また実際にDNA-PKの活性に重要な役割をもっていること<sup>11),12)</sup>、さらにKuが染色体上では活性部位に存在していることなどから導かれている<sup>13),14)</sup>。しかし、さらに詳細な検索をするにあたって、タンパクを抽出した組織や、精製方法などにより結果が一定でないことや<sup>15)</sup>、さらにタンパクを変性させずにKu二量体を各々のsubunitsへ分離することが困難であることが大きな障害になってきた。そのため本研究では、Baculovirusを用いてリコンビナントKu subunits(p70, p86)を作成し、これらを細胞内で機能的な二量体へと結合させたのち、タンパクに対し保存的な方法で簡便かつ大量、高純度に精製した。更にこのシステムを用いて、Ku抗原がDNAへ結合するためには、p70とp86のふたつのsubunitが二量体を形成することが必要であることを示した。

#### 材料および方法

**Transfer vectorの構築：**3.4 kbのhuman p86 cDNA<sup>6)</sup> EcoR1断片を、transfer vector pBlueBac2 (Invitrogen社)のBamH1 siteへKlenow fragmentとT<sub>4</sub> ligaseを用いて挿入、クローン化した後、制限酵素マッピングで断片の方向を確認した(pBB2-86Ku)。Human p70 cDNA<sup>16)</sup>の下流にはhexa-histidineシグナル<sup>17)</sup>をoverhanged primerを用いてPCRで構築、一旦pBluescript II (Invitrogen社)のBamH1 siteへsubcloningした。DNA sequencingによりPCRエラーの有無を確認した後、この

BamH1断片をpBlueBac2へ挿入した(pBB2-70tH<sup>6)</sup>) (Fig. 1A)。

**Recombinant virus：**上記のtransfer vector (pBB2-86Ku及びpBB2-70tH<sup>6)</sup>) 2  $\mu$ gとlinear wild type AcMNPV (Invitrogen社) 0.5  $\mu$ gをcalcium phosphate法を用いてSf9細胞( $2 \times 10^6$  cells in 25 cm<sup>2</sup> flask)にtransfectした。cDNAは細胞内でhomologous recombinationによりAcMNPVに挿入され、5日間培養後、上清内に放出されたrecombinant virusはX-gal (150  $\mu$ g/ml)を含むoverlayを用いてplaque purificationを行った。(VBB2-86Ku及びVBB2-70tH<sup>6)</sup>) (Fig. 1B)<sup>18)</sup>。

**Recombinantタンパクの発現：**Sf9細胞に20 multiplicity of infection (MOI)のrecombinant virusを感染させ、63-72時間培養した。タンパクを [<sup>35</sup>S] methionineでラベルする場合は、48時間感染後、Sf9細胞をPBSで洗浄、methionine deficient Grace's medium (Sigma社)で30分培養し、TRANS35-LABEL (ICN社)を加えてさらに15時間培養した。

**Western blot：**SDS-PAGEは常法通り行った<sup>19)</sup>。細胞は2  $\times$  Laemmli bufferに溶解し、8% polyacrylamide gel上で展開、PVDF membraneに転写した後、抗Ku患者血清で検出、<sup>125</sup>Iラベル二次抗体とオートラジオグラフィを用いて可視化した。

**免疫蛍光抗体法：**スライドガラス上で培養したSf9細胞を感染後48時間にてアセトン+メタノール (50%/50%)で固定、抗Ku血清及びFITCラベル二次抗体を用いて染色、蛍光顕微鏡下でKu抗原の局在を観察した。

**Immunoprecipitation：**[<sup>35</sup>S] methionineでラベルした細胞をPBSで洗浄後50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 1  $\mu$ g/ml Leupepsin, 1  $\mu$ g/ml Pepstatin A, 1 mM PMSFを加え ( $2 \times 10^6$  cells/500  $\mu$ l)凍結溶解、超音波破碎、遠沈による不溶画分の除去を行いタンパク溶液とした。このうち3  $\mu$ lをとり100  $\mu$ lに上記の溶媒を用いて希釈、40  $\mu$ l (50% slurry)のprotein A-

