

網膜芽細胞腫蛋白質における 73 kDa 熱ショック蛋白質会合部位の 同定と分子会合の機能的意義の解析

曾ヶ端 克 哉

札幌医科大学救急集中治療部 (主任 金子正光 教授)

鳥 越 俊 彦 佐 藤 昇 志

札幌医科大学病理学第1講座 (主任 菊地浩吉 教授)

The interaction between 73 kDa heat shock protein (HSC73) and
retinoblastoma protein (pRb). —The identification of the binding region of
pRb and the function of HSC73—

Katsuya SOGAHATA

Department of Traumatology and Critical Care Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine
(Chief : Prof. M. KANEKO)

Toshihiko TORIGOE, Noriyuki SATO

Department of Pathology (Section 1), Sapporo Medical University School of Medicine
(Chief : Prof. K. KIKUCHI)

ABSTRACT Retinoblastoma protein (pRb) interacts with transcriptional factors and, particularly, dephosphorylated pRb functions as a negative regulator of cell cycle. We have previously demonstrated that dephosphorylated pRb was associated with 73 kDa heat shock cognate protein (HSC73) in certain tumor cell lines. In this experiment, we analyzed the interaction between these two proteins *in vitro* and determined the HSC73-binding region of pRb by using GST-deletion mutant pRb fusion proteins and synthetic peptides corresponding to the amino acid sequence of pRb. Our data showed that HSC73 interacted directly with a novel region which was located in N-terminal 328-340 amino acid residues outside the pocket region of pRb. Furthermore, we analyzed the function of HSC73 in its interaction with pRb *in vitro*. The analysis using native polyacrylamide gel electrophoresis indicated that the HSC73 could confer the conformational change on pRb, and might protect the aggregation. Dephosphorylated pRb, but not phosphorylated pRb was degraded by the liver-derived cytosolic extract when the interaction with HSC73 was blocked by the synthetic peptide. These data suggest that HSC73 acts as the molecular chaperone selectively for the dephosphorylated pRb, thereby potentiating the pRb function as the inhibitory regulator of cell cycle and, further, cell proliferation.

(Received January 13, 1996 and accepted February 3, 1996)

Key words : Heat shock protein, Cell cycle, Retinoblastoma protein

1 諸 言

熱ショック蛋白質 (Heat Shock Protein, HSP) は、細胞に熱ショックのようなストレスが加わった時に発

現が高まる一群の蛋白質である。HSP の多くは非ストレス下においても恒常的に発現しており、そのなかでも約 73 kDa の分子量をもつ Heat Shock Cognate Protein, HSC73 は、細胞の中でさまざまなペプチドや

蛋白質と会合し、その高次構造形成や細胞内輸送を介助する、分子シャペロンと呼ばれる蛋白質の1つである。細胞内蛋白質の高次構造に変化をもたらすようなストレス下では、HSC73は蛋白質と会合してその変性や凝集を防ぐ働きをしている。

一般に、細胞にストレスが加えられると細胞の増殖は抑制される。また、細胞にHSPを過剰発現させると細胞の増殖速度が低下する傾向が観察される。これらの事実は、熱ショック蛋白質が細胞増殖制御機構と密接な関わりを持っていることを示唆している。

真核細胞の増殖過程は、DNA複製期(S期)、細胞分裂期(M期)とこれらをはさむ2つの間欠期(G1期、G2期)を1サイクルとする細胞周期から成る。細胞周期の進行は、サイクリンに依存して活性化する蛋白質キナーゼ(cdks)の活性とその基質である癌抑制遺伝子産物のひとつ、網膜芽細胞腫蛋白質(pRb)のリン酸化の状態によって制御されている。これまで、HSC73が細胞周期の抑制にはたらくp53と会合してその半減期を延長していること¹⁾が知られ、我々は、細胞内でHSC73がpRbと会合していることを見出した²⁾。また、HSP90がサイクリン依存性蛋白質キナーゼ(cdks)と会合してそれらを安定化していることなどが報告され³⁾、我々もまた、肺癌由来のHSP90が23kDaと会合しcdksの活性抑制に働いていることを発表した(1996日本免疫学会総会)。このようにして、HSPと細胞周期制御機構との関わりが分子レベルで明らかになりつつある。

pRbと細胞周期に関しては、脱リン酸化型pRbは細胞周期の進行に重要な遺伝子転写調節因子E2Fと会合し、その活性を阻害することによって細胞周期の進行を抑制する働きをしている⁴⁾。pRbがcdksによってリン酸化を受けると、pRbはE2Fから解離し、E2Fを抑制から解除する結果、細胞周期は進行する^{5,6)}。DNA腫瘍ウイルスの癌遺伝子産物であるアデノウイルスE1A蛋白質、SV40 large T抗原、パピローマウイルスE7蛋白質は、ポケット領域と呼ばれるE2Fとの会合部位においてpRbと直接会合し^{7,8,9)}、pRbとE2Fとの会合を競合的に阻害する結果、pRbの細胞周期抑制作用を無効にしていることが知られている^{10,11,12,13)}。これまで我々は、精製蛋白質を用いたin vitroの実験によって、(a)HSC73はpRbと直接的に会合すること¹⁾、(b)HSC73と会合するのは、脱リン酸化型pRbであること、(c)HSC73との分子会合は、ポケット領域を介するE1A蛋白質との分子会合には影響を与えないこと、(d)ATP存在下では、HSC73はpRbから解離すること、などを

