

膜タンパク質 CD81 の分解機構の解明

2019 年度

京都薬科大学大学院 課程博士学位論文

【薬学】細胞生物学分野

細川 晃平

課程博士学位論文 内容の要旨

専攻・課程： 薬学専攻博士課程
氏名（英字名）： 細川晃平（Kohei Hosokawa）
学位論文題目： 膜タンパク質 CD81 の分解機構の解明

序章

ヒトの膜タンパク質は細胞の全タンパク質中の約 30%、医薬品標的となるタンパク質の約 60%を占めることが知られている。したがって膜タンパク質の安定性、分解や遺伝子発現調節機構の解明は、抗体医薬品や低分子医薬品の研究開発に貢献すると考えられる。CD81 は N 末端を細胞質内にもつ 4 回膜貫通型タンパク質であり、CD81 の機能は膜タンパク質同士の会合により発揮していると考えられている。CD81 は B 細胞表面上で膜タンパク質複合体を形成し、またウイルスのエンベロープとの相互作用を介したウイルス感染、エクソソームの形成、受精の調節といった機能など、多くの細胞機能が示唆されている。一般に膜タンパク質の機能発現は、リガンドとの結合やリン酸化などの翻訳後修飾の他、膜タンパク質自身の発現と分解によって制御されている。

膜タンパク質の分解機構として、標的タンパク質のユビキチン (Ubiquitin; Ub) 化を介したプロテアソームまたはリソソームによる分解経路が知られている。翻訳後修飾分子である Ub は Ub 活性化酵素 (E1)、Ub 結合酵素 (E2)、E3 Ub リガーゼ (E3) という 3 つの触媒酵素を介して標的タンパク質のリジン (K) 残基側鎖 ϵ -NH₂ 基に共有結合する。共有結合した Ub の K 残基に新たな Ub の C 末端が共有結合する反応が繰り返されてポリ Ub 鎖は形成される。ヒトにおいて E1 は 2 種類、E2 は約 50 種類、E3 は約 600 種類存在している。E3 は E2 に結合した Ub を基質に転移させる反応機構の違いにより HECT 型と RING 型に大別され、E2 と E3 の組み合わせによって、Ub 分子内の 7 つの K 残基 (K6、11、27、29、33、48、63) を介したポリ Ub 鎖の結合様式の多様性が生まれる。この構造多様性が様々な細胞内の生理機能発現を可能にしている。ポリ Ub 鎖の結合様式の中で最も有名な K48-linked ポリ Ub 鎖は、26S プロテアソームのサブユニットとの相互作用によってタンパク質分解シグナルとして働く。K63-linked ポリ Ub 鎖はエンドサイトーシス、シグナル伝達、タンパク質間相互作用、選択的オートファジーなど、多種多様な細胞機能を与える。しかし、CD81 のポリ Ub 鎖結合様式やポリ Ub 鎖の機能は不明である。

また興味深いことに、CD81 のタンパク質発現は上皮細胞と比べて B 細胞で亢進している。このことから CD81 の発現増加は遺伝子発現の亢進、またはタンパク質分解の抑制が考えられるが、その機構は不明であり、さらに CD81 の分解や遺伝子発現の機構は明らかになっていない。そこで本研究では CD81 の分解機構を明らかにした。

第 1 章 CD81 の分解経路の同定

CD81 がプロテアソームとリソソームのいずれの経路で分解されるのかを同定するため、プロテアソーム阻害剤ラクタシスチン、リソソーム阻害剤クロロキン、またはプロテアソームかつリソソーム阻害剤 MG132 を用いて細胞表面に存在する CD81 の発現量を解析した。未処理やラクタシスチン処理に比べてクロロキンまたは MG132 処理により細胞膜上での CD81 の発現が増加した。次に CD81 の分解に Ub 化修飾が関与するか解析するため、上記の阻害剤を用いて CD81 のポリ Ub 化を CD81 のプルダウンアッセイにより解析した。その結果、クロロキンまたは MG132 処理により CD81 のポリ Ub 化が亢進した。次に CD81 のポリ Ub 鎖の結合様式を解析するため、2 つの Ub 変異プラスミド (Ub-K48 と Ub-K63) を用いて CD81 のポ

リ Ub 鎖を解析した。Ub-K48 と Ub-K63 は Ub の K48 または K63 以外の K 残基をそれぞれアルギニン (R) 残基に置換したプラスミドである。その結果、CD81 のポリ Ub 化は野生型 Ub に比べて Ub-K48 の発現により完全に消失し、Ub-K63 の発現で減少したが完全に消失しなかった。このことから CD81 は K48 以外のポリ Ub 鎖を形成されリソソームで分解されることが示唆された。さらに Ub の K29、K48 または K63 を R に置換した Ub 変異プラスミド (Ub-K29R、Ub-K48R または Ub-K63R) を用いて CD81 のポリ Ub 鎖解析を行った。興味深いことに、Ub-K63R に加えて Ub-K29R の発現により CD81 のポリ Ub 化は減少した。以上の結果から、CD81 は K63-または K29-linked ポリ Ub 化を介してリソソームで分解されることが明らかになった。

第 2 章 CD81 のエンドサイトーシス経路の解析

次にリソソームによる CD81 の分解経路を解析するため、クロロキン存在下で CD81 の局在を解析した。その結果、CD81 は初期エンドソームマーカー EEA1 とリソソームマーカー LAMP1 と共局在したが、オートファゴソームマーカーである p62 と共局在しなかった。したがって、リソソームによる CD81 の分解はオートファジー非依存的であり、CD81 はエンドサイトーシスを介して細胞内移行しリソソームで分解されることが考えられた。次に CD81 のエンドサイトーシス機構を解析するため、クラスリン依存的エンドサイトーシス阻害剤 CPMZ、カベオラ依存的エンドサイトーシス阻害剤 MBCD、クラスリン・カベオラ非依存的エンドサイトーシス阻害剤スクロースを用いて CD81 の分解阻害を解析した。その結果 CPMZ 処理により細胞表面に存在する CD81 の発現は未処理に比べて上昇した。このことから、CD81 はクラスリン依存的エンドサイトーシスを介して内部移行することが考えられた。

第 3 章 CD81 のポリ Ub 化機構

CD81 の細胞内領域の N 末端に 2 ヶ所の K 残基 (K8 と K11) と細胞外領域に 10 ヶ所存在しており、一般に膜タンパク質の細胞内領域が Ub 化される。そこで CD81 の細胞内領域の K 残基を A (アラニン) に変えた KA 変異プラスミド (CD81-K8A と CD81-K11A) を用いて、どの K 残基にポリ Ub 鎖が結合するのかをプルダウンアッセイにより解析した。その結果、K8 にポリ Ub 鎖が結合することが明らかになった。さらに CD81 の KA 変異体の安定性をシクロヘキシミドによるパルスチェイス実験で解析すると、野生型 CD81 と CD81-K11A に比べて CD81-K8A の半減期は延長した。このことから、CD81 は K8 を介したポリ Ub 化を介して分解されることが明らかになった。また CD81 の結合タンパク質の探索から膜結合型 E3 である MARCH と GRAIL の 2 種類が CD81 の E3 として報告されている。そこで MARCH ファミリーに属しウイルス性 E3 である K3 と K5 によって CD81 が分解されるか解析した。その結果、CD81 は K5 によって分解された。さらに Ub 転移を促進する RING ドメイン構造を破壊した K5 を発現させると、CD81 の分解は阻害された。これらの結果から、CD81 は K5 を含む MARCH ファミリーによってポリ Ub 化され分解されることが想定された。

総括

本研究により、CD81 は細胞内領域 K8 に K63-または K29-linked ポリ Ub 化され、クラスリン依存的エンドサイトーシスを介して細胞内移行し、エンドソーム上の CD81 はリソソームと融合し分解されることを明らかにした。

本論文は以下の報告の内容を総括したものである。なお、図の転載については出版社より許可済みである。

1. Kohei Hosokawa, Hanako Ishimaru, Tadashi Watanabe, Masahiro Fujimuro. The lysosome pathway degrades CD81 on the cell surface by poly-ubiquitination and clathrin-mediated endocytosis. *Biol. Pharm. Bull.* **2020**, *43*, 540-545

略語

A	Alanine
ADAM	A disintegrin and metalloprotease
AIP4	Atrophia-1-interacting protein 4
Amp	Ampicillin
ANOVA	Analyses of variance
APS	Ammonium Peroxodisulphate
ATP	Adenosine triphosphate
BD	Becton Dickinson
BES	N, N-Bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
CHX	Cycloheximide
CPMZ	Chlorpromazine
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
Dw	Distilled Water
E1	Ubiquitin-activating enzyme
E2	Ubiquitin-conjugating enzyme
E3	Ubiquitin ligase
E6AP	E6-Associated Protein
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EEA1	Early endosome antigen1
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
eIF3f	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit f
FBS	Fetal bovine serum
GRAIL	Gene related to anergy in lymphocytes
GTPase	Guanosine triphosphatase
HCV	Hepatitis C virus
HECT	Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus
HEK293T	293T
HRP	Horseradish peroxidase
Ig	Immunoglobulin
K	Lysine
Kan	Kanamycin
KSHV	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus
LAMP1	Lysosomal-associated membrane protein 1
LEL	Large extracellular loop

M	Methionine
MARCH	Membrane-associated RING-CH
MBCD	Methyl- β -cyclodextrin
MBL	Medical & Biological Laboratories
MDM2	Murine double minute 2
MHC	Major histocompatibility complex
Mini prep	Mini preparation
MS4A3	Membrane spanning 4-domains A3
NEM	N-ethyl emaleimide
ns	Not significant
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
R	Arginine
RING	Really interesting new gene
RIPA	Radioimmuno precipitation assay
RNase	Ribonuclease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SD	Standard deviation
SCF	Skp, Cullin, F-box containing complex
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEL	Small extracellular loop
TAPA1	a target of an anti-proliferative antibody-1
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylene-Diamine
TM	Transmembrane
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
Trk	Tyrosine kinase receptor
Tween-20	Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate
Ub	Ubiquitin
UIM	Ubiquitin interacting motif
WT	Wild type

試薬

10x Alkaline Phosphatase Buffer
10xloading buffer
Ampicillin
Ampicillin
Anti-CD81-antibody
Anti-CD81-antibody Alexa fluor 647
Anti-EEA1-antibody
Anti-HA-tag-antibody
Anti-LAMP1-antibody
Anti-mouse antibody HRP
Anti-Myc-tag-antibody
Anti-p62-antibody
Anti-rabbit antibody HRP
Anti-S-tag-antibody
Anti-β-actin-antibody
Aprotinin
APS
Bafilomycin
BES
BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix
Bovain serum albumin
CaCl₂
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution
Chlorpromazine
Chloroquine
Cycloheximide
Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit
DMEM
DMSO
DNA ligation kit
ECL
EDTA
FK2
Gel/PCR エクストラクション kit
HCl
Kanamycin
KOD FX
Lactacystin

社名

タカラバイオ
タカラバイオ
ナカライテスク
ナカライテスク
Santa Cruz
Santa Cruz
BD Biosciences
MBL
Santa Cruz
GE ヘルスケア
MBL
Santa Cruz
GE ヘルスケア
MBL
Santa Cruz
ナカライテスク
ナカライテスク
Adipogen
同仁化学研究所
Thermo Fisher Scientific
シグマアルドリッチ
ナカライテスク
タカラバイオ
東洋紡
ナカライテスク
TOCRIS
富士フィルム和光純薬
BD Biosciences
ナカライテスク
富士フィルム和光純薬
タカラバイオ
GE ヘルスケア
ナカライテスク
当ラボで作製
日本ジェネティクス
富士フィルム和光純薬
ナカライテスク
東洋紡
ペプチド研究所

LB 培地	ナカライテスク
Leupeptin	ナカライテスク
Methyl- β -cyclodextrin	東京化成
MG132	ペプチド研究所
NaCl	ナカライテスク
NaOH	ナカライテスク
NEM	ナカライテスク
NP-40	富士フィルム和光純薬
Pepstatin	ナカライテスク
PMSF	ナカライテスク
Protein A/G PLUS-Agarose	Santa Cruz
PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit	Invitrogen
QIAamp DNA Blood Mini Kit	QIAGEN
Rnase	ナカライテスク
RPMI1640	ナカライテスク
S-prototein agarose	Merck Millipore
Saponin	ナカライテスク
SDS	ナカライテスク
Sodium deoxycholate	富士フィルム和光純薬
Sphadex G-75	Pharmacai fine chemicals
TEMED	ナカライテスク
Tris	ナカライテスク
Trypsin	ナカライテスク
Tween-20	ナカライテスク
イソプロパノール	富士フィルム和光純薬
エタノール	ナカライテスク
エチジウムブロマイド	ナカライテスク
クロロホルム	富士フィルム和光純薬
酢酸	ナカライテスク
酢酸カリウム	ナカライテスク
制限酵素類	タカラバイオ
ニトロセルロース膜	富士フィルム和光純薬
メタノール	富士フィルム和光純薬
β -メルカプトエタノール	富士フィルム和光純薬

目次

序論	1
第1章 CD81 の分解経路の同定	6
1-1. はじめに	6
1-2. 材料と方法	10
1-2-1. 阻害剤調整と抗体	10
1-2-2. 細胞の継代	10
1-2-3. プラスミド	10
1-2-4. 発現プラスミドの構築	12
1-2-5. プルダウンアッセイ	16
1-2-6. 培養細胞への遺伝子導入 (トランスフェクション)	16
1-2-7. ウェスタンブロット	17
1-2-8. フローサイトメトリー法	19
1-2-9. 統計処理	19
1-3. 結果	20
1-3-1. CD81 はリソソームで分解される	20
1-3-2. CD81 は K63-または K29-linked ポリ Ub 化され分解される	23
1-4. 考察	26
第2章 CD81 のエンドサイトーシス経路の解析	28
2-1. はじめに	28
2-2. 材料と方法	30
2-2-1. 阻害剤調整と抗体	30
2-2-2. 細胞の継代	30
2-2-3. 蛍光抗体染色と共局在解析	30
2-2-4. ウェスタンブロット	30
2-2-5. フローサイトメトリー法	31
2-2-6. 統計解析	31
2-3. 結果	32
2-3-1. CD81 はエンドサイトーシスを介してリソソームで分解される	32
2-3-2. CD81 はクラスリンエンドサイトーシスを介して細胞内移行する	36
2-4. 考察	39
第3章 CD81 のポリ Ub 化機構	41
3-1. はじめに	41
3-2. 材料と方法	43
3-2-1. 阻害剤調整と抗体	43
3-2-2. 細胞の継代	43
3-2-3. プラスミド	43
3-2-4. ゲノム抽出	43
3-2-5. 発現プラスミドの構築	43

3-2-6. 変異プラスミドの構築	45
3-2-7. フローサイトメトリー法	46
3-2-8. プルダウンアッセイ	47
3-2-9. 培養細胞への遺伝子導入 (トランスフェクション)	47
3-2-10. ウェスタンブロット	47
3-3. 結果	48
3-3-1. CD81 のポリ Ub 化部位は K8 であり、K8 は CD81 の安定性に寄与する	48
3-3-2. K5 は CD81 をポリ Ub 化し分解誘導する	50
3-4. 考察	54
総括	56
結語	58
謝辞	59
引用文献	60
Supplementary information	67

序論

すべての生物は、細胞膜で囲まれた細胞を生命の基本単位としている。細胞の内部には、さらに生体膜で囲まれたエンドソームやリソソームなどの細胞小器官も存在し、生体膜が生命活動を支えている。生体膜は異なる空間を隔てるバリアーとして働くが、それに加えて、生体膜上での適切な物質の輸送や情報の伝達、エネルギー産生なども生命活動に必須な機能である。これらの多様な生体膜機能を担うのが、疎水性の脂質二重層からなる生体膜に埋め込まれた多種多様な膜タンパク質である。生体膜上の膜タンパク質は独立して機能するのではなく、自身または他の膜タンパク質が互いに膜上で密接に相互作用し、会合して複合体を形成している。そしてこれら複合体はシグナル伝達、細胞遊走や細胞接着、物質輸送などの多くの細胞性機能を担っている。このような膜タンパク質同士の会合に重要な役割を果たす膜タンパク質の1つとして、テトラスパニンが挙げられる。

テトラスパニンは2つの細胞外ドメイン (SEL; small extracellular loop と LEL; large extracellular loop)、3つの細胞内ドメインと4つの膜貫通領域 (TM1; transmembrane 1 から TM4) から形成される4回膜貫通型タンパク質である^{1,2)} (Fig. J-1A)。全ての4回膜貫通型タンパク質がテトラスパニンに分類されるのではなく、CD20 や MS4A3 はテトラスパニンに分類されていない。テトラスパニンはLEL内にCCGモチーフとシステイン(C)を介した二つの分子内ジスルフィド結合によって特徴付けられている^{3,4)}。抗テトラスパニン抗体が認識するエピトープは分子内ジスルフィド結合が形成するループ構造に存在する物が多く、還元条件下ではエピトープとなるループ構造が破壊され、抗体による検出が不能になる。したがってウェスタンブロットによる検出には非還元条件で調整されたサンプルを用いる。テトラスパニンは細胞外ドメインLELを介してテトラスパニン同士、あるいはインテグリン、成長因子受容体やプロテアーゼなどの膜タンパク質と横方向に相互作用し、テトラスパニンウェブと呼ばれるテトラスパニンが豊富に含まれるマイクロドメインを形成する^{3,5-8)} (Fig. J-1B)。またテトラスパニンは細胞内ドメインを介して protein kinase C、phosphoinositide 4-kinase、低分子量 GTPase である Ras、Rac1、CDC42 などのシグナル伝達分子と相互作用する^{9,10,11)}。このような機能を通してテトラスパニンは細胞接着、増殖、分化、遊走、シグナル伝達など幅広い細胞性機能に影響を与えている^{5,12-14)}。

テトラスパニンは哺乳類で33種類存在すると考えられており、CD81もテトラスパニンに分類されている。CD81はB細胞性リンパ腫の増殖を抑制する抗体スクリーニングによって発見され、TAPA1 (a target of an anti-proliferative antibody-1) と命名された¹⁵⁾。CD81の機能はCD81ノックアウトマウスのB細胞を用いてよく研究されている。CD81のノックアウトマウス内のT細胞やB細胞の発達には影響しないが、野生型と比べてCD81ノックアウトマウスのB細胞はB細胞シグナル伝達の応答が低下し抗体産生が減少している¹⁶⁻¹⁸⁾。ヒトにおいてもCD81の変異は低ガンマグロブリン血症を発症させることが知られている¹⁹⁾。テトラスパニンの機能がヒトでもマウスでも一致して報告されているテトラスパニンは現在のところCD81しかない。さらにCD81は、自身のTM1とLELを介してB細胞シグナル伝達分子で重要なチロシンキナーゼCD19と相互作用し、CD19の細胞表面への輸送を行っている^{20,21)}。これらの知見を合わせると、CD81の変異がある低ガンマグロブリン血症の患者では、CD81機能低下によりCD19の細胞膜表面への輸送が阻害されており、B細胞シグナル伝達が抑制され抗体産生に影響しているのではないかと考えられている¹⁹⁾。またCD81ノックアウト雌マウスは生殖能力が低下しており、CD9/CD81ダブルノックアウトマウスでは完全に不妊となる^{22,23)}。細胞機能の他にもCD81はマラリア原虫やC型肝炎ウイルス(HCV)の受容体とし

て働き、ヒトサイトメガロウイルス、インフルエンザウイルスの侵入を促進させ、また反対に HIV の感染を抑制する機能をもつ²⁴⁻²⁹⁾。特にウイルス感染における CD81 の機能は HCV で多く解析されている。C 型肝炎ウイルスがコードしているエンベロープタンパク質 E2 と CD81 の LEL と結合することが報告された^{26,27)}。その後 HCV を用いた感染実験において、肝細胞がん細胞である HepG2 細胞や Huh7 細胞は CD81 を発現していないが、これらの細胞に CD81 を強制発現させると HCV の感染が成立することから、CD81 は HCV の受容体であることが示唆されている^{26,27)}。さらに CD81 は HCV の侵入を促進している²⁷⁾。このように多岐にわたる CD81 の機能の報告にもかかわらず、CD81 の分解機構や遺伝子発現調節機構はほとんど解明されていない。

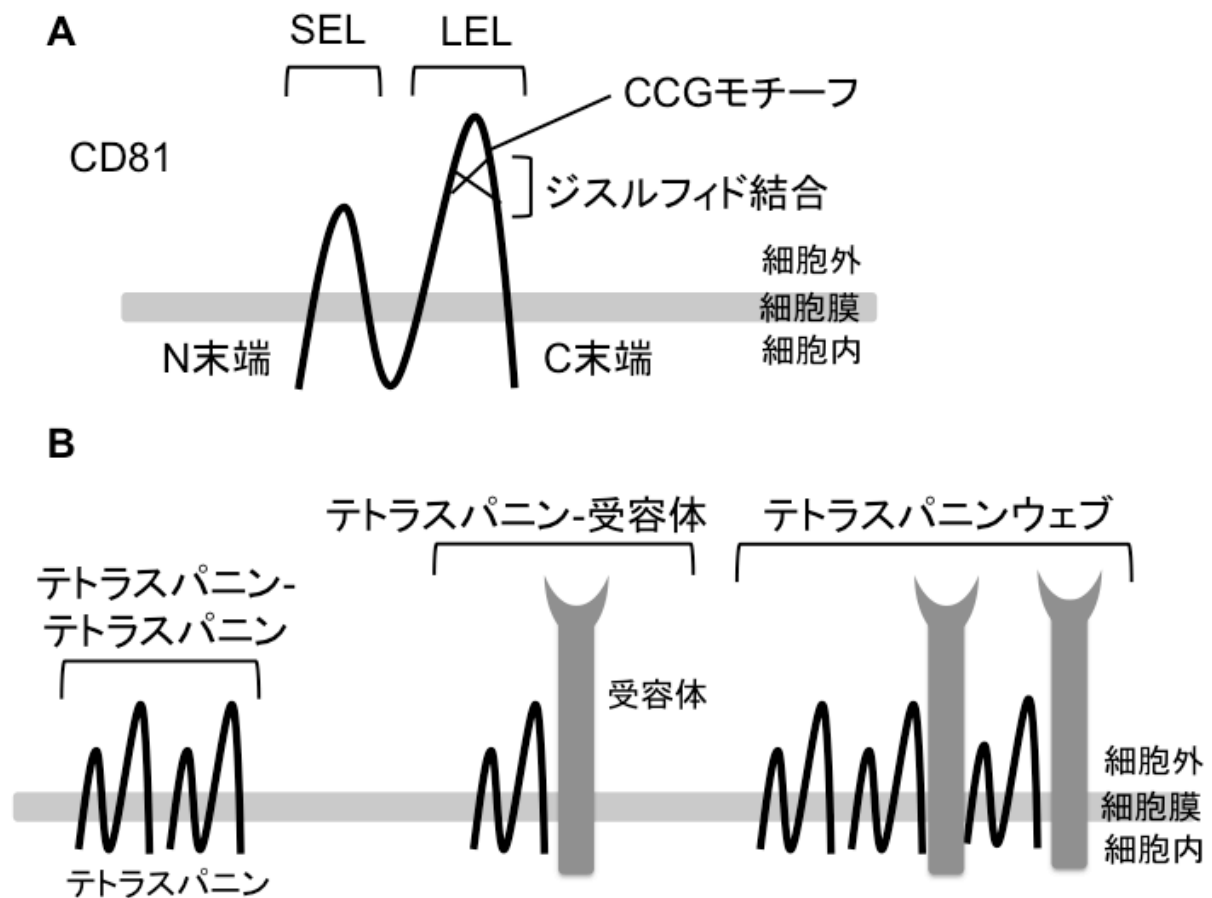


Fig. J-1. CD81 とテトラスパニンの特徴

(A) CD81 の構造の模式図

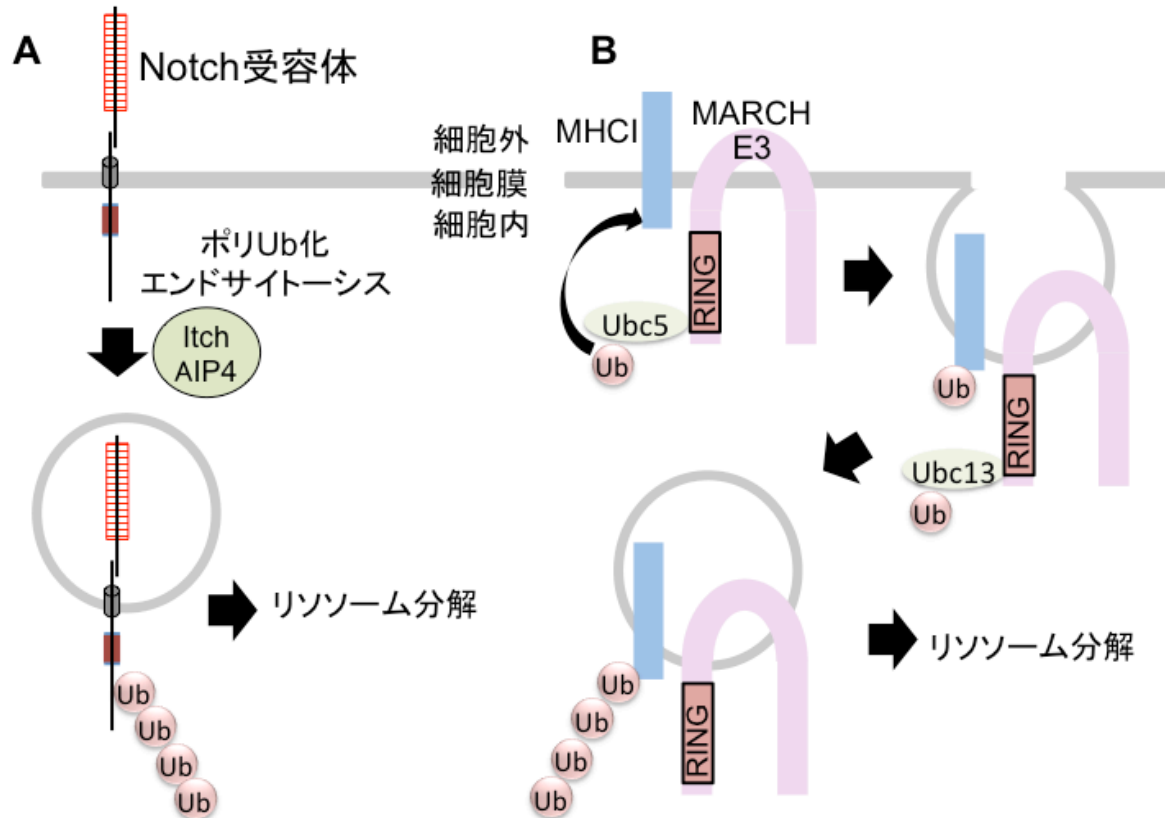
CD81 は細胞外領域に 2 つのループと細胞質内に 3 つの細胞内領域をもつ 4 回膜貫通型タンパク質である。細胞外領域に存在する 2 つのループは SEL; small extracellular loop と LEL; large extracellular loop と呼ばれ、LEL に C 残基同士の分子内結合によるジスルフィド結合が二つ存在する。またテトラスパニンに特徴的なモチーフである CCG モチーフが LEL に有している。

(B) テトラスパニンと膜タンパク質との相互作用によるテトラスパニンウェブの形成

テトラスパニンは側方向に膜タンパク質と相互作用し、テトラスパニン同士の複合体やテトラスパニンと受容体同士の複合体を形成し、テトラスパニンウェブと呼ばれるマイクロドメインを細胞表面上に形成する。

CD81 を含むテトラスパニンの分解機構は解析されていないが、notch 受容体や MHC クラ

ス I などの膜タンパク質の分解機構は多くの研究者により解析されている (Fig. J-2)。Notch 受容体は細胞膜上でポリ Ub 化され細胞内へ移行しリソソームで分解される^{30,31)} (Fig. J-2A)。MHC クラス I はモノ Ub 化された後細胞内へ移行し、細胞内でさらにポリ Ub されリソソームにより分解される^{32,33)} (Fig. J-2B)。一方で、notch 受容体が膜介在性メタロプロテアーゼにより切断され膜にアンカリングした transmembrane notch intracellular domain (TM-NICD) はモノ Ub 化され細胞内へ移行し、さらに γ -セクレターゼによる切断で生成される Ub 化 NICD は脱 Ub されると核内へ移行し、E3 である SCF/Sel-10/FBXW7 によってポリ Ub されプロテアソームによって分解される^{34,35)} (Fig. J-2C)。このように膜タンパク質の分解、局在変化には翻訳後修飾分子である Ub が重要な働きを担う。基質タンパク質の Ub 化には、E1 (Ub 活性化酵素)、E2 (Ub 結合酵素)、E3 (Ub リガーゼ) から成る連続的な酵素反応が必要である³⁶⁻³⁸⁾ (Fig. J-2D)。まず、ATP 依存的に E1 によって Ub の C 末端が活性化される。活性化状態を保った Ub は E1 から E2 に転移し、Ub は E2 のシステイン残基を介したチオエステル結合で共有結合している。最後に E3 によって Ub は基質に受け渡される。特に E3 は基質タンパク質を認識する重要なタンパク質である。結合タンパク質の探索から、CD81 の結合タンパク質として GRAIL と MARCH であることが報告されている^{39,40)}。これらの報告によると、GRAIL は CD81 をプロテアソームによって分解誘導し、MARCH は CD81 をリソソームにより分解誘導することが示されているが、CD81 がいずれの分解経路により分解されるのかは明らかになっていない。GRAIL と MARCH は基質を Ub 化する E3 であることから、CD81 の分解には少なくとも Ub が関与しているという推論を立てた。そこで第 1 章では CD81 の分解機構を明らかにするため、CD81 の Ub 化と CD81 の真の分解経路を解析した。