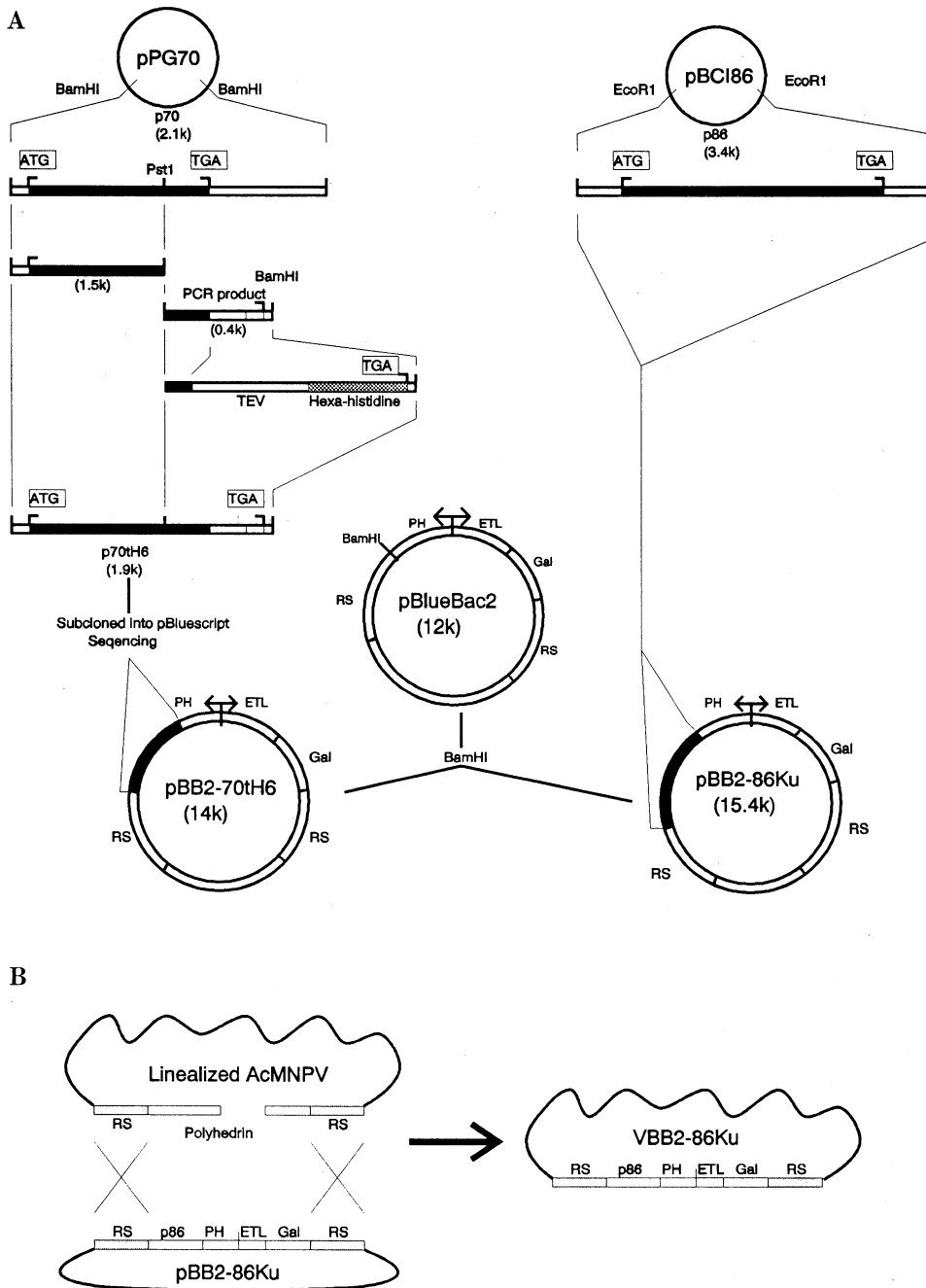


Fig. 1. A) A p70 cDNA-TEV-Hexahistidine fusion fragment or a p86 cDNA fragment was inserted into the Bam HI site of the pBlueBac 2. B) Fragments were introduced into the wild-type AcMNPV gene by homologous recombination. The recombination event caused the linear AcMNPV to be the circular recombinant virus and rescued the viral replication. TEV : Tobacco etch virus proteinase sensitive site. PH : Polyhedrin promoter. ETL : ETL promoter. RS : Recombination site. Gal :  $\beta$ -Gal.

agarose beads (Sigma 社) を加えて前処理をし、その上清に抗Ku抗体でコートした protein A-agarose beads を加えて室温で1時間反応させた後、beads を PBS で洗浄、2×Laemmli buffer で沈降物を溶解、8% SDS-PAGE で展開し、オートラジオグラフィーで可視化した。

**Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) :** 細胞回収後、PBS を用いて洗浄、40 mM HEPES pH 7.9, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.1% Nonidet P-40, 1 μg/ml Leupepsin, 1 μg/ml Pepstatin A, 1 mM PMSF 中に冷凍溶解及び超音波破砕を用いて溶解した ( $1 \times 10^7$  cells/ml). これから遠沈にて不溶画分を除去したのち30—70%硫酸塩析画分を回収、5 ml の 20 mM HEPES pH 7.9, 0.1 M KCl, 0.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 20% Glycerol, 1 μg/ml Pepstatin A, 1 mM PMSF に溶解、透析した。Linear dsDNA probe として p70 subunit cDNA の Nhe1-Sty1, 147 bp 断片を Fill-in 法を用いて <sup>32</sup>P-dCTP でラベルした。試料となるタンパクと DNA probe を 20 mM HEPES pH 7.9, 0.15 M KCl, 0.2 mM EDTA, 20% Glycerol, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 20 μl 中に混合し室温で30分反応させた後、polyacrylamide gel (4% polyacrylamide, 50 mM Tris-borate, 1 mM EDTA, 2% Glycerol) にて展開、オートラジオグラフィーで可視化した<sup>20)</sup>。

**Recombinant Ku heterodimer の精製 :** Sf9 細胞に VBB2-86Ku 及び VBB2-70tH<sup>6</sup> を同時に感染させ (co-infection) 回収、硫酸塩析の後 50 mM Na-phosphate pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% Glycerol に溶解、透析した。タンパクの純化には immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) と DNA affinity chromatography を用いた。random DNA-sepharose は salmon sperm DNA を超音波破砕と HhaI, Sau3A1 消化のより断片化し、cyanogen bromide activated sepharose 4B (Sigma 社) に固着化した。精製は、タンパク溶液をまず Ni-NTA-agarose (Qiagen 社) に加

え、pH 5.0 にて Ku 抗原を含む画分を抽出、20 mM HEPES pH 7.9, 150 mM KCl, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 20% Glycerol, 1 mM PMSF で透析した後 random DNA-sepharose へ加え、500 mM KCl にて抽出した。カラム操作はいずれも室温で行った。

## 結 果

**Recombinant Ku subunits の発現 :** p70, p86 それぞれの recombinant virus の作成を **Figure 1** に示す。VBB2-70tH<sup>6</sup> の p70 subunit をコードする部分の下流には金属結合ペプチドである hexa-histidine を標識として構築した。標識の部位は、両 subunits の methionine は翻訳後取り除かれる可能性があること、p70 subunit の C 端に DNA binding site が想定されているため<sup>21)</sup>、この部分が二量体分子を形成した際、その表面に露出されると思われることから選定した。これらの virus を昆虫の細胞株である Sf9 細胞にそれぞれ感染させ、コードしているタンパクの発現を SDS-PAGE 及び Western blot で確認した (**Fig. 2**)。いずれの virus もそのサイズから full-length と思われる p70 及び p86 subunit を発現し、抗ヒト Ku 抗体に対し反応性を有した。またこれらの産物は室温、37°C で安定であった。最も効果的な recombinant Ku subunits の発現は感染後 60—70 時間後で、回収した細胞の総タンパクの 60% に及んだ (data not shown)。

**Recombinant Ku subunits の細胞内における局在 :** Sf9 細胞内で発現した Ku subunits の細胞内における局在を免疫蛍光抗体法を用いて観察した (**Fig. 3**)。いずれの subunit も細胞核へと移送されていたが、p70 subunit では核は正常な形態を保っていたものの、p86 subunit では核は著しく膨化し、変形した。