明らかにしてきた¹⁴⁾。今回、pRbの部分欠失変異蛋白質と合成ペプチドとを用いて、pRbにおけるHSC73会合部位を同定した。さらに、pRb蛋白質の高次構造や安定性に着目して、HSC73との分子会合にどのような機能的意義があるのかを解析した。これらの実験結果をもとに、細胞周期制御機構、ひいては細胞増殖機序における熱ショック蛋白質の役割について考察する。

2 実験材料と方法

2.1 精製蛋白質と抗体

ウシの脳組織から精製されたHSC73蛋白質はStress-Gen (Victoria, BC, Canada) から購入した。バキュロウイルスシステムによって産生され、生化学的に精製されたpRb蛋白質は田矢博士(国立癌センター研究所)から供与された¹⁴⁾。抗pRb抗体Mh-Rb-02P(mouse IgG1)はPharmingen (San Diego, CA, USA) から購入した。この抗体はpRbのN末端から300-380番目のアミノ酸領域を認識する。抗HSP70抗体3a3(mouse IgG1)はAffinity Bioreagents (Neshanic Station, NJ, USA) から購入した。

2.2 GST-pRb融合蛋白質の作製

網膜芽細胞腫遺伝子cDNAを含むプラスミドp4.95BTはDr. T. P. Dryja (Harvard Medical School, USA) から供与された。pRbのアミノ酸1-300の領域をコードするEcoRIフラグメントとアミノ酸301-514の領域をコードするEcoRI/NcoIフラグメントは、それぞれpGEX-2T (Pharmacia Biotech Inc., USA) に由来するGlutathione-S-transferase (GST) 発現ベクターpGTにin frameで挿入された。pRbのアミノ酸373-928の領域をコードするGST融合蛋白質発現ベクターは日本ロシュ研究所松七五三仁博士より供与された。GST融合蛋白質はSmithらの方法^{15,16)}により大腸菌AD202(千葉大学斉藤隆博士より供与)に発現させ、精製された。すなわち、トランスフォームした大腸菌を50 µg/ml Ampicillin添加500 ml Luria-Bertani培地で37°C、5時間培養した。0.1 mM isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (Life Technologies, Inc, USA) を添加し、さらに2時間培養した。大腸菌を8000 xgで20分間遠心分離した後、40 mlのsonication buffer [100 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM EDTA, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mg/ml lysozyme] に再浮遊し、大腸菌を超音波によって破碎した。10000 xgで15分間遠心分離し、その上清を回収した。上清1 mlにつき25 µlのglutathione-sepharose beads (Phar-

macia Biotech, Inc.)を加え, 4°C, 3時間インキュベートした後, beadsをPBSで3回洗浄した。

2・3 ペプチドの合成

pRb蛋白質のアミノ酸297-309, 310-327, 328-340, 341-356, 357-371の各配列に相当するペプチドは, それぞれ431A Peptide Synthesizer (Applied Biosystems)によって合成され, High Performance Liquid Chromatography (HPLC)を用いて精製された。合成されたペプチドのアミノ酸配列は, 477A Protein Sequencer (Applied Biosystems)によって確認され, それぞれCFIP, NGLP, CNKD, KTLQ, PRKSと名付けられた(Fig. 3)。p53蛋白質のHSC73結合部位として知られている17-30番目の領域に相当するペプチド(ETFSGLWKLPPED)も同様にして合成され, ETFSと名付けられた。合成ペプチドは20mMの濃度となるよう50%Dimethylsulfoxide (DMSO)を含むPBSに溶解した。

2・4 GST-pRb 融合蛋白質と HSC73 の in vitro 会合実験

20 μ l の Glutathione Beads と結合した GST-pRb 融合蛋白質約 1 μ g を, 45 ml の binding buffer [25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 3 mM DTT] の下で, 2 μ g の精製 HSC73 と 37°C, 1時間インキュベートした。野生型 pRb 蛋白質と HSC73 の会合実験においては, 1 μ g の精製 pRb 蛋白質と 2 μ g の精製 HSC73 蛋白質とを同様にインキュベートし, Affigel 10Beads (BioRad, USA) に固相化した抗 pRb 抗体で免疫沈降した。beads は washing buffer [0.2 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 M NaCl, 0.1%CHAPS] で3回洗浄した後, SDS sample buffer [final 75 mM Tris-HCl (pH 6.8), 5%0.1 ME, 2%SDS, 0.1% bromophenol blue (BPB), 10%glycerol] とともに5分間煮沸し, その上清を8%SDS-PAGEで分離した。HSC73はWestern blottingによって検出された。合成ペプチドを用いた会合阻害実験では, インキュベートの前に最終濃度が2mMとなるようそれぞれの合成ペプチドを反応液中に加えた。