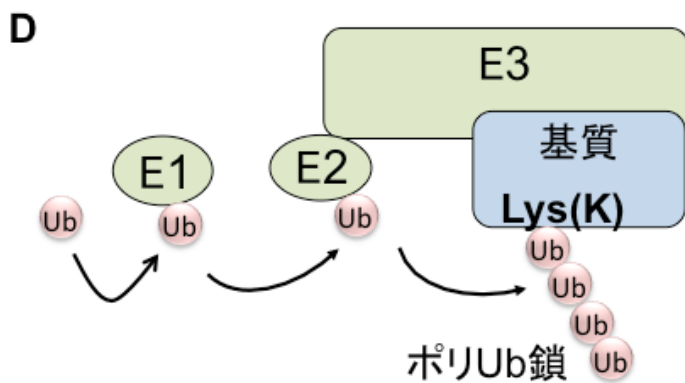
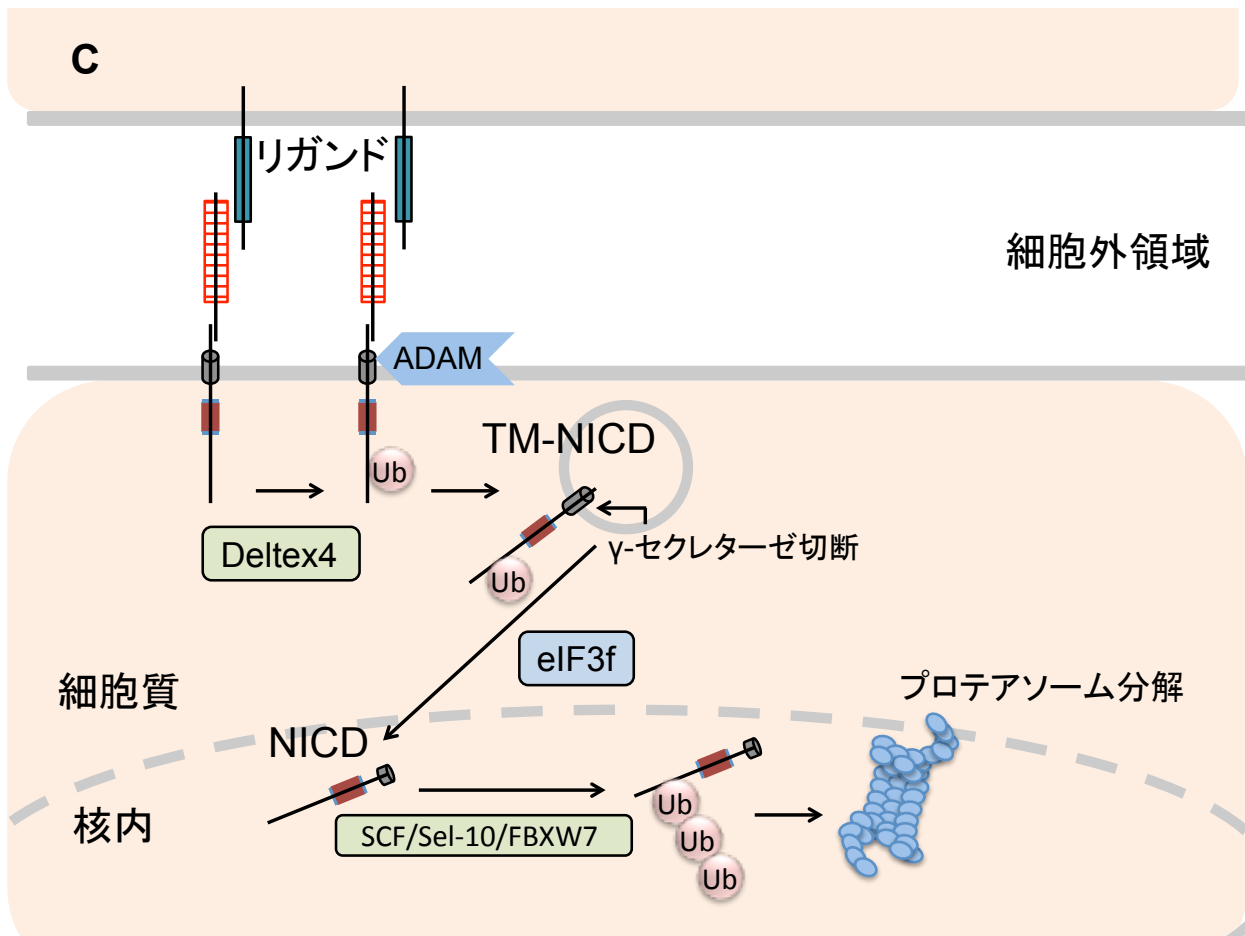


Fig. J-2. 膜タンパク質の Ub 化と Ub 化修飾機構

(A) Itch/AIP4 による notch 受容体の分解機構

Notch 受容体は E3 である Itch と AIP4 によってポリ Ub 化されリソソームに分解される。

図中の略語は以下に示す。Ub; Ubiquitin

(B) MARCH による MHC クラス I の分解機構

E3 である MARCH は RING ドメインを介して E2 である Ubc5 と結合し、MHC クラス I をモノ Ub 化する。その後 MARCH は Ubc13 と結合し MHC クラス I をポリ Ub 化する。ポリ Ub 化された MHC-I はリソソームによって分解される。

図中の略語は以下に示す。MHCI; MHC クラス I、RING; RING ドメイン

(C) eIF3f による NICD (notch intracellular domain) の分解機構

Notch 受容体は E3 である *deltex4* によってモノ Ub 化されたのち、メタロプロテアーゼである ADAM によって切断されモノ Ub 化 TM-NICD (Transmembrane-NICD) を生成する。モノ Ub 化 TM-NICD は γ -セクレターゼによって切断を受け生成されたモノ Ub 化 NICD は脱 Ub 化酵素である eIF3f によって脱 Ub 化されたのち核内に移行する。核局在した NICD は E3 によってポリユビキチン化を受けプロテアソームで分解される。

図中の略語は以下に示す。NICD; notch intracellular domain、TM-NICD; Transmembrane-NICD

(D) Ub 化修飾機構

Ub は E1、E2、E3 の 3 つの酵素を介して基質に Ub 化される。この反応が繰り返されることで基質にポリ Ub 鎖が形成される

図中の略語は以下に示す。E1; Ub 活性化酵素、E2; Ub 結合酵素、E3; Ub リガーゼ

第1章 CD81の分解機構の解析

1-1. はじめに

CD81は細胞表面に存在する4回膜貫通型タンパク質で、テトラスパニンファミリーに属している^{1, 2)}。哺乳類において33種類存在しているテトラスパニンは膜貫通領域や細胞内領域の保存性は高いが、細胞外領域であるLELのアミノ酸配列の保存性は低いことが知られている。しかし、LELにはテトラスパニンに特徴的な構造であるCCGモチーフとシステインを介した二つのジスルフィド結合があり、LEL内の立体構造が膜タンパク質同士の会合を促進していると考えられている³⁾。CD81は細胞表面でホモまたはヘテロ2量体として存在しテトラスパニンウェブを形成しており、膜タンパク質の輸送や受精、エクソソームの分泌など多くの細胞機能を発揮している^{5, 23, 41)}。しかし、CD81を含む多くのテトラスパニンファミリーの分解機構は明らかになっていない。

一般に膜タンパク質はE3によってUb化されプロテアソームあるいはリソソームで分解されることが知られている。Ubはすべての真核生物に存在する76アミノ酸からなる小球状タンパク質であり、ATP依存的に標的タンパク質に結合することでタンパク質の機能を制御する翻訳後修飾分子である⁴²⁾。細胞内に存在する全タンパク質の約4割がUb化を受け、そのうち8割のUb化タンパク質に1~4個のUbが連結していることが推定されている⁴³⁾。Ubが発見された経緯から、Ub化されたタンパク質はプロテアソームによって分解されると考えられていた。しかしUb化は分解のみならず、Ubの結合様式によってタンパク質の局在変化、DNA修復、シグナル伝達、膜タンパク質の輸送など多彩な機能を持ち合わせる^{44, 45)}。このUb化によるタンパク質機能の多様性はUb化修飾の構造多様性に起因すると考えられている。Ub修飾は基質に一つのUb分子が付加したモノUb化と、Ub同士の結合により形成されるポリUb化の2つの結合様式に大別される(Fig. 1-1)。モノUb化はUbのC末端のグリシンが、基質タンパク質のリジン(K)残基側鎖ε-NH₂基に共有結合する反応である(Fig. 1-1A)。ポリUb化はモノUb化された基質のUbのK残基に、新たなUbのC末端が結合する反応が繰り返されて形成される(Fig. 1-1B)。ポリUb化によって形成されるポリUb鎖は、Ub分子内に存在する7つのK(K6、11、27、29、33、48、63)を介して形成される^{46, 47)}(Fig. 1-2)。モノUb化とポリUb化がタンパク質に与える機能は異なっており、モノUb化の機能として膜タンパク質のエンドサイトーシスが知られている^{32, 33)}。一方ポリUb鎖の中で、K48の側鎖を介したポリUb鎖(K48-linkedポリUb鎖)はタンパク質の分解シグナルとして働き⁴⁸⁾、K63のKを介したポリUb鎖(K63-linkedポリUb鎖)はエンドサイトーシス、シグナル伝達や選択的オートファジーなどの機能を持つ^{49, 50)}(Fig. 1-3)。さらに近年、UbのN末端M(メチオニン)のα-アミノ基を介して連結した8番目のポリUb鎖が同定された⁵¹⁾。また、K11-linkedポリUb鎖にK63-linkedポリUb鎖が結合した混成型ユビキチン鎖の存在も報告されており、Ub修飾に内包された情報はユビキチンコードと称されている⁵²⁾。このような多種多様なUb修飾により様々な構造体が生成され、基質タンパク質に新たな機能を与えている。しかしK48、K63-linkedポリUb鎖以外のポリUb鎖の機能は不明な部分が多い。

細胞内におけるUb化膜タンパク質分解系にはUb-プロテアソーム分解経路とリソソーム分解経路の二つが存在している⁵³⁾(Fig. 1-4)。Ub-プロテアソーム経路はE1、E2、E3の3種類の触媒酵素群を介して基質タンパク質にUbを付加し、Ub化されたタンパク質がプロテアソームで分解される経路であり、E3がもつ基質認識機構によって成立する選択的タンパク質分解機構である^{42, 43)}。一方でリソソーム分解経路は、エンドサイトーシスで取り込まれた膜タンパク質が初期エンドソーム、多胞体、後期エンドソームを経てリソソームと融合し分解される

経路である⁵⁴⁻⁵⁷)。エンドサイトーシスが誘導される時、Ub 化が関与することが知られているが、個々のタンパク質によって Ub の結合様式が異なり、現在では K11、K29、K48、K63 を組み合わせた混成型ポリ Ub 鎖がエンドサイトーシスに関わることが示唆されている⁵⁸⁻⁶⁰)。

そこで本章では CD81 の分解機構を明らかにするため、CD81 の分解には Ub 化が関与するという仮説を立て、CD81 のポリ Ub 鎖の同定と分解経路の解析を行った。

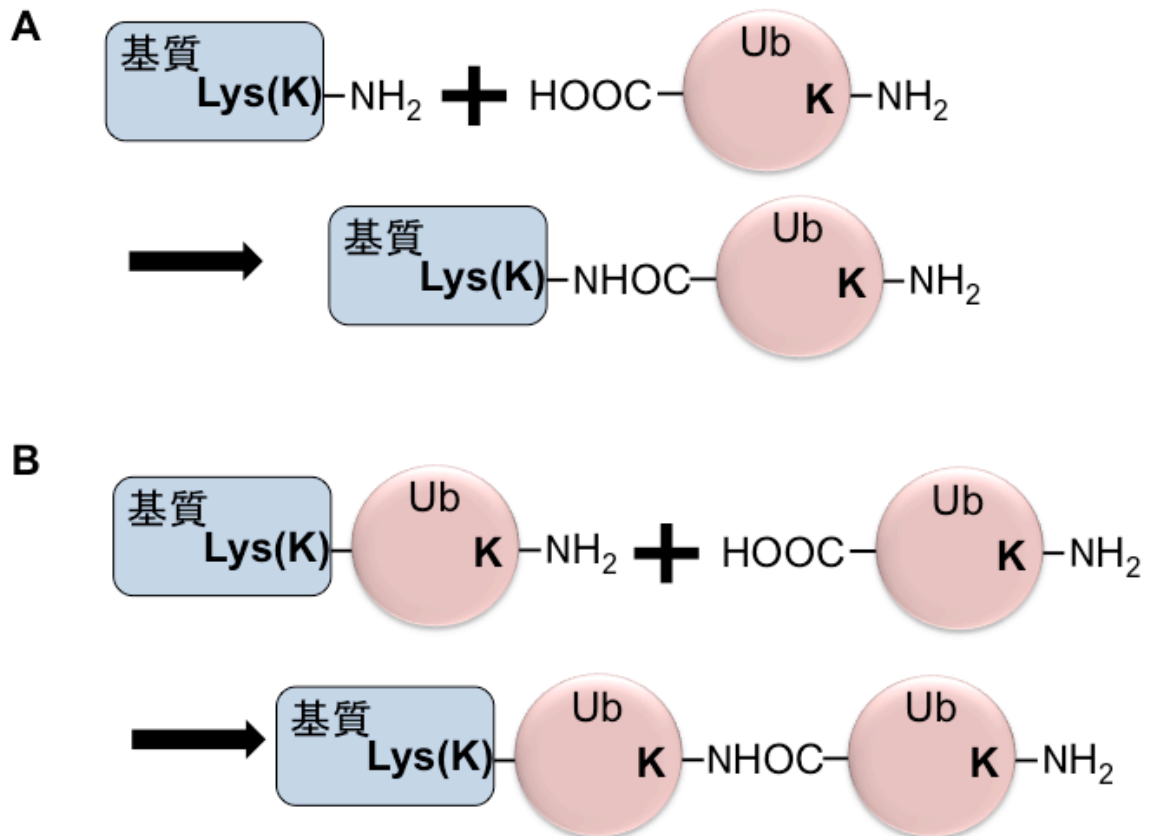


Fig. 1-1. 基質に対する Ub 化修飾

(A)モノ Ub 化反応機構

Ub は自身の C 末端のカルボキシル基と基質のリジン残基側鎖アミノ基と共有結合することで基質に付加する。

(B) モノ Ub 化された Ub 付加反応機構

共有結合した Ub のリジン残基側鎖アミノ基は新たな Ub の C 末端のカルボキシル基と共有結合する。この反応が繰り返されることでポリ Ub 鎖が形成される。



Fig. 1-2. Ub 分子

Ub タンパク質の 1 次構造の一部を示している。Ub 分子内には 7 個の K 残基(K6、11、27、29、33、48、63)が存在している。どの K 残基を介して共有結合が繰り返されかで形成されるポリ Ub 鎖の結合様式が異なる。

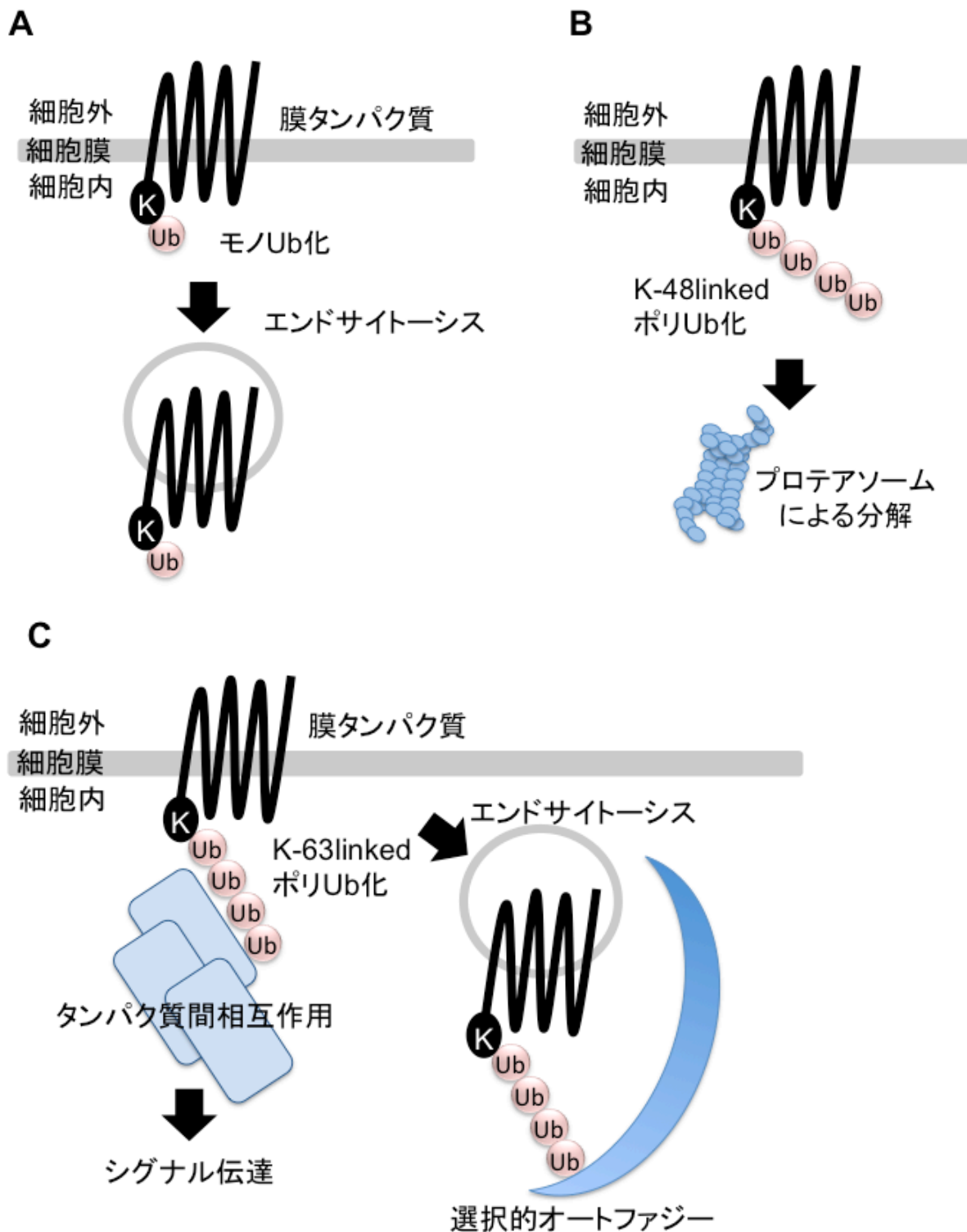


Fig. 1-3. モノ Ub 化とポリ Ub 化の機能

(A) モノ Ub 化膜タンパク質の機能

モノ Ub 化された膜タンパク質はエンドサイトーシスを介して細胞内に移行する。

図中の略語は以下に示す。K; 膜タンパク質のリジン

(B) K48-linked ポリ Ub 化タンパク質の機能

プロテアソームは K48-linked ポリ Ub 鎖を認識する。細胞膜上で K48-linked ポリ Ub 化された膜タンパク質はプロテアソームによって分解される。

(C) K63-linked ポリ Ub 化された膜タンパク質の機能

細胞膜上で K63-linked ポリ Ub 化された膜タンパク質はタンパク質間相互作用を介してシグナル伝達を調節する。また K63-linked ポリ Ub 化はエンドサイトーシスのトリガーとなり、細胞内移行シグナルとして働くことや、選択的オートファジーを誘導するという機能も担っている。

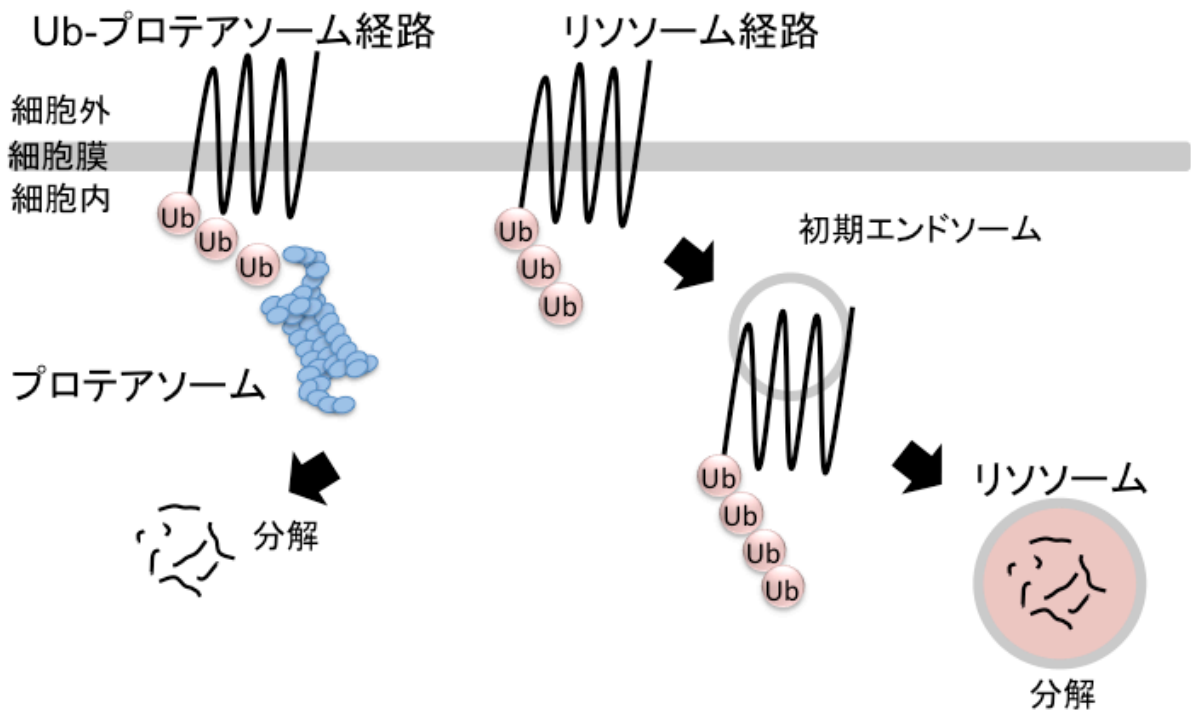


Fig. 1-4. Ub 化膜タンパク質の分解経路

Ub 化された膜タンパク質は Ub-プロテアソーム経路で分解される経路と、リソソームで分解される経路の二つに大別される。Ub-プロテアソーム経路は Ub 化された膜タンパク質がプロテアソームで分解される経路であり、リソソーム経路は Ub 化膜タンパク質がエンドサイトーシスを介して細胞質内に移行し、初期エンドソームに局在した Ub 化膜タンパク質がリソソームと融合し分解される経路である。

1-2. 材料と方法

1-2-1. 試薬と試薬調整

Lactacystin、MG132、bafilomycin A1 を DMSO に溶解し、chloroquine を蒸留水 (DW) に溶解し、CHX を 99.5 %エタノールに溶解し-20℃に保存した。

抗体は以下に記す。

Anti-CD81-antibody	Santa Cruz
Anti-β-actin-antibody	Santa Cruz
Anti-S-tag-antibody	MBL
Anti-HA-tag-antibody	MBL
Anti-Myc-tag-antibody	MBL
FK2	当ラボで作製 ⁶¹⁾
Anti-mouse antibody HRP	GE ヘルスケア
Anti-rabbit antibody HRP	GE ヘルスケア

1-2-2. 細胞の継代

HEK293T 細胞(以下 293T 細胞) は 10% FBS (fetal bovine serum) 含有 DMEM を用い(以下 DMEM 培地)、5% CO₂、37℃の条件下で培養した。細胞の継代のため、コンフルエントになった細胞を 1.25 mM EDTA 含有 5% トリプシン (以下トリプシン溶液)で処理し、5% CO₂、37℃の条件下でインキュベートした。細胞剥離後、DMEM 培地を加えトリプシン消化反応を止めた。細胞懸濁液を 15 mL チューブに回収し、1,500 rpm、2 分間室温で遠心して細胞を沈降させ、上清を捨てた。再び DMEM 培地で懸濁し、ディッシュまたはプレートに播種した。

1-2-3. プラスミド

使用した発現プラスミドは 2xS-CD81-WT、HA-Ub-WT、HA-Ub-K48、HA-Ub-K63、Myc-Ub-WT、Myc-Ub-K29R、Myc-Ub-K48R、Myc-Ub-K63R である。なお、2xS-CD81-WT、2xS-CD81-K8A、2xS-CD81-K11A、2xS-CD81-KK8、11AA は自身で作製した。HA-Ub-WT、HA-Ub-K48、HA-Ub-K63 は Addgene から購入し、そのプラスミド名と ID を以下に記す。

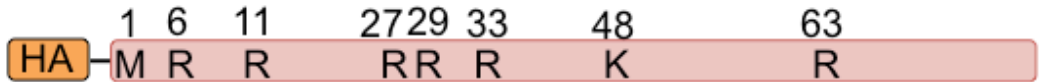
プラスミド名	略名	ID
pRK5-HA-Ubiquitin-WT	HA-Ub-WT	17608
pRK5-HA-Ubiquitin-K48	HA-Ub-K48	17605
pRK5-HA-Ubiquitin-K63	HA-Ub-K63	17606

HA-Ub-K48、HA-Ub-K63 はそれぞれ Ub 分子内の K のうち 48 番目または 63 番目の K だけを残し、残りの 6 個の K を R に変異させた Ub プラスミドである。また、Myc-Ub-WT、Myc-Ub-K29R、Myc-Ub-K48R、Myc-Ub-K63R は当ラボで作製したプラスミドである⁶²⁾。Myc-Ub-K29R、Myc-Ub-K48R、Myc-Ub-K63R は 29 番目、48 番目、63 番目の K を R に変異させた Ub プラスミドである。以下に野生型と変異型の Ub の模式図を記す。

HA-Ub-WT



HA-Ub-K48



HA-Ub-K63



Myc-Ub-WT



Mcy-Ub-K29R



Myc-Ub-K48R



Myc-Ub-K63R

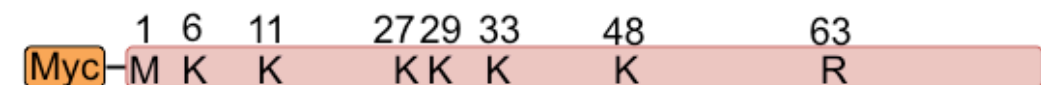


Fig. 1-5. HA-Ub と Myc-Ub タンパク質の模式図

HA-Ub-WT、HA-Ub-K48、HA-Ub-K63、Myc-Ub-WT、Myc-Ub-K29R、Myc-Ub-K48R、

Myc-Ub-K63R タンパク質の模式図を示している。M はメチオニン、K はリジン、R はアルギニンを表しており、Ub の N 末端に HA タグもしくは Myc タグが融合している。なお、使用したベクターは promega 社の pCIneo に 2xS タグペプチドをコードする DNA 配列を制限酵素サイト NheI と EcoRI サイトの間に挿入した pCIneo_2xS ベクターであり、2xS タグペプチドは CD81 の N 末端に融合した形で発現する

1-2-4. 発現プラスミドの構築

a) プライマー設計と Polymerase chain reaction (PCR)による DNA 断片の増幅

CD81-wild type(CD81-WT)の発現プラスミドを構築するため、以下に示すプライマー (Forward、Reverse)をユーロフィンジェノミクス株式会社で合成し、HeLa 細胞から抽出した cDNA を用いて PCR を行い、CD81 の PCR 産物を得た。

<2xS-CD81-WT の作製用プライマー>

Forward: 5'-atgaattcatgggagtgagggctgca-3'

Reverse: 5'-catgtcgactcagtcacggagctgtccgga-3'

PCR は KOD FX と上記のプライマーを用いて、以下の反応液の組成、条件で行った。

<反応液の組成>

2xPCR バッファー	25 μ L
2 mM dNTPs	10 μ L
10 μ M Forward プライマー	1.5 μ L
10 μ M Reverse プライマー	1.5 μ L
DW	8 μ L
KOD polymerase	2 μ L
cDNA	2 μ L (100 ng)
<hr/>	
Total	50 μ L

<反応条件>

Pre-denature	94°C, 2 min	35 cycles
Denature	98°C, 10 sec	
Extension	68°C, 50 sec	

得られた PCR 産物を含む溶液に 10x loading バッファーを加え、エチジウムブロマイド含有の低融点アガロースゲルで電気泳動した後、紫外線下で目的のバンドを切り出し、切り出したゲルを 1.5 mL チューブに入れた。切り出したゲルの重量を測定し、Gel/PCR エクストラクション kit を用い、添付プロトコルに従ってゲル抽出を行った。40 μ L TE バッファーを用いて 2 回の遠心 13,000 rpm、2 分間、4°C でカラムに吸着した DNA を溶出した。抽出された PCR 産物を吸光度測定し DNA 濃度を測定した。

b) 制限酵素処理、アルカリフォスファターゼ処理、ライゲーション、トランスフォーム

得られた PCR 産物の両端を切断し pCIneo-2xS ベクターを線状化するために、制限酵素を

用いて、以下の組成で混ぜた反応溶液を 37°C、3 時間反応させた。

<ベクターへの制限酵素処理>

DW	up to 100 μ L
10 \times HB	10 μ L
EcoRI	1.5 μ L
SalI	1.5 μ L
Vector	3 μ g
<hr/>	
Total	100 μ L

<PCR 産物への制限酵素処理>

DW	up to 100 μ L
10 \times HB	10 μ L
EcoRI	1.5 μ L
SalI	1.5 μ L
PCR 産物	1~3 μ g
<hr/>	
Total	100 μ L

反応終了後、酵素と PCR 断片を除くため、Gel/PCR エクストラクション kit を用いて制限酵素処理された DNA 断片を精製した。

ベクターのセルフライゲーションを防ぐため、DNA の 5'末端のリン酸基を除くアルカリフォスファターゼ処理を行なった。反応液の組成は以下に示しておりこの反応液を 50°C、1 時間反応させた。

<反応液の組成>

DW	23 μ L
10x Alkaline Phosphatase バッファー	5 μ L
Vector	20 μ L
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase	2 μ L
<hr/>	
Total	50 μ L

反応終了後、酵素を除くため、Gel/PCR エクストラクション kit を用いて脱リン酸化処理されたベクターを精製した。

次に脱リン酸化処理したベクターと制限酵素処理した PCR 産物 (インサート) を組み込むため、ベクターとインサートのモル比をベクター : インサート=1 : 3 とし、16°C、15~18 時間ライゲーション反応を行なった。以下に反応液の組成を記載する。

<反応液の組成>

ベクター : インサート 1 : 3 (ベクター量: 40 ng)

DW	up to 20 μ L
Ligation Mix	10 μ L

Total	20 μ L
-------	------------

同時にセルフライゲーション効率を確認するため、インサートを含まない反応液を準備した。反応液の組成は以下の通りである。

<反応液の組成>

ベクター	40 ng
DW	up to 20 μ L
Ligation Mix	10 μ L
Total	20 μ L

それぞれの 10 μ L のライゲーション反応液と 100 μ L のコンピテントセル (DH5 α) を混合することで、DH5 α にプラスミドを形質導入した。この混合溶液を氷上で 30 分間静置させた後、42°C で 40 秒間静置させ、再び氷上で 10 分間静置させた。この溶液全量を 100 μ g/mL ampicillin 含有 LB プレートに播種した。この LB プレートを 37°C、15~18 時間培養し、プラスミド抽出のため 5~10 個のコロニーを採取した。採取したコロニーを 1 個ずつ 100 μ g/mL ampicillin 含有 2 mL LB 培地が入ったチューブに植菌し 37°C、15~18 時間培養した。

c) 少量のプラスミド抽出 (Mini preparation; Mini prep)

Mini prep で用いる sol. 1、sol. 2、sol. 3 の組成を以下に記す。

<sol. 1>

25 mM Tris/HCl
10 mM EDTA

<sol. 2>

0.8% NaOH
1% SDS

<sol. 3>

酢酸カリウム 29.45 g
酢酸 12 mL
DW 53 mL

Mini prep は以下に示す方法で行われた。大腸菌の培養液を回収するため、3,000 rpm、5 分間、4°C で遠心し、上清を破棄した。そこに sol. 1 を 100 μ L 加え、ボルテックスで攪拌し大腸菌ペレットを完全にほぐした。続けて sol. 2 を 200 μ L 加え、この混合液をゆっくり転倒混和した。この溶液に 5 分以内に sol. 3 を 150 μ L 加え転倒混和し溶解反応を止め、クロロホルムを 10 μ L 加え、しっかり転倒混和した。クロロホルムを加えた混合液を 15,000 rpm、5 min、4°C で遠心し、タンパク質を沈殿させた。その上清を別のエッペンに移し、イソプロパノールを 500 μ L 加えボルテックスでしっかり混合し、15,000 rpm、10 分間、4°C で遠心し、プラスミドを沈殿させた。上清を破棄し、70% エタノールで洗浄し上清を破棄した後、沈殿物を 5 分間乾燥させた。100 μ g/mL RNase 含有 DW に沈殿物を溶解させた。

d) 制限酵素処理によるインサートの確認

c)で得られたプラスミドにインサートが組み込まれているか確認するため、制限酵素を用いて 37°C、3 時間、以下に示す反応液を反応させることでプラスミドを切断させた。制限酵素を加えた反応液の組成は以下に示した。

<反応液の組成>

DW	14.75 μ L
10 \times HB	2 μ L
EcoRI	0.125 μ L
SaII	0.125 μ L
Template	3 μ L
<hr/>	
Total	20 μ L

その後反応液に loading バッファーを加え、その混合溶液をエチジウムブロマイド含有の低融点アガロースゲルで電気泳動した後、紫外線下で目的のバンドを確認した。

e) DNA シーケンス解析

DNA 配列を解析するために用いた DNA template として、mini prep で精製されたプラスミド DNA を Gel/PCR エクストラクション kit により精製した DNA を用いた。DNA シーケンス解析はユーロフィンジェノミクス株式会社に委託することで、もしくは自身で PCR を行い反応後の DNA をエタノール沈殿後 HiDi ホルムアミド溶液で固定し、シーケンサーで DNA 配列を解析した。なお、シーケンス用プライマーは以下に示した。