**機能的 Ku 二量体の合成 :** Recombinant の p70 及び p86 subunit を自然の Ku 抗原と同様な二量体へと合成するため、以下の二つの方法を試みた。1) p70, p86 subunit を別々に発現させ

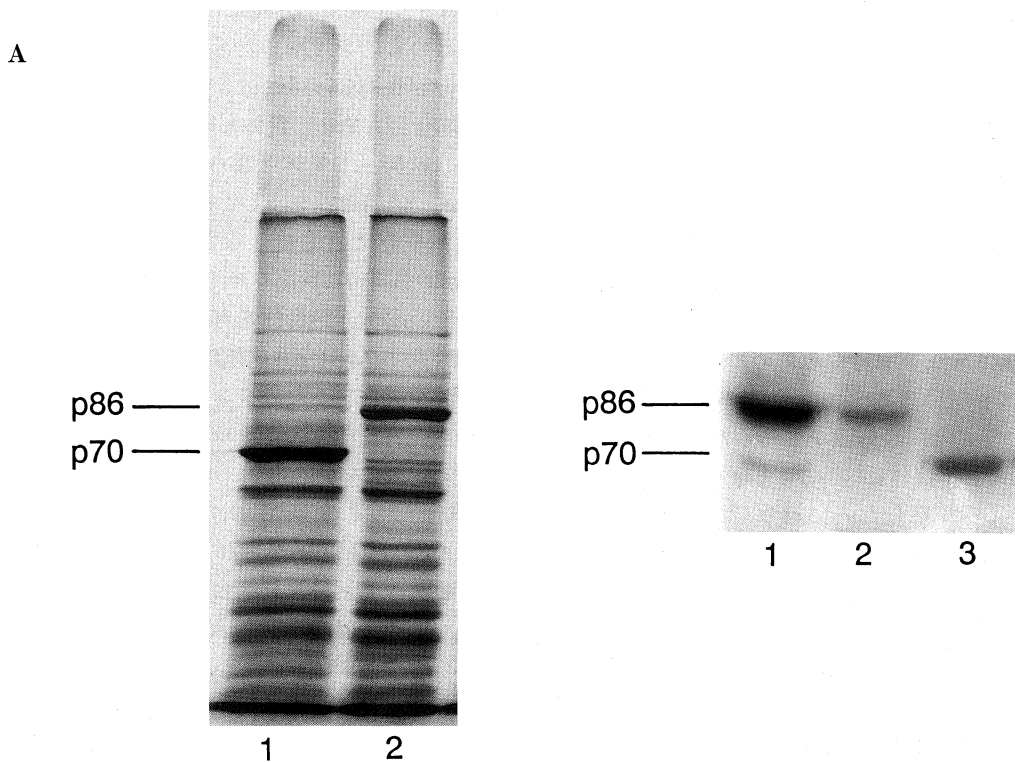


Fig. 2. The p70 subunit or the p86 subunit was expressed in Sf9 cells. **A)** Cells were labeled with [<sup>35</sup>S] methionine and analyzed by 8 % SDS-PAGE. Lane 1, VBB2-70tH<sup>6</sup> infected Sf9 cells ; lane 2, VBB2-86Ku infected Sf9 cells. Positions of recombinant products are indicated. **B)** Immunoblot with anti-human Ku patient serum. Lane 1, HEP-2 cells indicating authentic human Ku ; lane 2, VBB2-86Ku infected Sf9 cells ; lane 3, VBB2-70tH<sup>6</sup> infected Sf9 cells. Prominence of p70 and p86 bands on lane 1 were caused by reactivity of antiserum.

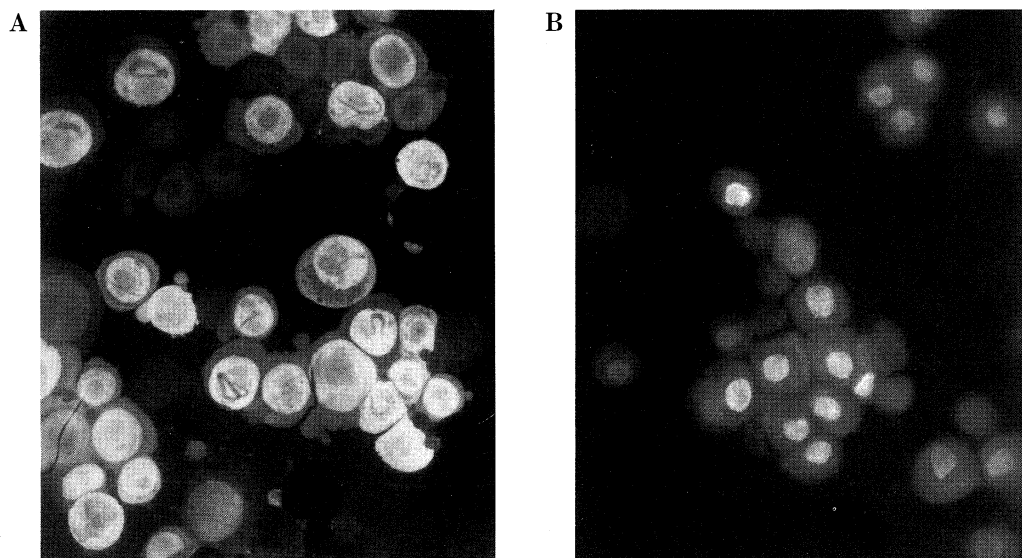


Fig. 3. Recombinant p70 and p86 subunits were transported into Sf9 cell nuclei. Immunofluorescent stainings of, **A)** VBB2-86Ku infected Sf9 cells were stained with rabbit anti-p86 antiserum ; **B)** VBB2-70tH<sup>6</sup> infected Sf9 cells were stained with rabbit anti-p70 antiserum.