2・5 Western blotting

polyacrylamide gel を用いて電気泳動, 分離された試料は, Trans-blot SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad, USA) を用いて methanol で前処理された Immobilon membrane (Millipore, Bedford, MA, USA) へ転写した。転写膜を室温の10%skim milk-PBSに2時間浸してブロッキング処理した後, 適量希釈した抗 HSP70 抗体または抗 pRb 抗体を90分間反応

させた。0.1%Tween 20-PBSで2回洗浄した後, さらに1000倍希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc., USA) を30分間反応させた。シグナルは ECL detection reagent (RPN 2105, Amersham, US) を用いて発光させ, X-ray フィルム (Konica medical film) に感光させて検出した。

2・6 Native PAGE analysis

10 mM glutathion によって glutathion-sepharose beads から分離精製した GST-pRb301-514 融合蛋白質 1 μ g に 15 μ l の binding buffer [25 mM Tris-HCl (pH 7.15), 20 mM Hepes, 47.5 mM KCl, 22.5 mM Mg (O₂CCH₃)₂] を加え, 1 μ g の精製 HSC73 または bovine serum albumin (BSA) と室温で2時間インキュベートした後, sample buffer [final 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.1%BPB, 10%glycerol] を加えて6% polyacrylamide gel にロードした。GST-pRb301-514 融合蛋白質は Western blotting によって検出した。

2・7 ラット肝臓からの細胞質抽出物 Fraction 2 の精製

Hershko らの方法¹⁷⁾ によって, プロテアゾーム系の蛋白質分解酵素に富んだ細胞質抽出物 Fraction 2 をラットの肝臓から精製した。すなわち, WKA Rat の肝臓 8g をホモゲナイズして buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM DTT, 0.1 mM soybean trypsin inhibitor, 1.0 mM PMSF, 1 mM ATP] に suspend し, 4°Cで6000 xg, 30分間遠心した。その上清をさらに4°Cで70000 xg, 2時間遠心して上清を回収した。これを equilibration buffer [3 mM potassium phosphate (pH 7.0), 1 mM DTT] で飽和させたイオン交換樹脂 DEAE-Cellulose (DE52, Whatman, England) カラムに apply し, equilibration buffer と washing buffer [3 mM potassium phosphate (pH 7.0), 1 mM DTT, 20 mM KCl] で洗浄した後, elution buffer [0.5 M KCl, 20 mM Tris (pH 7.2), 1 mM DTT] によって溶出される分画 Fraction 2 を得た。これに90%飽和となるよう硫酸アンモニウムを加え, 析出した蛋白質を遠心分離して回収した。得られた pellet は buffer [50 mM Tris (pH 7.5), 2 mM DTT, 1 mM ATP, 20% Glycerol] に溶解して-20°Cに保存し, プロテアゾームのソースとして用いた。

2・8 degradation assay

バキュロウイルスシステムから精製された pRb 蛋白質 1 μ g と 20 μ l の細胞質抽出物 Fraction 2 とを, 30 μ l の degradation buffer [25 mM Tris (pH 7.15),

20 mM Hepes, 47.5 mM KCl, 22.5 mM Mg (O₂ CCH₃)₂] の下で 37°C, 3 時間インキュベートし, 8% SDS-PAGE によって分離した後, Western blotting によって pRb を検出した。

3 実験結果

3.1 GST-欠失変異 pRb 融合蛋白質と HSC73 との分子会合

HSC73 が Rb 蛋白質のどの部位に会合するのかを確認するために, GST-pRb 融合蛋白質を作成し, HSC73 との分子会合を検討した。本実験で作成された欠失変異 pRb 蛋白質の構造は Fig. 1 に示す。glutathion-sepharose beads に結合したそれぞれの GST 融合蛋白質を, 精製 HSC73 とともにインキュベートし, 8% SDS-polyacrylamide gel で電気泳動した後, Western blotting により HSC73 を検出した。

アミノ酸 373-928 のポケット領域を含んだ GST-pRb 融合蛋白質や N 末端側 1-300 の GST-pRb 融合蛋白質は HSC73 と会合しなかったが, ポケット領域よりも N 末端側にあるアミノ酸 301-514 の領域を含む GST 融合蛋白質は, 野性型 pRb と同様に HSC73 と会合した (Fig. 2)。以上の結果から, HSC73 は pRb のアミノ酸 301-371 の領域に会合することが判明した。