<pCIneo vector に挿入したプラスミドのインサートの配列を読むためのプライマー>

Forward prime: 5'- gagacagagaagactcttg -3'

Revers primer: 5'- gcattctagtgtgtgttg -3'

<PCR で用いた溶液の組成>

Template	150~300 ng
5x バッファー	3.5 μ L
1 μ M プライマー	3.2 μ L
DW	Up to 20 μ L
BigDye™ Terminator 3.1	
Ready Reaction Mix	1.0 μ L
<hr/>	
Total	20 μ L

<反応条件>

Pre-denature	96°C, 1 min	25 cycles
Denature	96°C, 10 sec	
Annealing	50°C, 5 sec	
Extension	60°C, 4 min	

エタノール沈殿は次のように行った。PCR後の溶液に 60 μ L の Dw を加え、続けて 10 μ L 0.125M EDTA (pH8.0) と 10 μ L 3M 酢酸ナトリウムを加え混合した。さらにこの溶液に 300 μ L 100% エタノールを加え-20°Cで 30 分間反応させ、15,000 rpm、10 分間 4°Cで遠心し上清を破棄した。400 μ L の冷えた 70 %エタノールを加えゆっくり転倒混和し、15,000 rpm、5 分間 4°Cで遠心後上清を破棄した。5 分間乾燥後 HiDi ホルムアミドを 20 μ L 加えシーケンサーで解析した。

f) プラスミド精製

プラスミド精製は PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit を用いて添付プロトコル通りに行われ、プラスミドを精製した。

1-2-5. プルダウンアッセイ

プルダウンアッセイでは断りがない限り、全て on ice で行なった。プルダウンアッセイで用いる RIPA バッファの組成を以下に記す。

<RIPA バッファ>

50 mM Tris-HCl (pH7.5)

150 mM NaCl

5 mM EDTA

0.5% sodium deoxycholate

1% NP-40

0.1% SDS

細胞を冷却した PBS で 2 回洗浄した後、RIPA (radioimmuno precipitation assay) バッファ [1 mM NEM (N-ethylmaleimide)、500 μ M PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)、1 μ g/mL aprotinin、1 μ g/mL leupeptin、1 μ M pepstatin を含む] で細胞を懸濁し、5 秒間超音波破碎した。得られた細胞破碎液に RIPA バッファで洗浄した sephadex G-75 ビーズをビーズボリューム 30 μ L 加え、この溶液を 4°Cで 10 分間攪拌した。その後ビーズを含んだ溶液を 15,000 rpm、4°C、13 分間遠心することで不溶性画分を除去し、上清を回収した。この sephadex G-75 ビーズによる洗浄をもう 1 度行い不溶性画分を完全に除去した。この上清の一部をインプットサンプルとして 70 μ L 回収した。また残りの上清に、S ペプチドと結合する S-ptotein agarose ビーズをビーズボリューム 30 μ L 加えた。この混合液を 4°C、1 時間攪拌することで、抗原を S-ptotein agarose ビーズに結合させた。その後この混合溶液を 3,000 rpm、4°C、10 秒遠心することで S-ptotein agarose ビーズを沈降させ、上清を除去し RIPA バッファで 3 回洗浄した。S-ptotein agarose ビーズに結合した S 抗原の溶出時に 5% メルカプトエタノール含有 4xSDS バッファを 1 サンプルあたり 45 μ L 加え、室温で 10 分間静置させた。Ub 鎖を検出するとき、溶出したサンプルを煮沸すると Ub 鎖の凝集物が生じ、SDS-PAGE によるタンパク質の分離ができないため、煮沸は行わなかった。またインプットサンプルに 5% メルカプトエタノール含有 4xSDS sample バッファを 22.5 μ L 加え、その溶液を 95°Cで 5 分間煮沸した。これら精製サンプルを-20°Cで保存した。

1-2-6. 培養細胞への遺伝子導入 (トランスフェクション)

トランスフェクション直前に培地を新しい DMEM 培地に交換し、リン酸カルシウム法を用いてプラスミド DNA を細胞に遺伝子導入した。10 cm ディッシュにトランスフェクションを行う場合、総容量を 450 μ L になるように 20 μ g の DNA と DW をよく混合した。その溶液に

2.5 M CaCl₂ 水溶液を 50 μL 加えボルテックスで混合した。さらにその溶液に等量の 500 μL の 2xBBS バッファーを加えボルテックスでよく混合した後、37°C で 15 分間反応させることで、トランスフェクション溶液を調製した。80%コンフルエントに達した細胞に上記のトランスフェクション溶液を加え、CO₂ インキュベーター (35°C、3.5% CO₂) 内で一晩培養した。次に、細胞を PBS で 2 回洗浄し、新しい培地に交換した後、さらに培養 (37°C、5% CO₂) を続け、12 時間後に細胞を回収した。以下に培養サイズによるトランスフェクション溶液の調整方法と 2xBBS バッファーの組成を記載する。

<培養サイズ別トランスフェクション溶液の組成>

培養サイズ	細胞数	培地量	最大 DNA 量	DNA+DW 量
10 cm ディッシュ	7.0 x 10 ⁶ cells/ディッシュ	10 mL	20 μg	450 μL
6 well プレート	2.5 x 10 ⁶ cells/well	2 mL	5 μg	90 μL
12 well プレート	5.0 x 10 ⁵ cells/ well	1 mL	2.5 μg	45 μL

培養サイズ	2.5 M CaCl ₂	2xBBS バッファー	総量
10 cm ディッシュ	50 μL	500 μL	1000 μL
6 well プレート	10 μL	100 μL	200 μL
12 well プレート	5 μL	50 μL	100 μL

<2xBBS バッファー>

50 mM BES
280 mM NaCl
1.5 mM Na₂HPO₄

1-2-7. ウェスタンブロット

a) ウェスタンブロット用サンプル調製

10 cm ディッシュまたは 6 well プレート上の細胞を PBS で 2 回 wash し 4xSDS サンプルバッファー(1 mM NEM、500 μM PMSF、1 μg/mL aprotinin、1 μg/mL leupeptin、1 μM pepstatin を含む) を処理し細胞を溶解させ 15 秒間超音波処理した。CD81 以外のウェスタンブロット解析をするとき、2~5% β-メルカプトエタノールをセルライゼートに加えた。抗 CD81 抗体の認識部位は CD81 分子内のジスルフィド結合であるため、CD81 のウェスタンブロット解析をする細胞溶解液には、β-メルカプトエタノールなどの還元剤を細胞溶解液に添加しなかった。その後 95°C で 5 分間煮沸しウェスタンブロット用サンプルとした。サンプルを使用するまで -20°C で保存した。

b) ウェスタンブロット法

抽出した細胞溶解液またはプルダウンサンプルを 12.5% ポリアクリルアミドゲルに添加し、SDS 泳動バッファーを用いて 40~50 mA の定電流で SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) を行なった。SDS-PAGE し終えたゲルをウェット方式 (80 V の定電流) で 2~3 時間ニトロセルロース膜へ転写した。転写されたニトロセルロース膜を 2.5% スキムミルク含有 PBS で 30 分間振盪させることでブロッキングした後、PBS に希釈した 1 次抗体とニトロセルロース膜を室温で 1~2 時間または 4°C で 15~18 時間反応させた。その後その膜を 0.1%

Tween-20 含有 PBS (PBS-T) で 30 分間洗浄し、HRP 結合 2 次抗体溶液をニトロセルロース膜に浸し室温で 1 時間反応させた。その膜を再び PBS-T で 30 分間洗浄し PBS に置換し 10 分間振盪させた。最後にニトロセルロース膜を ECL (Enhanced chemiluminescence) 溶液処理することで化学発光させ X 線フィルムに最大 30 分間感光させた。反応が悪い時には Can Get Signal[®] Immunoreaction Enhancer Solution を用いて抗体を希釈した。ポリアクリルアミドゲル、SDS 泳動バッファー、トランスファーバッファー、PBS の組成は以下に記す。バンド定量は ImageJ software を用いて解析した。

<12.5%ポリアクリルアミドゲル>

Running gel

30 % アクリルアミドゲル	4.17 mL
1.5 M Tris/HCl (pH8.8)	2.5 mL
Mili Q	3.17 mL
10 % SDS	100 μ L
APS	50 μ L
<hr/>	
Total	10 mL

Stacking gel

30 % アクリルアミドゲル	1.66 mL
0.5 M Tris/HCl (pH6.8)	2.5 mL
Mili Q	5.62 mL
10 % SDS	100 μ L
APS	50 μ L
<hr/>	
Total	10 mL

以上の組成で混ぜた後、TEMED を 30 μ L ずつ running gel と stacking gel に加えてポリアクリルアミドゲルを作製した。

<SDS 泳動バッファー>

- 25 mM Tris
- 192 mM グリシン
- 0.1 % SDS

<トランスファーバッファー>

- 25 mM Tris
- 192 mM グリシン
- 20 % メタノール

<PBS>

- 137 mM NaCl

2.7 mM KCl
4.3 mM Na₂HPO₄
1.4 mM NaH₂PO₄

<PBS-T>

137 mM NaCl
2.7 mM KCl
4.3 mM Na₂HPO₄
1.4 mM NaH₂PO₄
0.1 % Tween-20

1-2-8. フローサイトメトリー法

細胞表面に発現する CD81 の発現量を解析するため、抗 CD81 抗体と蛍光抗体を用いて蛍光強度をフローサイトメーターで解析した。6 well プレートに播種した接着細胞にトリプシン溶液を処理し DMEM 培地で懸濁後、1,500 rpm、5 分間遠心し細胞を沈降させた。4℃に冷やした PBS で 2 回洗浄し、4℃に冷やした 4% パラホルムアルデヒドにより室温で 10~20 分間細胞を固定した。PBS で 3 回洗浄後、抗体の非特異反応を防ぐため、3% FBS を含む PBS (FACS バッファー) で細胞を懸濁しブロッキングを 30 分間行なった。PBS に懸濁した抗 CD81 抗体もしくは抗マウス抗体を細胞に処理し 1 時間氷上で反応させた。FACS バッファーで 3 回洗浄後、PBS に懸濁した Alexa fluor 647 標識ロバ抗マウス抗体を細胞に処理し 1 時間氷上で反応させた。その細胞懸濁液を FACS バッファーで 3 回洗浄し、3,000 rpm で 2 分間遠心して染色した細胞を沈降させ PBS で再懸濁した。この細胞懸濁液を 70 μm 径のナイロンメッシュに通した後、LSRFortessa Flow Cytometer を用いて蛍光強度を解析した。コントロール IgG である抗マウス抗体を処理した細胞の蛍光強度を基準にし、抗 CD81 抗体で染色した細胞の蛍光強度を測定した。細胞の蛍光強度を FACSDiva™ software で解析した。なお、トリプシン処理によって、細胞表面に存在する CD81 の発現量に影響を与えないことは確認している。

1-2-9. 統計解析

3 群以上の比較のとき、分散分析法として ANOVA を用い、検定には Dunnet 検定を用いて統計解析を実行した。統計解析ソフトは GraphPad Prism7 を使用した。得られた実験結果は平均値+標準偏差で表示した。危険率 5% 以下を統計学的に有意差があると判定した。

第1章 CD81 の分解経路とポリ Ub 化の解析

1-3. 結果

1-3-1. CD81 はリソソームで分解される

CD81 がプロテアソームまたはリソソームのどちらで分解されるのかを解析するため、プロテアソーム阻害剤 lactacystin、リソソーム阻害剤 bafilomycin A1、chloroquine、プロテアソームかつリソソーム両阻害剤 MG132 を 293T 細胞に 24 時間処理し、細胞表面に発現する CD81 をフローサイトメトリー法で定量した (Fig. 1-6A, B)。MG132 は一般的にプロテアソーム阻害剤として知られているが、リソソームに含まれるカテプシン K を阻害することも報告されており^{63,64}、本研究では MG132 をプロテアソームとリソソームの両方を阻害する化合物として用いた。Bafilomycin A1 はリソソームの内腔を酸性化する V-ATPase を阻害し^{65,66}、chloroquine はリソソームによるタンパク質分解を阻害する^{67,68}。また本研究で用いた抗 CD81 抗体は CD81 の細胞外領域を認識する^{69,70}。これらの化合物と抗体を用いることで CD81 の分解経路を解析した。その結果、DMSO または lactacystin 処理に比べて、MG132、bafilomycin A1 または chloroquine 処理した細胞表面の CD81 の発現が増加した。このことから CD81 はリソソームで分解されることが示唆された。

次にリソソームによる CD81 の分解を観察するため、タンパク質合成阻害薬 cycloheximide (CHX) を用いて CD81 の半減期を解析した。CHX 存在下 MCF7 細胞に MG132 または chloroquine を 0、12、24、36 時間処理し、細胞内の CD81 の発現量をウェスタンブロットで解析した (Fig. 1-6C, D)。その結果、DMSO、MG132 または chloroquine 処理の CD81 の半減期はそれぞれ約 24 時間、36 時間以上、36 時間であった。この結果は CD81 の半減期はリソソーム阻害剤によって延長することを示している。以上の結果から、CD81 はリソソームで分解されることが明らかになった。

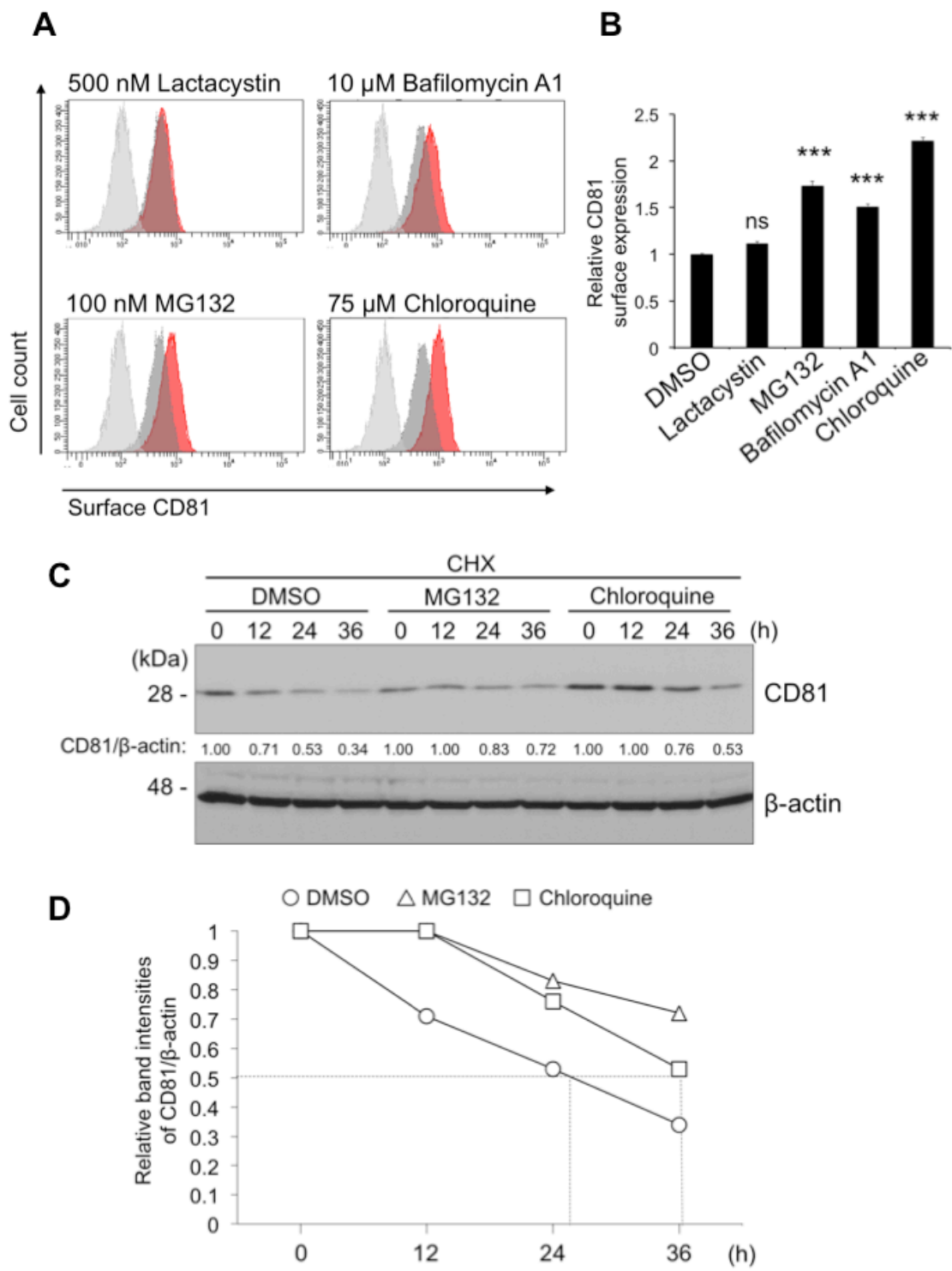


Fig. 1-6. CD81 はリソソームで分解する

(A) 293T 細胞に lactacystin、MG132、bafilomycin A1、chloroquine を 24 時間処理し、CD81 の細胞外領域を認識する抗体を用いて細胞表面の CD81 の発現をフローサイトメトリーで解析した。図は CD81 の蛍光強度のヒストグラムを示している。赤は各種阻害剤 (500 nM lactacystin、100 nM MG132、10 μM bafilomycin A1、75 μM chloroquine)、ダークグレーは DMSO 処理したヒストグラムである。ライトグレーはコントロール IgG を処理した 293T 細胞のヒストグラムを示している。図は、*Biol. Pharm. Bull.* 2019, Hosokawa K. et al. の Fig. 1A を一部変更し、引用

した。

(B) DMSO 処理した CD81 の蛍光強度を 1 とした相対値を縦軸に示している。棒グラフは平均値+SD で表している。***は $p < 0.001$ を表しており、DMSO 処理した値と比較した。図は、*Biol. Pharm. Bull.* 2019, Hosokawa K. et al. の Fig. 1B を一部変更し、引用した。

(C) 293T 細胞に 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CHX 存在下 0.1% DMSO、100 nM MG132、75 mM chloroquine を最大 36 時間処理し、CD81 の発現をウェスタンブロットで解析した。バンド強度は Image J で算出し、0 時間の CD81/ β -actin の値を 1 とし、相対値として図の下に示した。図は、*Biol. Pharm. Bull.* 2019, Hosokawa K. et al. の Fig. 1C を一部変更し、引用した。

(D) Fig. 1C で算出した値を縦軸に、時間を横軸に示した。丸、三角、四角はそれぞれ DMSO、MG132、chloroquine を処理した細胞を示している。図は、*Biol. Pharm. Bull.* 2019, Hosokawa K. et al. の Supplemental Figure-S1 を一部変更し、引用した。

1-3-2. CD81 は K63-または K29-linked ポリ Ub 化され分解される

リソソームによる CD81 の分解にポリ Ub 化が関与するか解析するため、293T 細胞に 2xS-CD81-WT プラスミドを単独で (Fig. 1-7A)、または HA-Ub-WT プラスミドと同時に遺伝子導入した (Fig. 1-7B)。12 時間後 lactacyclin、MG132、chloroquine を 6 時間処理し S-protin agarose ビーズでプルダウンアッセイを行なった。CD81 のポリ Ub 鎖を検出するため、FK2 (Fig. 1-7A) と anti-HA antibody (Fig. 1-7B) を用いた。FK2 はポリ Ub 鎖を認識する抗体であり、当ラボで作製した⁶¹⁾。その結果、DMSO 処理に比べて lactacyclin 処理した細胞の CD81 のポリ Ub 化に変化はなかったが、MG132 または chloroquine 処理により CD81 のポリ Ub 鎖が多く検出された。このことから、CD81 はポリ Ub 化されリソソームで分解されることが示唆された。

次に CD81 のポリ Ub 鎖の結合様式を解析した。293T 細胞に HA-Ub-WT、-K48 または -K63 プラスミドを 2xS-CD81-WT プラスミドと共に遺伝子導入した。12 時間後 MG132 を 6 時間処理し S-protin agarose ビーズでプルダウンアッセイを行なった (Fig. 1-7C)。HA-Ub-K48、-K63 は Ub の 7 つの K の内、K48 または K63 のみを残し、他の K を R (アルギニン) に置換した Ub mutant プラスミドである (Fig. 1-5)。DMSO 処理に比べて MG132 を処理すると CD81 のポリ Ub 鎖が多く検出されたが、HA-Ub-K48 プラスミドを遺伝子導入すると CD81 のポリ Ub 化は完全に消失した。さらに HA-Ub-K63 を発現させると HA-Ub-WT に比べて CD81 のポリ Ub 化は減少した。これらの結果から、CD81 は K48-linked ポリ Ub 鎖以外のポリ Ub 鎖が結合することが示唆された。

そこで CD81 のポリ Ub 化様式を詳細に解析するために、293T 細胞に 2xS-CD81-WT プラスミドと Myc-Ub-WT、-K29R、-K48R または -K63R プラスミドを共に遺伝子導入し 12 時間後 S-protin agarose ビーズでプルダウンアッセイを行なった (Fig. 1-7D)。Myc-Ub-K29R、Myc-Ub-K48R、Myc-Ub-K63R はそれぞれ K29、K4、K63 を R に置換した Ub mutant プラスミドである (Fig. 1-5)。CD81 のポリ Ub 鎖を検出するため、FK2 と anti-Myc antibody を用いてウェスタンブロットを行なった。その結果、Myc-Ub-WT に比べて CD81 のポリ Ub 鎖は Myc-Ub-K48R の発現により変化はなく、Myc-Ub-K29R または Myc-Ub-K63R の発現により減少した。これらの結果から CD81 は K63-と K29-linked ポリ Ub 化されリソソームで分解されることが明らかになった。

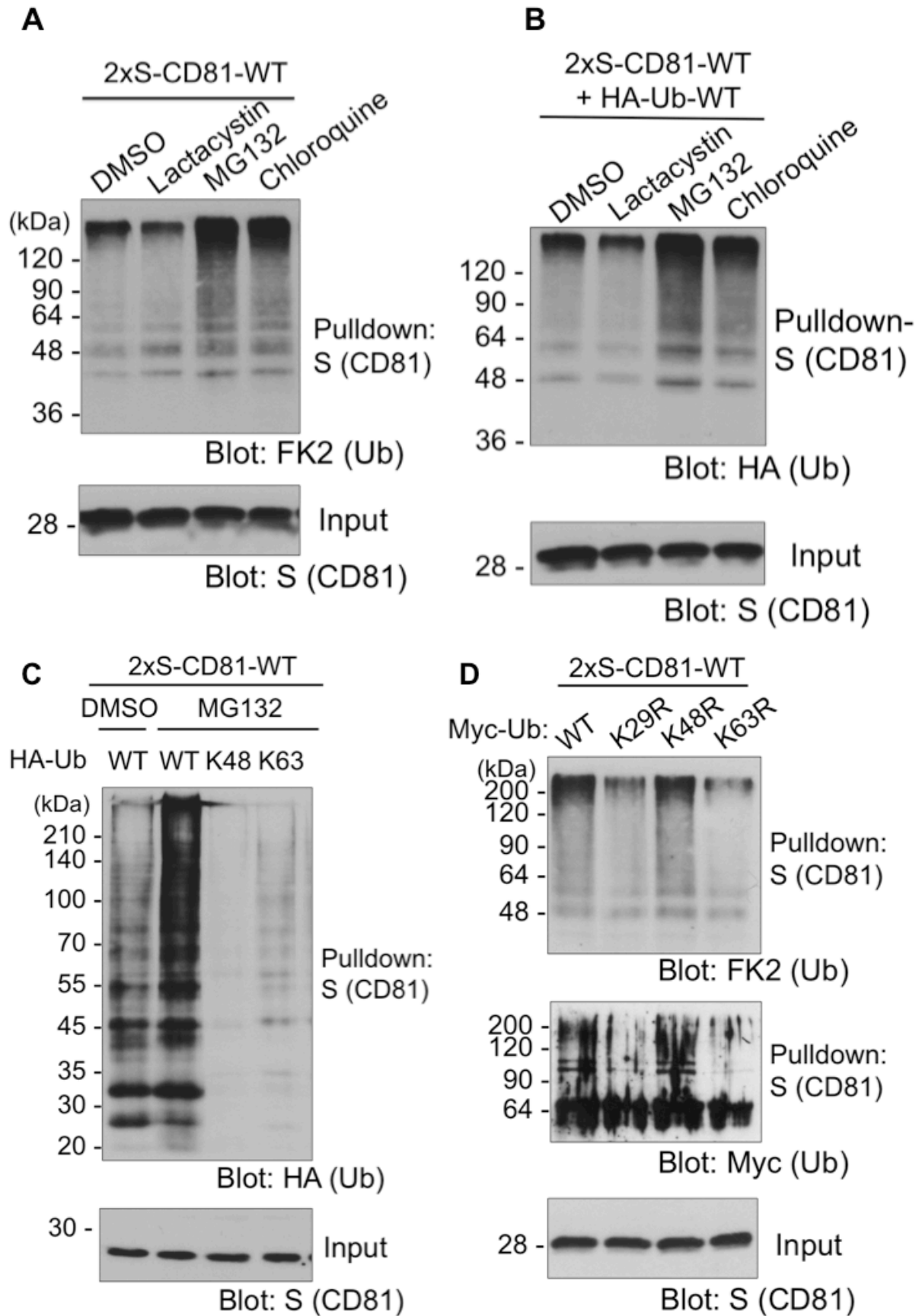


Fig. 1-7. CD81 のポリ Ub 化解析

(A) 293T 細胞に 2xS-CD81-WT プラスミドを遺伝子導入し、12 時間後 0.1% DMSO、1 μ M

lactacystin、100 nM MG132、75 mM chloroquine を 6 時間処理し S-ptotein agarose ビーズでプルダウンアッセイを行なった。プルダウンにより沈降した 2xS-CD81 を含むサンプルに対して FK2 を用いて、インプットサンプルに対し抗 S タグ抗体を用いてウェスタンブロットを行なった。図は、*Biol. Pharm. Bull.* 2019, Hosokawa K. et al. の Fig. 1D を一部変更し、引用した。

(B) 293T 細胞に 2xS-CD81-WT プラスミドと HA-Ub-WT プラスミドを同時に遺伝子導入し、12 時間後 0.1% DMSO、1 μ M lactacystin、100 nM MG132、75 mM chloroquine を 6 時間処理し S-ptotein agarose ビーズでプルダウンアッセイを行なった。プルダウンにより沈降した 2xS-CD81 を含むサンプルに対し抗 HA タグ抗体で、インプットサンプルに対し抗 S タグ抗体を用いてウェスタンブロットを行なった。図は、*Biol. Pharm. Bull.* 2019, Hosokawa K. et al. の Supplemental Figure-S2 を一部変更し、引用した。

(C) 293T 細胞に HA-Ub-WT、-K48 または -K63 プラスミドを 2xS-CD81-WT プラスミドと共に遺伝子導入し、12 時間後 100 nM MG132 を 6 時間処理し S-ptotein agarose ビーズでプルダウンアッセイを行なった。プルダウンにより沈降した 2xS-CD81 を含むサンプルに対し抗 HA タグ抗体で、インプットサンプルに対し抗 S タグ抗体を用いてウェスタンブロットを行なった。図は、*Biol. Pharm. Bull.* 2019, Hosokawa K. et al. の Fig. 1E を一部変更し、引用した。

(D) 293T 細胞に Myc-Ub-WT、-K29R、-K48R または -K63R プラスミドを 2xS-CD81-WT プラスミドと共に遺伝子導入し、12 時間後 S-ptotein agarose ビーズでプルダウンアッセイを行なった。プルダウンにより沈降した 2xS-CD81 を含むサンプルに対し FK2 または抗 Myc タグ抗体で、インプットサンプルに対し抗 S タグ抗体を用いてウェスタンブロットを行なった。図は、*Biol. Pharm. Bull.* 2019, Hosokawa K. et al. の Fig. 1F を一部変更し、引用した。

1-4. 考察

第1章でCD81はポリ Ub 化を介してリソソームで分解されることを明らかにした (Fig. 1-6, 1-7)。Fig. 1-6 では阻害剤を用いた CD81 の分解阻害を、Fig. 1-8 では CD81 のポリ Ub 鎖を解析した。Fig. 1-6 の結果からリソソーム阻害剤を処理すると細胞表面に発現する CD81 の発現量が上昇した。このことから CD81 はリソソーム経路で分解されることが示唆される。リソソーム阻害剤によって細胞表面上の CD81 の発現が上昇する理由として、リソソーム阻害剤処理によって分解されなかったエンドソーム上の CD81 はリサイクリング経路を経由して細胞表面上に輸送される結果、細胞表面上の CD81 の発現量が上昇することが考えられた。Fig. 1-7A、B の結果から、リソソーム阻害剤である MG132、chloroquine 処理した細胞内の CD81 のポリ Ub 化が多く検出されたことから、リソソームによって分解されることが示唆され、この結果は Fig. 1-6 の結果に一致している。Lineberry らの先行研究によると、CD81 は E3 である GRAIL によってポリ Ub 化されプロテアソームによって分解されることが示唆されているが³⁹⁾、2 つの解釈の誤りによって、この報告と本研究結果は相反していると考察した。解釈の誤りの 1 つ目として、阻害剤の作用点の違いが考えられる。Lineberry らはプロテアソーム阻害剤である ALLN と MG132 を処理することで、未処理に比べて CD81 のポリ Ub 鎖が多く検出されたという結果から、GRAIL は CD81 をプロテアソームにより分解誘導することを示している。しかし ALLN や MG132 はプロテアソームだけではなく、リソソームに含まれるシステインプロテアーゼであるカプテンシンも阻害することが知られている^{63, 64, 71, 72)}。Fig. 1-7A、B からプロテアソームを阻害しリソソームを阻害しない lactacystin を処理した時、DMSO 処理に比べて CD81 のポリ Ub 化量に変化はなかったが、リソソームを阻害しプロテアソームを阻害しない chloroquine を処理した時、CD81 のポリ Ub 鎖の量は亢進した。以上の知見と結果から、プロテアソームかつリソソームを阻害する ALLN と MG132 を処理することで CD81 の分解経路を判断することはできないと考える。解釈の誤りの 2 つ目は、プロテアソーム阻害剤もしくはリソソーム阻害剤を処理し、CD81 のポリ Ub 鎖の量を観察することで CD81 の分解経路を判断している点である。CD81 を含むタンパク質の分解経路を解析する方法として、標的タンパク質に結合する Ub 鎖の量を観察するよりも、プロテアソーム阻害剤もしくはリソソーム阻害剤を処理し、阻害剤を処理したタンパク質の発現量を解析する方が、タンパク質の分解経路をより正確に判断できると考える。Fig. 1-6 でプロテアソーム阻害剤とリソソーム阻害剤を用いて CD81 の発現量を解析した。しかし Lineberry らは CD81 の発現量を解析しておらず、CD81 の Ub 化量の変化で分解経路を判断していた。したがって CD81 の分解経路の結論に違いが生じ、CD81 の真の分解経路はリソソームである。一方で、Bartee らは MARCH が CD81 をリソソームで分解することを示している⁴⁰⁾。MARCH は MHC-I、ICAM-1、B7、CD4 などの膜タンパク質を Ub 化しリソソームで分解誘導することが知られており^{73, 74)}、分解経路は本研究結果と一致する。

また Fig. 1-7C、D の結果から CD81 は K63-または K29-linked ポリ Ub 化されることが明らかになった。これまでの先行研究から、細胞表面に存在する膜タンパク質のポリ Ub 化はエンドサイトーシスを介した細胞内移行シグナルとして働くことが知られている^{8, 30, 50)}。また細胞質内で K29-linked ポリ Ub 化された Norch 受容体はリソソームに輸送されることから、K29-linked ポリ Ub 化はリソソームへの輸送シグナルであることが示唆されている³⁰⁾。これらの報告と本研究結果から、CD81 は細胞表面で K63-linked ポリ Ub 化されたのち、細胞質内に移行し、さらに K29-linked ポリ Ub 化されるとリソソームに輸送され分解されることが考えられる (Fig. 1-8)。一方で Lineberry らによると、CD81 は GRAIL によって K48-linked ポリ Ub 化されることが示唆されており、本研究結果の Ub 結合様式とは異なっている。Lineberry ら