た後、それらの細胞を混合した後処理して結合させる。2) おおのの viral stock を適当な割合で混合し、一つの dish に感染させる。この場合、本システムでは 20 MOI の virus を使用しているため一つの細胞が両方の virus の感染をうけ、p70 及び p86 subunit を同時に発現することになる (co-infection)。Figure 4A に示したように、VBB2-86Ku : VBB2-70th<sup>6</sup> = 19 : 1 でほぼ同量の両 subunits を発現した。

二量体形成を確認するために subunit 特異的な抗体を用いて co-immunoprecipitation を行った。上記 1) の方法から得られた検体では抗 p86 subunit 抗体に対しごくトレースレベルの p70 subunit が沈降したのに対し、2) の方法では、それぞれのアミノ酸残基に含まれる methionine の量から推定するにほぼ同量の p86, p70 subunit が沈降した (Fig. 4)。つまりこの方法において p86 と p70 subunit は効果的に結合し、二量体を形成したことを示している。また抗 p70 subunit 抗体を用いた co-immunoprecipitation でも同様の結果を得た (data not shown)。

**Recombinant Ku 抗原の DNA 結合活性：**発現した Ku subunits 及び Ku 二量体の DNA 結合能を検討した (Fig. 5)。Ku 抗原は DNA element に対する結合特異性が低い<sup>22),23)</sup>。そのた

め DNA probe には sequence に意図的なものを持たないものを使用した。この DNA probe と個々の p70, p86 subunit, それらを混合した物、及び結合した Ku 二量体とを用いて EMSA を行った。結果、二量体となった Ku のみが DNA probe との結合性を示し、p70, p86 subunit それ自体のみでは結合しなかった。また双方の subunit を同時に反応させても二量体を形成をしていない場合、結合性を有しなかった。

**Recombinant Ku 抗原の純化：**機能的な Ku 二量体を純化するためタンパクに多くの操作を加えず、また精製のステップを減らし簡便化する目的でタンパクを hexa-histidine で標識した。Sf9 細胞内で合成された Ku 二量体は p70 subunit の C 端に構築された hexa-histidine により金属イオンに対し結合性を有することになる<sup>17)</sup>。これを用いて IMCA から標識されたタンパクを取り出した。次に random DNA affinity column へ加えることによって、DNA に結合性を有するタンパクを精製した。精製の各段階ごとのフラクションは 8% SDS-PAGE で展開し、Silver stain で検定した。Figure 6 に示すごとく、本法では二段階のカラム操作のみでほぼ純粋で機能的な recombinant Ku 二量体タンパクを回収した。発現させるタンパクの設計段階で、

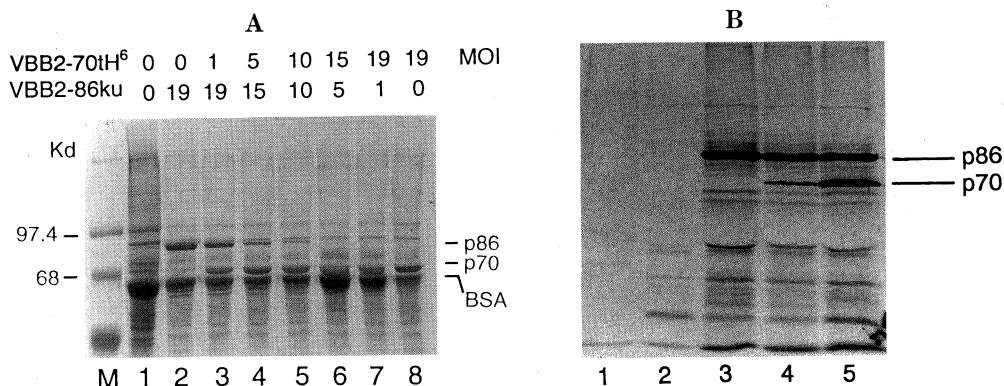


Fig. 4. The p70 and the p86 subunits were heterodimerized in Sf9 cells. A) Sf9 cells were infected with both viruses. Amounts of VBB2-70th<sup>6</sup> and VBB2-86Ku are indicated above each lane. Samples were contaminated with the calf serum albumin as shown. B) Cells were labeled with [<sup>35</sup>S] methionine and prepared as described. Proteins were then precipitated using anti-p86 antibody coated protein A beads and analyzed on 8% SDS-PAGE. Lane 1, non-infected Sf9 cells; lane 2, VBB2-70th<sup>6</sup> infected Sf9 cells; lane 3, VBB2-86Ku infected Sf9 cells; lane 4, Cells used in lane 2 and 3 were mixed, lysed, and incubated for 1h at room temperature. Lane 5, co-infected Sf9 cells.