3.2 合成ペプチドによる GST-pRb301-514 融合蛋白質と HSC73 との会合阻害

Rb 蛋白質のアミノ酸 301-372 の領域における HSC73 会合部位をさらに特定するため, この領域をすべてカバーする 13-17 アミノ酸残基から成る 5 種類の合成ペプチドを作製し (Fig. 3), これらのペプチドが GST-pRb 301-514 融合蛋白質と HSC73 との会合を競合的に阻害するかどうか検討した。p 53 のアミノ酸 17-30 の領域に相当するペプチド ETFS は, HSC73 と直接会合して, p 53 蛋白質と HSC73 との会合を阻害することが知られているので陽性対照として実験に用いた。glutathion-sepharose beads に結合した 1 mg の GST-pRb 301-514 融合蛋白質を, 1 mg の HSC73 と 2 mM の各ペプチドとともにインキュベートし, 8% SDS-polyacrylamide gel で電気泳動した後, Western blotting により HSC73 を検出した。その結果, ETFS ペプチドと CNKD ペプチド (Fig. 3 参照) は HSC73 の会合を阻害したが, NGLP, KTLQ, PRKS, CFIP の各ペプチド (Fig. 3 参照) は, HSC73 の会合にほとんど影響しなかった (Fig. 4)。すなわち, GST-pRb 融合蛋白質と HSC73 との会合は, pRb のアミノ酸 328-340 に相当する合成ペプチドによって選択的に阻害されることが

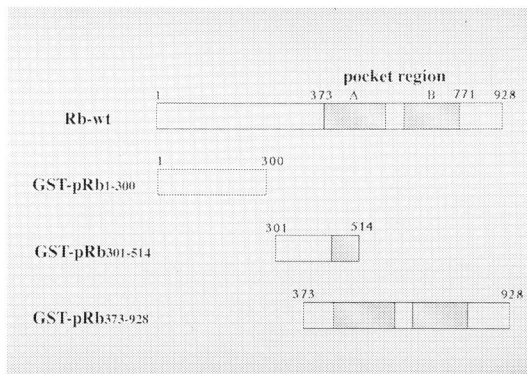


Fig. 1 Summary of GST-pRb deletion constructs. So called pocket regions (residues 373-579 and 640-771) are indicated by the shadow box.

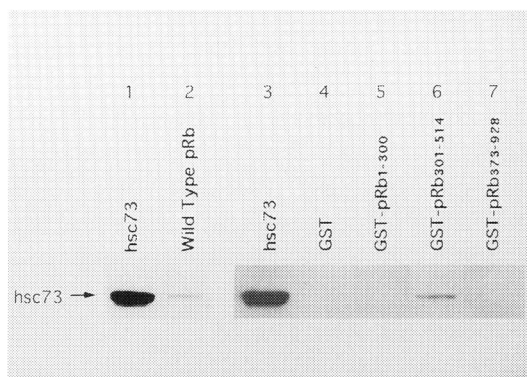


Fig. 2 HSC73 directly binds to a region N-terminal to the pocket in pRb.

Four different recombinant fusion proteins (lane 4-7) conjugated with glutathione-sepharose beads were incubated with HSC73. In lane 2, purified wild type pRb was incubated with HSC73, and was immunoprecipitated with anti-pRb mAb-conjugated beads. Then the beads were washed and run on 8% SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-HSP70 mAb. In lane 1 and 3, 1 ug purified HSC73 were run on the SDS-PAGE.

示され, この領域が HSC73 の会合部位であると推定された。

さらに, CNKD ペプチドが競合的に阻害しているのかどうかを確認するために, ペプチドの濃度を変化させて同様な実験を行った。その結果, CNKD ペプチドの濃度に依存して, GST-pRb 融合蛋白質と会合する HSC73 のレベルが低下することが示された (Fig. 5)。

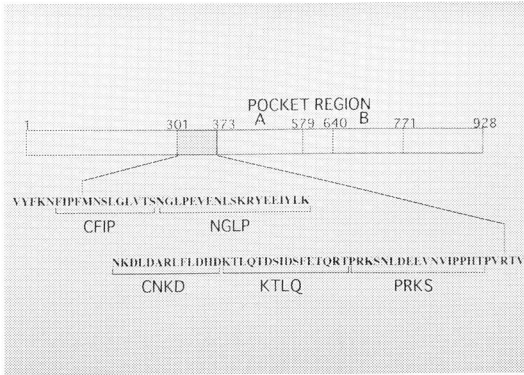


Fig. 3 Summary of the amino acid sequences of the synthetic peptides. Five different peptides were derived from the amino acid sequence of residues 301-373 in pRb.

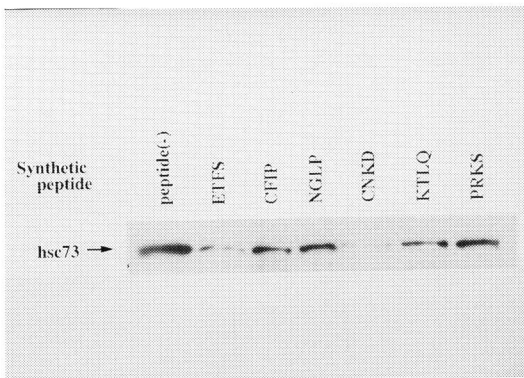


Fig. 4 Inhibition of the HSC73-binding to the GST-pRb fusion protein by the synthetic peptides ETFS and CNKD. GST-pRb (301-514) fusion protein conjugated with beads was incubated with HSC73 in the presence of various synthetic peptides as indicated. Then the beads were washed and run on 8% SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-HSP70 mAb.