の実験系は CD81 と GRAIL の過剰発現であり、本研究の実験系とは異なるため、CD81 のポリ Ub 鎖の結合様式の結果が異なると考えられる。

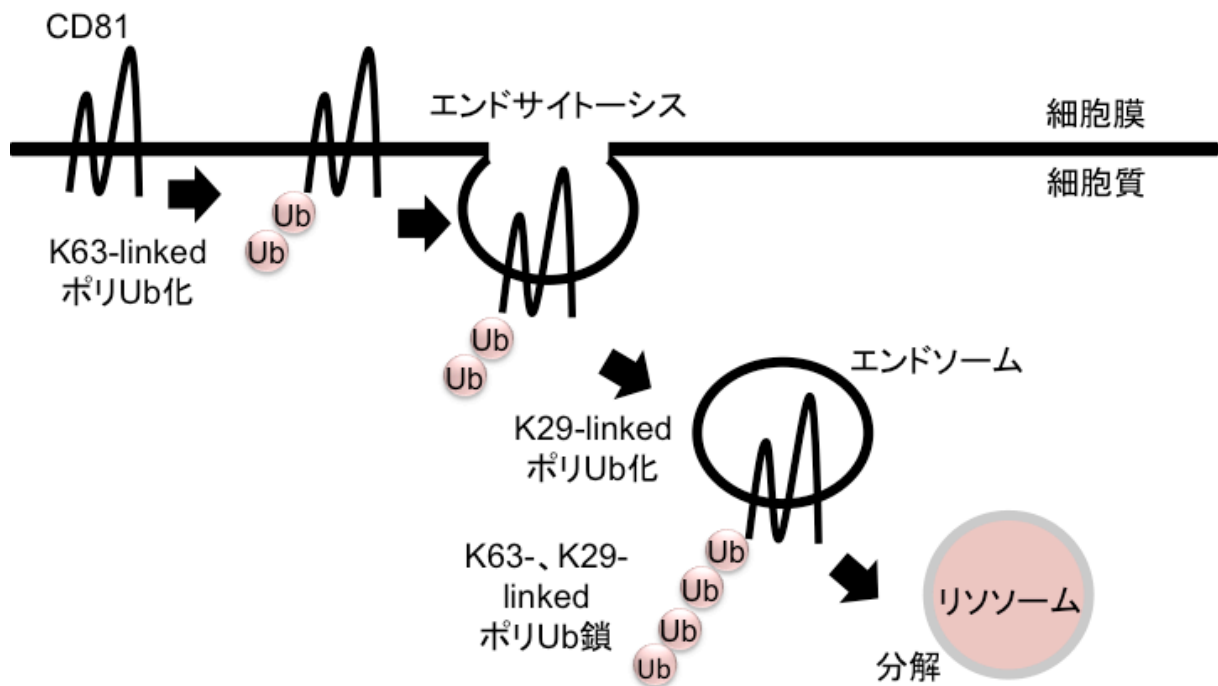


Fig. 1-8. CD81 の分解経路の模式図

CD81 は細胞表面上で K63-linked ポリ Ub 化されたのちエンドサイトーシスを介して細胞内移行し、細胞内で K29-linked ポリ Ub 化されたのちリソソームで分解されることが想定される。

第2章 CD81のエンドサイトーシス経路の解析

2-1. はじめに

細胞膜上で Ub 化された膜タンパク質はエンドサイトーシスを介して細胞内に移行し、エンドソームとして細胞質内に内在化することが知られている。Notch receptor や human ether-a-go-go K⁺ (hERG) channel は Ub 化されエンドソームと多胞体を経由し^{75,76)}、またドパミン受容体 D3 や L 型カルシウムチャネルはオートファゴソームを経由しリソソームで分解される^{77,78)}。第1章で CD81 は Ub 化されリソソームで分解されることが明らかになったが、CD81 はエンドサイトーシスを介して細胞質内に移行しリソソームに分解されるまで、どのような経路をたどるのか不明である。エンドソームに局在する膜タンパク質の分解経路は、隔離膜 (ファゴフォア) によってエンドソームが包まれることで形成されるオートファゴソームがリソソームと融合し分解される経路と、エンドソームが陥入することで形成される多胞体を経由しリソソームと融合し分解される経路に大別される^{79,80)} (Fig. 2-1)。細胞質内に移行した CD81 がどちらの経路を介してリソソームに分解されるのか、明らかになっていない。また、膜タンパク質のエンドサイトーシスはクラスリン依存的エンドサイトーシス、カベオラ依存的エンドサイトーシス、クラスリン・カベオラ非依存的エンドサイトーシスに分類される^{81,82,83)} (Fig. 2-2) が、CD81 はどのようなエンドサイトーシス機構を介して細胞内に移行するのか不明である。第2章ではリソソーム阻害剤とエンドサイトーシス阻害剤を用いて CD81 の局在を解析することで CD81 のエンドサイトーシス経路を解析した。

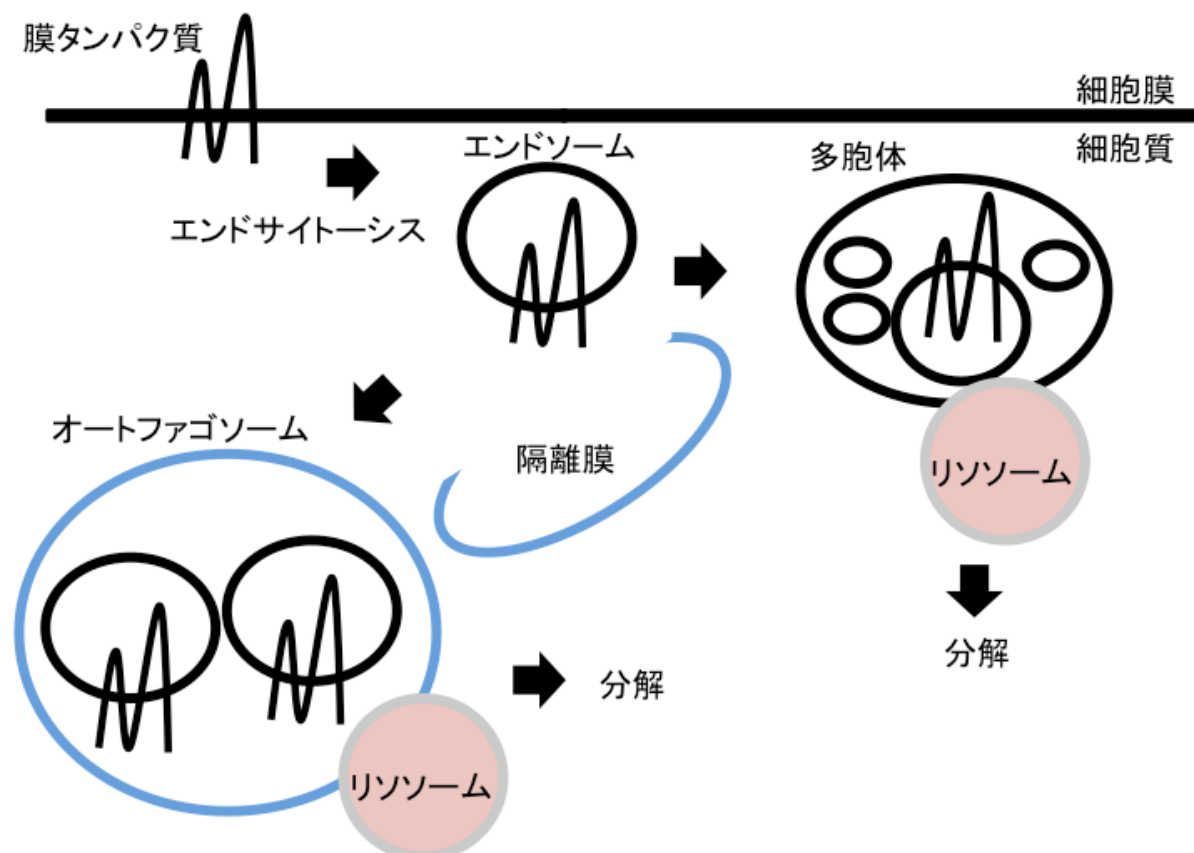


Fig. 2-1. エンドソーム上の膜タンパク質の分解経路

エンドソーム上の膜タンパク質のリソソームによる分解経路はオートファジーを経由する経路と多胞体を経由する経路が存在する。オートファゴソームを経由するとき、隔離膜がエン

ドソームを取り囲むことでオートファゴソームが形成される。オートファゴソームとエンドソームが融合したオルガネラであるアンフィソームはリソソームと融合することで、膜タンパク質は分解される。多胞体を経由するとき、細胞質内に取り込まれた膜タンパク質は初期エンドソーム、多胞体、後期エンドソームの順に輸送され、最終的にリソソームと融合し分解される。

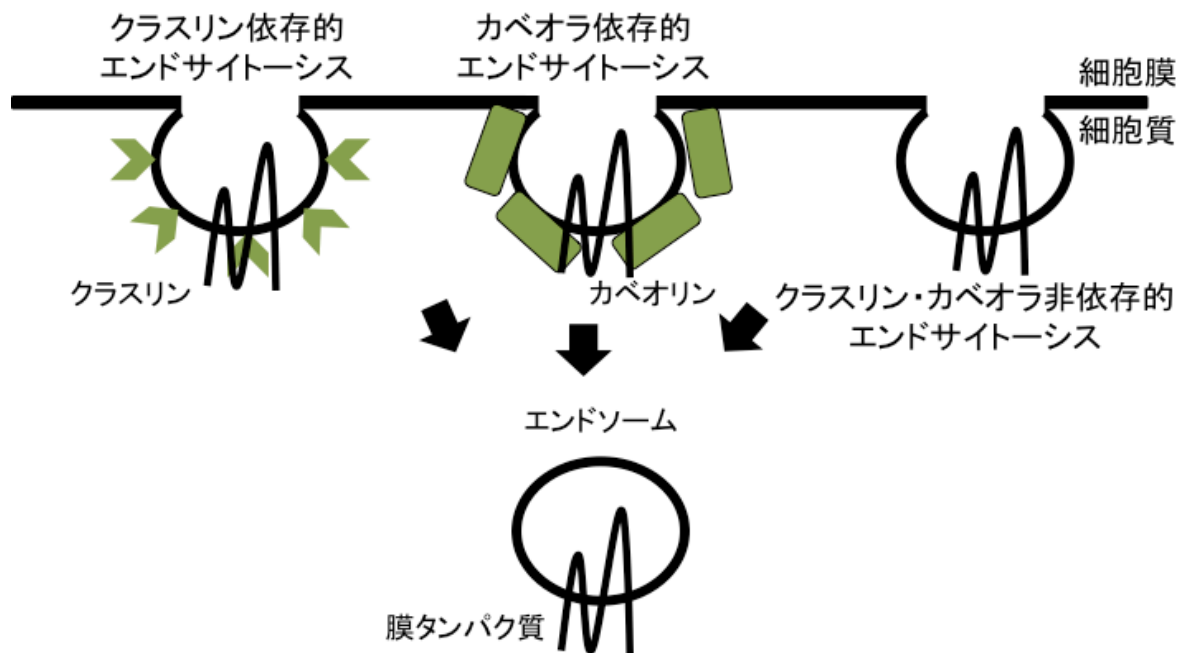


Fig. 2-2. 膜タンパク質のエンドサイトーシス機構

膜タンパク質はクラスリン依存的エンドサイトーシス、カベオラ依存的エンドサイトーシス、クラスリン・カベオラ非依存的エンドサイトーシスの3つの経路で細胞表面から細胞質内へ内部移行する。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 阻害剤調製と抗体

Chlorpromazine (CPMZ) は DMSO に溶解し、methyl- β -cyclodextrin (MBCD) と sucrose は蒸留水 (DW) に溶解し、-20°C に保存した。DW に溶解させた MBCD と sucrose は 0.2 μ m フィルターを用いて滅菌処理を行った。

ウェスタンブロット、蛍光抗体染色とフローサイトメトリーで使用した抗体を以下に記す。

Anti-CD81-antibody	Santa Cruz
Anti- β -actin-antibody	Santa Cruz
Anti-CD81-antibody Alexa fluor 647	Santa Cruz
Anti-LAMP1-antibody	Santa Cruz
Anti-p62-antibody	Santa Cruz
Anti-EEA1-antibody	BD Biosciences
Anit-mouse-IgG-antibody	Santa Cruz
Anti-mouse antibody HRP	GE ヘルスケア

2-2-2. 細胞の継代

MCF7 細胞の培養は 10% FBS 含有 DMEM を使い、5% CO₂、37°C で行った。MCF7 細胞と 293T 細胞の継代は第 1 章の 1-2-2 で記している方法で行った。

2-2-3. 蛍光抗体染色と共局在解析

カバーガラス上へ播種された 30 %コンフルエントの細胞を 4°C に冷やした PBS で洗浄し 4°C に冷やした 4% パラホルムアルデヒドにより 20 分間室温で細胞を固定した。固定した細胞を常温の PBS で 3 回洗浄後、PBS に懸濁した 0.1% saponin により 40 分間室温で透過処理し、PBS で 3 回洗浄した。抗体の非特異反応を防ぐため、PBS に懸濁した 3% bovine serum albumin を透過処理した細胞に加え 30 分間室温でブロッキングした。抗体反応以降、カバーガラスをパラフィルム上へ移して実験を進めた。CD81 以外の 1 次抗体をカバーガラス上の固定細胞に 1 時間室温で処理し、PBS で 3 回洗浄した。Alexa fluor 488 標識ロバ抗マウス抗体を二次抗体として使用し、PBS に希釈した抗体溶液を 1 次抗体処理した細胞に室温 1 時間で反応させた。PBS で 3 回洗浄した後、Alexa fluor 647 で標識された抗 CD81 抗体を PBS に希釈した抗体溶液を細胞に処理し、室温 1 時間で反応させ PBS で 3 回洗浄した。また核標識しながら封入するため、1 枚のカバーガラスあたり 8 μ L の Fluoro-KEEPER with DAPI をスライドガラス上へ添加し、カバーガラスをスライドガラス上へ移した。染色した細胞を共焦点レーザー顕微鏡 (LSM800) で観察した。また、共局在解析は縦軸と横軸に Alexa fluor 488 と Alexa fluor 647 の蛍光強度を設定した座標に、同一エリアの蛍光強度をプロットすることで得られるピアソンの相関係数を Zen system imaging software によって算出し行われた。ピアソンの相関係数が高いほど共局在する部分が多い。

2-2-4. ウェスタンブロット

第 1 章の 1-2-7 と同様の方法で行った。

2-2-5. フローサイトメトリー法

第1章の1-2-8と同様の方法で行った。

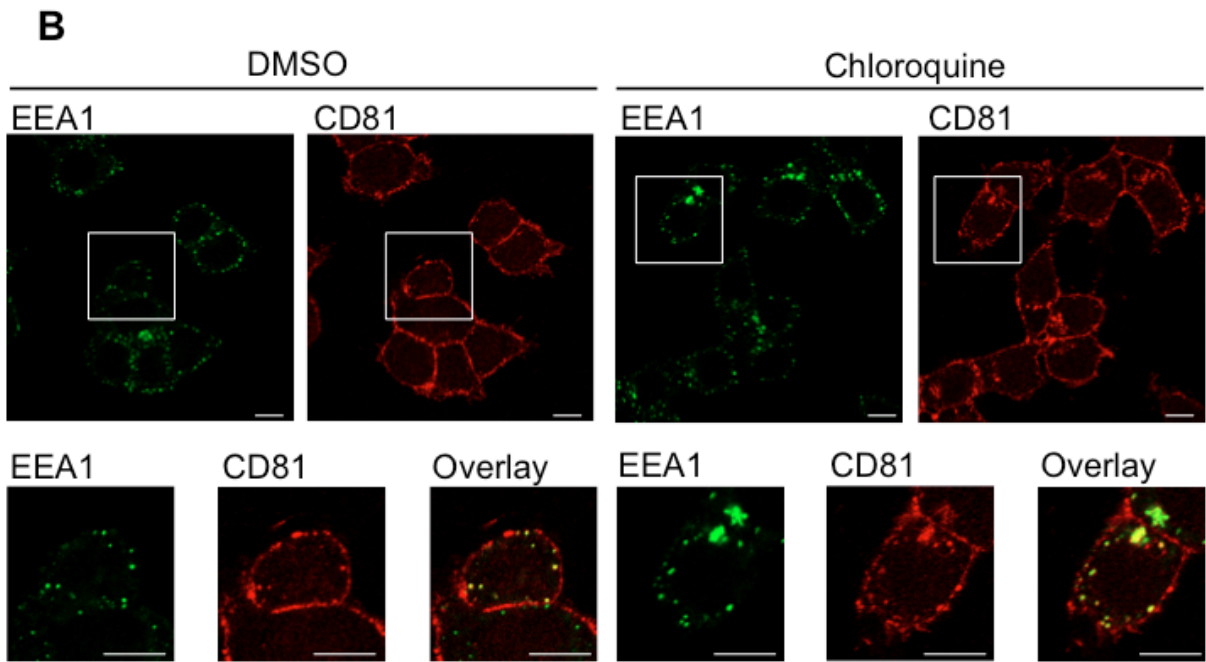
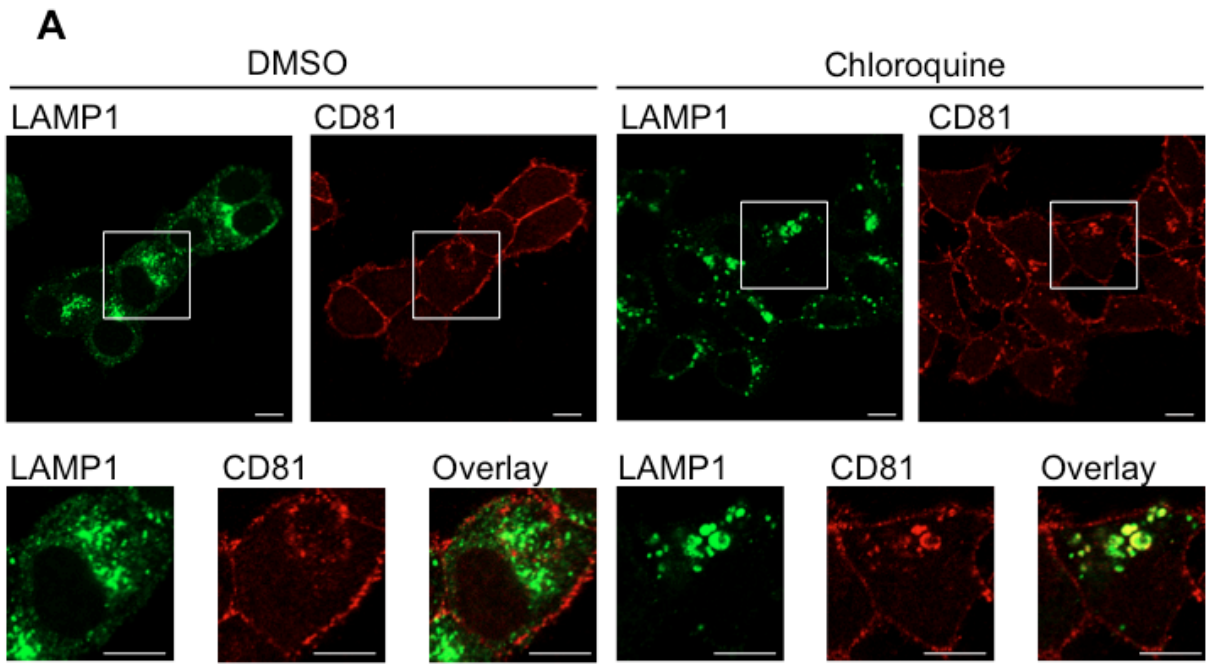
2-2-6. 統計解析

3群以上の比較のとき、分散分析法としてANOVAを用い、検定にはDunnet検定もしくはTukey検定を用いて統計解析を実行した。統計解析ソフトはGraphPad Prizm7を使用した。得られた実験結果は平均値+標準偏差で表示した。危険率5%以下を統計学的に有意差があると判定した。

2-3. 結果

2-3-1. CD81 はエンドサイトーシスを介してリソソームで分解される

CD81 は主に細胞表面に局在していることが報告されている^{84,85}。第1章で CD81 はリソソームで分解されることが明らかになったが、どのように細胞内に移行するのかは不明であった。そこで CD81 の分解機構を明らかにするために、CD81 の局在を蛍光抗体染色により解析した。まず CD81 の分解過程でリソソーム、エンドソーム、オートファゴソームに局在しているかを解析するため、MCF7 細胞に chloroquine を 6 時間処理しリソソームマーカーである LAMP1、初期エンドソームマーカーである EEA1、オートファゴソームマーカーである p62 を用いて CD81 と共染色した (Fig. 2-3A、B、C)。LAMP1、EEA1、p62 は赤色蛍光に CD81 は緑色蛍光で示している。その結果、未処理時の CD81 は細胞膜上と細胞質内に存在していたが、chloroquin 処理すると LAMP1 と EEA1 は細胞質内の CD81 と共局在したが、p62 と CD81 は共局在しなかった。さらに CD81 の細胞内局在を解析するため、LAMP1、EEA1 または p62 と CD81 とのピアソンの相関係数を Zen system imaging software を用いて解析した (Fig. 2-3D)。その結果、chloroquine 処理により LAMP1 と CD81 の共局在割合は上昇した。一方、EEA1 または p62 と CD81 の共局在割合は変化が見られなかった。このことから、リソソーム阻害によって一部の CD81 は初期エンドソームとリソソームに局在することが明らかになった。さらに CD81 の分解はオートファジー非依存的であり、エンドソーム上の CD81 とリソソームが融合し CD81 は分解されることが示唆された。



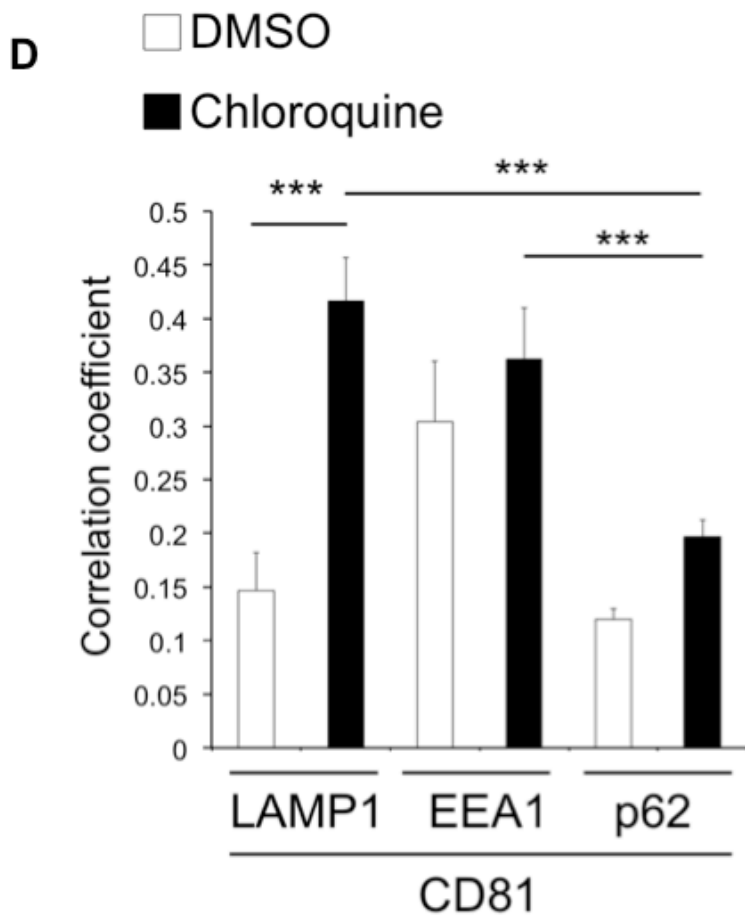
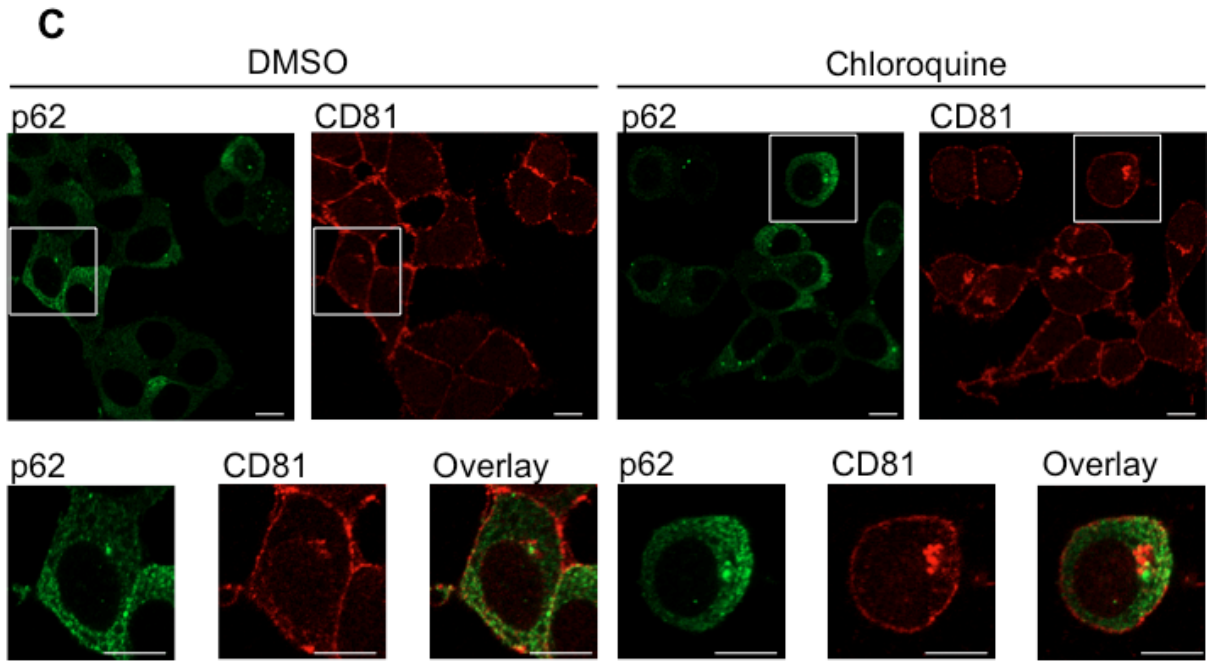


Fig. 2-3. CD81 の局在解析

(A) MCF7 細胞に 0.1 % DMSO または 50 mM chloroquine を 6 時間処理し固定後、0.1% saponin

で透過処理し LAMP1 を緑色蛍光色素で、CD81 を赤色蛍光色素で染色した。下段の図は上段の図の四角部分を拡大した図である。スケールバーは 20 μm である。図は、*Biol. Pharm. Bull.* 2019, Hosokawa K. et al. の Supplemental Figure-S3 を一部変更し、引用した。

(B) MCF7 細胞に 0.1% DMSO または 50 mM chloroquine を 6 時間処理し固定後、0.1% saponin で透過処理し EEA1 を緑色蛍光色素で、CD81 を赤色蛍光色素で染色した。下段の図は上段の図の四角部分を拡大した図である。スケールバーは 20 μm である。図は、*Biol. Pharm. Bull.* 2019, Hosokawa K. et al. の Supplemental Figure-S3 を一部変更し、引用した。

(C) MCF7 細胞に 0.1% DMSO または 50 mM chloroquine を 6 時間処理し固定後、0.1% saponin で透過処理し p62 を緑色蛍光色素で、CD81 を赤色蛍光色素で染色した。下段の図は上段の図の四角部分を拡大した図である。スケールバーは 20 μm である。図は、*Biol. Pharm. Bull.* 2019, Hosokawa K. et al. の Supplemental Figure-S3 を一部変更し、引用した。

(D) Fig. 3A、B、C をの写真を含む異なる 3 つの視野を撮影し、LAMP1、EEA1 または p62 と CD81 の共局在を pearson の相関係数として算出し、相関係数を縦軸に示した。棒グラフは平均値+SD で表している。***は $p < 0.001$ を表している。図は、*Biol. Pharm. Bull.* 2019, Hosokawa K. et al. の Supplemental Figure-S3 を一部変更し、引用した。

2-3-2. CD81 はクラスリンエンドサイトーシスを介して細胞内移行する

CD81 の分解経路にはエンドサイトーシス機構が寄与することが考えられたため、次に各種エンドサイトーシス阻害剤を用いて CD81 のエンドサイトーシス機構を解析した。クラスリン依存的エンドサイトーシス阻害剤である CPMZ、カベオラ依存的エンドサイトーシス阻害剤である MBCD、クラスリン・カベオラ非依存的エンドサイトーシス阻害剤である sucrose を用いて CD81 の分解阻害を解析した。293T 細胞に CPMZ、MBCD または sucrose を処理し 24 時間後、細胞表面に存在する CD81 の発現量をフローサイトメーターで定量した (Fig. 2-4A、B)。その結果、CPMZ 処理は DMSO 処理に比べて CD81 の発現を上昇させたが、MBCD または sucrose 処理は CD81 の発現量に影響を与えなかった。またこれら阻害剤を用いて CD81 の細胞全体の発現量を解析するため、293T 細胞に CPMZ、MBCD または sucrose を処理し 24 時間後、抗 CD81 抗体を用いてウェスタンブロットした (Fig. 2-4C)。その結果、CD81 の発現量に変化はなかった。次に CD81 の細胞内局在を解析するため、MCF7 細胞に CPMZ、MBCD または sucrose を処理し 24 時間後、抗 CD81 抗体を用いた蛍光抗体染色を行なった (Fig. 2-4D)。その結果、CD81 は CPMZ 処理により細胞表面上に局在するだけでなく、細胞質にも存在しドット状で観察された。以上の結果から、CD81 はクラスリン依存的エンドサイトーシスを介して細胞内に移行することが明らかになった。