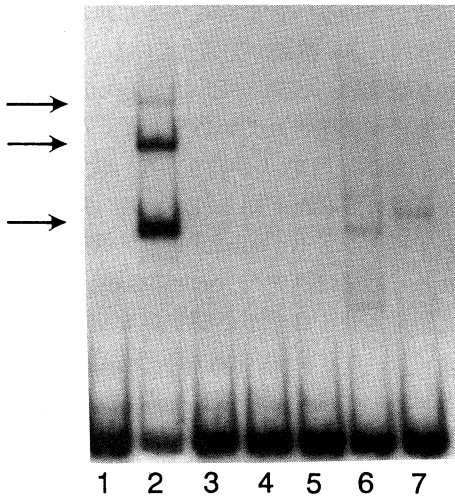


Fig. 5. DNA binding activity of the recombinant Ku was analyzed by an EMSA. Lane 1, free probe ; lane 2, heterodimerized Ku ; lane 3, non-dimerized both subunits were mixed ; lane 4, p70 subunit ; lane 5, p86 subunit ; lane 6, wild - type AcMNPV infected Sf9 cells ; lane 7, Sf9 cells. The heterodimerized Ku and DNA probe formed multiple shift bands and these bands were migrated in logarithmic proportion (arrow). The band shift due to Ku was confirmed by "Super shift" assay with an anti-Ku antibody (Data not shown).

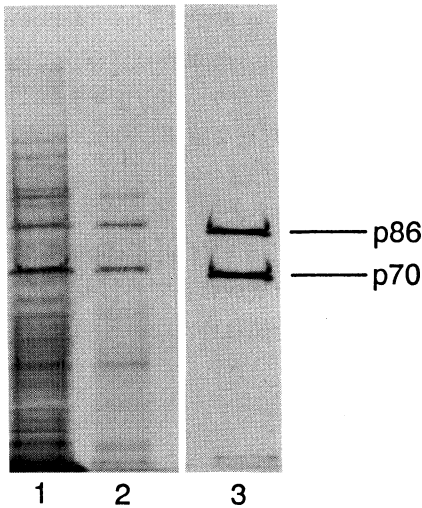


Fig. 6. Protein fractions from each purification step were analyzed on 8% SDS-PAGE. Lane 1, ammonium sulfate precipitated proteins ; lane 2, a fraction from Ni-agarose column ; lane 3, a fraction from DNA column. Proteins were visualized by the silver staining.

Figure 1A に示すように、p70 coding region と hexa-histidine tag の間にはスペーサーとして、また精製段階で tag を切り取れるように tobacco etch virus (TEV) proteinase site<sup>24)</sup> を構築したが、p70 subunit のアミノ酸配列には感受性領域が認められないにも関わらず、別に大腸菌を用いて作成した GST-TEV proteinase fusion protein (unpublished product) に対して不安定であったためこの操作を省略し、fusion protein のまま精製した。最終的な回収量は培養液 1ml あたり 5 $\mu$ g 程度であった。

考 察

Ku 抗原分子の性質、機能を検討する上で、安定な試料の供給源を確保することは重要であり、また目的の分子に対して容易に修飾の加えるリコンビナントタンパクを作成することが試みられてきた。その多くは大腸菌を用いているが、これらの系では Ku 抗原のいずれの subunit も N 端側をはぶいた断片でない効率的には発現しない<sup>4),6)</sup>。こうした部分断片の産物は主に臨床研究の分野で、自己抗原としてのエピトープを検索する目的で活用されてきた。また Griffith らは rabbit reticulocyte lysate を用いた *in vitro* translation system で Ku 抗原を発現させ、それが機能することを示したが<sup>25)</sup>、システムの性格上、安定、大量の供給源とはなり難い。Ku 抗原の生体分子としての機能を構造的に解析するためには、Ku 抗原の全長、及び機能的な二量体をまず得る必要がある。さらに、発現産物の精製段階で immunoaffinity purification などのタンパクに対し高度に不自然となるステップを省くことが望ましい。一方、Baculovirus は昆虫細胞を host とする virus で、これに目的とするタンパクをコードする DNA を挿入し、真核生物である昆虫細胞に感染させて発現させるシステムで、タンパクの翻訳、修飾が哺乳動物に近いこと、大量に発現すること、細胞のメンテナンスが容易であること、脊椎動物には感染しないため研究者や実験動物に安全で

あることなどの利点により広く用いられてきた。Allawayらはこのシステムを用いて、全長と思われる p70 subunit を Sf9 細胞内で発現させ得ることを示しており<sup>16)</sup>、そのため、本研究では Baculovirus を vector として用いた。また hexa-histidine tag を付加することによりこれらの条件を満たしながら、大量かつ簡便に機能的なりコンビナント Ku 抗原を得た。