3.3 Native PAGE による GST-pRb 融合蛋白質の高次構造の解析

HSC73 が pRb 蛋白質の高次構造に対してどのような影響を与えているのかを検討した。GST-pRb 301-514 融合蛋白質を、HSC73 の存在下または非存在下で、6% Native-polyacryl-amide gel にロードし、電気泳動した後、Western blotting により抗 Rb 抗体を用いて GST-pRb 融合蛋白質を検出した。その結果、HSC73 とともにインキュベートした場合においてのみ、

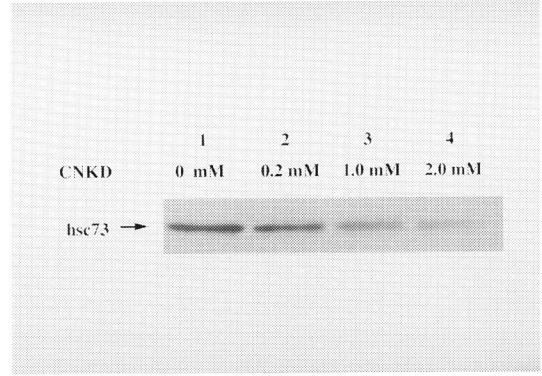


Fig. 5 Concentration-dependent inhibition of the HSC73-binding to the GST-pRb fusion protein by the synthetic peptide CNKD. GST-pRb (301-514) fusion protein conjugated with beads was incubated with HSC73 in the presence of various concentration of CNKD peptide as indicated. Then the beads were washed and run on 8% SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-HSP70 mAb.

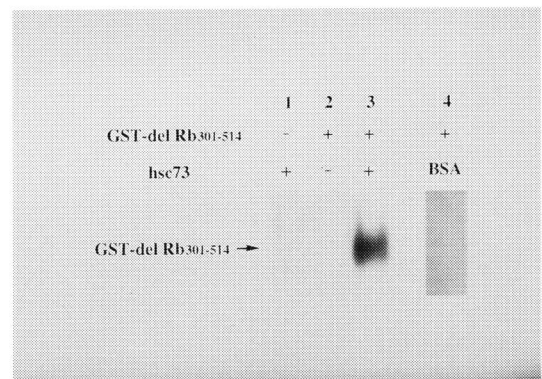


Fig. 6 GST-pRb fusion protein is detected by the native PAGE analysis when it was incubated with HSC73, but not with BSA. GST-pRb (301-514) fusion protein was incubated with HSC73 (lane 3) or BSA (lane 4) followed by 6% native PAGE and immunoblotting with anti-pRb mAb. In lane 1 and 2, HSC73 or GST-pRb fusion protein alone was run on the native PAGE, respectively.

GST-pRb 融合蛋白質を検出することができた。BSA とインキュベートしても検出されないことから、HSC73 に特異的な作用であると考えられた (Fig. 6)。ロードした GST-pRb 融合蛋白質が検出できないのは、蛋白質が凝集して分離ゲル内に泳動されないためであると推察された。

3.4 pRb 蛋白質の細胞質抽出物 Fraction 2 による分解

細胞内の変性蛋白質の多くは、プロテアゾーム系によって分解を受けることが知られている。我々は、HSC73 と会合していない脱リン酸化型 pRb は、高次構造の変化した変性蛋白質としてプロテアゾーム系によって分解を受けるのではないかと推測し、実験を行った。まず、ラットの肝組織から細胞質抽出物を得、イオン交換クロマトグラフィーによって Fraction 2 を精製した。この Fraction 2 は、プロテアゾームが豊富な分画であることが知られている。しかし、Fraction 2 には HSC73 も含まれているため、pRb と HSC73 との会合を、HSC73 結合領域に相当する合成ペプチド CNKD によって競合阻害した。精製 pRb と Fraction 2 とをインキュベートしても、pRb に変化は見られなかったが、CNKD ペプチド存在下でインキュベートすると、脱リン酸化型 pRb のレベルが顕著に減少した。それに対して、リン酸化型 pRb のレベルに有意な変化は認められなかった。CNKD ペプチドは 50% DMSO を溶媒としていたが、DMSO のみでは変化は見られないことから、CNKD ペプチドに特異的な作用であると考えられた (Fig. 7)。この結果から、脱リン酸化型 pRb はプロテアゾームによる分解を受けやすく、HSC73 はそれを保護していることが示唆された。