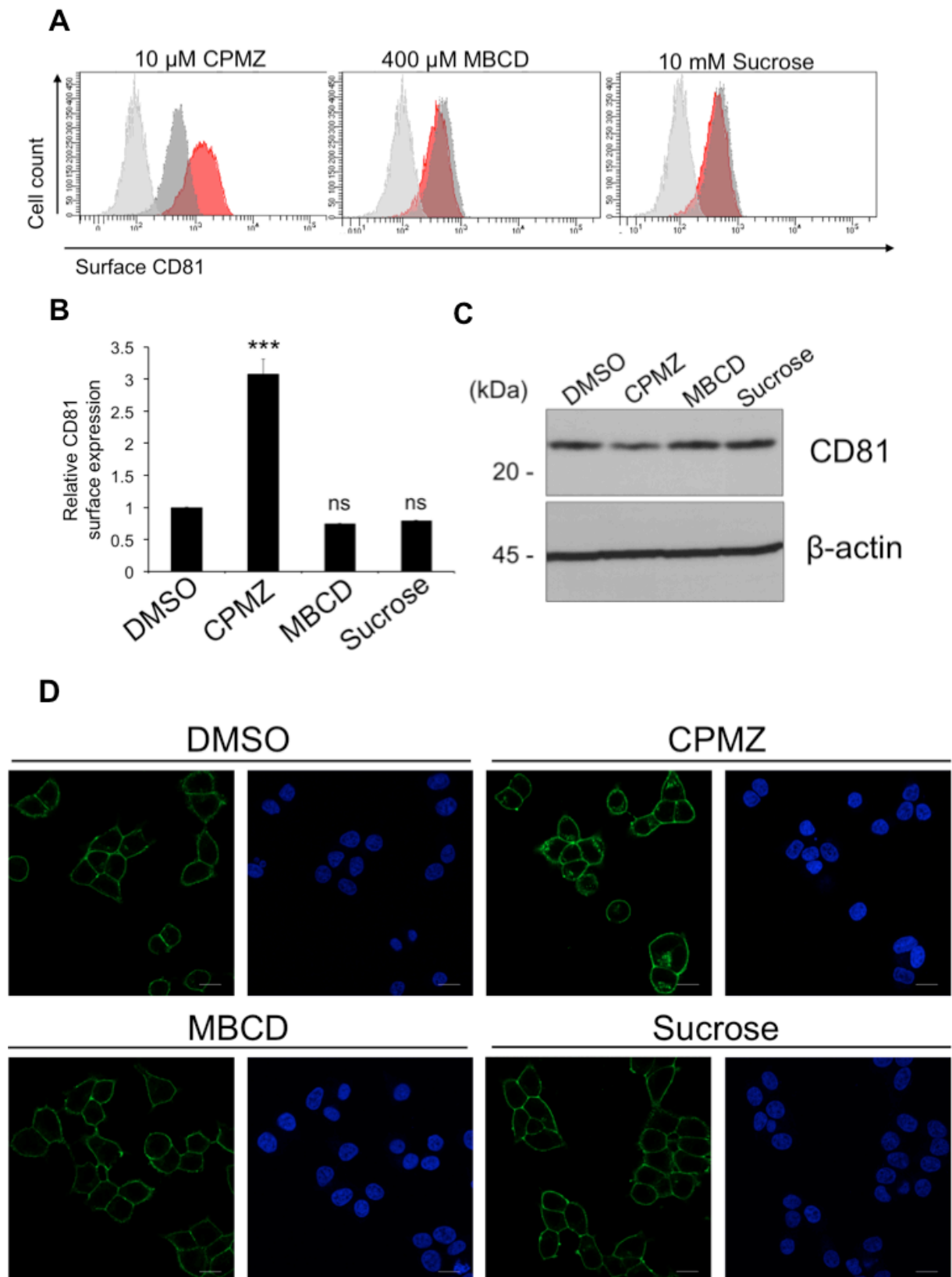


Fig. 2-4. CD81 の局在解析

(A) 293T 細胞に 0.1% DMSO、10 μ M CPMZ、400 μ M MBCD または 10 mM Sucrose を 24 時間処理し、CD81 の細胞外領域を認識する抗体を用いてフローサイトメーターを用いて細胞表面

の CD81 の発現を解析した。図は CD81 の蛍光強度のヒストグラムを示している。赤は各種阻害剤(CPMZ、MBCD、Sucrose)、ダークグレーは DMSO 処理したヒストグラムである。ライトグレーはコントロール IgG を処理した 293T 細胞のヒストグラムを示している。図は、*Biol. Pharm. Bull.* 2019, Hosokawa K. et al.の Fig. 3A を一部変更し、引用した。

(B) 0.1% DMSO 処理した CD81 の蛍光強度を 1 とした相対値を縦軸に示している。棒グラフは平均値+SD で表している。***は $p < 0.001$ を、ns は有意差なしを表しており、DMSO 処理した値と比較した。図は、*Biol. Pharm. Bull.* 2019, Hosokawa K. et al.の Fig. 3B を一部変更し、引用した。

(C) MCF7 細胞に 0.1% DMSO、10 μ M CPMZ、400 μ M MBCD または 10 mM Sucrose を 24 時間処理し、細胞全体の CD81 の量をウェスタンブロットで解析した。図は、*Biol. Pharm. Bull.* 2019, Hosokawa K. et al.の Fig. 3C を一部変更し、引用した。

(D) MCF7 細胞に 0.1% DMSO、10 μ M CPMZ、400 μ M MBCD または 10 mM Sucrose を 24 時間処理し、4% パラホルムアルデヒドで室温 10 分間固定後、0.1% saponin で透過処理し CD81 を緑色蛍光色素で、核を青色蛍光色素で染色した。スケールバーは 20 μ m である。図は、*Biol. Pharm. Bull.* 2019, Hosokawa K. et al.の Fig. 3D を一部変更し、引用した。

2-4. 考察

CD81 は主に細胞表面上に局在することが知られており、本研究においても CD81 は原形質膜局在であることが確認できた (Fig. 2-3)。CD81 の一部は細胞質にも局在することが観察され、EEA1 と共局在することがわかったが (Fig. 2-3B)、CD81 の分解機構は細胞質内の CD81 がオートファジー経路によって分解されているのか、原形質膜に局在する CD81 がエンドソーム-リソソーム経路を介して分解されているのか不明であった。Fig. 2-3 の結果から、CD81 は p62 と共局在しなかったが、EEA1 と LAMP1 共に共局在を示した。このことから、CD81 はエンドサイトーシスを介して初期エンドソームに局在し、その後多胞体を経て後期エンドソームへと局在変化し、リソソームと融合し分解されると考えられる (Fig. 2-5)。しかし、今回の実験によって、クラスリン依存的エンドサイトーシスが CD81 の分解を誘導することは証明されていない。CD81 を放射ラベルまたは蛍光ラベルすることで、CD81 の分解を観察する必要があると考える。

Fig. 2-4A、B の結果から、クラスリン阻害剤である CPMZ 処理により細胞表面に発現する CD81 の発現量は増加したが、Fig. 2-4C の結果から、CPMZ 処理により細胞全体の CD81 の発現量は増加しなかった。CPMZ 処理により細胞全体の CD81 の発現量が上昇しない理由として、2つの可能性を考えた。1つ目の可能性として、エンドソーム上の CD81 がリソソームと融合し分解されることによって、細胞全体の CD81 が増加しないことが考えられた。もう1つの可能性として、エンドソーム上の CD81 がエキソサイトーシスを介して細胞外に放出されることによって、細胞全体の CD81 の量に変化がなかったことが考えられた。CD81 はエクソソームとして放出されることが知られている⁴¹⁾。エンドサイトーシス阻害剤を処理した細胞から放出されるエクソソームの量を解析することで、CPMZ 処理した細胞内の CD81 の発現量が増加しない理由が解明されると推察する。

膜タンパク質の輸送は、細胞膜からエンドサイトーシスによりエンドソームやリソソームなど各オルガネラに到達し、それぞれのオルガネラが膜やその内容を交換しあっている⁸⁶⁻⁸⁸⁾。これらのネットワークは脂質二重膜に包まれた小胞の行き来により制御されており、小胞の出芽、モータータンパク質による輸送、標的となる膜への繫留や融合といったダイナミックな膜動態をとともなう^{89, 90)}。これらの膜動態を総称して、メンブレントラフィックとよんでいる。CD81 はテトラスパニンファミリーの特徴である膜タンパク質を組織化し、精子と卵子との膜融合やウイルスによる細胞への吸着や侵入に関わる^{22, 23, 26, 27)}ことから、CD81 はメンブレントラフィックに関与することが考えられる。メンブレントラフィックに重要な役割を果たす Rab ファミリーと CD81 の関連性が今後の検討課題になってくるだろう。

クラスリン依存的エンドサイトーシスは、①膜の窪み、②積み荷の集積、③膜の被覆化 (クラスリン被覆ピットの形成)、④切断、⑤脱被覆の 5つのステップで構成され、膜タンパク質などの積み荷は小胞に包めて細胞内部へ取り込まれる^{91, 92)}。クラスリン依存的エンドサイトーシスに重要な役割を果たすクラスリンは細胞膜に直接結合しないが、脂質アダプタータンパク質 AP-2 や epsin を介して結合しクラスリン被覆ピットを形成する。一方でクラスリンはエンドサイトーシスだけではなく、ゴルジ体とエンドソーム間での小胞輸送にも関わることが知られている^{93, 94)}。このゴルジ体からエンドソームへの輸送には AP-1 を介したクラスリンの結合がクラスリン被覆ピットの形成に寄与している。本研究で用いた CPMZ はクラスリン阻害剤であるため、クラスリン依存的エンドサイトーシスとゴルジ体-エンドソーム間での小胞輸送の過程で作用し、Fig. 2-4D のように細胞質内で CD81 の凝集が観察されたと推察する。また epsin の構造には ubiquitin interacting motif (UIM) を保有しており、epsin はモノ Ub またはポリ Ub 鎖と UIM を介して結合できる^{95, 96)}。このことから CD81 のクラスリン依存的エンド

サイトーシスは CD81 のポリ Ub 鎖と epsin などの UIM を有するアダプタータンパク質により惹起されるのではないかと推察する。

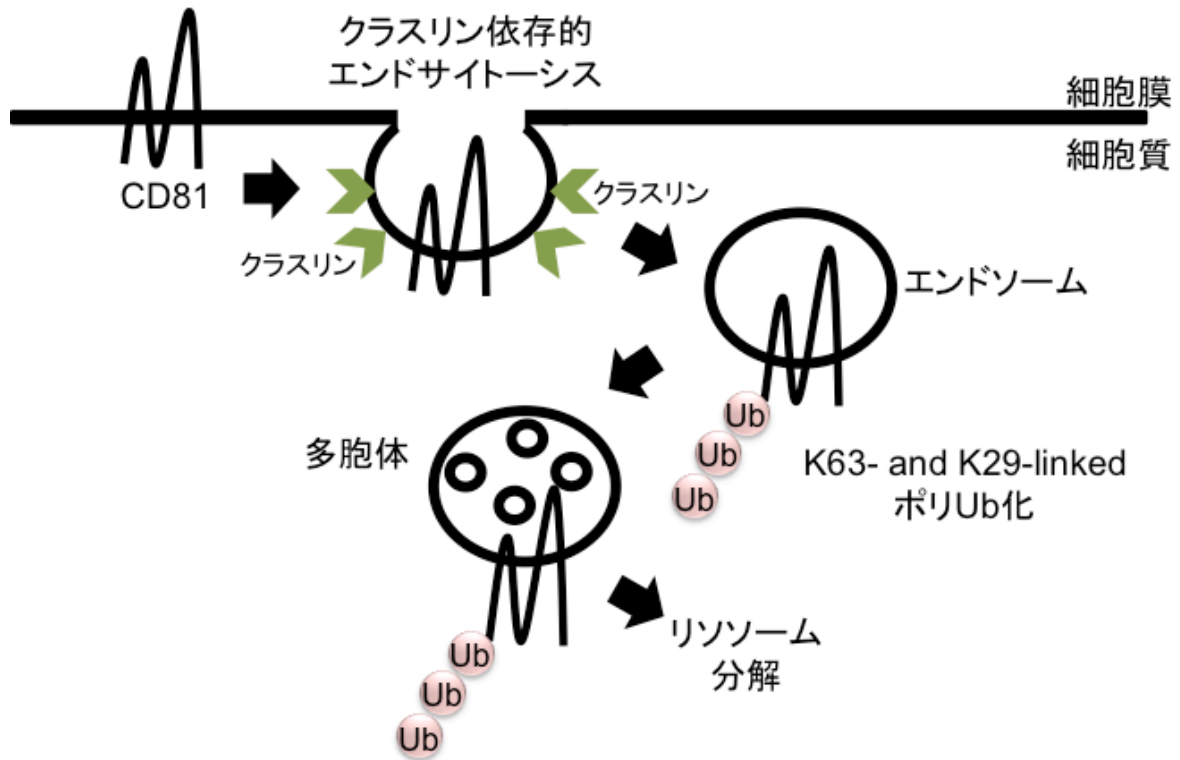


Fig. 2-5. CD81 のエンドサイトーシス機構と分解経路の模式図

CD81 はクラスリン依存的エンドサイトーシスを介して細胞内にエンドソームとして移行する。その後エンドソームは成熟し多胞体を経由しリソソームと融合し、CD81 は分解される。

第3章 CD81 のポリ Ub 化機構

3-1. はじめに

Ub 化修飾は E1、E2、E3 からなるユビキチン化酵素群の作用により、ユビキチン（分子量 8.6 kDa）が標的タンパク質の Lys 残基の ϵ -アミノ基にイソペプチド結合する反応である³⁶⁾。このユビキチン化反応が繰り返されて、ポリユビキチン鎖が形成される。哺乳類には E1 が 2 種類⁹⁷⁾、E2 が約 50 種類⁹⁸⁾、E3 が約 600 種類知られており⁹⁹⁾、E2 と E3 の組み合わせによって形成されるポリ Ub 鎖の多様性が生まれる^{47, 52)}。特に E3 は基質認識に重要であり、E2 上の Ub を基質へ転移させる反応機構の違いで HECT 型 E3 と RING 型 E3 に分類される⁹⁹⁾ (Fig. 3-1)。HECT 型 E3 は E2 と結合する HECT ドメインと、基質タンパク質と結合するタンパク質-タンパク質結合ドメインを有しており、Nedd4 や E6AP などが知られている^{100, 101)}。RING 型 E3 は E2 と結合する RING ドメインを有しており、単量体ではたらく E3 として MARCH、MDM2、GRAIL などが知られている¹⁰²⁾。また複合体を形成する RING 型 E3 として SCF ユビキチンリガーゼ複合体が有名である。MARCH は元来ウイルス性の RING 型 E3 として発見され、そのうち哺乳類で 11 種類の MARCH が報告され、これらは MRACH ファミリーと呼ばれている^{103, 104)}。最初に発見された MARCH は K3 と K5 でありカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) がコードする膜結合型 E3 であり、基質は MHC クラス I やインターフェロン受容体 I などの免疫に参与する膜タンパク質である¹⁰⁴⁾。K3 と K5 は基質である MHC クラス I を K63-linked ポリ Ub 化しクラスリンと epsin 依存的に細胞内に移行させ、リソソームで分解誘導する³²⁾。また K3 と K5 は E2 である Ubc5 と Ubc13 と相互作用し MHC クラス I の Ub 化を触媒している¹⁰⁵⁾。

他のグループの報告により、CD81 の結合タンパク質として、RING ドメインを有する CD81 の結合タンパク質 GRAIL と MARCH の二つが見出されている^{39, 40)}。GRAIL と MARCH は RING 型 E3 であることが知られており、GRAIL は K48-linked ポリ Ub 化を、MARCH は K63-linked ポリ Ub 化を誘導する E3 である。第 1 章の結果から、CD81 は K63 と K29-linked ポリ Ub 化されることを明らかにしたが、どの E3 が CD81 の Ub 化を触媒するのか不明である。そこで K63-linked ポリ Ub 化を誘導する MARCH が CD81 の Ub 化を行っているのではないかと仮説を立て、第 3 章では MARCH ファミリーである K3 と K5 が CD81 のポリ Ub 化を触媒し分解誘導するかを解析した。

また、CD81 の K は細胞質内領域に 2 個、細胞外領域に 10 個存在している。Ub は細胞質内と細胞外領域の両方に存在しているが、E1、E2、E3 は細胞質内に存在しているため、Ub 化反応は細胞質内で行われることが考えられる (Fig. 3-2)。したがって、CD81 の Ub 化部位として細胞内領域の K8 と K11 に着目し、CD81 の Ub 化部位を調べた。

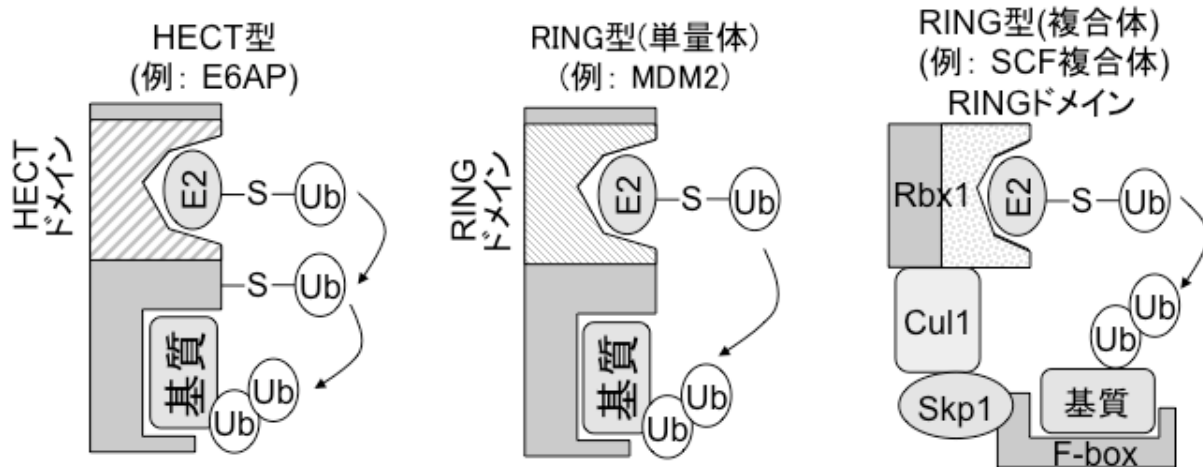


Fig. 3-1. HECT型 E3 と RING 型 E3

E3 には E2 の転移機構の違いにより HECT 型 E3 と RING 型 E3 に分けられる。HECT 型 E3 は自身のシステイン残基に E2 と結合した Ub をチオエステル結合で受け渡されたのち、基質を Ub 化する。RING 型 E3 は E2 と基質と結合し、E2 上の Ub を基質に直接転移させる。また RING 型 E3 は単量体または複合体で機能する 2 種類の E3 が存在する。

● K残基

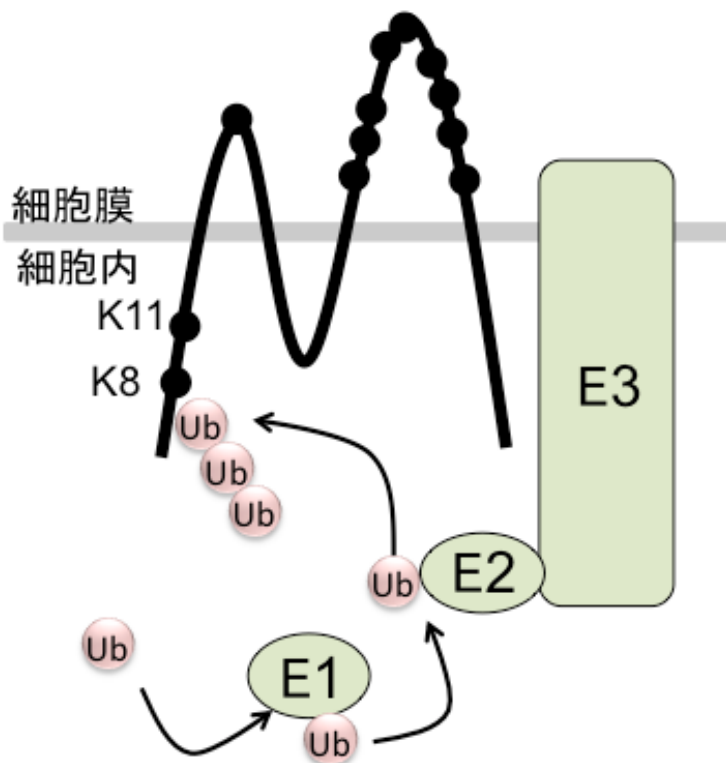


Fig. 3-2. CD81 の Ub 化機構と K 残基の模式図

CD81 は細胞質内領域に 2 個、細胞外領域に 10 個の K 残基を有する。Ub は E1、E2、E3 の 3 つの触媒を介して基質に付加し、この一連の反応は細胞質内で起こる。

材料と方法

3-2-1. 阻害剤調製と抗体

Cycloheximide (CHX)は 100% エタノールに溶解し-20℃に保存した。

ウェスタンブロットとフローサイトメトリーで使用した抗体を以下に記す。

Anti-CD81-antibody	Santa Cruz
Anti-β-actin-antibody	Santa Cruz
Anti-CD81-antibody Alexa fluor 647	Santa Cruz
Anti-S-tag-antibody	MBL
Anti-HA-tag-antibody	MBL
Anti-EGFP-antibody	MBL
Anit-mouse-IgG-antibody	Santa Cruz
Anti-mouse antibody HRP	GE ヘルスケア
Anti-rabbit antibody HRP	GE ヘルスケア

3-2-2. 細胞の継代

HeLa 細胞は 10% FBS 含有 DMEM を用いて、5% CO₂、37℃で培養された。293T 細胞の継代は第 1 章の 1-1-2 で記している方法で行った。KSHV 感染 B 細胞株である BCBL1 細胞は 10% FBS 含有 RPMI1640 を用い、5% CO₂、37℃の条件下で T-75 フラスコの中で培養された。

3-2-3. プラスミド

使用した発現プラスミドは 2xS-CD81-WT、2xS-CD81-K8A、2xS-CD81-K11A、2xS-CD81-KK8、11AA、CD81-WT-2xHA、CD81-K8A-2xHA、CD81-K11A-2xHA、HA-Ub-WT、EGFP-K3-WT、EGFP-K5-WT、EGFP-K5-ΔRING、EGFP-K5-Y156A である。Supplementary information に 2xS-CD81-K8A、2xS-CD81-K11A、2xS-CD81-KK8、11AA、CD81-WT-2xHA、CD81-K8A-2xHA、CD81-K11A-2xHA、EGFP-K3-WT、EGFP-K5-WT、EGFP-K5-CC30、32AA、EGFP-K5-ΔRING、EGFP-K5-Y156A のプラスミドマップを記した(Fig. Sup. 2~13)。なお、使用したベクターは pCIneo_2xS ベクター、pCIneo_2xHA ベクター、pEGFP_C2 ベクターであり、pCIneo_2xS ベクター情報は第 1 章の 1-1-3. に記されている。pCIneo_2xHA ベクターは promega 社の pCIneo に 2xHA タグペプチドをコードする DNA 配列を制限酵素サイト Sall と NotI サイトの間に挿入したベクターであり、2xHA タグペプチドは CD81 の C 末端に融合した形で発現する。pCIneo_2xHA ベクターと pEGFP-C2 ベクターは北海道医療大学中川教授から譲り受け、EGFP は K3 または K5 の N 末端に融合した形で発現する。

3-2-4. ゲノム抽出

KSHV 感染 B 細胞である 1x10⁶ cells の BCBL1 細胞から KSHV ゲノムを抽出した。KSHV ゲノム抽出は QIAamp DNA Blood Mini Kit を用いて添付プロトコルに従った。

3-2-5. 発現プラスミドの構築

a) プライマー設計と PCR による DNA 断片の増幅

CD81-wild type (CD81-WT)の発現プラスミドを構築するため、以下に示すプライマー (Forward、Reverse)をユーロフィンジェノミクス株式会社で合成し、HeLa の cDNA を用いて

PCR を行い、CD81 の PCR 産物を得た。なお、今回使用したプライマーは第 1 章の 1-1-4 a) で 2xS-CD81-WT の作製用プライマーの forward プライマーと同じであるが reverse プライマーと異なっており、終止コドン抜きの配列である。以下に CD81-WT-2xHA の作製用プライマーの配列を記す。

<CD81-WT-2xHA の作製用プライマー>

Forward: 5'-atgaattcatgggagtgaggctgca-3'

Reverse: 5'-catgtcgacgtacagcgagctgtccg-3'

PCR は KOD FX を用いて、1-1-4 a) と同様な反応液の組成、条件で行った。

また K3-WT と K5-WT の発現プラスミドの構築に用いたプライマーは以下に示しており、PCR に用いたテンプレートとして第 3 章 3-1-4. で精製した KSHV ゲノムを用いた。

<EGFP-K3-WT の作製用プライマー>

Forward: 5'-ccgggaattcatggaagatgaggatgttctgtctg-3'

Reverse: 5'-ccgggtcgactttaataaacataaggcagacg-3'

<EGFP-K5-WT の作製用プライマー>

Forward: 5'-cgggaattcatggcgccaaggacgtag-3'

Reverse: 5'-ccgggtcgactcaaccgtgtttttgg-3'

PCR は KOD FX を用いて、以下の反応液の組成、条件で行った。

<反応液の組成>

2xPCR バッファー	25 μ L
2 mM dNTPs	10 μ L
10 μ M Forward プライマー	1.5 μ L
10 μ M Reverse プライマー	1.5 μ L
DW	8 μ L
KOD polymerase	2 μ L
KSHV genome	2 μ L (100 ng)
<hr/>	
Total	50 μ L

<反応条件 (K3-WT の場合)>

Pre-denature	94°C, 2 min		35 cycles
Denature	98°C, 10 sec		
Annealing	57°C, 30 sec		
Extension	68°C, 60 sec		

<反応条件 (K5-WT の場合)>

Pre-denature	94°C, 2 min		35 cycles
Denature	98°C, 10 sec		
Annealing	55°C, 30 sec		
Extension	68°C, 50 sec		

得られた PCR 産物溶液に 10x loading バッファーを加え、エチジウムブロマイド含有の低融

点アガロースゲルで電気泳動した後、紫外線下で目的のバンドを切り出し、切り出したゲルを 1.5 mL チューブに入れた。切り出したゲルの重量を測定し、Gel/PCR エクストラクション kit を用い、添付プロトコルに従ってゲル抽出を行った。抽出された PCR 産物を吸光度測定し濃度を測定した。

- b) 制限酵素処理、アルカリフォスファターゼ処理、ライゲーション、トランスフォーム
- c) 少量のプラスミド抽出 (mini prep)
- d) 制限酵素処理による insert の確認
- e) DNA シーケンス解析
- f) プラスミド精製

以上 b)から f)は第 1 章 1-1-4 b)から f)と同様に行った。pEGFP-C2 vector に挿入したプラスミド EGFP-K3-WT、EGFP-K5-WT のシーケンス解析するためのプライマーを以下に示した。
<pEGFP-C2 vector に挿入したプラスミドのインサートの配列を読むためのプライマー>

Forward primer: 5'- cacaacgtctatatcatg -3'

Revers primer: 5'- gatgagtttgacaaacc -3'

3-2-6. 変異プラスミドの構築

- a) インバース PCR による変異プラスミドの増幅

1-2-4. と 3-2-5. で作成した 2xS-CD81-WT と CD81-2xHA-WT を鋳型にし、以下のプライマーを用いたインバース PCR によりリジン (K)をアラニン (A)置換した KA mutant (CD81-K8A、CD81-K11A、CD81-KK8, 11AA)を作製した。作製した変異プラスミドは 2xS-CD81-K8A、2xS-CD81-K11A 、 2xS-CD81-KK8, 11AA 、 CD81-K8A-2xHA 、 CD81-K11A-2xHA 、 EGFP-K5-C30A-C32A、EGFP-K5-ΔRING、EGFP-K5-Y156A である。EGFP-K5-CC30, 32AA は EGFP-K5-ΔRING を作るための中間体のプラスミドであり、EGFP-K5-ΔRING は EGFP-K5-CC30, 32AA をテンプレートにし、以下に示す EGFP-K5-ΔRING のプライマーを用いてインバース PCR により作製された。

<変異導入プライマー>

作製プラスミド	Forward primer 5'→3'	Revers primer 5'→3'
CD81-K8A	tgcaccgcgtgcatcaagtacctgctcttcg	gatgcacgcggtgcagccctccac
CD81-K11A	tgcatcgcgtacctgctcttcgtcttcaatttcg	caggtacgcgatgcacttgggtgcagcc
CD81-KK8, 11AA	tgcatcgcgtacctgctcttcgtcttcaatttcg	caggtacgcgatgcacgcggtgc
EGFP-K5-CC30, 32AA	cccgccgccgctaccggagagc	ggtagcggcggcggggtgtatgcc
EGFP-K5-ΔRING	gtgccccgcaggctttaagcacttggc	taaagcctgcggggcgacgacatccag
EGFP-K5-Y156A	gcattagccgcggcaataacaccgggtgac	tgccgcggctaatgcctcagctgc

これらのプライマーセットを用いてインバース PCR を行なった。反応液の組成と反応条件は以下に記す。

<反応液の組成>

2xPCR バッファー	25 μL
2 mM dNTPs	10 μL

10 μ M Forward プライマー	1.5 μ L
10 μ M Revers プライマー	1.5 μ L
DW	8 μ L
KOD polymerase	2 μ L
プラスミド	2 μ L (50 ng)
<hr/>	
Total	50 μ L

<反応条件>

Pre-denature	94°C, 2 min		17 cycles
Denature	98°C, 10 sec		
Annealing	54°C, 30 sec		
Extension	68°C, 6 min 35 sec		

PCR 産物が増幅されているか確認するため、反応液に loading バッファーを加え、その混合溶液をエチジウムブロマイド含有の低融点アガロースゲルで電気泳動した後、紫外線下で目的のバンドを確認した。

b) 制限酵素 DpnI 処理、トランスフォーム

インバース PCR の反応液に含有するメチル化 DNA を消化するため、PCR 産物に対し DpnI を 37°C、2 時間処理した。反応液の組成は以下に記す。

<反応液の組成>

PCR product	18 μ L
BSA	2 μ L
10xT バッファー	2.4 μ L
DpnI	2 μ L
<hr/>	
Total	24.4 μ L

制限酵素処理した反応液を DH5 α にトランスフォームし、その溶液を 100 μ g/mL ampicillin 含有 LB プレートに播種し 37°C、15~18 時間培養した。

c) Mini prep、制限酵素処理、シーケンス解析

1-2-4. c)、d)、e)と同様に行なった。ただし、pEGFP-C2 ベクターに挿入したプラスミド EGFP-K5-CC30, 32AA、EGFP-K5- Δ RING、EGFP-K5-Y156A のシーケンスは以下に示すプライマーを用いて解析した。

<pEGFP-C2 ベクターに挿入したプラスミドのインサートの配列を読むためのプライマー>

Forward prime: 5'- cacaacgtctatatcatg -3'

Revers primer: 5'- gatgagtttgacaaacc -3'

3-2-7. フローサイトメトリー法

EGFP-K3 と EGFP-K5 陽性細胞における CD81 の細胞表面と細胞質内の発現量を解析するため、抗 CD81 抗体と蛍光抗体を用いて蛍光強度をフローサイトメトリーで解析した。6 well

プレートに播種した接着細胞にトリプシン溶液を処理し DMEM 培地で懸濁後、1,500 rpm、5 分間遠心し細胞を沈降させた。回収した細胞の固定と透過処理を行うため、BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit を用いて Fixation/Permeabilization solution を氷上で 20 分間細胞に処理した。透過処理した細胞を PBS で 3 回洗浄後、抗体の非特異反応を防ぐため、FACS バッファーで懸濁しブロッキングを氷上で 30 分間行なった。PBS に懸濁した抗 CD81 抗体もしくは抗マウス抗体を細胞に処理し 1 時間氷上で反応させた。FACS バッファーで 3 回洗浄後、PBS に懸濁した Alexa fluor 647 標識ロバ抗マウス抗体を細胞に 1 時間氷上で反応させた。FACS バッファーで 3 回洗浄し、3,000 rpm で 2 分間遠心して染色した細胞を沈降させ PBS で再懸濁した。この細胞懸濁液を 70 μm 径のナイロンメッシュに通した後、LSRFortessa Flow Cytometer を用いて解析した。コントロール IgG である抗マウス抗体を処理した細胞の蛍光強度を基準にし、抗 CD81 抗体で染色した細胞の蛍光強度を測定した。細胞の蛍光強度を FACSDiva™ software で解析した。

3-2-8. プルダウンアッセイ

第 1 章の 1-2-5. と同様に行った。

3-2-9. 培養細胞への遺伝子導入 (トランスフェクション)

第 1 章の 1-2-6. と同様に行った。

3-2-10. ウェスタンブロット

第 1 章の 1-2-7. と同様に行った。

3-3. 結果

3-3-1. CD81 のポリ Ub 化部位は K8 であり、K8 は CD81 の安定性に寄与する

CD81 のどの K 残基がポリ Ub 化を受けているのかをプルダウンアッセイで解析した (Fig. 3-3A)。293T 細胞に 2xS-CD81-WT、2xS-CD81-K8A、2xS-CD81-K11A または 2xS-CD81-KK8, 11AA プラスミドを HA-Ub-WT プラスミドと同時に遺伝子導入し、S ビーズを用いてプルダウンを行い、沈降した CD81 のポリ Ub 化を抗 HA-tag 抗体を用いることで検出した。その結果、2xS-CD81-WT のポリ Ub 化と比べて 2xS-CD81-K11A のポリ Ub 化に変化はなかったが、2xS-CD81-K8A と 2xS-CD81-KK8, 11AA のポリ Ub 化は減少した。このことから、CD81 は K8 にポリ Ub 化されることが明らかになった。