Sf9 細胞の中で発現した p70 及び p86 subunits は室温、または 37°C で安定であったが (data not shown)、p86 subunit を発現している Sf9 細胞は加えて 62 kD と 66 kD の二つのバンドを発現した。これらは抗 Ku 抗体に対して反応性を示さず、また長期間培養することによって強く発現してきた。これらの産物は、Ku 抗原の“第三の subunit”といわれる 60—65 kD の分子の存在が、細胞にさまざまなストレスをかけた際に見られることが示されており、これが p86 subunit の分解産物であろうとする Quinn らの推察に一致するものであろう<sup>15),26)</sup>。

一般に Sf9 細胞内で発現したりコンビナントタンパクが、実際のタンパクと同じように Sf9 細胞内で移送されることが知られている<sup>27)</sup>。本実験では、Figure 3 に示したようにいずれの subunit も Sf9 細胞内で核へと移送されていた。一方、Ku subunits のアミノ酸配列には既知の nuclear localization sequence (NLS)<sup>28)</sup> に類したドメインは認められないため、多分、Ku 抗原が独自の移送シグナルを両方の subunits に持つのであろう。さらに p86 subunit は細胞核を強く変形させたのに対して p70 subunit を発現している Sf9 細胞が正常の形態を保ったことから、p70 subunit 上にさらに核内での局在を規定するドメインが存在する可能性がある。一方、Ku 抗原は一般に核内で nucleosome linker に当たる部分に結合していると考えられているが<sup>13),14)</sup>、本実験とは別に HL60 細胞核のゲノムを遠心分画した際、大まかに全体の 50% の Ku 抗原がゲノムとは別に抽出された (data not shown)。核の抽出、遠心の際に混入することが予測されるため正確な割合は不明だが、Ku 抗原の一部は DNA ゲノム

と結合していない形で存在すると思われる。また細胞膜に Ku 抗原が関連していることも言われており細胞膜—核間の“Shuttle protein”としての可能性が指摘されている<sup>29)</sup>。

Ku 抗原は、DNA が存在しない状態でも二量体を形成することが知られている。本研究ではリコンビナント Ku subunits を二量体へと結合させるためには両方の recombinant virus を同時に感染させることが必要であることを示した (Fig. 4)。もとよりヒト細胞から抽出した Ku 抗原を、タンパクを変性させることなくそれぞれの subunit に分離することは困難であり、その結合は強固である。さらに、Ku 抗原が DNA 結合機能を持つためには二量体を形成することが必要であり、個々の subunits はそれ自体のみでは DNA に結合しなかった (Fig. 5)。これらのことから、他の多くの DNA 代謝を司る二量体核タンパクにみられる、それぞれが別々に発現し DNA 上で結合することによって制御を行うメカニズムと異なり、Ku 抗原は生体内でも双方の subunit が co-translate され常に結合した形で機能すると思われる。本研究で用いた co-infection の手法が多分、細胞内での co-translation の環境を再現し、二量体を形成し得たのであろう。また、Figure 4 の結果では、co-infection によって発現された Ku subunits はほぼ全てが heterodimer を形成しており、p70/p70 または p86/p86 homodimer の存在を確認し得なかった。さらに別々に発現させた個々の subunit が EMSA で特定バンドを示さなかった事実を考え合わせると (Fig. 5)、こうした homodimer は構成されないか、または構成されても heterodimer と同様の DNA 結合能は持たないと思われる。

稿を終えるにあたり、ご指導ならびにご校閲賜りました川崎医科大学皮膚科学教室 植木宏明教授に慎んで感謝いたします。

本研究は UT Southwestern Medical Center at Dallas, Department of Microbiology で行われたものであり、本誌へ寄稿する際、ご快諾くださり、また直接



ご指導いただいた J. Donald Capra 教授, そしてご助力 D. Sontheimer 教授, およびその教室員の皆様に深く感謝  
いただきました同校 Philip D. Tucker 教授, Richard 謝いたします.