4 考 察

網膜芽細胞腫 (Retinoblastoma, Rb) に欠失している癌抑制遺伝子として見出された Rb 遺伝子は、分子量約 110 kDa の核内蛋白質 pRb をコードする。pRb は細胞周期の進行に中心的な役割を果たすリン酸化蛋白質である。特に、cdk/サイクリン複合体による pRb のリン酸化は、G1 期から S 期への移行に必須であり、様々な細胞増殖開始シグナルの集約点となっている。逆に、M 期後期から G1 期にかけて、pRb は脱リン酸化され、E2F のような細胞増殖に重要な遺伝子転写調節因子と会合して、その活性を抑制する^{6,18,19}。細胞増殖を抑制するシグナルの多くは、pRb の脱リン酸化を促進し、pRb のリン酸化を抑制することによって、細胞周期を G1 期に停止させる。

G1 期停止は細胞分化の門戸であり、pRb の機能が阻害されると G2 期の停止が起こらないため、細胞の分化が障害され、無制限に増殖を続けるようになることが知られている。アデノウイルス、パピローマウイルスなどの DNA 腫瘍ウイルスの癌遺伝子産物 E1A 蛋白質、E7 蛋白質は、pRb と直接会合して pRb と E2F の会合

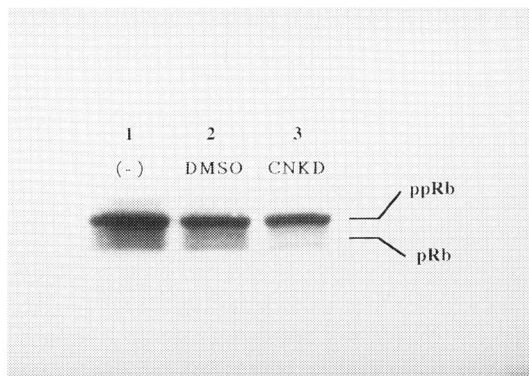


Fig. 7 Dephosphorylated pRb is degraded by the cytosolic extract fraction 2 when incubated with CNKD peptide.

Purified pRb was incubated with the rat liver-derived cytosolic extract fraction 2 in the absence (lane 1) or presence of dimethylsulfoxide (DMSO, lane 2) or CNKD peptide (lane 3). Then the proteins were run on 8% SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-pRb mAb. Faster migrating form represents the dephosphorylated pRb (indicated as pRb), whereas slower migrating form represents the hyper-phosphorylated pRb (indicated as ppRb).

を阻害する結果、細胞の癌化に働く。また、G1 期は DNA 複製前のチェックポイントとしても重要であり、遺伝子に変化をもたらすようなストレスが加わると、細胞周期の進行は一時的に停止し、DNA の修復が行われる。

我々の実験結果は、ストレスが細胞周期を抑制する分子機構に、熱ショック蛋白質 HSC73 が関わっていることを強く示唆している。HSC73 は、分子シャペロンとして細胞内で様々な蛋白質と会合し、その高次構造の形成や細胞内輸送を介助している。HSC73 は、通常細胞質に多く発現しているが、細胞にストレスが加わると核内に移行する。我々は、その核内標的分子の 1 つが pRb であることを明らかにした^{3,14}。

pRb における HSC73 の会合部位を同定した結果、ポケット領域よりも N 末端側のアミノ酸 328-340 の領域であることが判明した。このことは、HSC73 が pRb のポケット領域を介する E1A 蛋白質との会合には影響しないというこれまでの実験結果と一致している¹⁴。この領域のアミノ酸配列は疎水性残基に富んだ領域で、HSP70 ファミリーの 1 つである BiP の結合モチーフに類似した構造を有していた (Fig. 8)。同様なモチーフは、p53 蛋白質の HSC73 結合領域にも見出されてい

た。一方、3D10 抗体では逆に 3-*O*-Ac GM3 の方がやや反応性が高かった。

3・4 LILA

M2590 抗体を用いて行った LILA の結果を Fig. 7 に示す。3-*O*-Ac GM3 と GM3 を単独で抗原に用いた場合のリポソームの崩壊が起こり始める閾値を比較すると、6 mol% (総脂質に対するガングリオシドの percentage) で GM3 は 20% 近くの崩壊が生じているのに対し、3-*O*-Ac GM3 では崩壊が生じておらず、GM3 の方が閾値が低かった。6 mol% と 8 mol% での両者の崩壊量を比較すると、どちらの濃度においても GM3 の方が有意に多かった ($p < 0.01$)。また、リポソームの崩壊量の最大値を比較すると、3-*O*-Ac GM3 が 45% 程度であるのに対して GM3 では 50% 前後であり、GM3 の方が幾分高値を示した ($p < 0.1$)。

3-*O*-Ac GM3 と GM3 をそれぞれ 65:35, 50:50, 35:65 の比 (mol: mol) に混合したものを抗原として用いた場合、この 3 種類を比較すると閾値、最大崩壊量ともにほぼ同じ値であり、これらの混合比による差は認めなかった。しかし、3-*O*-Ac GM3 と GM3 を単独で用いた場合と比べると、閾値は GM3 単独のときとほぼ同様であるのに対して最大崩壊量は 43% から 45% であり、3-*O*-Ac GM3 単独のときとほぼ同様の値を示し