次に CD81 のポリ Ub 化部位がタンパク質の安定性に関与するのか解析するため、CD81-WT-2xHA、CD81-K8A-2xHA、CD81-K11A-2xHA プラスミドをそれぞれ HeLa 細胞に遺伝子導入した (Fig. 3-3B)。12 時間後、タンパク質合成阻害剤である CHX を処理し継時的に細胞を回収し、細胞内の CD81 の発現をウェスタンブロットで解析した。その結果、ポリ Ub 化される K8 を A に置換した CD81-K8A-2xHA の発現は 12 時間まで観察できるが、CD81-WT-2xHA、CD81-K11A-2xHA の発現は 12 時間後にほとんど消失した。このことから、CD81 のポリ Ub 化部位である細胞内領域 K8 は CD81 のタンパク質安定を制御する部位であることが示された。

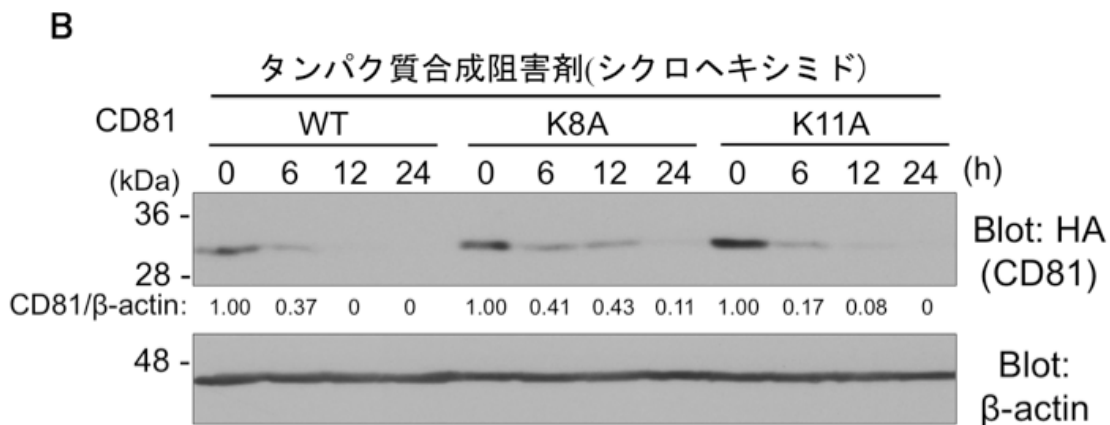
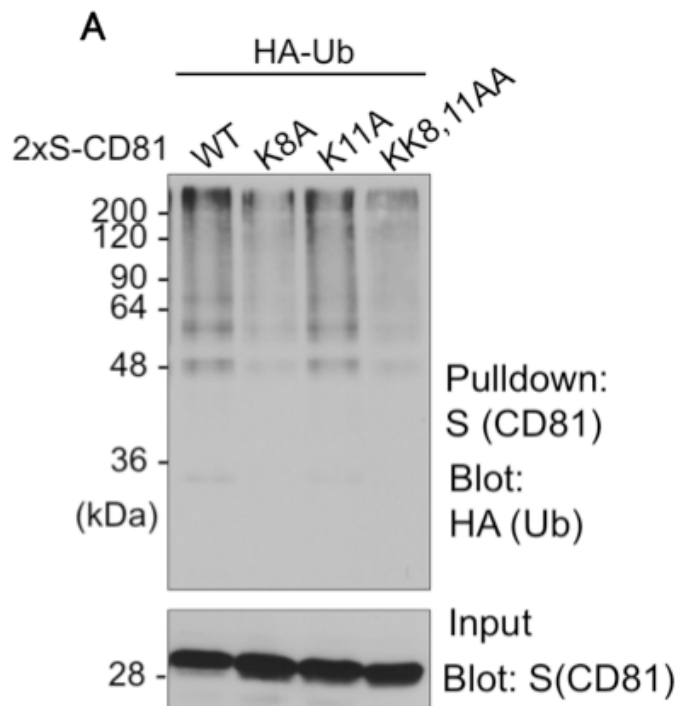


Fig. 3-3. CD81 の K8 はポリ Ub 化部位であり、CD81 の安定性に寄与する。

(A) CD81 のポリ Ub 化部位の解析

293T 細胞に 2xS-CD81-WT、2xS-CD81-K8A、2xS-CD81-K11A または 2xS-CD81-KK8, 11A プラスミドを HA-Ub-WT プラスミドと共に遺伝子導入させ、12 時間後に S-protein agarose ビーズを用いてプルダウンアッセイを行った。沈降した 2xS-CD81 のポリ Ub 化を抗 HA-tag 抗体を用いて解析した。図は、*Biol. Pharm. Bull.* 2019, Hosokawa K. et al. の Fig. 4B を一部変更し、引用した。

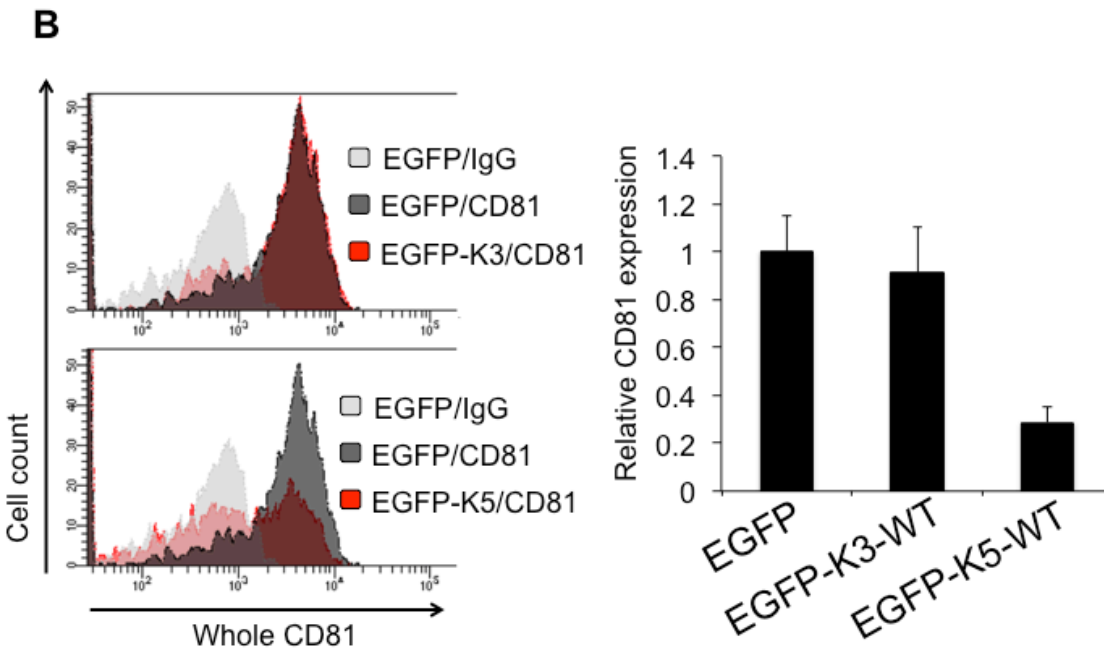
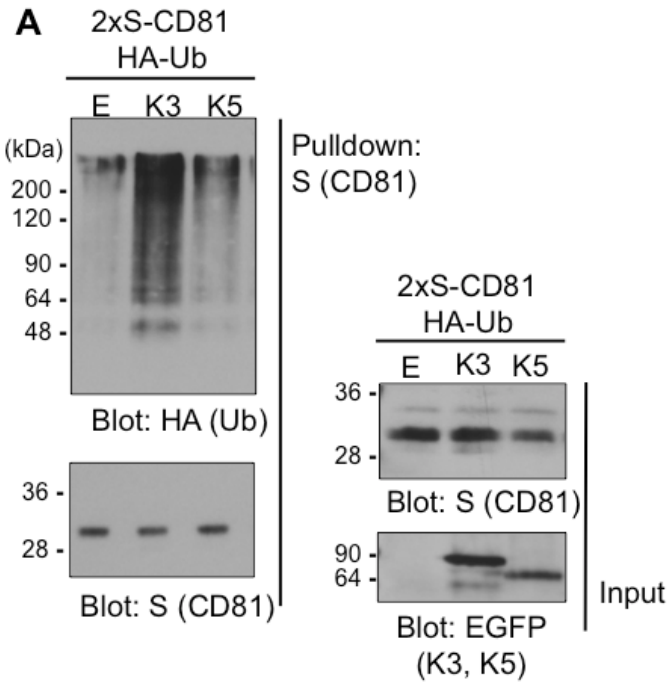
(B) HeLa 細胞に CD81-WT-2xHA、CD81-K8A-2xHA、CD81-K11A-2xHA プラスミドをそれぞれ遺伝子導入し、12 時間後 100 μ g/mL CHX を 0、6、12、24 時間処理し継時的に細胞を回収した。CD81 の発現は抗 HA-tag 抗体を用いて検出した。*Biol. Pharm. Bull.* 2019, Hosokawa K. et al. の Fig. 4C を一部変更し、引用した。

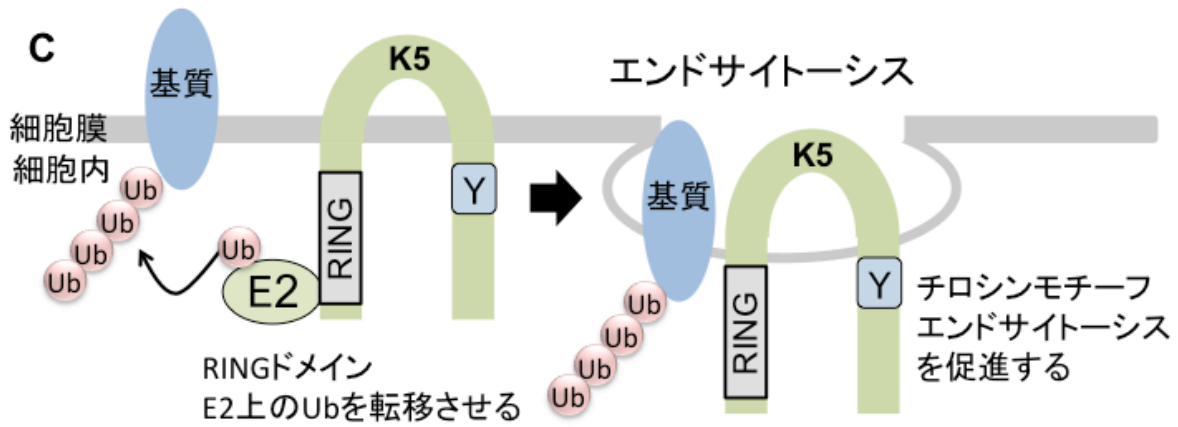
3-3-2. K5 は CD81 をポリ Ub 化し分解誘導する

これまでの結果から CD81 はポリ Ub 化されることが明らかになったが、CD81 のポリ Ub 化を触媒する E3 は不明であった。他のグループの報告から MARCH が CD81 の RING 型 E3 である可能性を考えたため、MARCH のオルソログである KSHV がコードする K3 と K5 によって CD81 のポリ Ub 化が誘導するかどうか解析した (Fig. 3-4A)。293T 細胞に EGFP-K3-WT または EGFP-K5-WT を 2xS-CD81-WT と HA-Ub-WT と共発現させ 12 時間後に細胞ライセートを回収し、S ビーズを用いてプルダウンアッセイを行った。沈降した 2xS-CD81-WT に結合した Ub を抗 HA-tag 抗体を用いて解析した。その結果、EGFP を発現させたコントロールベクターに比べて EGFP-K3 または EGFP-K5 を発現させた細胞内の CD81 のポリ Ub 化は亢進した。さらに K3 の方が K5 に比べて CD81 のポリ Ub 化を亢進させた。このことから K3 と K5 によって CD81 がポリ Ub 化されることが明らかになった。

次に K3 と K5 のどちらが CD81 の分解を誘導するのかを解析した (Fig. 3-4B)。EGFP-K3 と EGFP-K5 をそれぞれ HeLa 細胞に遺伝子導入し、EGFP 陽性細胞中の CD81 の発現量をフローサイトメーターで解析した。その結果、EGFP コントロールベクターに比べて、EGFP-K3 を発現させた細胞の CD81 の発現量に変化はなかったが、EGFP-K5 を発現させた細胞の CD81 の発現量は低下した。このことから K5 が CD81 ポリ Ub 化し分解誘導することが、明らかになった。

K5 は構造中に RING ドメインとチロシンエンドサイトーシスモチーフを有している¹⁰⁶⁻¹⁰⁸⁾ (Fig. 3-4C)。RING ドメインは E2 の結合と E2 上の Ub を基質に転移する機能を持っており、RING ドメインの中に亜鉛イオンをキレートする特徴的なジンクフィンガーモチーフを有している。チロシンエンドサイトーシスモチーフは K5 と基質のエンドサイトーシスを誘導する機能を持っており、YXXΦ (X は任意のアミノ酸、Φ は疎水性側鎖をもつアミノ酸) という配列を有する¹⁰⁹⁾。K5 は RING ドメインとチロシンエンドサイトーシスモチーフにより基質を分解誘導する。そこで K5 による CD81 の発現低下に E2 による Ub 化の転移反応とエンドサイトーシスが関与するかどうか解析するため、RING ドメインのジンクフィンガーモチーフ構造を破壊した EGFP-K5-ΔRING とチロシンエンドサイトーシスモチーフの Y156 を A に変異させた EGFP-K5-Y156A 発現プラスミドを作製した。EGFP-K5-ΔRING と EGFP-K5-Y156A プラスミドを HeLa 細胞に遺伝子導入し、EGFP 陽性細胞の CD81 の発現量をフローサイトメーターで解析した (Fig. 3-4D)。その結果 K5 による CD81 の発現低下は K5-ΔRING と K5-Y156A の発現によって抑制された。このことから CD81 は K5 によってポリ Ub 化されエンドサイトーシスを介して細胞内に移行することが示唆された。





<K5のRINGドメイン構造とジンクフィンガーモチーフ>

	1	2	3	4	5	6	7	8										
K5-WT	C	W	I	C	X ₁₁	C	A	C	X ₇	H	P	Q	C	X ₁₂	C	Q	M	C
K5-ΔRING	C	W	I	C	X ₁₁	A	A	A	X ₇	A	P	Q	A	X ₁₂	C	Q	M	C

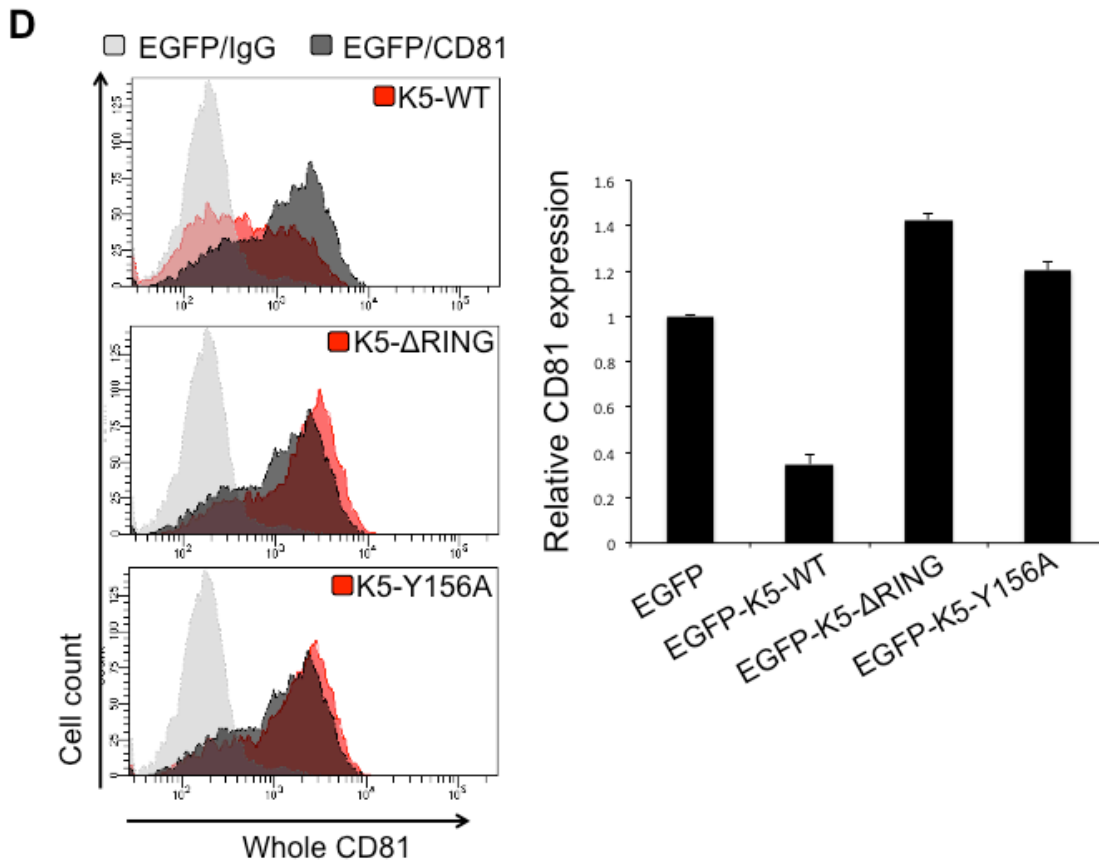
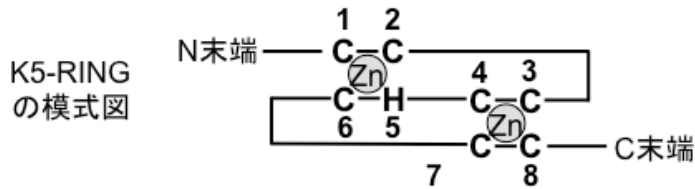


Fig. 3-4. K5 は CD81 のポリ Ub 化を亢進させ、分解を亢進させる。

(A) K3 と K5 発現による CD81 のポリ Ub 化解析

293T 細胞に EGFP、EGFP-K3-WT または EGFP-K5-WT 発現プラスミドを 2xS-CD81-WT と HA-Ub-WT と共に遺伝子導入した。12 時間後に S-protin agarose ビーズを用いてプルダウンアッセイを行い沈降した 2xS-CD81 のポリ Ub 化を抗 HA-tag 抗体で検出した。

(B) K3 と K5 発現による CD81 の発現量への影響

HeLa 細胞に EGFP、EGFP-K3-WT または EGFP-K5-WT プラスミドを発現させ、12 時間後に 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CHX を 12 時間処理した細胞を回収しフローサイトメーターで細胞内の CD81 の発現量を解析した。左のヒストグラムは縦軸に細胞数、横軸に CD81 の蛍光強度の対数値を示している。薄いグレーと濃いグレーのヒストグラムは EGFP 発現 HeLa 細胞にそれぞれコントロール IgG と Alexa fluor 647 標識抗 CD81 抗体で染色した細胞を表しており、また赤のヒストグラムは EGFP-K3-WT または EGFP-K5-WT 発現 HeLa 細胞に Alexa fluor 647 標識抗 CD81 抗体で染色した細胞を表している。右の棒グラフの縦軸は EGFP 陽性細胞中の CD81 の発現量を 1 とした相対値を表している。棒グラフは平均値+SD で表している。

(C) K5 が有する RING ドメインとチロシンエンドサイトーシスモチーフの模式図

RING ドメインは K5 の N 末領域に、エンドサイトーシスモチーフは K5 の C 末領域に存在している。RING ドメインはドメイン構造内のジンクフィンガーモチーフを介して E2 と結合し E2 上の Ub を基質に転移させる。エンドサイトーシスモチーフは AP-2 と結合し基質と K5 をエンドサイトーシスに誘導する機能を持つ。図中の略語は以下に示す。Y; チロシンエンドサイトーシスモチーフ、W; トリプトファン、I; イソロイシン、P; プロリン、Q; グルタミン、X; 任意のアミノ酸、Zn; 亜鉛イオン

(D) K5 による CD81 の分解機構の解析

HeLa 細胞に EGFP、EGFP-K5-WT、EGFP-K5- Δ RING または EGFP-K5-Y156A 発現プラスミドを発現させ、12 時間後に 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CHX を 12 時間処理した細胞を回収しフローサイトメーターで細胞全体の CD81 の発現量を解析した。左のヒストグラムは縦軸に細胞数、横軸に CD81 の蛍光強度の対数値を示している。薄いグレーと濃いグレーのヒストグラムは EGFP 発現 HeLa 細胞にそれぞれ control IgG と Anti-CD81-antibody Alexa fluor 647 で染色した細胞を表しており、また赤のヒストグラムは EGFP-K5-WT、EGFP-K5- Δ RING または EGFP-K5-Y156A 発現 HeLa 細胞を Alexa fluor 647 標識抗 CD81 抗体で染色した細胞を表している。右の棒グラフの縦軸は EGFP 陽性細胞中の CD81 の発現量を 1 とした相対値を表している。棒グラフは平均値+SD で表している。

3-4. 考察

Lineberry らは CD81 の結合タンパク質として GRAIL を報告している³⁹⁾。GRAIL は膜結合型の RING 型 E3 であり、CD81 の K8 と K11 の両方がポリ Ub 化されることを見出している。Fig. 3-3A の結果から見出された CD81 の Ub 化部位は K8 であり Lineberry らの結果と一致した。しかし、CD81 の K11 が Ub 化されるという Lineberry らの結果は CD81 の K11 は Ub 化されていないという本研究結果と異なっていた。Lineberry らは CD81 の K 残基を R 残基に置換した KR mutant と Ub の二つの発現プラスミドを遺伝子導入し、CD81 のポリ Ub 化部位を解析しているが、Ub の過剰発現系では CD81 の R 残基に Ub 化されることが考えられる。一方、本研究で用いた CD81 mutant は、K を A に置換した KA mutant であるため、置換した A に Ub が結合することは考えにくい。作製した CD81 の mutant プラスミドの違いから Lineberry らの研究結果と本研究結果は異なっていると考えられる。また Lineberry らは CD81 の K8、K11 の両方を R 残基に置換した CD81-KK8, 11RR が安定化していることを示しているが、K8 と K11 のどちらが CD81 の安定性を制御しているのか解析していなかった。本研究の結果から、CD81 のタンパク質の安定性を制御する K 残基は K8 であることが示された (Fig. 3-3B)。しかし、24 時間後には CD81-K8A-2xHA の発現は消失した。このことから、CD81 は Ub 化を介したリソソームによる分解機構の他に、プロテアーゼによる膜切断機構などの Ub 化以外の機構によっても分解される可能性が考えられた。実際、Notch 受容体は Ub 化による分解と膜結合型メタロプロテアーゼである ADAM により切断されるという二つの機構でタンパク質の安定性が制御されている^{39,57)}。Ub 化以外の CD81 分解制御機構の解明が今後の課題であると考えられる。また MHC クラス I は K 残基の他、C 残基に Ub が付加され分解に関与すること^{32,110)}や TrkA (神経成長因子受容体) の細胞質内領域の K 残基の Ub 化は分解に重要なアミノ酸残基であることが示唆されている¹¹¹⁾。これらの報告から、膜タンパク質の細胞質内領域の Ub 化は分解に関与することが考えられ、本研究は膜タンパク質の Ub 化による分解機構を支持する結果であると推察する。

Bartee らは MARCH が CD81 を分解することを示しているが、CD81 のポリ Ub 化の解析は行われていない⁴⁰⁾。本研究により MARCH のオルソログである K5 は CD81 の分解を誘導した (Fig. 3-4B)。この結果は Bartee らの MARCH による CD81 の分解という結果と一致する。また K5 よりも K3 の方が CD81 の Ub 化は亢進したが、K3 は CD81 を分解しなかった。この結果から、二つの可能性が考えられる。一つ目として、K3 による CD81 のポリ Ub 化は分解シグナルとして働かず、シグナル伝達やタンパク質間相互作用など分解以外の機能に関与するのではないかと推察する。K48-linked ポリ Ub 鎖は分解シグナルを⁴⁸⁾、K63-linked ポリ Ub 鎖はシグナル伝達の調節や局在変化を誘導するシグナルとして知られており^{49,50)}、K3 による CD81 の Ub 鎖の結合様式を解析すると K3 による CD81 のポリ Ub 化の機能解明につながるのではないかと考える。もう一つの可能性として、K3 のポリ Ub 化が K5 による CD81 の分解促進を増強しているのではないかと考えた。K3 と K5 は KSHV がコードするウイルス性の E3 であり、KSHV が粒子を産生する時期(溶解感染期)に移行する時に K3 が発現し、その後 K5 が発現する¹¹²⁾。つまり KSHV 感染細胞内で K3 と K5 は同時に発現する時期があり、K3 と K5 が共発現することで単独発現に比べて効率的な CD81 の分解を誘導するのではないかと考えた。今後 K3 と K5 を共発現させ CD81 の発現量を解析する実験を行うことで明らかになっていくと考える。また K3 と K5 は MHC クラス I やインターフェロン γ 受容体を認識しポリ Ub 化することから^{33,113)}、K3 と K5 のどちらにも認識される基質があると示唆される。本研究結果から CD81 は K3 と K5 の両方からポリ Ub 化を受けることから、CD81 は K3 と K5 どちらにも認識され Ub 化することが考えられる。Fig. 3-4D の結果から、細胞全体の CD81

の発現が K5 によって抑制された。K5 による CD81 の発現低下は細胞表面の CD81 が発現低下しているかどうかは不明であるが、透過処理していない細胞で解析する必要があると考える。また、Fig. 3-4D の結果から、EGFP-K5- Δ RING の発現によって K5 による CD81 の発現が抑制された。EGFP-K5- Δ RING は CD81 と結合できるが E2 と結合できなくなり、CD81 を Ub 化できない結果、CD81 を分解誘導できないと考えられる。K5 の RING ドメインは E2 の Ub 転移に必要なドメインであり、チロシンエンドサイトーシスモチーフはエンドサイトーシスを促進するアダプタータンパク質 AP-2 と結合することが示唆されており、K5 による CD81 の分解誘導機構には E2 上にある Ub 化転移反応や AP-2 を介したエンドサイトーシスが関与していることが推察できる。

総括

本研究では CD81 の分解機構を明らかにする目的で、CD81 のポリ Ub 化修飾機構と分解経路、K5 による CD81 の分解亢進機構を解析した (Fig. S1)。第 1 章では、CD81 がプロテアソーム、リソソームのどちらで分解されるのかを評価し、さらに CD81 の分解にポリ Ub 化修飾が関与するのかを解析した。その結果、CD81 はリソソーム阻害剤で細胞表面の発現が増加したこと、またリソソーム阻害剤で CD81 のポリ Ub 化が亢進したことから CD81 はポリ Ub 化されリソソームで分解されることが明らかになった。さらに CD81 のポリ Ub 鎖の結合様式を調べるため、変異 Ub プラスミドを用いて解析した結果、CD81 は K63-と K29-linked ポリ Ub 鎖が結合していることが示された。第 2 章では、CD81 の分解時にどのような経路でリソソームに移行するのかを解析するため、初期エンドソーム、リソソームやオートファゴソームと CD81 の共局在を観察した。その結果、CD81 は細胞表面と細胞質内に存在し一部エンドソームに局在していたが、リソソーム阻害剤により CD81 はエンドソーム、リソソームに一部局在しており、オートファゴソームと共局在していなかった。次に CD81 のエンドサイトーシス機構を明らかにするため、エンドサイトーシス阻害剤を用いて CD81 の発現上昇を解析した。その結果クラスリン依存的エンドサイトーシス阻害剤で CD81 の細胞表面の発現量が上昇した。これらの結果から CD81 はクラスリン依存的エンドサイトーシスにより細胞内に移行しエンドソームを経てリソソームと融合し分解されることが考えられる。第 3 章では、CD81 のポリ Ub 化部位である K 残基の特定と Ub 化を触媒する E3 について解析した。CD81 の K 残基を A に変異させた CD81 KA mutant 発現プラスミドを用いて CD81 のポリ Ub 化部位を解析した。その結果 CD81 の細胞内領域 K8 がポリ Ub 化部位であることが明らかになった。さらに CD81 のポリ Ub 化部位を変異させた CD81-K8A のタンパク質半減期は CD81-WT に比べて延長した。このことから CD81 は K8 にポリ Ub 化され分解されることが示された。次に CD81 の E3 によるポリ Ub 化と分解機構を解析した。その結果、CD81 は K3 と K5 によってポリ Ub 化されるが、K5 によって CD81 は分解されることが明らかになった。本研究が発見し、CD81 に結合した Ub の連結様式が CD81 の分解を誘導するシグナルとして働くことが明らかになれば、K29-linked ポリ Ub 鎖や K63-linked ポリ Ub 鎖が有する細胞機能の解明につながることを期待される。いまだ明らかにされていないポリ Ub 鎖の機能を明らかにするために、本研究はポリ Ub 鎖の機能解明に対し基礎的知見を与えうると考える。

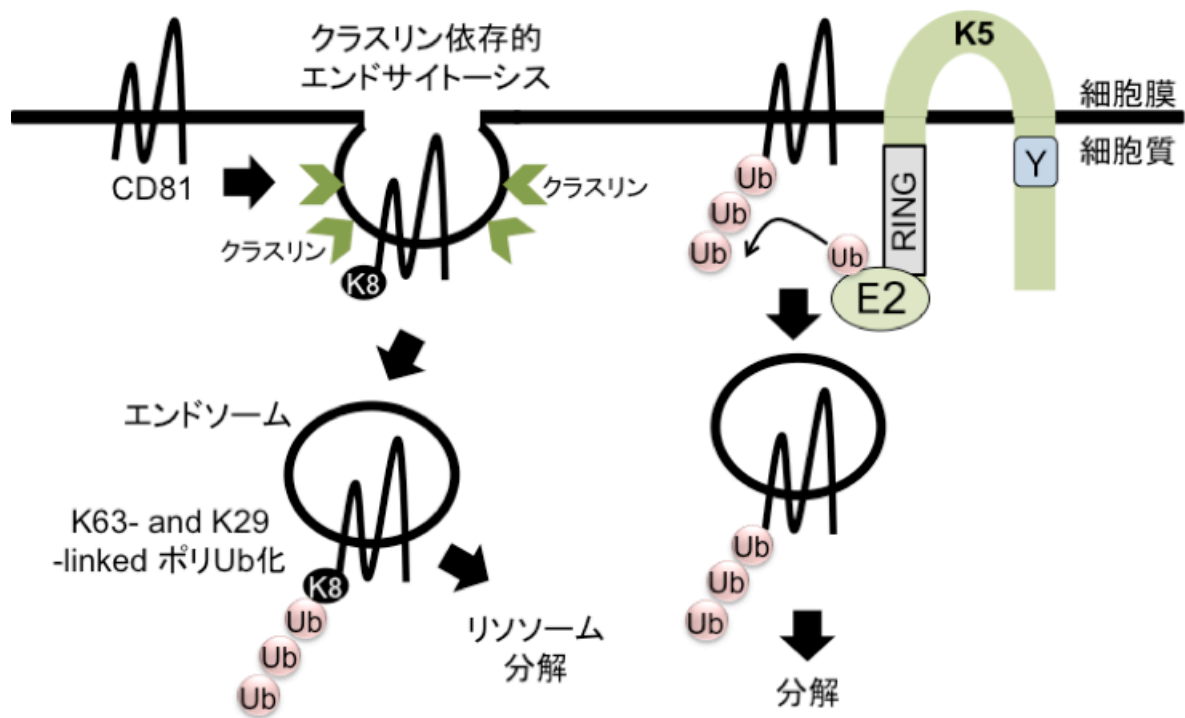


Fig. S1. CD81 の分解機構と K5 による CD81 の分解亢進機構の模式図

CD81 はクラスリン依存的エンドサイトーシスで細胞内に移行し、CD81 の N 末端 K8 が K63- と K29-linked ポリ Ub 化されリソソームで分解される。KSHV の E3 である K5 は CD81 をポリ Ub 化させ分解誘導する。