## 文 献

- 1) Mimori T, Akizuki M, Yamagata H, Inada S, Yoshida S, Homma M : Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J Clin Invest* 68 : 611-620, 1981
- 2) de Vries E, van Driel W, Bergsma WG, Arnberg AC, van der Vliet PC : Hela nuclear protein recognizing DNA termini and translocating on DNA forming a regular DNA-multimeric protein complex. *J Mol Biol* 208 : 65-78, 1989
- 3) Stuver MH, Coenjaerts FEJ, van der Vliet PC : The autoantigen Ku is indistinguishable from NFIV, a protein forming multimeric protein-DNA complexes. *J Exp Med* 172 : 1049-1054, 1990
- 4) Reeves WH, Stoeber ZM : Molecular cloning of cDNA encoding the p70 (Ku) lupus autoantigen. *J Biol Chem* 264 : 5047-5052, 1989
- 5) Chan JYC, Lerman MI, Prabhakar BS, Isazaki 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
- 6) 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
- 7) Carayannopoulos L, Hanke JH, Johnson DG, Tucker PW, Capra JD : Purification and partial characterization of 70KD and 92KD proteins associated with OTF-1. *J Pro Chem* 9 : 347-348, 1990
- 8) Quinn JP, Farina AR : Autoimmune antigen Ku is enriched on oligonucleotide columns distinct from those containing the octamer binding protein DNA consensus. *FEBS Letters* 286 : 225-228, 1991
- 9) Liu ES, Lee AS : Common sets of nuclear factors binding to the conserved promoter sequence motif of two coordinately regulated ER protein genes, GRP78 and GRP94. *Nucl Acids Res* 19 : 5425-5431, 1991
- 10) Lai JS, Herr W : Ethidium bromide provides a simple tool for identifying genuine DNA-independent protein associations. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 6958-6962, 1992
- 11) Dvir A, Peterson SR, Kunth MW, Lu H, Dynan WS : Ku autoantigen is the regulatory component of a template-associated protein kinase that phosphorylates RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 : 11920-11924, 1992
- 12) Gottlieb TM, Jackson SP : The DNA-dependent protein kinase : Requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* 72 : 131-142, 1993
- 13) Higashiura M, Shimizu Y, Tanimoto M, Morita T, Yagura T : Immunolocalization of Ku-proteins (p80/p70) : Localization of p70 to nucleoli and periphery of both interphase nuclei and metaphase chromosomes. *Exp cell Res* 201 : 444-451, 1992
- 14) Yaneva M, Busch H : A 10S particle released from deoxyribonuclease-sensitive regions of Hela cell nuclei contains the 86-kilodalton-70-kilodalton protein complex. *Biochemistry* 25 : 5057-5063, 1986
- 15) Kunth MW, Gunderson SL, Thompson NE, Strasheim LA, Burgess RR : Purification and characterization of proximal sequence element-binding protein 1, a transcription activating protein related to Ku and TREF that binds the proximal sequence element of the human U1 promoter. *J Biol Chem* 265 : 17911-17920, 1990
- 16) Allaway GP, Vivino AA, Kohn LD, Notkins AL, Prabhakar BS : Characterization of the 70kDa component of the human Ku autoantigen expressed in insect cell nuclei using a recombinant

- baculovirus vector. *Biochem Biophys Res Commun* 168 : 747—755, 1990
- 17) Sharma SK, Evans DB, Vosters AF, McQuade TJ, Tarpley WG : Metal affinity chromatography of recombinant HIV-1 reverse Transcriptase containing human renin cleavable metal binding domain. *Biotechnol Appl Biochem* 14 : 69—81, 1991
  - 18) Summers MD, Smith GE : A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Texas Agricultural Experiment Station, Bulletin. 1987
  - 19) Laemmli EK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680—685, 1970
  - 20) Landolfi NF, Capra JD, Tucker PW : Interaction of cell-type-specific nuclear proteins with immunoglobulin VH promoter region sequence. *Nature* 323 : 548—551, 1986
  - 21) Chou CH, Wang J, Kunth MW, Reeves WH : Role of a major autoepitope in forming the DNA binding site of the p70 (Ku) antigen. *J Exp Med* 175 : 1677—1684, 1992
  - 22) Paillard S, Strauss F : Analysis of the mechanism of interaction of simian Ku protein with DNA. *Nucl Acids Res* 19 : 5619—5624, 1991
  - 23) Zhang WW, Yaneva M : On the mechanisms of Ku protein binding to DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 186 : 574—579, 1992
  - 24) Dougherty WG, Cary SM, Dawnparks T : Molecular genetic analysis of a plant virus polyprotein cleavage site : A model. *Virology* 171 : 356—364, 1989
  - 25) Griffith AJ, Blier PR, Mimori T, Hardin JA : Ku polypeptides synthesized in vitro assemble into complexes which recognize ends of double-stranded DNA. *J Biol Chem* 267 : 331—338, 1992
  - 26) Quinn JP, Simpson J, Farina AR : The Ku complex is modulated in response to viral infection and other cellular changes. *Biochim Biophys Acta* 1131 : 181—187, 1992
  - 27) Miller DW, Safer P, Miller LK : An insect Baculovirus host-vector system for high-level expression of foreign genes. *Genetic Engineering* 8 : 277—299, 1986
  - 28) Robbins J, Dilworth SM, Lasky RA, Dingwall C : Two independent basic domains in nucleoplasmic nuclear targeting sequence : Identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64 : 615—623, 1991
  - 29) Prabhakar BS, Allaway GP, Srinivasappa J, Notkins AL : Cell surface expression of the 70 kD component of Ku, a DNA-binding nuclear autoantigen. *J Clin Invest* 86 : 1301—1305, 1990