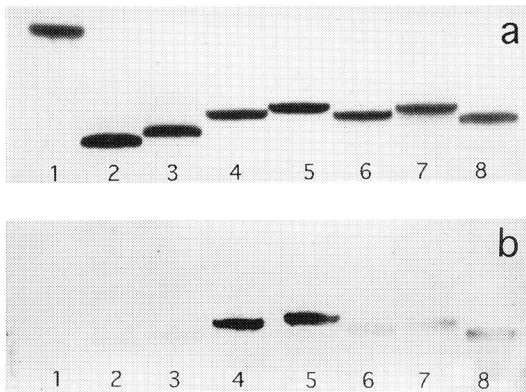


Fig. 5 TLC-immunostaining of various glycolipids with mAb 3D10. (a) Glycolipids (2.5 nmol/lane) were chromatographed with chloroform/methanol/water (60/40/9, v/v/v) and visualized with orcinol- H_2SO_4 . Lane 1: LacCer, lane 2: GM1 (NeuAc), lane 3: GM2 (NeuAc), lane 4: GM3 (NeuAc), lane 5: 3-*O*-Ac GM (NeuAc), lane 6: GM3 (NeuGc), lane 7: 3-*O*-Ac GM3 (NeuGc), lane 8: GD3 (NeuAc). (b) The same glycolipids (total 1 nmol/lane) were chromatographed similarly and immunostained with 3D10.

た。

3・5 マウスにおける 3-*O*-Ac GM3, GM3 の免疫原性

3-*O*-Ac GM3, GM3 または 3-*O*-Ac GM3 と GM3 の混合物 (35:65, mol: mol) で免疫した C3H/HeN マウスの 3-*O*-Ac GM3 と GM3 に対する血清の抗体価を ELISA 法で定量した。IgM 抗体価の結果を Fig. 8 に示す。GM3 免疫群では抗 GM3 抗体価の軽度の上昇を認めたが、抗 3-*O*-Ac GM3 抗体価は 0.025 (A 490 nm) を下回る極めて低い値だった。一方、3-*O*-Ac GM3 免疫群、3-*O*-Ac GM3・GM3 混合物免疫群では抗 3-*O*-Ac GM3 抗体価、抗 GM3 抗体価ともに 0.025 (A 490 nm) 以下であり、極めて低い値であった。なお、いずれの免疫原においても IgG 抗体価の上昇は

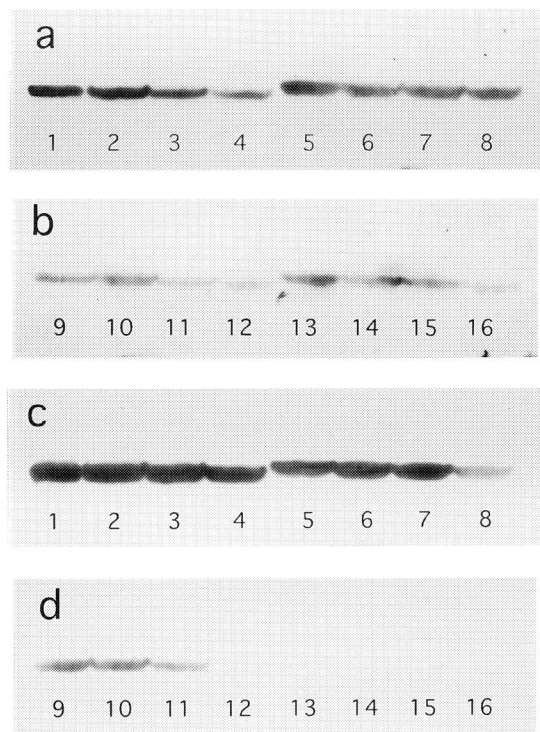


Fig. 6 TLC-immunostaining of 3-*O*-Ac GM3 (NeuAc) and GM3 (NeuAc) with 3D10. Various concentrations of the gangliosides were chromatographed at Lanes 1-4 and 9-12 for GM3 (NeuAc) and Lanes 5-8 and 13-16 for 3-*O*-Ac GM3 (NeuAc) with chloroform/methanol/water (60/40/9, v/v/v) and immunostained with 3D10 (a, b) and M2590 (c, d). Ganglioside was applied at Lanes 1 and 5 with 2.5 nmol; 2 and 6, 1.5 nmol; 3 and 7, 1.0 nmol; 4 and 8, 0.5 nmol; 9 and 13, 0.25 nmol; 10 and 14, 0.15 nmol; 11 and 15, 0.1 nmol; 12 and 16, 0.05 nmol, respectively.