結語

本研究で明らかにしたことを以下に示す。

- (1) CD81 はリソソームによって分解される。
- (2) CD81 は K63-と K29-linked ポリ Ub 化される。
- (3) CD81 はクラスリン依存的エンドサイトーシスで細胞内に移行する。
- (4) CD81 のポリ Ub 化部位は 8 番目の K である。
- (5) CD81 は K5 によって分解される。
- (6) CD81 は K5 によってポリ Ub 化される。

謝辞

本研究の遂行にあたり、丁寧かつ的確な助言をくださいました京都薬科大学大学院 薬学研究科 細胞生物学分野研究室 藤室雅弘教授に心から深く感謝いたします。

本研究の内容に関して、的確な助言及び多大なる御協力下さいました京都薬科大学大学院 薬学研究科 細胞生物学分野研究室 渡部匡史助教に心から御礼申し上げます。

本論文を審査して下さいました京都薬科大学大学院 薬学研究科生化学分野研究室 中山祐治教授、病態生理学分野研究室 芦原英司教授に、深く感謝いたします。

本研究第3章の遂行にあたり、プラスミドベクター等の実験材料を提供して下さいました北海道医療大学 薬学部 薬学科 薬学教育支援室 中川宏治教授に御礼申し上げます。

本研究第3章の発現プラスミドの構築にあたり、実験の一部にご協力賜りました京都薬科大学大学院 薬学研究科 細胞生物学分野研究室 石丸華子氏に御礼申し上げます。

最後に、本大学院への進学に理解および支援してくれた両親に、そして温かく見守ってくださった後輩に心から深く感謝いたします。

2020年3月

参考文献

- (1) Charrin, S.; Jouannet, S.; Boucheix, C.; Rubinstein, E. Tetraspanins at a Glance. *J. Cell Sci.* **2014**, *127*, 3641–3648.
- (2) Min, G.; Wang, H.; Sun, T.-T.; Kong, X.-P. Structural Basis for Tetraspanin Functions as Revealed by the Cryo-EM Structure of Uroplakin Complexes at 6-Å Resolution. *J. Cell Biol.* **2006**, *173*, 975–983.
- (3) Kitadokoro, K.; Bordo, D.; Galli, G.; Petracca, R.; Falugi, F.; Abrignani, S.; Grandi, G.; Bolognesi, M. CD81 Extracellular Domain 3D Structure: Insight into the Tetraspanin Superfamily Structural Motifs. *EMBO J.* **2001**, *20*, 12–18.
- (4) Eon Kuek, L.; Leffler, M.; Mackay, G. A.; Hulett, M. D. The MS4A Family: Counting Past 1, 2 and 3. *Immunol. Cell Biol.* **2016**, *94*, 11–23.
- (5) Hemler, M. E. Tetraspanin Functions and Associated Microdomains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 801–811.
- (6) Boucheix, C.; Rubinstein, E. Tetraspanins. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 1189–1205.
- (7) Charrin, S.; le Naour, F.; Silvie, O.; Milhiet, P.-E.; Boucheix, C.; Rubinstein, E. Lateral Organization of Membrane Proteins: Tetraspanins Spin Their Web. *Biochem. J.* **2009**, *420*, 133–154.
- (8) Saint-Pol, J.; Eschenbrenner, E.; Dornier, E.; Boucheix, C.; Charrin, S.; Rubinstein, E. Regulation of the Trafficking and the Function of the Metalloprotease ADAM10 by Tetraspanins. *Biochem. Soc. Trans.* **2017**, *45*, 937–944.
- (9) Zhang, X. A.; Bontrager, A. L.; Hemler, M. E. Transmembrane-4 Superfamily Proteins Associate with Activated Protein Kinase C (PKC) and Link PKC to Specific Beta(1) Integrins. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 25005–25013.
- (10) Yauch, R. L.; Berditchevski, F.; Harler, M. B.; Reichner, J.; Hemler, M. E. Highly Stoichiometric, Stable, and Specific Association of Integrin Alpha3beta1 with CD151 Provides a Major Link to Phosphatidylinositol 4-Kinase, and May Regulate Cell Migration. *Mol. Biol. Cell* **1998**, *9*, 2751–2765.
- (11) Hong, I. K.; Jeoung, D. I.; Ha, K. S.; Kim, Y. M.; Lee, H. Tetraspanin CD151 Stimulates Adhesion-Dependent Activation of Ras, Rac, and Cdc42 by Facilitating Molecular Association between Beta1 Integrins and Small GTPases. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 32027–32039.
- (12) Levy, S.; Todd, S. C.; Maecker, H. T. CD81 (TAPA-1): A Molecule Involved in Signal Transduction and Cell Adhesion in the Immune System. *Annu. Rev. Immunol.* **1998**, *16*, 89–109.
- (13) Yanez-Mo, M.; Barreiro, O.; Gordon-Alonso, M.; Sala-Valdes, M.; Sanchez-Madrid, F. Tetraspanin-Enriched Microdomains: A Functional Unit in Cell Plasma Membranes. *Trends Cell Biol.* **2009**, *19*, 434–446.
- (14) Jiang, X.; Zhang, J.; Huang, Y. Tetraspanins in Cell Migration. *Cell Adh. Migr.* **2015**, *9*, 406–415.
- (15) Oren, R.; Takahashi, S.; Doss, C.; Levy, R.; Levy, S. TAPA-1, the Target of an Antiproliferative Antibody, Defines a New Family of Transmembrane Proteins. *Mol. Cell. Biol.* **1990**, *10*, 4007–4015.
- (16) Maecker, H. T.; Levy, S. Normal Lymphocyte Development but Delayed Humoral Immune Response in CD81-Null Mice. *J. Exp. Med.* **1997**, *185*, 1505–1510.

- (17) Tsitsikov, E. N.; Gutierrez-Ramos, J. C.; Geha, R. S. Impaired CD19 Expression and Signaling, Enhanced Antibody Response to Type II T Independent Antigen and Reduction of B-1 Cells in CD81-Deficient Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 10844–10849.
- (18) Mattila, P. K.; Feest, C.; Depoil, D.; Treanor, B.; Montaner, B.; Otipoby, K. L.; Carter, R.; Justement, L. B.; Bruckbauer, A.; Batista, F. D. The Actin and Tetraspanin Networks Organize Receptor Nanoclusters to Regulate B Cell Receptor-Mediated Signaling. *Immunity* **2013**, *38*, 461–474.
- (19) van Zelm, M. C.; Smet, J.; Adams, B.; Mascart, F.; Schandene, L.; Janssen, F.; Ferster, A.; Kuo, C.-C.; Levy, S.; van Dongen, J. J. M.; et al. CD81 Gene Defect in Humans Disrupts CD19 Complex Formation and Leads to Antibody Deficiency. *J. Clin. Invest.* **2010**, *120*, 1265–1274.
- (20) Bradbury, L. E.; Goldmacher, V. S.; Tedder, T. F. The CD19 Signal Transduction Complex of B Lymphocytes. Deletion of the CD19 Cytoplasmic Domain Alters Signal Transduction but Not Complex Formation with TAPA-1 and Leu 13. *J. Immunol.* **1993**, *151*, 2915–2927.
- (21) Shoham, T.; Rajapaksa, R.; Kuo, C.-C.; Haimovich, J.; Levy, S. Building of the Tetraspanin Web: Distinct Structural Domains of CD81 Function in Different Cellular Compartments. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 1373–1385.
- (22) Rubinstein, E.; Ziyat, A.; Prenant, M.; Wrobel, E.; Wolf, J.-P.; Levy, S.; Le Naour, F.; Boucheix, C. Reduced Fertility of Female Mice Lacking CD81. *Dev. Biol.* **2006**, *290*, 351–358.
- (23) Ohnami, N.; Nakamura, A.; Miyado, M.; Sato, M.; Kawano, N.; Yoshida, K.; Harada, Y.; Takezawa, Y.; Kanai, S.; Ono, C.; et al. CD81 and CD9 Work Independently as Extracellular Components upon Fusion of Sperm and Oocyte. *Biol. Open* **2012**, *1*, 640–647.
- (24) Silvie, O.; Rubinstein, E.; Franetich, J.-F.; Prenant, M.; Belnoue, E.; Renia, L.; Hannoun, L.; Eling, W.; Levy, S.; Boucheix, C.; et al. Hepatocyte CD81 Is Required for Plasmodium Falciparum and Plasmodium Yoelii Sporozoite Infectivity. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 93–96.
- (25) Yalaoui, S.; Zougbede, S.; Charrin, S.; Silvie, O.; Arduise, C.; Farhati, K.; Boucheix, C.; Mazier, D.; Rubinstein, E.; Froissard, P. Hepatocyte Permissiveness to Plasmodium Infection Is Conveyed by a Short and Structurally Conserved Region of the CD81 Large Extracellular Domain. *PLoS Pathog.* **2008**, *4*, e1000010.
- (26) Pileri, P.; Uematsu, Y.; Campagnoli, S.; Galli, G.; Falugi, F.; Petracca, R.; Weiner, A. J.; Houghton, M.; Rosa, D.; Grandi, G.; et al. Binding of Hepatitis C Virus to CD81. *Science* **1998**, *282*, 938–941.
- (27) Cormier, E. G.; Tsamis, F.; Kajumo, F.; Durso, R. J.; Gardner, J. P.; Dragic, T. CD81 Is an Entry Coreceptor for Hepatitis C Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 7270–7274.
- (28) Gordon-Alonso, M.; Yanez-Mo, M.; Barreiro, O.; Alvarez, S.; Munoz-Fernandez, M. A.; Valenzuela-Fernandez, A.; Sanchez-Madrid, F. Tetraspanins CD9 and CD81 Modulate HIV-1-Induced Membrane Fusion. *J. Immunol.* **2006**, *177*, 5129–5137.
- (29) He, J.; Sun, E.; Bujny, M. V.; Kim, D.; Davidson, M. W.; Zhuang, X. Dual Function of CD81 in Influenza Virus Uncoating and Budding. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003701.
- (30) Chastagner, P.; Israel, A.; Brou, C. AIP4/Itch Regulates Notch Receptor Degradation in the Absence of Ligand. *PLoS One* **2008**, *3*, e2735.
- (31) Sakata, T.; Sakaguchi, H.; Tsuda, L.; Higashitani, A.; Aigaki, T.; Matsuno, K.; Hayashi, S. Drosophila Nedd4 Regulates Endocytosis of Notch and Suppresses Its Ligand-Independent Activation. *Curr. Biol.* **2004**, *14*, 2228–2236.

- (32) Duncan, L. M.; Piper, S.; Dodd, R. B.; Saville, M. K.; Sanderson, C. M.; Luzio, J. P.; Lehner, P. J. Lysine-63-Linked Ubiquitination Is Required for Endolysosomal Degradation of Class I Molecules. *EMBO J.* **2006**, *25*, 1635–1645.
- (33) Ishido, S.; Wang, C.; Lee, B. S.; Cohen, G. B.; Jung, J. U. Downregulation of Major Histocompatibility Complex Class I Molecules by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus K3 and K5 Proteins. *J. Virol.* **2000**, *74*, 5300–5309.
- (34) Gupta-Rossi, N.; Le Bail, O.; Gonen, H.; Brou, C.; Logeat, F.; Six, E.; Ciechanover, A.; Israel, A. Functional Interaction between SEL-10, an F-Box Protein, and the Nuclear Form of Activated Notch1 Receptor. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 34371–34378.
- (35) Wu, G.; Lyapina, S.; Das, I.; Li, J.; Gurney, M.; Pauley, A.; Chui, I.; Deshaies, R. J.; Kitajewski, J. SEL-10 Is an Inhibitor of Notch Signaling That Targets Notch for Ubiquitin-Mediated Protein Degradation. *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 7403–7415.
- (36) Scheffner, M.; Nuber, U.; Huibregtse, J. M. Protein Ubiquitination Involving an E1-E2-E3 Enzyme Ubiquitin Thioester Cascade. *Nature* **1995**, *373*, 81–83.
- (37) Hershko, A.; Heller, H.; Elias, S.; Ciechanover, A. Components of Ubiquitin-Protein Ligase System. Resolution, Affinity Purification, and Role in Protein Breakdown. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 8206–8214.
- (38) Hershko, A.; Ciechanover, A.; Heller, H.; Haas, A. L.; Rose, I. A. Proposed Role of ATP in Protein Breakdown: Conjugation of Protein with Multiple Chains of the Polypeptide of ATP-Dependent Proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1980**, *77*, 1783–1786.
- (39) Lineberry, N.; Su, L.; Soares, L.; Fathman, C. G. The Single Subunit Transmembrane E3 Ligase Gene Related to Anergy in Lymphocytes (GRAIL) Captures and Then Ubiquitinates Transmembrane Proteins across the Cell Membrane. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 28497–28505.
- (40) Barteel, E.; Eyster, C. A.; Viswanathan, K.; Mansouri, M.; Donaldson, J. G.; Fruh, K. Membrane-Associated RING-CH Proteins Associate with Bap31 and Target CD81 and CD44 to Lysosomes. *PLoS One* **2010**, *5*, e15132.
- (41) Jelonek, K.; Widlak, P.; Pietrowska, M. The Influence of Ionizing Radiation on Exosome Composition, Secretion and Intercellular Communication. *Protein Pept. Lett.* **2016**, *23*, 656–663.
- (42) Hershko, A.; Ciechanover, A. The Ubiquitin System. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 425–479.
- (43) Chen, T.; Zhou, T.; He, B.; Yu, H.; Guo, X.; Song, X.; Sha, J. MUBiSiDa: A Comprehensive Database for Protein Ubiquitination Sites in Mammals. *PLoS One* **2014**, *9*, e85744.
- (44) Deshaies, R. J.; Joazeiro, C. A. P. RING Domain E3 Ubiquitin Ligases. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 399–434.
- (45) Finley, D. Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 477–513.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081507.101607>.
- (46) Schlesinger, D. H.; Goldstein, G.; Niall, H. D. The Complete Amino Acid Sequence of Ubiquitin, an Adenylate Cyclase Stimulating Polypeptide Probably Universal in Living Cells. *Biochemistry* **1975**, *14*, 2214–2218.
- (47) Komander, D. The Emerging Complexity of Protein Ubiquitination. *Biochem. Soc. Trans.* **2009**, *37*, 937–953.
- (48) Petroski, M. D.; Deshaies, R. J. Mechanism of Lysine 48-Linked Ubiquitin-Chain Synthesis by

- the Cullin-RING Ubiquitin-Ligase Complex SCF-Cdc34. *Cell* **2005**, *123*, 1107–1120.
- (49) Spence, J.; Sadis, S.; Haas, A. L.; Finley, D. A Ubiquitin Mutant with Specific Defects in DNA Repair and Multiubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 1265–1273.
- (50) Deng, L.; Wang, C.; Spencer, E.; Yang, L.; Braun, A.; You, J.; Slaughter, C.; Pickart, C.; Chen, Z. J. Activation of the I κ B Kinase Complex by TRAF6 Requires a Dimeric Ubiquitin-Conjugating Enzyme Complex and a Unique Polyubiquitin Chain. *Cell* **2000**, *103*, 351–361.
- (51) Iwai, K.; Fujita, H.; Sasaki, Y. Linear Ubiquitin Chains: NF-KappaB Signalling, Cell Death and Beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology*. England August 2014, pp 503–508.
- (52) Komander, D.; Rape, M. The Ubiquitin Code. *Annu. Rev. Biochem.* **2012**, *81*, 203–229.
- (53) Nam, T.; Han, J. H.; Devkota, S.; Lee, H. W. Emerging Paradigm of Crosstalk between Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System. *Mol. Cells* **2017**, *40*, 897–905.
- (54) Mizushima, N.; Komatsu, M. Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell* **2011**, *147*, 728–741.
- (55) Klionsky, D. J.; Cregg, J. M.; Dunn, W. A. J.; Emr, S. D.; Sakai, Y.; Sandoval, I. V.; Sibirny, A.; Subramani, S.; Thumm, M.; Veenhuis, M.; et al. A Unified Nomenclature for Yeast Autophagy-Related Genes. *Developmental cell*. United States October 2003, pp 539–545.
- (56) Rudolf, R.; Straka, T. Nicotinic Acetylcholine Receptor at Vertebrate Motor Endplates: Endocytosis, Recycling, and Degradation. *Neurosci. Lett.* **2019**, *711*, 134434.
- (57) Moretti, J.; Brou, C. Ubiquitinations in the Notch Signaling Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 6359–6381.
- (58) Ohtake, F.; Saeki, Y.; Ishido, S.; Kanno, J.; Tanaka, K. The K48-K63 Branched Ubiquitin Chain Regulates NF-KappaB Signaling. *Mol. Cell* **2016**, *64*, 251–266.
- (59) Boname, J. M.; Thomas, M.; Stagg, H. R.; Xu, P.; Peng, J.; Lehner, P. J. Efficient Internalization of MHC I Requires Lysine-11 and Lysine-63 Mixed Linkage Polyubiquitin Chains. *Traffic* **2010**, *11*, 210–220.
- (60) Michel, M. A.; Elliott, P. R.; Swatek, K. N.; Simicek, M.; Pruneda, J. N.; Wagstaff, J. L.; Freund, S. M. V.; Komander, D. Assembly and Specific Recognition of K29- and K33-Linked Polyubiquitin. *Mol. Cell* **2015**, *58*, 95–109.
- (61) Fujimuro, M.; Sawada, H.; Yokosawa, H. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Specific to Multi-Ubiquitin Chains of Polyubiquitinated Proteins. *FEBS Lett.* **1994**, *349*, 173–180.
- (62) Shigemitsu, Z.; Furukawa, Y.; Hosokawa, K.; Minami, S.; Matsuhira, J.; Nakata, S.; Watanabe, T.; Kagawa, H.; Nakagawa, K.; Takeda, H.; et al. Diallyl Trisulfide Induces Apoptosis by Suppressing NF-KappaB Signaling through Destabilization of TRAF6 in Primary Effusion Lymphoma. *Int. J. Oncol.* **2016**, *48*, 293–304.
- (63) Votta, B. J.; Levy, M. A.; Badger, A.; Bradbeer, J.; Dodds, R. A.; James, I. E.; Thompson, S.; Bossard, M. J.; Carr, T.; Connor, J. R.; et al. Peptide Aldehyde Inhibitors of Cathepsin K Inhibit Bone Resorption Both in Vitro and in Vivo. *J. Bone Miner. Res.* **1997**, *12*, 1396–1406.
- (64) Leung, D.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P. Protease Inhibitors: Current Status and Future Prospects. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 305–341.
- (65) Ohkuma, S.; Shimizu, S.; Noto, M.; Sai, Y.; Kinoshita, K.; Tamura, H. Inhibition of Cell Growth by Bafilomycin A1, a Selective Inhibitor of Vacuolar H(+)-ATPase. *In Vitro Cell. Dev.*

- Biol. Anim.* **1993**, *29A*, 862–866.
- (66) Ohta, T.; Arakawa, H.; Futagami, F.; Fushida, S.; Kitagawa, H.; Kayahara, M.; Nagakawa, T.; Miwa, K.; Kurashima, K.; Numata, M.; et al. Bafilomycin A1 Induces Apoptosis in the Human Pancreatic Cancer Cell Line Capan-1. *J. Pathol.* **1998**, *185*, 324–330.
- (67) Glaumann, H.; Ahlberg, J. Comparison of Different Autophagic Vacuoles with Regard to Ultrastructure, Enzymatic Composition, and Degradation Capacity--Formation of Crinosomes. *Exp. Mol. Pathol.* **1987**, *47*, 346–362.
- (68) Poole, B.; Ohkuma, S. Effect of Weak Bases on the Intralysosomal PH in Mouse Peritoneal Macrophages. *J. Cell Biol.* **1981**, *90*, 665–669.
- (69) Takahashi, S.; Doss, C.; Levy, S.; Levy, R. TAPA-1, the Target of an Antiproliferative Antibody, Is Associated on the Cell Surface with the Leu-13 Antigen. *J. Immunol.* **1990**, *145*, 2207–2213.
- (70) Altomonte, M.; Montagner, R.; Pucillo, C.; Maio, M. Triggering of Target of an Antiproliferative Antibody-1 (TAPA-1/CD81) up-Regulates the Release of Tumour Necrosis Factor-Alpha by the EBV-B Lymphoblastoid Cell Line JY. *Scand. J. Immunol.* **1996**, *43*, 367–373.
- (71) Donkor, I. O.; Korukonda, R. Synthesis and Calpain Inhibitory Activity of Peptidomimetic Compounds with Constrained Amino Acids at the P2 Position. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4806–4808.
- (72) Yamada, M.; Yoshida, Y.; Mori, D.; Takitoh, T.; Kengaku, M.; Umeshima, H.; Takao, K.; Miyakawa, T.; Sato, M.; Sorimachi, H.; et al. Inhibition of Calpain Increases LIS1 Expression and Partially Rescues in Vivo Phenotypes in a Mouse Model of Lissencephaly. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 1202–1207.
- (73) Ohmura-Hoshino, M.; Goto, E.; Matsuki, Y.; Aoki, M.; Mito, M.; Uematsu, M.; Hotta, H.; Ishido, S. A Novel Family of Membrane-Bound E3 Ubiquitin Ligases. *J. Biochem.* **2006**, *140*, 147–154.
- (74) Hoer, S.; Smith, L.; Lehner, P. J. MARCH-IX Mediates Ubiquitination and Downregulation of ICAM-1. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 45–51.
- (75) Chang, W. L.; Bellen, H. J. Endocytosis and Intracellular Trafficking of Notch and Its Ligands. *Curr. Top. Dev. Biol.* **2010**, *92*, 165–200.
- (76) Apaja, P. M.; Foo, B.; Okiyoneda, T.; Valinsky, W. C.; Barriere, H.; Atanasiu, R.; Ficker, E.; Lukacs, G. L.; Shrier, A. Ubiquitination-Dependent Quality Control of HERG K⁺ Channel with Acquired and Inherited Conformational Defect at the Plasma Membrane. *Mol. Biol. Cell* **2013**, *24*, 3787–3804.
- (77) Li, Z.; Ji, X.; Wang, W.; Liu, J.; Liang, X.; Wu, H.; Liu, J.; Eggert, U. S.; Liu, Q.; Zhang, X. Ammonia Induces Autophagy through Dopamine Receptor D3 and MTOR. *PLoS One* **2016**, *11*, e0153526.
- (78) Yuan, Y.; Zhao, J.; Gong, Y.; Wang, D.; Wang, X.; Yun, F.; Liu, Z.; Zhang, S.; Li, W.; Zhao, X.; et al. Autophagy Exacerbates Electrical Remodeling in Atrial Fibrillation by Ubiquitin-Dependent Degradation of L-Type Calcium Channel. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 873.
- (79) Morgan, N. E.; Cutrona, M. B.; Simpson, J. C. Multitasking Rab Proteins in Autophagy and Membrane Trafficking: A Focus on Rab33b. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*.
- (80) Lindmo, K.; Stenmark, H. Regulation of Membrane Traffic by Phosphoinositide 3-Kinases. *J.*

- Cell Sci.* **2006**, *119*, 605–614.
- (81) Kaksonen, M.; Roux, A. Mechanisms of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 313–326.
- (82) Sandvig, K.; Kavaliauskiene, S.; Skotland, T. Clathrin-Independent Endocytosis: An Increasing Degree of Complexity. *Histochem. Cell Biol.* **2018**, *150*, 107–118.
- (83) Lajoie, P.; Nabi, I. R. Lipid Rafts, Caveolae, and Their Endocytosis. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2010**, *282*, 135–163.
- (84) Levy, S.; Shoham, T. The Tetraspanin Web Modulates Immune-Signalling Complexes. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5*, 136–148.
- (85) van Deventer, S. J.; Dunlock, V.-M. E.; van Spriël, A. B. Molecular Interactions Shaping the Tetraspanin Web. *Biochem. Soc. Trans.* **2017**, *45*, 741–750.
- (86) Gorvel, J. P.; Chavrier, P.; Zerial, M.; Gruenberg, J. Rab5 Controls Early Endosome Fusion in Vitro. *Cell* **1991**, *64*, 915–925.
- (87) van der Sluijs, P.; Hull, M.; Webster, P.; Male, P.; Goud, B.; Mellman, I. The Small GTP-Binding Protein Rab4 Controls an Early Sorting Event on the Endocytic Pathway. *Cell* **1992**, *70*, 729–740.
- (88) Simpson, J. C.; Griffiths, G.; Wessling-Resnick, M.; Fransen, J. A. M.; Bennett, H.; Jones, A. T. A Role for the Small GTPase Rab21 in the Early Endocytic Pathway. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 6297–6311.
- (89) Rojas, R.; van Vlijmen, T.; Mardones, G. A.; Prabhu, Y.; Rojas, A. L.; Mohammed, S.; Heck, A. J. R.; Raposo, G.; van der Sluijs, P.; Bonifacino, J. S. Regulation of Retromer Recruitment to Endosomes by Sequential Action of Rab5 and Rab7. *J. Cell Biol.* **2008**, *183*, 513–526.
- (90) Simonsen, A.; Lippe, R.; Christoforidis, S.; Gaullier, J. M.; Brech, A.; Callaghan, J.; Toh, B. H.; Murphy, C.; Zerial, M.; Stenmark, H. EEA1 Links PI(3)K Function to Rab5 Regulation of Endosome Fusion. *Nature* **1998**, *394*, 494–498.
- (91) Fielding, A. B.; Royle, S. J. Mitotic Inhibition of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Cell. Mol. Life Sci.* **2013**, *70*, 3423–3433.
- (92) Mettlen, M.; Chen, P. H.; Srinivasan, S.; Danuser, G.; Schmid, S. L. Regulation of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **2018**, *87*, 871–896.
- (93) Robinson, M. S. Forty Years of Clathrin-Coated Vesicles. *Traffic* **2015**, *16*, 1210–1238.
- (94) Nakatsu, F.; Hase, K.; Ohno, H. The Role of the Clathrin Adaptor AP-1: Polarized Sorting and Beyond. *Membranes (Basel)*. **2014**, *4*, 747–763.
- (95) Song, K.; Wu, H.; Rahman, H. N. A.; Dong, Y.; Wen, A.; Brophy, M. L.; Wong, S.; Kwak, S.; Bielenberg, D. R.; Chen, H. Endothelial Epsins as Regulators and Potential Therapeutic Targets of Tumor Angiogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *74*, 393–398.
- (96) Horvath, C. A. J.; Vanden Broeck, D.; Boulet, G. A. V.; Bogers, J.; De Wolf, M. J. S. Epsin: Inducing Membrane Curvature. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 1765–1770.
- (97) Schulman, B. A.; Harper, J. W. Ubiquitin-like Protein Activation by E1 Enzymes: The Apex for Downstream Signalling Pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 319–331.
- (98) van Wijk, S. J. L.; Timmers, H. T. M. The Family of Ubiquitin-Conjugating Enzymes (E2s): Deciding between Life and Death of Proteins. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2010**, *24*, 981–993.
- (99) Berndsen, C. E.; Wolberger, C. New Insights into Ubiquitin E3 Ligase Mechanism. *Nat. Struct.*

- Mol. Biol.* **2014**, *21*, 301–307.
- (100) Fajner, V.; Maspero, E.; Polo, S. Targeting HECT-Type E3 Ligases - Insights from Catalysis, Regulation and Inhibitors. *FEBS Lett.* **2017**, *591*, 2636–2647.
- (101) Huibregtse, J. M.; Scheffner, M.; Beaudenon, S.; Howley, P. M. A Family of Proteins Structurally and Functionally Related to the E6-AP Ubiquitin-Protein Ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 2563–2567.
- (102) Bulatov, E.; Valiullina, A.; Sayarova, R.; Rizvanov, A. Promising New Therapeutic Targets for Regulation of Inflammation and Immunity: RING-Type E3 Ubiquitin Ligases. *Immunol. Lett.* **2018**, *202*, 44–51.
- (103) Bauer, J.; Bakke, O.; Morth, J. P. Overview of the Membrane-Associated RING-CH (MARCH) E3 Ligase Family. *N. Biotechnol.* **2017**, *38*, 7–15.
- (104) Fruh, K.; Bartee, E.; Gouveia, K.; Mansouri, M. Immune Evasion by a Novel Family of Viral PHD/LAP-Finger Proteins of Gamma-2 Herpesviruses and Poxviruses. *Virus Res.* **2002**, *88*, 55–69.
- (105) Boname, J. M.; Lehner, P. J. What Has the Study of the K3 and K5 Viral Ubiquitin E3 Ligases Taught Us about Ubiquitin-Mediated Receptor Regulation? *Viruses* **2011**, *3*, 118–131.
- (106) Thomas, M.; Wills, M.; Lehner, P. J. Natural Killer Cell Evasion by an E3 Ubiquitin Ligase from Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *Biochem. Soc. Trans.* **2008**, *36*, 459–463.
- (107) Lehner, P. J.; Hoer, S.; Dodd, R.; Duncan, L. M. Downregulation of Cell Surface Receptors by the K3 Family of Viral and Cellular Ubiquitin E3 Ligases. *Immunol. Rev.* **2005**, *207*, 112–125.
- (108) Samji, T.; Hong, S.; Means, R. E. The Membrane Associated RING-CH Proteins: A Family of E3 Ligases with Diverse Roles through the Cell. *Int. Sch. Res. Not.* **2014**, *2014*, 637295.
- (109) Haucke, V.; Krauss, M. Tyrosine-Based Endocytic Motifs Stimulate Oligomerization of AP-2 Adaptor Complexes. *Eur. J. Cell Biol.* **2002**, *81*, 647–653.
- (110) Cadwell, K.; Coscoy, L. Ubiquitination on Nonlysine Residues by a Viral E3 Ubiquitin Ligase. *Science* **2005**, *309*, 127–130.
- (111) Geetha, T.; Jiang, J.; Wooten, M. W. Lysine 63 Polyubiquitination of the Nerve Growth Factor Receptor TrkA Directs Internalization and Signaling. *Mol. Cell* **2005**, *20*, 301–312.
- (112) Taylor, J. L.; Bennett, H. N.; Snyder, B. A.; Moore, P. S.; Chang, Y. Transcriptional Analysis of Latent and Inducible Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Transcripts in the K4 to K7 Region. *J. Virol.* **2005**, *79*, 15099–15106.
- (113) Li, Q.; Means, R.; Lang, S.; Jung, J. U. Downregulation of Gamma Interferon Receptor 1 by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus K3 and K5. *J. Virol.* **2007**, *81*, 2117–2127.

Supplementary information

以下に本研究で作製したプラスミドマップとその情報を記載する。

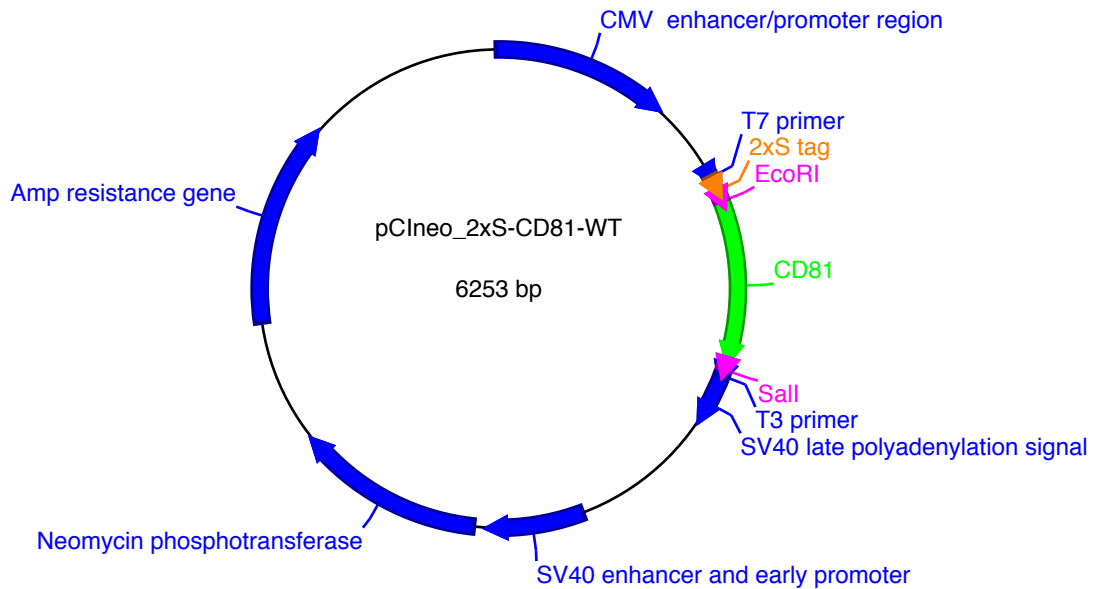


Fig. Sup. 1. 2xS-CD81-WT の発現プラスミドの模式図

プラスミド名：pCIneo_2xS-CD81-WT

略名：2xS-CD81-WT

全長：6253 bp

インサートサイズ：711 bp

タグペプチドとその配列：2xS タグ

5'-atgaaagaaccgctgctgctaaattcgaacgccagcacatggacagcaaagaaccgctgctgctaaattcgaacgccagcacatggacagc-3'

M K E T A A A K F E R Q H M D S K E T A A A K F E
R Q H M D S

耐性遺伝子：Ampicillin; Amp

制限酵素サイト：EcoRI、SalI

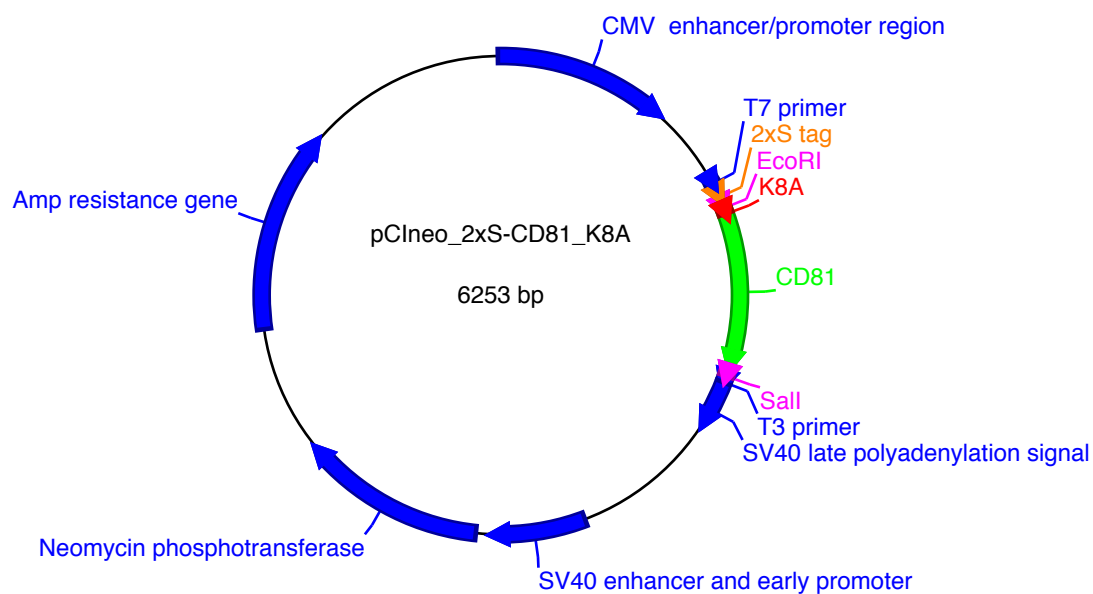


Fig. Sup. 2. 2xS-CD81-K8A の発現プラスミドの模式図

プラスミド名 : pCIneo_2xS-CD81-K8A

略名 : 2xS-CD81-K8A

全長 : 6253 bp

インサートサイズ : 711 bp

変異箇所 : K8 を A に変異 (5'-aag-3'を 5'-gcg-3'に変異させた。)

タグペプチドとその配列 : 2xS タグ

5'-atgaaagaaccgctgctgctaaattcgaacgccagcacatggacagcaaagaaccgctgctgctaaattcgaacgccagcacatggacagc-3'

M K E T A A A K F E R Q H M D S K E T A A A K F E
R Q H M D S

耐性遺伝子 : Ampicillin; Amp

制限酵素サイト : EcoRI、Sall

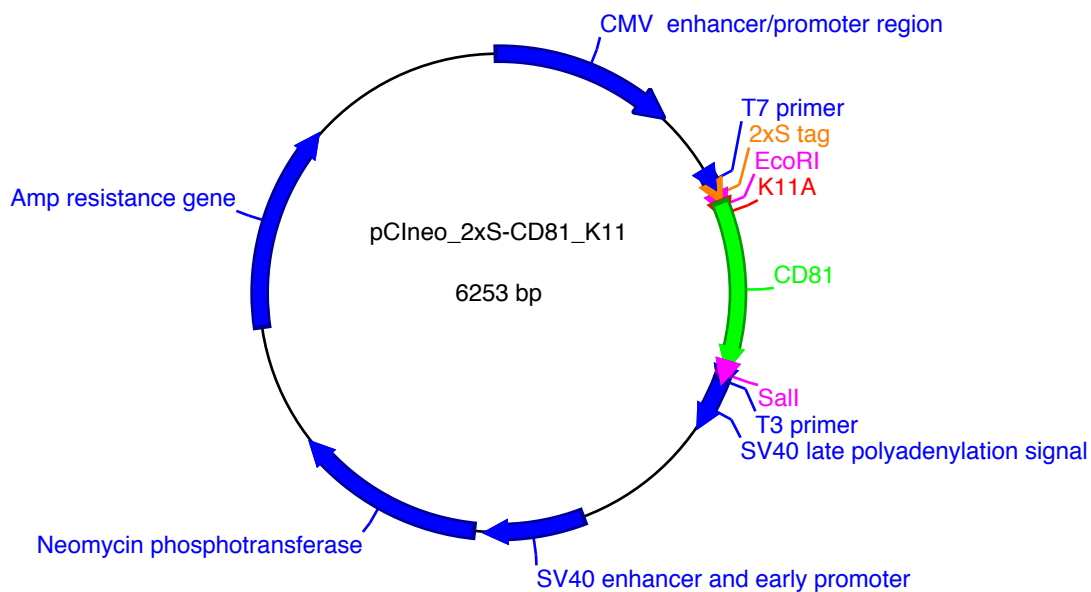


Fig. Sup. 3. 2xS-CD81-K11A の発現プラスミドの模式図

プラスミド名：pCIneo_2xS-CD81-K11A

略名：2xS-CD81-K11A

全長：6253 bp

インサートサイズ：711 bp

変異箇所：K11 を A に変異 (5'-aag-3'を 5'-gcg-3'に変異させた。)

タグペプチドとその配列：2xS タグ

5'-atgaaagaaccgctgctgctaaattcgaacgccagcacatggacagcaaagaaccgctgctgctaaattcgaacgccagcacatggacagc-3'

M K E T A A A K F E R Q H M D S K E T A A A K F E
R Q H M D S

耐性遺伝子：Ampicillin; Amp

制限酵素サイト：EcoRI、Sall

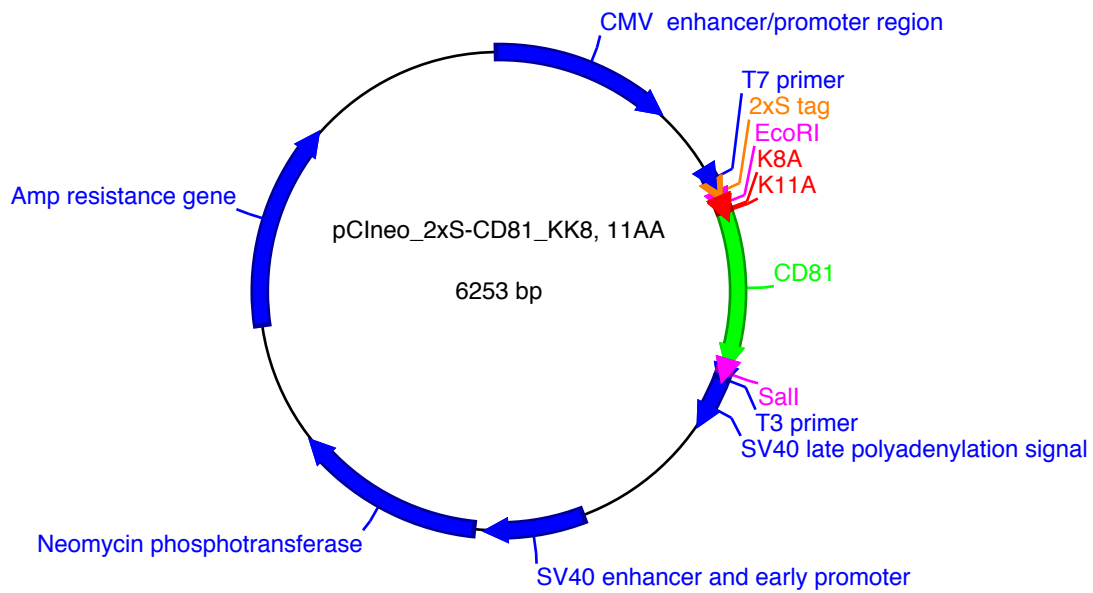


Fig. Sup. 4. 2xS-CD81- KK8, 11AA の発現プラスミドの模式図

プラスミド名：pCIneo_2xS-CD81- KK8, 11AA

略名：2xS-CD81- KK8, 11AA

全長：6253 bp

インサートサイズ：711 bp

変異箇所：K8 と K11 を A に変異 (5'-aag-3' と 5'-aag-3' を 2 つとも 5'-gcg-3' に変異させた。)

タグペプチドとその配列：2xS タグ

5'-atgaaagaaccgctgctgctaaattcgaacgccagcacatggacagcaaagaaccgctgctgctaaattcgaacgccagcacatggacagc-3'

M K E T A A A K F E R Q H M D S K E T A A A K F E
R Q H M D S

耐性遺伝子：Ampicillin; Amp

制限酵素サイト：EcoRI、Sall

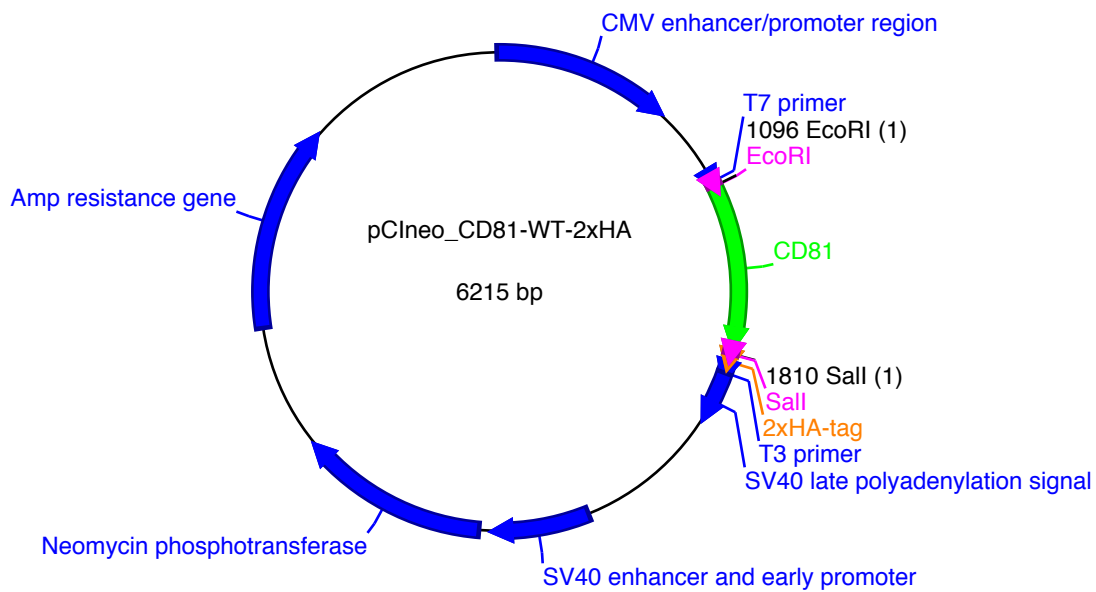


Fig. Sup. 5. CD81-WT-2xHA の発現プラスミドの模式図

プラスミド名 : pCIneo_CD81-WT-2xHA

略名 : CD81-WT-2xHA

全長 : 6215 bp

インサートサイズ : 711 bp

タグペプチドとその配列 : 2xHA タグ

5'- taccatacgcagctccagactacgcctaccatacgcagctccagactacgcctaa -3'

Y P Y D V P D Y A Y P Y D V P D Y A

耐性遺伝子 : Ampicillin; Amp

制限酵素サイト : EcoRI、Sall

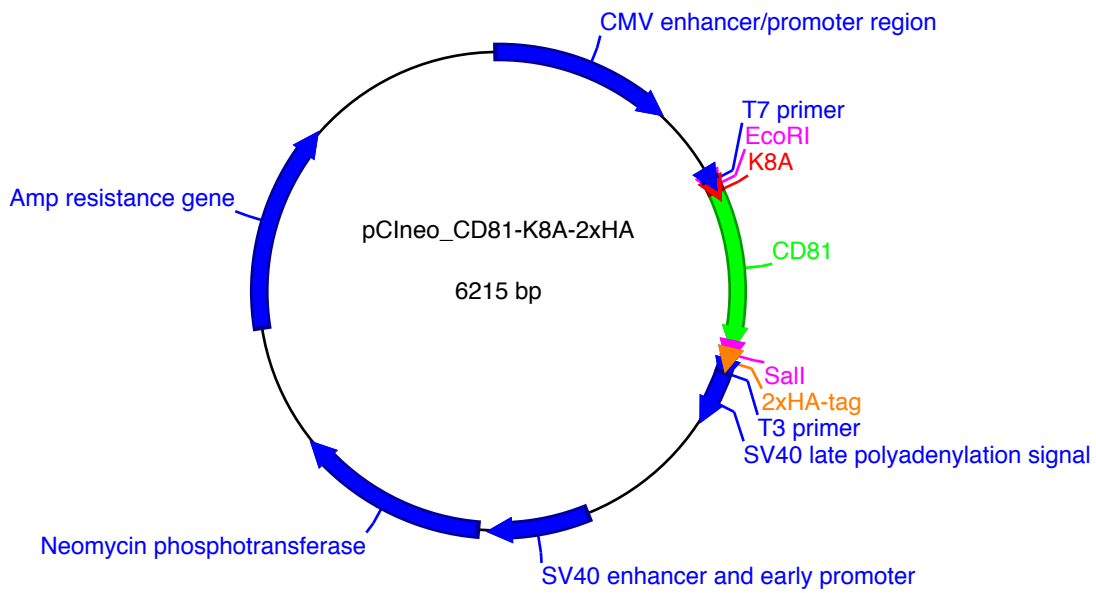


Fig. Sup. 6. CD81-K8A-2xHA の発現プラスミドの模式図

プラスミド名：pCIneo_CD81-K8A-2xHA

略名：CD81-K8A-2xHA

全長：6215 bp

インサートサイズ：711 bp

変異箇所：K8 を A に変異 (5'-aag-3'を 5'-gcg-3'に変異させた。)

タグペプチドとその配列：2xHA タグ

5'- tacccatcgcagctcccagactacgcctaccatcgcagctcccagactacgcctaa -3'

Y P Y D V P D Y A Y P Y D V P D Y A

耐性遺伝子：Ampicillin; Amp

制限酵素サイト：EcoRI、Sall

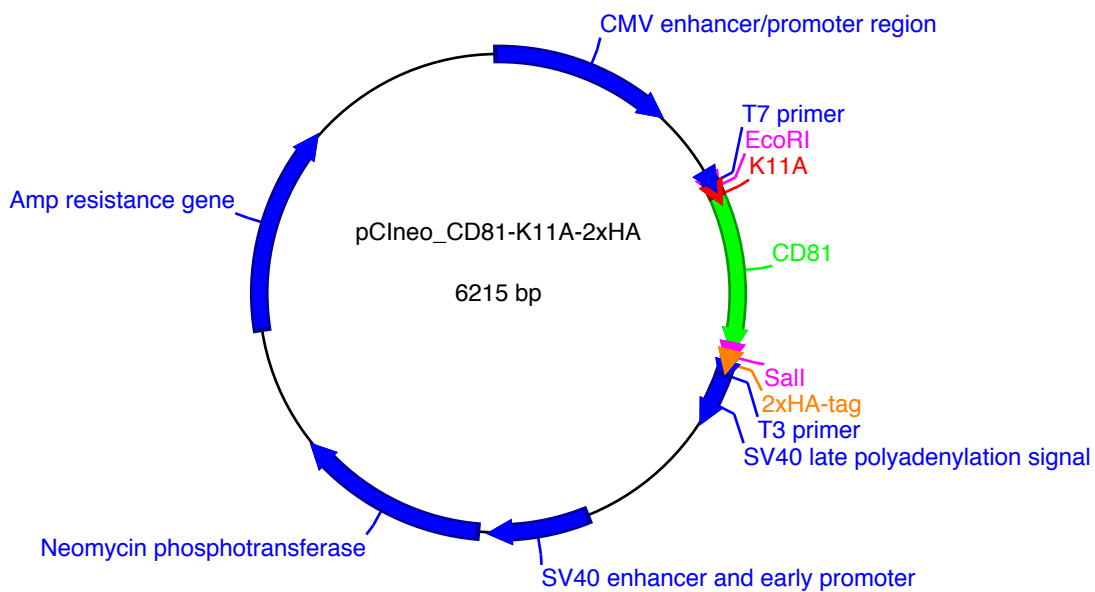


Fig. Sup. 7. CD81-K11A-2xHA の発現プラスミドの模式図

プラスミド名：pCIneo_CD81-K11A-2xHA

略名：CD81-K11A-2xHA

全長：6215 bp

インサートサイズ：711 bp

変異箇所：K11 を A に変異 (5'-aag-3'を 5'-gcg-3'に変異させた。)

タグペプチドとその配列：2xHA タグ

5'- tacccatacgacgtcccagactacgcctaccatacgacgtcccagactacgcctaa -3'

Y P Y D V P D Y A Y P Y D V P D Y A

耐性遺伝子：Ampicillin; Amp

制限酵素サイト：EcoRI、SalI

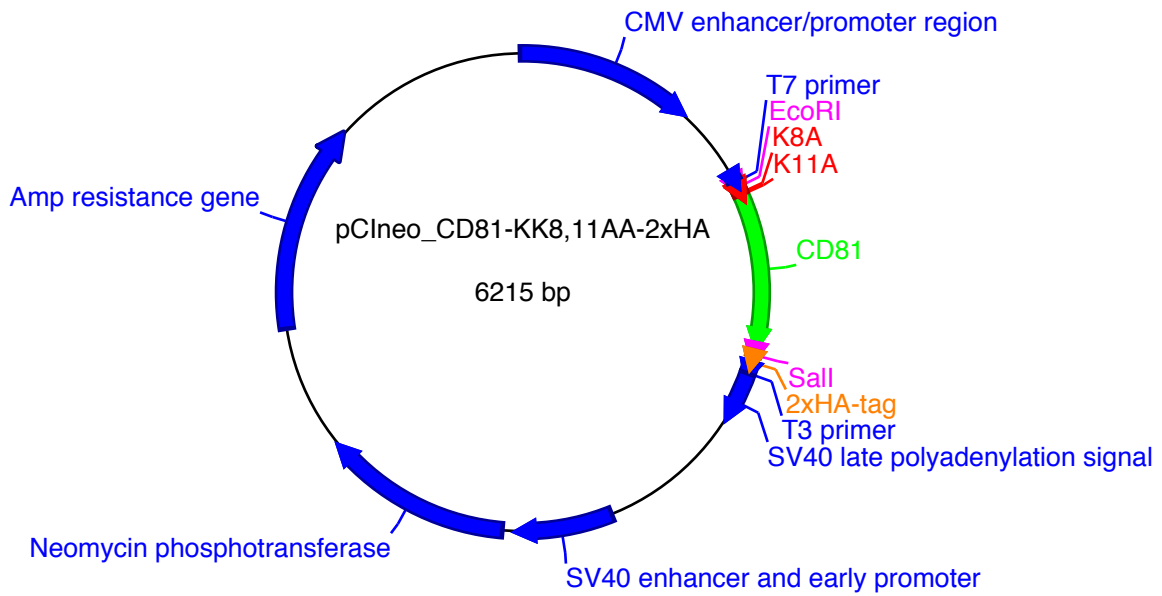


Fig. Sup. 8. CD81-KK8, 11AA-2xHA の発現プラスミドの模式図

プラスミド名 : pCIneo_CD81-KK8, 11AA-2xHA

略名 : CD81-KK8, 11AA-2xHA

全長 : 6215 bp

インサートサイズ : 711 bp

変異箇所 : K8 と K11 を A に変異 (5'-aag-3' と 5'-aag-3' を 2 つとも 5'-gcg-3' に変異させた。)

タグペプチドとその配列 : 2xHA タグ

5'- taccatacgcgctccagactacgcctaccatacgcgctccagactacgcctaa -3'

Y P Y D V P D Y A Y P Y D V P D Y A

耐性遺伝子 : Ampicillin; Amp

制限酵素サイト : EcoRI, Sall

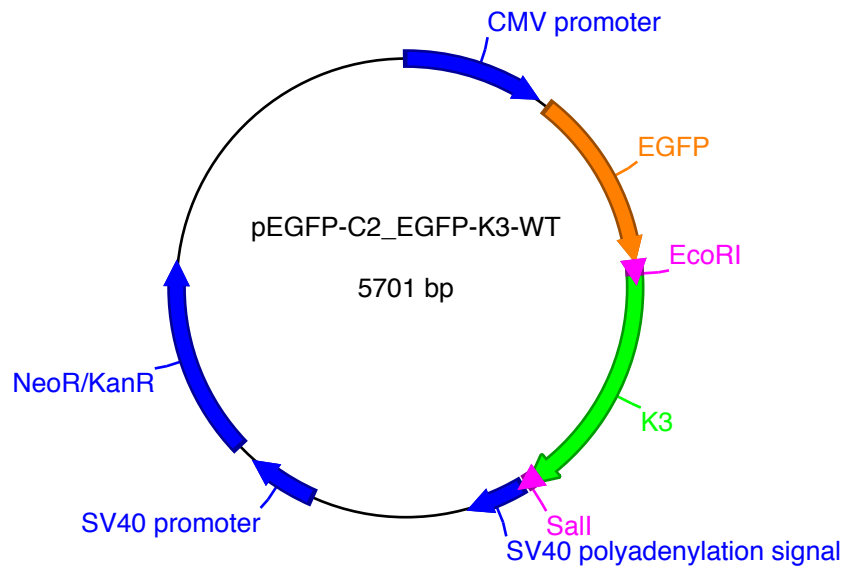


Fig. Sup. 9. EGFP-K3-WT の発現プラスミドの模式図

プラスミド名 : pEGFP-C2_EGFP-K3-WT

略名 : EGFP-K3-WT

全長 : 5701bp

インサートサイズ : 970 bp

タグ : EGFP タグ

耐性遺伝子 : kanamycin; Kan

制限酵素サイト : EcoRI、Sall

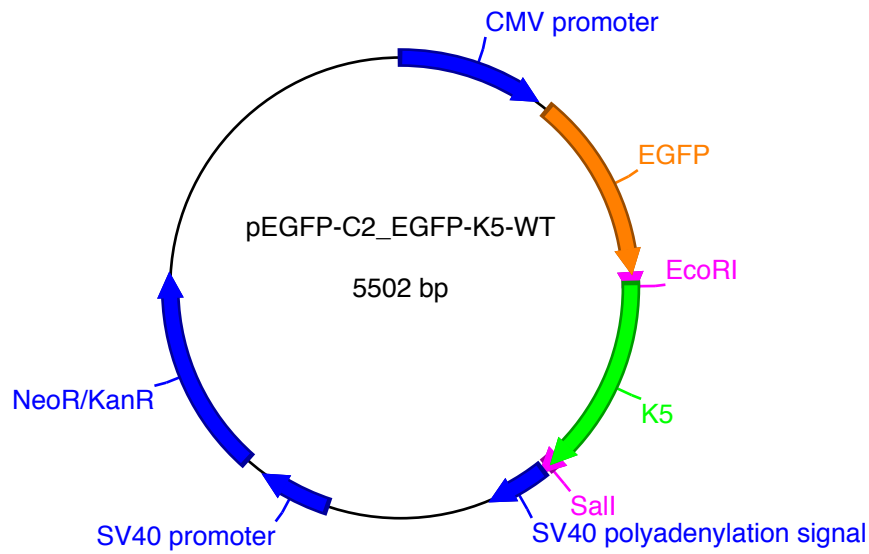


Fig. Sup. 10. EGFP-K5-WT の発現プラスミドの模式図

プラスミド名 : pEGFP-C2_EGFP-K5-WT

略名 : EGFP-K5-WT

全長 : 5502bp

インサートサイズ : 771 bp

タグ : EGFP タグ

耐性遺伝子 : kanamycin; Kan

制限酵素サイト : EcoRI、Sall

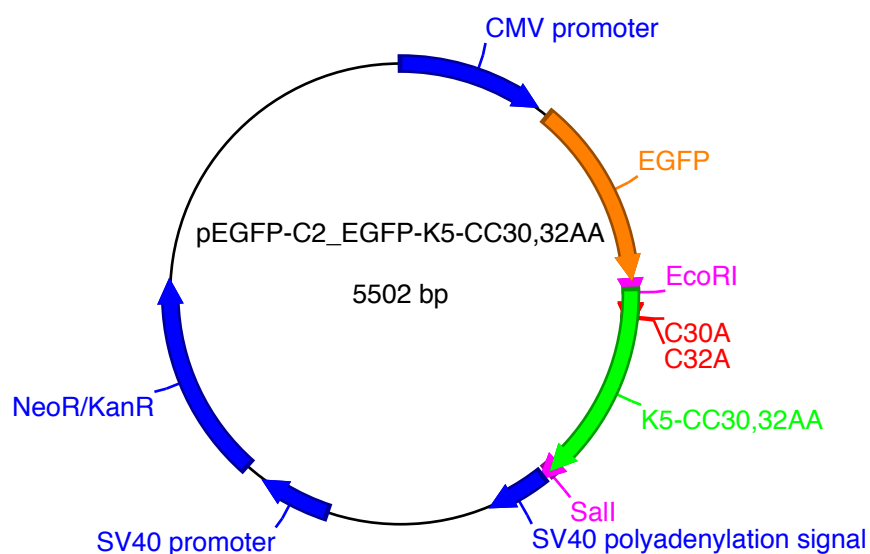


Fig. Sup. 11. EGFP-K5-CC30, 32AA の発現プラスミドの模式図

プラスミド名 : pEGFP-C2_EGFP-K5-CC30, 32AA

略名 : EGFP-K5-CC30, 32AA

全長 : 5502bp

インサートサイズ : 771 bp

変異箇所 : C30、C32 を A に変異 (5'-tgc-3'、5'-tgt-3'をそれぞれ 5'-gcc-3'、5'-gct-3'に変異させた。)

タグ : EGFP タグ

耐性遺伝子 : kanamycin; Kan

制限酵素サイト : EcoRI、Sall

図中の C はシステインを示している。

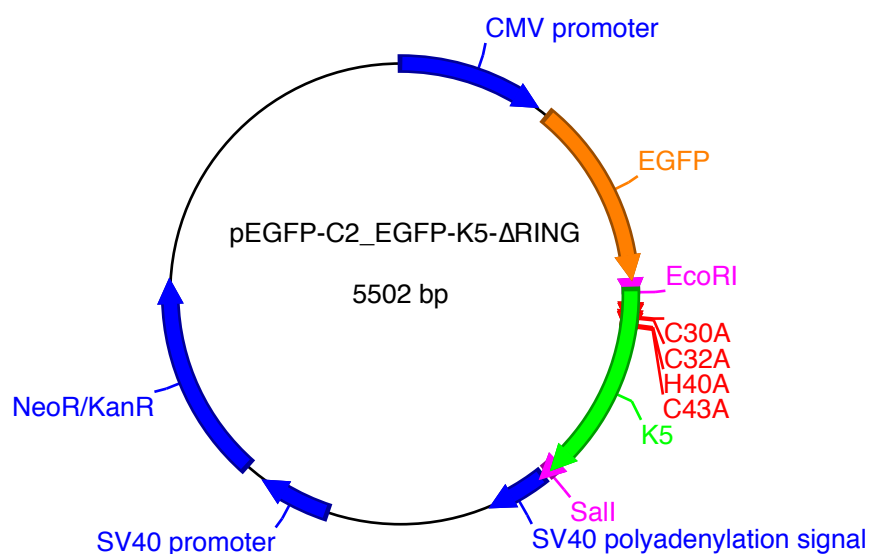


Fig. Sup. 12. K5-ΔRING の発現プラスミドの模式図

プラスミド名 : pEGFP-C2_EGFP-K5-ΔRING

略名 : EGFP-K5-ΔRING

全長 : 5502bp

インサートサイズ : 771 bp

変異箇所 : C30、C32、H40、C43 を A に変異 (5'-tgc-3'、5'-tgt-3'、5'-cac-3'、5'-tgt-3'をそれぞれ 5'-gcc-3'、5'-gct-3'、5'-gcc-3'、5'-gct-3'に変異させた。)

タグ : EGFP タグ

耐性遺伝子 : kanamycin; Kan

制限酵素サイト : EcoRI、Sall

図中の H はヒスチジンを示している。

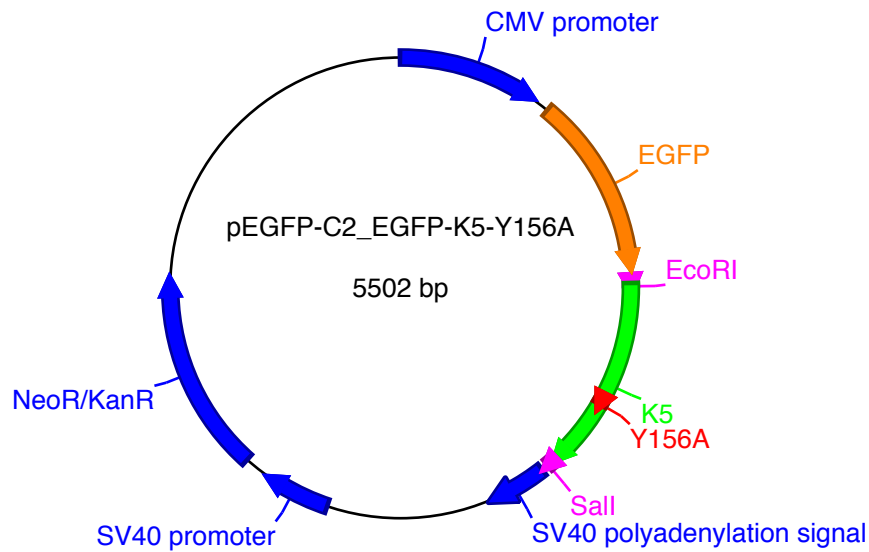


Fig. Sup. 13. EGFP-K5-Y156A の発現プラスミドの模式図

プラスミド名 : pEGFP-C2_EGFP-K5-Y156A

略名 : EGFP-K5-Y156A

全長 : 5502bp

インサートサイズ : 771 bp

変異箇所 : Y156 を A に変異 (5'-tac-3'をそれぞれ 5'-gcc-3'に変異させた。)

タグ : EGFP タグ

耐性遺伝子 : kanamycin; Kan

制限酵素サイト : EcoRI、Sall

図中の Y はチロシンを示している。