型 pRb を安定化していることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり御指導と御校閲を頂いた本学病理学第1講座 菊地浩吉教授ならびに貴重な研究の機会を与えて頂いた本学救急集中治療部 金子正光教授に深謝致します。また、本研究に御協力頂いた国立がんセンター研究所 田矢洋一博士、日本ロシユ研究所・生物部 松七五三仁博士ならびに尻尻臨海研究所 佐原弘益博士に深謝いたします。

参 考 文 献

1. Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* 1988, 8: 531-539.
2. Nihei T, Takahashi S, Sagae S, Sato N, Kikuchi K. Protein interaction of Retinoblastoma gene product pRb110 with Mr 73,000 heat shock cognate protein. *Cancer Res* 1993, 53: 1702-1705.
3. Stepanova L, Leng X, Parker SB, Harper JW. Mammalian p50^{cdc37} is a protein kinase targeting subunit of Hsp90 that binds and stabilizes Cdk4. *Genes Dev* 1996, 10: 1491-1502.
4. Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. The E2F transcription factor is a cellular target for the Rb protein. *Cell* 1991, 65: 1053-1061.
5. Buchkovich K, Duffy LA, Harlow E. The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* 1989, 58: 1097-1105.
6. Nevins JR. E2F: A link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 1992, 258: 424-429.
7. Hu Q, Dyson N, Harlow E. The region of the retinoblastoma protein needed for binding to adenovirus E1A or SV40 large T antigen are common sites for mutations. *EMBO J* 1990, 9: 1147-1155.
8. Huang S, Wang NP, Tseng BY, Lee WH, Lee EH. Two distinct and frequently mutated regions of retinoblastoma protein are required for binding to SV40 T antigen. *EMBO J* 1990, 9: 1815-1822.
9. Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushima H, Kato J, Livingston DM. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 1993, 73: 487-497.
10. DeCaprio JA, Ludlow JW, Figge J, Shew JY, Huang CM, Lee WH, Marsilio E, Paucha E, Livingston DM. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility Gene. *Cell* 1988, 54: 275-283.
11. Ludlow JW, DeCaprio JA, Huang CM, Lee WH, Paucha E, Livingston DM. SV40 large T antigen binds preferentially to an underphosphorylated member of the retinoblastoma susceptibility gene product family. *Cell* 1989, 56: 57-65.
12. DeCaprio JA, Ludlow JW, Lynch D, Furukawa Y, Griffin J, Piwnica-Worms H, Huang CM, Livingston DM. The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell* 1989, 58: 1085-1095.
13. Kaelin WG Jr, Ewen ME, Livingston DM. Definition of the minimal Simian Virus 40 large T antigen- and adenovirus E1A-binding domain in the retinoblastoma gene product. *Mol Cell Biol* 1990, 10: 3761-3769.
14. Inoue A, Torigoe T, Sogahata K, Kamiguchi K, Takahashi S, Sawada Y, Saijo M, Taya Y, Sato N, Kikuchi K. 70 kDa heat shock protein directly interacts with N-terminal region of the retinoblastoma gene product pRb-Identification of a novel region of pRb mediating protein interaction. *J Biol Chem* 1995, 270: 22571-22576.
15. Smith DB, Davern KM, Board PG, Tiu WU, Garcia EG, Mitche GF. Mr 26000 antigen of *Schistosoma japonicum* recognized by resistant WEHI 129/J mice is a parasite glutathione S-transferase. *Pro Natl Acad Sci* 1986, 83: 8703-8707.
16. Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as function with glutathione S-transferase. *Gene* 1988, 67: 31-40.
17. Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A. Components of Ubiquitin-Protein ligase system. *J Biol Chem* 1983, 258: 8206-8214.
18. William G, Kaelin WG Jr, Pallas DC, DeCaprio JA, Kaye FJ, Livingston DM. Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retinoblastoma gene product. *Cell* 1991, 64: 521-532.
19. Hiebert SW. Regions of the retinoblastoma gene product required for its interaction with the E2F transcription factor are necessary for E2 promoter

- repression and pRb-mediated growth suppression. *Mol Cell Biol* 1993, 13: 3384-3391.
20. Blond-Elguindi S, Cwirla SE, Dower WJ, Lipshutz RJ, Sprang SR, Sambrook JF, Gething MH. Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell* 1993, 75: 717-728.
21. Chen ZJ, Hagler J, Palombella VJ, Melandri F, Scherer D, Ballard D, Maniatis T. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I κ B α to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 1995, 9: 1586-1597.
22. Jariel-Encontre I, Pariat M, Martin F, Carillo S, Salvat C, Piechaczyk M. Ubiquitinylation is not an absolute requirement for degradation of c-Jun protein by the 26S proteasome. *J Biol Chem* 1995, 270: 11623-11627.
23. An B, Dou QP. Cleavage of retinoblastoma protein during apoptosis: an interleukin 1 β -converting enzyme-like protease as candidate. *Cancer Res* 1996, 56: 438-442.
24. Chen CF, Chen Y, Dai K, Chen PL, Riley DJ, Lee WH. A new member of the hsp90 family of molecular chaperones interacts with the retinoblastoma protein during mitosis and after heat shock. *Mol Cell Biol* 1996, 16: 4691-4699.
25. Gething MJ, Blond-Elguindi S, Mori K, Sambrook JF. Structure, function, and regulation of the endoplasmic reticulum chaperone, BiP.: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C, editors. *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperone*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1994, 111-135.

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学医学部救急集中治療部 曾ヶ端克哉